

INSTYTUT AGROFIZYKI  
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Dominika Matczuk

**IZOLACJA INHIBITORÓW UROLIZY Z MATERIAŁU  
ROŚLINNEGO I/LUB ZWIERZĘCEGO LUB PRODUKTÓW  
ICH PRZETWARZANIA**

ISOLATION OF UROLYSIS INHIBITORS FROM PLANT AND/OR ANIMAL  
MATERIAL OR PRODUCTS OF THEIR USE

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotora: dr hab. Anny Siczek

Opiekuna pomocniczego: Tomasza Martyniuka

© Dominika Matczuk

Lublin 2023

## OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data..... Podpis promotora rozprawy.....

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data..... Podpis opiekuna pomocniczego rozprawy.....

## OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data..... Podpis autora rozprawy.....

*Pragnę wrazić serdeczne podziękowania wszystkim Osobom, które w trakcie wykonywania badań i pisania niniejszej rozprawy doktorskiej dzieliły się ze mną swoją wiedzą, doświadczeniem i okazywały mi niesamowite wsparcie.*

*Szczególne podziękowania składam Pani Promotor dr hab. Annie Siczek za nieocenioną pomoc na wszystkich etapach przygotowywania rozprawy doktorskiej, a także za ogrom zrozumienia i cierpliwości, którymi mnie obdarzyła.*

*Ogromne podziękowania dla moich Najbliższych, którzy nie przestają we mnie wierzyć i dodają mi wiatru w skrzydła.*

*Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję mojemu Mężowi i Synkowi, to dzięki Wam dotarłam do momentu, w którym mogę napisać te słowa.*

*Praca naukowa finansowana z budżetu  
Ministerstwa Edukacji i Nauki  
w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy”  
Projektu Nr DWD/3/51/2019.*

## Streszczenie

Nawożenie azotem jest kluczowym czynnikiem mającym wpływ zarówno na wydajność prowadzonej produkcji rolnej oraz jakość uzyskanego plonu. Nawozy mineralne są głównym źródłem azotu, a ich aplikacja na grunty orne przyczynia się do wzbogacenia gleb w składniki pokarmowe, które są niezbędne do prawidłowego wzrostu uprawianych roślin. Mocznik jest nawozem mineralnym, który zawiera azot w najwyższym stężeniu – 46%. Szacuje się, że udział nawozów mocznikowych w całkowitym, światowym zużyciu nawozów mineralnych przekracza 50%. Wykorzystanie nawozów mocznikowych do nawożenia pól uprawnych związane jest z niekorzystnym zjawiskiem emisji amoniaku z nawożonej gleby, która skutkuje nieefektywnym wykorzystaniem dostarczonej roślinom dawki azotu, a co za tym idzie zmniejszeniem efektywności ekonomicznej prowadzonych upraw. Dane szacunkowe dotyczące emisji amoniaku do atmosfery mówią o 60% poziomie strat N, który zależy od wielu czynników glebowych i klimatycznych.

Rozporządzenie NEC – Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2016/2284 z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie redukcji krajowych emisji niektórych rodzajów zanieczyszczeń atmosferycznych zmieniło dyrektywę 2003/35/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 26 maja 2003 r. i jednocześnie uchyliło dyrektywę 2001/81/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2001 r., co doprowadziło do ograniczenia możliwości stosowania na terenie Unii Europejskiej zarówno mocznika, jak i nawozów na nim opartych, w związku z poziomem emisji towarzyszących stosowaniu wspomnianych nawozów.

Grupa Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A., jako główny producent mocznika, musiała więc podjąć działania mające na celu ograniczenie emisji amoniaku do poziomu akceptowalnego w Rozporządzeniu NEC. Jednym ze sposobów wprowadzenia w życie wspomnianych wyżej zmian jest zastosowanie inhibitorów ureazy, które w połączeniu z nawozem dałyby gotowy produkt możliwy do zastosowania w rolnictwie. W związku z faktem, iż dotychczas nie poznano potencjalnie negatywnych konsekwencji wynikających z długotrwałego stosowania komercyjnie dostępnych inhibitorów ureazy, Grupa Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A. rozpoczęła prace nad poszukiwaniami substancji naturalnych, nieszkodliwych dla środowiska, których aplikacja razem z wytwarzanymi w Grupie Azoty produktami nawozowymi umożliwiłaby redukcję emisji amoniaku.

Pierwszy etap prac realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej obejmował selekcję surowców roślinnych, które zawierałyby w sobie substancje powodujące zahamowanie aktywności ureazy. Następnie, przeprowadzono 2 etapy badań laboratoryjnych, tj. badania

inkubacyjne oraz badania wazonowe. W obu wspomnianych doświadczeniach wykorzystano dwa typy gleby o zróżnicowanych właściwościach – glebę płową o składzie granulometrycznym gliny piaszczystej (pH 5,4) oraz glebę bielicową o składzie granulometrycznym piasku gliniastego (pH 7,4). W trakcie trwania obu eksperymentów utrzymywano stałą wilgotność podłoża odpowiadającą wartości siły ssącej gleby (pF) 1,9.

W 14-dniowym doświadczeniu inkubacyjnym zweryfikowano wpływ 6 ekstraktów roślinnych (otrzymanych z owoców trzech gatunków roślin: borówki, maliny oraz morwy czarnej w dwóch stężeniach, tj. 10% i 25%) na emisję amoniaku. Pomiar emisji amoniaku przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora GASMET DX 4040 działającego w oparciu o metodę spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Dawka nawozu mocznikowego (granulowany mocznik) zaaplikowana w doświadczeniu łącznie z badanymi ekstraktami roślinnymi wynosiła 240 kg N ha<sup>-1</sup>. Niemalże wszystkie badane ekstrakty roślinne spowodowały istotne obniżenie emisji NH<sub>3</sub>. Ponadto, eksperyment inkubacyjny dostarczył informacji na temat wpływu wspomnianych ekstraktów roślinnych na aktywność enzymu ureazy oraz zawartość różnych form azotu (ogólnego, azotanowego i amonowego) w glebie. Aktywność ureazy była zależna zarówno od typu gleby wykorzystanej do przeprowadzenia doświadczenia, rodzaju aplikowanego ekstraktu, jak i terminu poboru próbek. Zaobserwowano również wpływ badanych ekstraktów na zawartość azotu azotanowego i amonowego w glebie. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowano najbardziej skuteczne ekstrakty roślinne, tj. 25% ekstrakt z borówki (redukcja skumulowanej emisji NH<sub>3</sub> w zakresie 49-90% w porównaniu do kontroli, w zależności od typu gleby użytej w badaniach) oraz 10% ekstrakt z morwy czarnej (78-87%), których skuteczność sprawdzono następnie w badaniach wazonowych.

Doświadczenie wazonowe, w którym wykorzystano pszenicę jarą odmiany Rusałka prowadzono do fazy kłoszenia pszenicy, przez okres 67 dni. Ilość azotu zaaplikowana do gleby w eksperymencie wynosiła łącznie 140 kg N ha<sup>-1</sup> i zgodnie z zaleceniami Kodeksu Dobrej Praktyki Rolniczej opracowanego przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB została podzielona na dwie dawki (aplikowane łącznie z badanymi ekstraktami roślinnymi). Pierwsza dawka wynosząca 90 kg N ha<sup>-1</sup> została zastosowana przedsięwzię, natomiast drugą dawkę wynoszącą 50 kg N ha<sup>-1</sup> zaaplikowano w fazie strzelania w źdźbło. W doświadczeniu wazonowym przeprowadzono 13-dniowy pomiar emisji amoniaku z gleby, co więcej, określono wpływ badanych ekstraktów na: aktywność ureazy i zawartość różnych form azotu w próbkach gleby, zawartość makroelementów i chlorofilu w częściach nadziemnych rośliny oraz natężenie procesu fotosyntezy. Dodatkowo przeprowadzono sekwencjonowanie nowej

generacji, które dostarczyło informacji nt. wpływu ekstraktów z borówki i morwy czarnej na mikroorganizmy glebowe (bakterie i grzyby). Wpływ ekstraktów na emisję amoniaku z gleby w doświadczeniu wazonowym uzależniony był od typu gleby. Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy potwierdziły skuteczność badanych ekstraktów roślinnych w redukcji emisji  $\text{NH}_3$  do środowiska (zmniejszenie skumulowanej emisji amoniaku o 31% i 40% w stosunku do kontroli przy aplikacji odpowiednio 25% ekstraktu z borówki oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej) w przypadku gleby biellicowej. Zaobserwowano wpływ ekstraktów roślinnych na zawartość azotu amonowego w glebie oraz makroskładników w roślinach. Uzyskane wyniki sekwencjonowania nowej generacji wskazują na możliwość modyfikacji struktury i liczebności mikroorganizmów w glebie za pomocą ekstraktów roślinnych stosowanych łącznie z moczniakiem.

## **Abstract**

Nitrogen fertilization is a key factor influencing both the efficiency of agricultural production and the quality of the obtained crop. Mineral fertilizers are the main source of nitrogen, and their application to arable land contributes to enriching the soil with nutrients that are necessary for the proper growth of cultivated plants. Urea is a mineral fertilizer that contains nitrogen in the highest concentration - 46%. It is estimated that the share of urea fertilizers in the total global consumption of mineral fertilizers exceeds 50%. The use of urea fertilizers to fertilize agricultural fields is associated with the unfavorable phenomenon of ammonia emission from the fertilized soil, which results in ineffective use of the nitrogen dose supplied to the plants, and thus reduces the economic efficiency of the crops. Estimated data of ammonia emissions into the atmosphere indicate a 60% level of N losses, which depends on many soil and climate factors.

Directive (EU) 2016/2284 of the European Parliament and of the Council of 14 December 2016 on the reduction of national emissions of certain atmospheric pollutants, amending Directive 2003/35/EC of the European Parliament and of the Council of 26 May 2003 and repealing Directive 2001/81/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2001, which led to restrictions on the use of both urea and fertilizers based on it in the European Union, due to the level of emissions associated with the use of the mentioned fertilizers.

Grupa Azoty Zakłady Azotowe "Puławy" S.A., as the main producer of urea, had to take action to reduce ammonia emissions to the level acceptable in the NEC Regulation. One way to implement the changes mentioned above is to use urease inhibitors, which, combined with fertilizer, would create a finished product that can be used in agriculture. Due to the fact that no potentially negative consequences resulting from long-term use of commercially available urease inhibitors have been identified so far, Grupa Azoty Zakłady Azotowe "Puławy" S.A. has started to work in order to find out for natural substances that are harmless to the environment, the application of which, together with fertilizer products manufactured by the Azoty Group, would enable the reduction of ammonia emissions.

The first stage of work carried out as part of this doctoral dissertation included the selection of plant raw materials that would contain substances that inhibit the activity of urease. Then, two stages of laboratory tests were carried out, i.e. incubation tests and pot tests. In both mentioned experiments, two types of soil with different properties were used - luvisols with a granulometric composition of sandy clay (pH 5.4) and podzolic soil with a granulometric



composition of clayey sand (pH 7.4). During both experiments, a constant substrate humidity was maintained, corresponding to the soil suction force (pF) value of 1.9.

In a 14-day incubation experiment, the influence of 6 plant extracts (obtained from the fruits of three plant species: blueberries, raspberries and black mulberries in two concentrations, i.e. 10% and 25%) on ammonia emission was verified. Ammonia emissions were measured using the GASMET DX 4040 analyzer based on the Fourier transform infrared absorption spectroscopy (FTIR) method. The dose of urea fertilizer (granulated urea) applied in the experiment together with the tested plant extracts was 240 kg N ha<sup>-1</sup>. Almost all tested plant extracts resulted in a significant reduction in NH<sub>3</sub> emissions. Moreover, the incubation experiment provided information on the influence of the mentioned plant extracts on the activity of the urease enzyme and the content of various forms of nitrogen (total, nitrate and ammonium) in the soil. Urease activity depended on the type of soil used for the experiment, the type of extract applied, and the date of sampling. The influence of the tested extracts on the content of nitrate and ammonium nitrogen in the soil was also observed. Based on the results obtained, the most effective plant extracts were selected, i.e. 25% blueberry extract (reduction of cumulative NH<sub>3</sub> emissions in the range of 49-90% compared to the control, depending on the type of soil used in the research) and 10% black mulberry extract (78-87%), the effectiveness of which was then checked in pot tests.

A pot experiment using spring wheat of the Rusalka variety was conducted until the earing phase of wheat for a period of 67 days. The amount of nitrogen applied to the soil in the experiment was a total of 140 kg N ha<sup>-1</sup> and, in accordance with the recommendations of the the code of good agricultural and forest practice developed by the Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute, it was divided into two doses (applied together with the tested plant extracts). The first dose of 90 kg N ha<sup>-1</sup> was applied before sowing, while the second dose of 50 kg N ha<sup>-1</sup> was applied during the shooting phase. In a pot experiment, a 13-day measurement of ammonia emissions from the soil was carried out. Moreover, the influence of the tested extracts on: urease activity and the content of various forms of nitrogen in soil samples, the content of macroelements and chlorophyll in the above-ground parts of the plant and the intensity of the photosynthesis process were determined. Additionally, next-generation sequencing was performed, which provided information on the impact of blueberry and mulberry extracts on soil microorganisms (bacteria and fungi). The influence of extracts on ammonia emission from soil in the pot experiment depended on the soil type. The results of the research presented in this study confirmed the effectiveness of the tested plant extracts in reducing NH<sub>3</sub> emissions into the environment (reducing the cumulative ammonia

emission by 31% and 40% compared to the control when applying 25% blueberry extract and 10% black mulberry extract, respectively) in the case of podzolic soil. The influence of plant extracts on the content of ammonium nitrogen in the soil and macronutrients in plants was observed. The obtained results of next-generation sequencing indicate the possibility of modifying the structure and number of microorganisms in the soil using plant extracts used together with urea.

## Spis treści

1. Wstęp .....	13
2. Przegląd literatury .....	15
2.1. Źródła azotu w przyrodzie .....	15
2.2. Czynniki warunkujące emisję amoniaku .....	19
2.3. Ureaza .....	22
2.4. Inhibitory ureazy .....	24
2.4.1. Syntetyczne inhibitory ureazy .....	25
2.4.2. Naturalne inhibitory ureazy .....	28
2.5. Wpływ ekstraktów roślinnych na wzrost roślin i mikroorganizmy glebowe .....	31
3. Cel pracy i hipoteza badawcza .....	34
4. Metodyka badań .....	35
4.1. Ekstrakty roślinne badane w doświadczeniach .....	35
4.1.1. Analizy ekstraktów roślinnych .....	36
4.2. Charakterystyka gleb użytych w doświadczeniu .....	37
4.3. Doświadczenie inkubacyjne .....	37
4.3.1. Pomiar emisji amoniaku z gleby .....	39
4.3.2. Analiza aktywności ureazy w glebie .....	40
4.3.3. Analiza zawartości azotu w glebie .....	41
4.4. Doświadczenie wazonowe .....	41
4.4.1. Analizy gleby .....	43
4.4.2. Analizy mikrobiomu .....	44
4.4.3. Analizy roślin .....	45
4.5. Analiza statystyczna .....	48
5. Wyniki .....	49
5.1. Badania wstępne – pomiar inhibicji ureazy oraz zawartości związków polifenolowych .....	49
5.2. Doświadczenie inkubacyjne .....	52

5.2.1. Emisja amoniaku z gleby w doświadczeniu inkubacyjnym.....	52
5.2.2. Aktywność ureazy w glebie .....	59
5.2.3. Zawartości azotu w glebie.....	61
5.3. Doświadczenie wazonowe .....	66
5.3.1. Emisja amoniaku z gleby w doświadczeniu wazonowym .....	66
5.3.2. Aktywność ureazy w glebie .....	70
5.3.3. Zawartości azotu w glebie.....	72
5.3.4. Plon biomasy oraz zawartość makroskładników w roślinach .....	76
5.3.5 Zawartość chlorofilu w liściach .....	79
5.3.6. Intensywność fotosyntezy .....	80
5.4. Wpływ ekstraktów roślinnych na mikrobiom gleby .....	83
5.4.1. Liczebność i struktura zbiorowisk bakterii i grzybów w glebie.....	83
5.4.3. Zróżnicowanie gatunków bakterii i grzybów.....	89
5.4.3. Bioróżnorodność mikroorganizmów.....	95
6. Dyskusja.....	101
6.1. Substancje aktywne występujące w roślinach i ich działanie na ureazę .....	101
6.2. Emisja amoniaku z gleby .....	102
6.3. Aktywność ureazy.....	105
6.4. Zawartość azotu w glebie.....	107
6.5. Analiza roślin .....	108
6.6. Wpływ ekstraktów roślinnych na mikrobiom gleby .....	109
7. Wnioski.....	111
Spis Rysunków.....	113
Spis Tabel.....	115
Literatura.....	116

## 1. Wstęp

Stały przyrost ludności na świecie niesie za sobą liczne konsekwencje, należy więc zrobić wszystko co jest możliwe, aby zwiększyć wydajność produkcji w takim stopniu, aby zaspokoiła ona stale rosnące zapotrzebowanie żywnościowe ludzkości. Ograniczona ilość użytków rolnych wymusza na producentach nawozów konieczność rozwoju sektora nawozów mineralnych, które są najchętniej stosowane przez europejskich rolników.

Mocznik jest jednym z najbardziej powszechnie stosowanych nawozów na świecie. W 2021 roku, globalna produkcja tego nawozu osiągnęła poziom 180 milionów ton (<https://www.statista.com/statistics/1287037/global-urea-production-by-region/>). Użycie nawozów na bazie mocznika niesie za sobą negatywną konsekwencję, jaką jest emisja amoniaku do środowiska. W związku z tym wprowadzany jest szereg regulacji prawnych, których nadrzędnym celem jest dbanie o środowisko naturalne.

Rozporządzenie NEC - DYREKTYWA PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (UE) 2016/2284 z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie redukcji krajowych emisji niektórych rodzajów zanieczyszczeń atmosferycznych, zmiany dyrektywy 2003/35/WE oraz uchylecia dyrektywy 2001/81/WE prowadzą do ograniczenia możliwości stosowania na terenie Unii Europejskiej zarówno mocznika, jak i nawozów na nim opartych. Jest to związane z koniecznością bardzo znacznego ograniczenia emisji amoniaku. Rozporządzenie NEC wskazuje sposoby redukcji emisji amoniaku z nawozów nieorganicznych, w tym zastąpienie nawozów na bazie mocznika nawozami na bazie azotanu amonu oraz dopuszczenie do dalszego stosowania nawozów na bazie mocznika wyłącznie z wykorzystaniem metod służących zmniejszeniu emisji amoniaku o co najmniej 30% w porównaniu do roku 2005. Jedną z metod obniżenia poziomu emisji amoniaku z nawozów na bazie mocznika jest zastosowanie inhibitorów ureazy czy nityfikacji (dyrektywa NEC).

Inhibitory ureazy zapobiegają lub hamują na pewien okres przemianę azotu amidowego w moczniku do wodorotlenku amonowego i amoniaku poprzez hydrolityczne działanie enzymu ureaza. Poprzez spowolnienie stopnia hydrolizy mocznika w glebie, straty związane z uwalnianiem się amoniaku są zredukowane. Dlatego efektywność mocznika oraz nawozów azotowych zawierających mocznik jest podwyższona, a negatywny wpływ na środowisko, związany z ich stosowaniem jest zmniejszony.

Związki chemiczne określane jako inhibitory ureazy muszą spełniać wymagania nietoksyczności, skuteczności przy niskich stężeniach, stabilności oraz kompatybilności z mocznikiem (stałym oraz ciekłym), a także muszą być degradowalnym w glebie i niedrogim

komponentem nawozowym. Celem inhibitorów ureazy jest ograniczenie ilości uwalnianego amoniaku, co spowoduje wydłużenie czasu działania nawozu na rośliny, a tym samym zwiększenie jego wydajności i efektywności. Wyniki większości dotychczas przeprowadzonych badań dotyczących stosowania nawozów azotowych czy nawozów organicznych zawierających inhibitory ureazy wskazują, że ich aplikacja do gleby, w porównaniu z nawozami bez inhibitorów, charakteryzuje się niższymi stratami azotu. Bezpośrednio widocznym efektem ich działania jest zwiększenie uzyskanego plonu poprzez zwiększenie dostępności azotu (Morales-Morales i in., 2019).

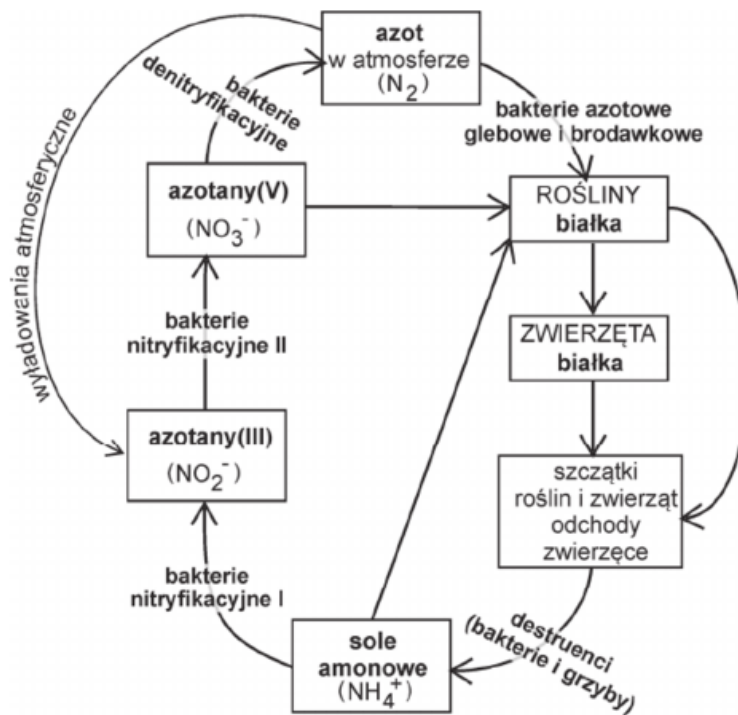
Alternatywą dla syntetycznych, najbardziej popularnych inhibitorów występujących na rynku takich jak: triamid kwasu N-(n-butylo) tiofosforowego (NBPT), triamid kwasu N-(n-propylo) tiofosforowego (NPPT) czy fosforan-3,4-dimetylo pirazolu (DMPP) mogłyby być inhibitory pochodzenia naturalnego. Zastosowanie komponentów naturalnych do wytworzenia innowacyjnych nawozów o obniżonej emisji amoniaku pozwoliłoby wyeliminować zarówno negatywny wpływ nawozów mineralnych, jak również potencjalnie szkodliwy wpływ inhibitorów syntetycznych na środowisko (Zanin i in., 2015). Substancje pochodzenia naturalnego, które mogłyby być wykorzystywane jako naturalne inhibitory ureazy to ekstrakty roślinne, pozostałości po przetwarzaniu, czy produkty metabolizmu mikroorganizmów. Przykłady roślin, z których otrzymano ekstrakty lub wyizolowano substancje aktywne, co do których udowodniono działanie hamujące procesy przemian azotu w glebie to: akacja (*Acacia decurrens*), migdałecznik chebułowiec (*Terminalia chebula*), sosna kalifornijska (*Pinus radiata*), czosnek pospolity (*Allium sativum*), cebula żółta i biała (*Allium cepa*), czy por (*Allium porrum*).

Producenci nawozów na bazie mocznika stoją przed nie lada wyzwaniem, którego celem jest opracowanie nowych formułacji nawozów, które będą charakteryzowały się niższą emisją  $\text{NH}_3$ , a także wyższą wydajnością stosowanych nawozów. Istnieją komercyjnie dostępne substancje, które spełniają te wymogi. Największą trudność stanowi opracowanie sposobu połączenia nawozu z inhibitorem, tak aby uzyskać jak najlepszą formułację, która spełni oczekiwania zarówno producenta, jak i odbiorców.

## 2. Przegląd literatury

### 2.1. Źródła azotu w przyrodzie

Azot jest pierwiastkiem niezbędnym do życia, występującym w glebie w różnych formach, które poddawane są licznym przemianom składającym się na cykl obiegu azotu w przyrodzie (Rysunek 1). Pierwotnym źródłem azotu dla wyspecjalizowanych bakterii i roślin tworzących z nimi układy symbiotyczne jest atmosfera. Gazowa postać azotu przekształcana jest w związki chemiczne, które mogą być dalej wykorzystane przez żywe organizmy. Mikroorganizmy pełnią niebywale ważną rolę w przebiegu licznych procesów związanych z przemianami azotu. Bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* są przykładami bakterii symbiotycznych wiążących azot. Azot może być przyswajany również przez żyjące w glebie organizmy niesymbiotyczne, należące do zarówno mikroorganizmów tlenowych, jak i beztlenowych, takich jak: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia* i cyjanobakterie (szczególnie z rodzaju *Anabaena* i *Nostoc*). Niektóre z bakterii zdolnych do przyswajania azotu cząsteczkowego ( $N_2$ ) są wykorzystywane w bionawozach, jako źródło azotu dla upraw (Chittora i in., 2020; Veresoglou i Menexes, 2010).



Rysunek 1 Cykl obiegu azotu w przyrodzie, T. Umiński „Ekologia, środowisko, przyroda”, 1995.

Większość azotu, która trafia z atmosfery do biosfery, jest wynikiem działalności bakterii azotowych, np. z rodzaju *Rhizobium*, występujących w brodawkach korzeni roślin bobowatych, których charakterystyczną cechą jest to, że posiadają enzym nitrogenazę, pełniący rolę katalizatora reakcji gazowego azotu z wodorem. Produktami tej reakcji są amoniak ( $\text{NH}_3$ ) oraz glutamina.

Bakterie nityfikacyjne utleniają do azotynów i azotanów część amoniaku, która trafia bezpośrednio do gleby. Systemy korzeniowe roślin są przystosowane do pobierania anionów azotynowych ( $\text{NO}_2^-$ ), azotanowych ( $\text{NO}_3^-$ ) i kationów amonowych ( $\text{NH}_4^+$ ). Zwierzęta nie są zdolne do przekształcania azotu z atmosfery, produkują jednak amoniak, który jest uwalniany do środowiska i wykorzystywany przez bakterie nityfikacyjne, bądź wykorzystywany w procesie *ammonax*, w wyniku którego amoniak przekształcany jest w gazowy azot.

Immobilizacja, czyli konwersja azotu nieorganicznego do organicznego jest kluczowym procesem zachodzącym podczas obiegu azotu w przyrodzie. Odwrotny proces, czyli mineralizacja zachodzi w wyniku działalności mikroorganizmów. Tempo zachodzenia obu wspomnianych procesów wzrasta wraz ze wzrostem temperatury i wilgotności gleby. Jony amonowe, które nie zostały wykorzystane w procesie immobilizacji są przekształcane w jony azotanowe w dwustopniowym procesie nityfikacji, który opiera się na działaniu bakterii z rodzaju *Nitrosomonas* zamieniających jony  $\text{NH}_4^+$  w jony azotynowe oraz bakterii z rodzaju *Nitrobacter*, odpowiedzialnych za konwersję jonów  $\text{NO}_2^-$  do  $\text{NO}_3^-$ .

Wspomniany cykl biogeochemiczny opisuje cyrkulację azotu i jego związków w biosferze. Atmosfera ziemską składa się w 78% z azotu i jest zarówno źródłem tego pierwiastka dla biosfery, jak i miejscem, do którego jest uwalniany. Związki azotu, zarówno organiczne, jak i nieorganiczne uczestniczą we wszystkich ważniejszych procesach biochemicznych – są składnikami aminokwasów tworzących białka, zasad azotowych nukleotydów budujących DNA i RNA, oraz chlorofilu biorącego udział w procesie fotosyntezy.

Innym źródłem azotu w glebie są nawozy mineralne pochodzące z surowców kopalnych lub też powstające w wyniku procesów produkcyjnych, np. w trakcie produkcji amoniaku w procesie Habera-Boscha, w którym azot jest asymilowany z powietrza. Zastosowanie nawozów mineralnych będących źródłem azotu w rolnictwie jest konieczne do uzyskania wysokich plonów, jest również źródłem znaczących zanieczyszczeń mających wpływ na stan środowiska naturalnego (Basosi i in., 2014). Biorąc pod uwagę fakt, iż popyt na nawozy mineralne stale rośnie, jest to niewątpliwie szczególnie istotne zagadnienie w kontekście zarówno dostarczania azotu do środowiska, jak i emisji amoniaku. Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (Food and Agriculture Organization of the



United Nations, FAO) opublikowała dane dotyczące zużycia nawozów mineralnych, z których jasno wynika, że zużycie nawozów NPK jest coraz większe (FAO, 2019).

Nawozy mineralne mogą być produkowane zarówno z materiałów kopalnianych, jak i wytwarzane na drodze syntezy chemicznej. Wyróżniamy nawozy jednoskładnikowe oraz wieloskładnikowe. Do najważniejszych składników nawozów mineralnych należą: azot (N), fosfor (P), potas (K), wapń (Ca), magnez (Mg) oraz siarka (S). Źródłem azotu oraz innych składników pokarmowych mogą być także materiały organiczne takie jak: obornik zwierzęcy, odpady organiczne czy resztki poźniwne (Litskas, 2023). Zawartość azotu różni się w zależności od źródła pochodzenia resztek poźniwnych, rośliny strączkowe są bogatsze w azot niż inne rośliny uprawne (Kalembasa i in., 2020).

Nawozy zawierają azot występujący w trzech formach – azotanowej (saletrzanej,  $\text{N-NO}_3^-$ ), amonowej ( $\text{N-NH}_4^+$ ) oraz amidowej (mocznikowej,  $\text{N-NH}_2$ ). Sposób działania każdej z nich jest odmienny, a użycie nawozu będącego źródłem konkretnej formy azotu powinno zostać dostosowane do potrzeb uprawianych roślin.

Azot w formie saletrzanej występuje w nawozach w postaci saletry sodowej, magnezowej, wapniowej i potasowej. Stosowany jest pogłównie w okresie intensywnego wzrostu roślin. Zastosowanie azotu azotanowego wspomaga pobieranie jonów zasadowych magnezu ( $\text{Mg}^{2+}$ ), wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i potasu ( $\text{K}^+$ ). Forma azotanowa azotu może być łatwo wymywana w głębsze warstwy gleby, a co za tym idzie może z łatwością przedostać się do zbiorników wodnych (Kowal, 2009).

Pobieranie jonów amonowych przez rośliny opiera się na wymianie jonowej. Wydzielenie do gleby jonów wodorowych ( $\text{H}^+$ ) powoduje miejscowe obniżenie pH. Przewagą jonów amonowych nad innymi formami azotu jest fakt, iż mogą być one bezpośrednio wbudowywane w aminokwasy w korzeniach roślin powodując ich wzrost oraz to, że nie istnieje ryzyko nagromadzenia się w roślinie jonów amonowych, tak, jak ma to miejsce w przypadku form azotanowej i azotynowej. Istotny jest fakt, iż w glebie o temperaturze przekraczającej  $10^\circ\text{C}$  jony amonowe ulegają procesowi nityfikacji, w wyniku którego są przekształcane do formy azotanowej, a ich obecność sprzyja pobieraniu fosforu.

Azot w formie amidowej, dostarczany z nawozów mocznikowych nie wpływa bezpośrednio na zmianę pH gleby. Dopiero po procesie hydrolizy mocznika, w wyniku działania ureazy glebowej, dzięki której jest przekształcany w formę amonową może wpłynąć na miejscowe zakwaszenie gleby.

Mocznik jest najbardziej popularnym nawozem mineralnym, który poza szerokim zastosowaniem w rolnictwie jest również wykorzystywany przy produkcji pasz dla zwierząt

hodowlanych i w procesach przetwórczych (Gilbert i in., 2006). Mocznik jest nawozem o wysokiej, 46-procentowej zawartości azotu amidowego. Niewątpliwymi zaletami mocznika są jego relatywnie niskie koszty produkcji, dostępność na rynku oraz łatwa aplikacja. Mocznik jest uniwersalnym nawozem, który może być wykorzystywany w nawożeniu dolistnym i doglebowym. Może być stosowany w większości upraw roślinnych zarówno pogłównie, jak i przedsiwnie. Proces hydrolizy mocznika prowadzi do wytworzenia formy amonowej azotu, która jest lepiej przyswajalna dla roślin. Hydroliza mocznika zachodzi w obecności enzymu ureaza. Tempo zachodzenia procesu zależy od aktywności enzymu, temperatury i wilgotności gleby. Zakres temperatur między 20 a 25°C sprzyja szybkiemu zachodzeniu procesu hydrolizy. Wysokie zakwaszenie gleb negatywnie wpływa na pobieranie azotu azotanowego i amonowego przez rośliny (Pal'ove-Balang i Mistrik, 2007). Nawożenie mocznikiem wiąże się z nadmierną emisją amoniaku, co w konsekwencji prowadzi do nieefektywnego wykorzystania nawozu i degradacji środowiska (Chunmei i in., 2020; Drury i in., 2017; Mulyani i in., 2001; Papangkorn i in., 2008).

Mocznik jest aplikowany w formie granul, które w kontakcie z wodą szybko się rozpuszczają. Szybkość rozpuszczania się granul zależy od dwóch parametrów: zawartości wody w glebie i temperatury. Reakcja hydrolizy jest katalizowana przez enzym ureaza (Kissel i Cabrera, 2005). Powstający w glebie amoniak jest podatny na ulatnianie się do atmosfery.

Niektóre związki azotu, takie jak amoniak, mogą niekorzystnie wpływać na zdrowie ludzi, stanowią również źródło zanieczyszczeń środowiska (Robertson i Groffman, 2015). Istnieją czynniki, które mogą mieć dwojaki wpływ na występowanie przemian azotowych. Część z nich stanowią efekty działalności człowieka, np. rodzaj i skład zastosowanych nawozów lub metoda prowadzonej uprawy, podczas gdy inne czynniki są zależne od środowiska, np. mikroorganizmy występujące w glebie oraz pH, wilgotność i struktura gleby (Li in., 2020).

Obecnie temat emisji amoniaku do środowiska jest przedmiotem zainteresowań Parlamentu Europejskiego. Związane jest to z faktem, że zbyt wysokie stężenie amoniaku w powietrzu może wywierając negatywny wpływ na rolnictwo, zdrowie ludzi i ekosystemy. Dlatego właśnie producentom nawozów i rolnikom stawiane są wymagania prowadzące do zmniejszenia poziomu emisji amoniaku. Ma to na celu ochronę środowiska naturalnego.

## 2.2. Czynniki warunkujące emisję amoniaku

Spośród wielu czynników, które mają bezpośredni wpływ na wielkość emisji amoniaku z gleby nie sposób wyróżnić jednego, który wpływałby na emisję bardziej niż pozostałe. Najistotniejsze czynniki, które mają wpływ na wielkość strat gazowych  $\text{NH}_3$  to: pH gleby, temperatura i stężenie  $\text{NH}_4^+$  w glebie, zawartość wody i struktura gleby (Fenn i Hossner, 1985; Follet, 2008). Metoda prowadzonej uprawy również wywiera wpływ na straty amoniaku. Poziom emisji amoniaku jest zależny od sposobu zagospodarowania gleby i wynosi 11,5% z gleby uprawnej i 23% z pastwisk (Wesołowska i in., 2021). Co więcej, zastosowanie nawożenia azotowego w uprawach bezorkowych, na których zastosowano ściółkowanie oraz nawożenie pastwisk może powodować większe straty azotu, zwłaszcza jeśli stosuje się nawożenie na powierzchnię gleby (de Campos Bernardi i in., 2014; Sherman i in., 2022)

Zhenghu i Honglang (2000) opisali kilka czynników, które bezpośrednio oddziałują na ulatnianie się amoniaku. Są to: pH, zawartość  $\text{CaCO}_3$  oraz całkowite zasolenie gleby. Naukowcy w 10-dniowym doświadczeniu zbadali 22 próbki gleby o różnej wartości pH (wartości z przedziału 4,32-9,12). Wyższy poziom emisji amoniaku obserwowali w próbkach, które charakteryzowały się wyższymi wartościami pH. Podobne wyniki dotyczące zależności między pH gleby a poziomem emisji amoniaku uzyskano w 3-letnich badaniach (Shan i in., 2015). Omawiane zjawisko związane jest z faktem, iż wysokie pH bezpośrednio oddziałuje na równowagę pomiędzy  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NH}_3$  (Gil i in., 2008). Proces konwersji jonów amonowych w amoniak jest ściśle zależny od wartości pH gleby. Należy zwrócić uwagę na fakt, że po aplikacji nawozu mocznikowego pH gleby może ulec zmianie. W trakcie zachodzenia procesu hydrolizy mocznika, wydzielany jest wodorowęglan amonu, który powoduje nagły wzrost wartości pH wokół granul nawozu (osiągając wartości powyżej 8), co sprzyja ulatnianiu się  $\text{NH}_3$ . Straty amoniaku są również obserwowane w przypadku kwaśnych gleb, w których zachodzi proces transformacji jonów amonowych w lotny amoniak. Należy jednak nadmienić, że są one obserwowane na dużo niższym poziomie niż w przypadku gleb o odczynie zasadowym (He i in., 1999; Klimczyk i in., 2021). Uzyskane wyniki badań wskazują na to, że wzrost całkowitego zasolenia gleby powoduje zintensyfikowanie negatywnego dla środowiska zjawiska towarzyszącego nawożeniu, jakim jest emisja amoniaku (Zhenghu i Honglang, 2000).

Ilość uwolnionego amoniaku wzrasta proporcjonalnie do wzrostu temperatury gleby (He, 1999). Wniosek ten potwierdzono w przeprowadzonym 4-dniowym doświadczeniu polowym, w którym co 3 godziny badano między innymi temperaturę gleby, potencjał wody glebowej i emisję amoniaku. Zaobserwowano, że poziom emisji amoniaku osiągnął najwyższe

wartości 2 dni po aplikacji mocznika w czasie odpowiadającym maksymalnej odnotowanej temperaturze gleby i malejącej zawartości wody w glebie (Clay i in., 1990).

Pojemność wymiany kationów (CEC) to zdolność gleby do adsorbowania kationów w formie, która może zostać łatwo zastąpiona innymi kationami występującymi w roztworze wodnym. Jest to jeden z podstawowych paramentów charakteryzujących glebę (Przelaskowska i Klaja, 2014), który wpływa na stabilność struktury gleby, dostępność składników odżywczych, pH i na sposób, w jaki gleba wchodzi w reakcję z nawozami. Wzrost CEC ma wpływ na większą dostępność podstawowych kationów, które są niezbędne dla prawidłowego wzrostu roślin (Reeza i in., 2009). Przykładem gleby o wysokiej zdolności wymiany kationów, jest gleba z dużą zawartością ilu lub o wysokiej zawartości substancji organicznej (Sidi i in., 2015; Zhao i in., 2020). Zhenghu i Honglang (2000) zaobserwowali istotną ujemną korelację między CEC i ulatnianiem się amoniaku. Wzrost wartości CEC w różnych rodzajach gleb powodował inhibicję ulatniania się amoniaku (Sommer i in., 2004). CEC jest jednym z najważniejszych czynników regulujących poziom ulatniania się amoniaku (Pelster i in., 2018).

Kolejnym, bardzo istotnym czynnikiem, który ma bezpośredni wpływ na poziom emisji amoniaku jest sposób aplikacji nawozu. Wyróżniane są dwie metody aplikacji nawozów granulowanych. Pierwsza z nich, ciesząca się największą popularnością polega na rozprowadzaniu nawozu na powierzchni gleby. Taki sposób nawożenia powoduje wysoki poziom emisji amoniaku do powietrza, który obserwowany jest kilka dni po aplikacji nawozu mocznikowego. Istnieje jednak możliwość zredukowania poziomu emisji amoniaku poprzez przykrycie nawozu cienką warstwą gleby zaraz po jego aplikacji. Takie działanie powoduje obniżenie emisji amoniaku od 50 do 80% i związane jest z wiązaniem  $\text{NH}_3$  przez materię organiczną i il koloidalny oraz tworzenie się w glebie nielotnych związków organicznych (Walczak i in. 2019). Zabieg ten jest szczególnie skuteczny na glebach, które charakteryzują się wysoką zawartością materii organicznej i/lub ilu koloidalnego. Metoda ma jednak pewne ograniczenia, nie może być stosowana w nawożeniu pogłównym. Drugi sposób opiera się na aplikowaniu dawki nawozu pod powierzchnią gleby. Zaleca się aplikację nawozu na głębokości 3-5 cm (Cameron i in., 2013), pamiętając o zastosowaniu odpowiedniej odległości od nasion, co zapewnia dobre warunki do kiełkowania roślin. Zastosowanie tej metody pozwala zredukować straty amoniaku do powietrza nawet o 90% (Kodeks dobrej praktyki rolniczej w zakresie ograniczania emisji amoniaku, 2019). Ta praktyka zapewnia bardziej efektywne wykorzystanie aplikowanego nawozu. Należy jednak pamiętać o tym, że źle przeprowadzony

zabieg może spowodować niepożądany wzrost wartości pH gleby, powodując nadmierną emisję amoniaku.

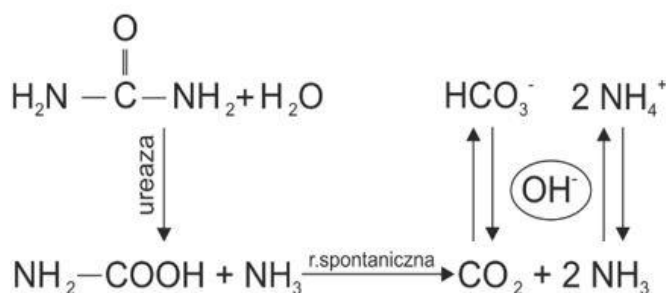
Marchesan i in. (2013) porównali dwa rodzaje systemów uprawy: konwencjonalny i bezorkowy pod kątem emisji amoniaku. Rolnictwo konwencjonalne jest ukierunkowane na maksymalizację zysku, który jest osiągany dzięki dużej wydajności prowadzonych upraw roślinnych i hodowli zwierząt. Wydajność ta jest osiągnięta w wyspecjalizowanych gospodarstwach, w których stosowane są technologie produkcji opierające się na wysokim zużyciu środków produkcji przy jednoczesnych niskich nakładach robocizny (Kuś i Fotyma, 1992). System bezorkowy wykorzystuje mieszanie gleby zamiast jej odwracania (orki). Jest to uproszczony rodzaj uprawy gleby, który ogranicza liczbę zabiegów uprawowych. W systemie bezorkowym praca pługa zastąpiona jest aktywnością dżdżownic i innych organizmów żywych, które bytują w warstwie ornej gleby i swoją aktywnością naturalnie spulchniają glebę, przyczyniając się do poprawy żyzności gleby, wspomagając jej wietrzenie i mieszając pozostałości poźniwne. We wspomnianym wcześniej doświadczeniu (Marchesan i in., 2013) zaobserwowano, że emisje amoniaku uzyskane z pól, na których zastosowano konwencjonalny system uprawy były niższe (wynosiły odpowiednio 1,2% zastosowanej dawki azotu wynoszącej  $75 \text{ kg N ha}^{-1}$  przy nawożeniu mocznikiem i 0,014% przy nawożeniu mocznikiem z dodatkiem NBPT) niż emisje amoniaku uzyskane z pól uprawianych metodą bezorkową (wynosiły analogicznie 11% i 7%). Niewątpliwie jest to związane z faktem, iż obecność wielu pozostałości roślinnych pozostawionych na powierzchni gleby w uprawie bezorkowej przyczynia się do przyspieszenia przebiegu procesu rozkładu mocznika.

Warto również wspomnieć o biowęglu i jego roli w procesie ulatniania się amoniaku z gleb. Biowęgiel to porowaty materiał bogaty w węgiel, który jest produkowany w procesie pirolizy biomasy, prowadzonym w temperaturze  $350\text{-}700^\circ\text{C}$ . Chemiczne i fizyczne właściwości biowęglu są ściśle skorelowane z parametrami procesu pirolizy i właściwościami surowca, z którego jest wytwarzany. Ze względu na swoją porowatą strukturę i obecność w niej różnorodnych grup funkcyjnych, które charakteryzują się dużą modyfikacyjnością, biowęgiel jest wykorzystywany do produkcji węgla aktywnego, jako sorbent do oczyszczania wody, surowiec licznych kataliz oraz jako środek poprawiający właściwości gleby (Shan i in., 2020). Przeprowadzono wiele badań ukazujących pozytywny wpływ zastosowania biowęglu na glebę. Dotychczasowe badania wskazują na to, że wpływ biowęglu na emisję amoniaku jest zróżnicowany i uzależniony od takich czynników jak warunki glebowe, czy sposób uprawy. Zhu i in. (2020) wykazali, że biowęgiel przyspiesza proces ulatniania  $\text{NH}_3$  z gleb o wysokim poziomie zasolenia. Wynika to z faktu, że w przypadku stosowania biowęglu na glebach

o wysokiej zawartości soli mineralnych zdolność adsorpcyjna  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  jest zredukowana przez jony soli w nich występujących (Zhu i in., 2020). W doświadczeniu przeprowadzonym przez Sun i in. (2019) odnotowano mniejszą ilość uwalnianego amoniaku z gleb spod uprawy ryżu (są to gleby podmokłe ze stojącą wodą na polach), na które aplikowany był mocznik z dodatkiem biowęgla w porównaniu do upraw, na których nie stosowano biowęgla. W przeprowadzonym przez wspomnianych naukowców eksperymencie polowym, którego czas trwania wynosił jeden sezon wegetacyjny ryżu, porównano poziom ulatniania się amoniaku w trzech przypadkach: przy użyciu słomy ryżowej i dwóch dawek biowęgla otrzymanego ze słomy ryżowej, które aplikowane były na powierzchnię gleby. Zastosowanie biowęgla zaowocowało niższym skumulowanym poziomem ulatniania się amoniaku wynoszącym około 20% w porównaniu do upraw, w których aplikowano słomę ryżową (Sun i in., 2019). Wyniki pokazały, że pozytywny (zmniejszenie ulatniania się amoniaku) lub niepożądany (wzrost ulatniania się amoniaku) wpływ biowęgla zależy od rodzaju gleby, na którą jest stosowany (Sha i in., 2019; Zhu i in., 2020).

### 2.3. Ureaza

Ureaza, amidohydrolaza mocznika jest enzymem z klasy hydrolaz, który katalizuje dwuetapowy proces rozkładu mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla (Rysunek 2). Produktem pierwszego etapu wspomnianego procesu, czyli hydrolizy, jest karbaminian, natomiast w drugim etapie - dysocjacji, powstają jony amonowe oraz dwutlenek węgla (Kissel and Cabrera, 2005).



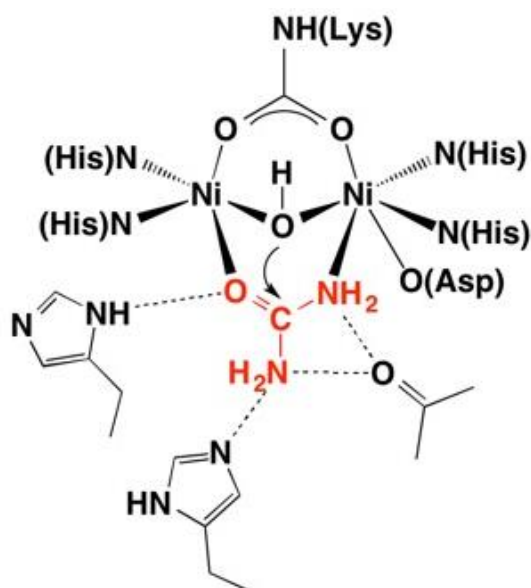
Rysunek 2 Przebieg reakcji hydrolizy mocznika

Ureaza jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie, występuje między innymi w algach, bakteriach, drożdżach, grzybach oraz roślinach. W zależności od pochodzenia, ureaza wykazuje różnice w swojej budowie strukturalnej (Kafarski i in., 2018). Enzymy pochodzące

z roślin i grzybów przyjmują postać heksamerów, natomiast enzymy pochodzące z bakterii mają postać kompleksów składających się z dwóch lub trzech podjednostek (Olech i in., 2014).

Ureaza była pierwszym enzymem, który udało się uzyskać w formie krystalicznej. Osiągnięcia tego dokonał amerykański chemik, James Sumner, który w 1926 roku wyizolował ureazę z nasion kanawalii mieczokształtnej (*Canavalia ensiformis*). Za to osiągnięcie przyznano Nagrodę Nobla.

Charakterystyczna budowa (Rysunek 3), wyróżniająca ureazę na tle innych enzymów wynika z faktu, że wokół jej centrum aktywnego znajdują dwa atomy niklu wraz z koordynującymi je czterema resztami histydynowymi, asparaginą i mostkującą lizyną. Jeden z atomów niklu jest koordynowany przez 3 ligandy, drugi natomiast jest skoordynowany z 5 ligandami. Oba atomy niklu są ze sobą połączone jonem wodorotlenowym, który wraz z trzema innymi cząsteczkami wody tworzy tetraedryczny klaster wody, który w miejscu aktywnym związany jest wiązaniem wodorowym (Kappaun i in., 2018).



Rysunek 3 Budowa cząsteczki enzymu ureaza

Badania przeprowadzone w 1975 roku udowodniły, że to właśnie atomy niklu obecne w centrum aktywnym enzymu odpowiadają za aktywność katalityczną ureazy (Kappaun i in., 2018). W procesie hydrolizy mocznik najpierw zajmuje miejsce cząsteczek wody znajdujących się w centrum aktywnym enzymu, a następnie poprzez tlen karbonylowy łączy się z jonem niklu. To sprawia, że węgiel pochodzący z mocznika zmienia swój charakter na bardziej elektrofilowy. Następnie, za pośrednictwem aminowych atomów azotu mocznik wiąże się z drugim jonem niklu tworząc tym samym dwukleszczowe wiązanie z ureazą.

Do węgla pochodzącego z mocznika przyłączana jest cząsteczka wody. W wyniku tej reakcji powstaje tetraedryczny związek pośredni, z którego uwalniane są amoniak i karbaminian.

## 2.4. Inhibitory ureazy

Zastosowanie inhibitorów ureazy umożliwia ograniczenie strat azotu w postaci emisji amoniaku z nawozów mocznikowych, a co za tym idzie bardziej efektywne wykorzystanie nawozów i ograniczenie ich negatywnego wpływu na środowisko. Rolą inhibitorów ureazy stosowanych jako dodatek do nawozów mocznikowych jest spowolnienie lub całkowite zahamowanie procesu rozkładu mocznika, czyli przemiany azotu amidowego do wodorotlenku amonowego i amoniaku poprzez hydrolityczne działanie enzymu. Powodują one wydłużenie dostępności azotu dla roślin z 6-8 tygodni do 8-16 tygodni (Jarosz i Faber, 2022). Stosowanie inhibitorów ureazy niesie za sobą szereg korzyści. Przede wszystkim spowolnienie procesu hydrolizy mocznika zawartego w glebie zmniejsza ilość amoniaku uwalnianego do atmosfery, ale również czyni nawóz bardziej wydajnym i ogranicza jego negatywny wpływ na środowisko (Kiss, 2002; Li i in., 2017). Biorąc pod uwagę te aspekty, zrozumiałym jest fakt, że producenci nawozów na bazie mocznika stale dążą do polepszenia właściwości wytwarzanych nawozów.

Inhibitory ureazy mogą zostać podzielone ze względu na mechanizm działania. Pierwszą grupę stanowią związki, które przyłączają się bezpośrednio do jonów niklu obecnych w centrum aktywnym enzymu. Przedstawicielami tej grupy związków są: triamid kwasu N-(n-butylo)tiofosforowego (NBPT), triamid kwasu N-(n-propylo)tiofosforowego (NPPT), triamid kwasu N-(2-nitrofenylo)tiofosforowego (2-NPT), fosfodiestraza (PPD) oraz hydroksymocznik. Do drugiej grupy zaliczamy ponadto między innymi hydrochinon i allicynę, które wiążąc się z centrum aktywnym enzymu przyczyniają się do powstania stabilnych kompleksów inhibitorów. Utworzenie tych kompleksów skutkuje zmniejszeniem aktywności enzymu.

Kolejny mechanizm działania inhibitorów ureazy polega na utworzeniu wiązania między związkami tiolowymi a centrum aktywnym ureazy, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia związków, które zawierają w sobie reszty cysteiny. Silne utleniacze, takie jak nadmanganian potasu ( $\text{KMnO}_4$ ) wykazują zdolność do reagowania z grupami tiolowymi  $-\text{SH}$  (będącymi składnikiem mobilnego białka „flap” zawierającego reszty cysteiny). Utlenianie grup tiolowych prowadzi do zmniejszenia aktywności enzymu. Należy jednak pamiętać o tym, że  $\text{KMnO}_4$  może utleniać nie tylko grupy  $-\text{SH}$ , ale również inne, co czyni go utleniaczem



niespecyficznym. Jony metali, np. jony srebra ( $\text{Ag}^+$ ) mają zdolność do modyfikowania mobilnej struktury białka cysteinowego, mają zatem bezpośredni wpływ na budowę enzymu. Jony srebra przyłączając się do centrum aktywnego zapobiegają przemieszczaniu się mobilnego białka „flap” hamując tym samym aktywność enzymu.

Ostatnią grupą stanowią przedstawiciele związków chelatujących, które swoim działaniem spowalniają formowanie centrum aktywnego. W wyniku wiązania, które tworzy się między jonami niklu ( $\text{Ni}^{2+}$ ) a chelatorami - kwasem wersenowym (EDTA) i kwasem pentetynowym (DTPA) zachodzi zahamowanie aktywności ureazy (Svane i in., 2020).

Można również podzielić inhibitory ureazy ze względu na ich pochodzenie, dzieląc je na inhibitory syntetyczne i naturalne (Tabela 1).

Tabela 1 Podział inhibitorów ureazy ze względu na ich pochodzenie

<b>Inhibitory ureazy</b>	
<b>Inhibitory syntetyczne</b>	<b>Inhibitory naturalne</b>
NBPT triamid kwasu N-(n-butylo) tiofosforowego	Allicyna
NPPT triamid kwasu N-(n-propylo) tiofosforowego	Kwercetyna i jej glikozydy
2-NPT N-(2-triamid nitrofenylo) fosforowy	Flawonoidy
HQ Hydrochinon	Kwas humusowy
ATS Tiosiarczan amonu	

#### 2.4.1. Syntetyczne inhibitory ureazy

Na rynku europejskim dostępne są różne substancje, które powodują zmniejszenie emisji amoniaku uwalnianego do środowiska. Za najbardziej skuteczny komercyjnie dostępny syntetyczny inhibitor ureazy uznawany jest triamid kwasu N-(n-butylo)tiofosforowego, NBPT (Cantarella i in., 2018; Silva i in., 2017). NBPT jest związkiem bezwonny, nietoksycznym, który może być aplikowany w formie natrysku formulacji płynnej na granule nawozu mocznikowego w końcowej fazie produkcji mocznika lub dodany do stopu mocznika jeszcze przed etapem granulacji. Istnieje również możliwość zmieszania NBPT z roztworem saletrzano-mocznikowym (Klimczyk i in., 2021). Inne, komercyjnie dostępne inhibitory ureazy to triamid kwasu N-(n-propylo)tiofosforowego oraz tiosiarczan amonu (ATS).

Z przeprowadzonych doświadczeń, w których mierzono emisję amoniaku wiadomo, że najbardziej efektywnymi inhibitorami enzymu ureaza są NBPT (Cantarella i in. 2018; Li i in. 2015, Watson i in. 2008) oraz stosowane jednocześnie NBPT oraz NPPT (Byrne i in. 2020; Li i in. 2015). NBPT reaguje z ureazą poprzez tworzące się wiązanie między dwoma jonami niklu i atomem tlenu pochodzącym z mostku karbaminianowego. Utworzenie tego wiązania zmniejsza ryzyko połączenia mocznika z jonami niklu. Liczne badania naukowe, które polegały na sprawdzeniu efektywności NBPT w hamowaniu hydrolizy mocznika dowodzą, że zastosowanie nawet małej dawki (500-1200 mg NBPT na kg mocznika) triamidu kwasu N-(n-butylo)tiofosforowego pozwala uzyskać redukcję emisji amoniaku na poziomie 50-60% (Cantarella i in., 2018; Wang i in., 2020). Zastosowanie NBPT w połączeniu z mocznikiem powoduje opóźnienie pojawienia się piku emisji amoniaku o 3-4 dni (Cantarella i in., 2018). Ponadto zaobserwowano, że uzyskana sumaryczna emisja amoniaku ze wszystkich dni prowadzenia doświadczenia w obiektach, w których zaaplikowano mocznik w połączeniu z NBPT była niższa niż w obiektach, w których aplikowano sam mocznik (Wang i in., 2020). Skuteczność redukcji emisji amoniaku jest zależna od szeregu czynników, m. in.: typu gleby, stosowanej metody uprawy oraz warunków klimatycznych (Klimczyk i in., 2021). Najwyższą skuteczność wspomnianej substancji zaobserwowano na glebie, która charakteryzowała się wysokim pH oraz niską zawartością materii organicznej. W doświadczeniu inkubacyjnym, w którym stosowano NBPT oraz fosforodiamidan fenylu (PPDA) razem z mocznikiem w różnych warunkach uwilgotnienia gleby zastosowanie NBPT spowodowało obniżenie aktywności ureazy w ciągu dwóch dni od aplikacji nawozu, a efekt ten utrzymywał się do 10 dnia po nawożeniu. Najniższe stężenie jonów  $\text{NH}_4^+$  zaobserwowano w próbkach gleby, w których aplikowano mocznik z dodatkiem NBPT. Ponadto, zaobserwowano o 75% niższą aktywność ureazy w przypadku gleby, która charakteryzowała się wskaźnikiem WFPS (ang. Water Filled Pores Space) o wartości 60% (Sanz-Cobena i in., 2013).

Zastosowanie NPPT zwiększa efektywność nawozów zawierających mocznik poprzez zmniejszenie emisji amoniaku. Zaaplikowanie go razem z mocznikiem przyczyniło się do uzyskania o 50% niższej emisji amoniaku niż w przypadku aplikacji samego mocznika (Modolo i in., 2018).

Inny związek o zdolności hamowania ureazy to N-(2-triamid nitrofenylo) fosforowy. Niewątpliwą przewagą 2-NPT nad NBPT jest jego stabilność w wysokich temperaturach, w których rozkłada się NBPT. Zastosowanie 2-NPT powoduje zauważalną redukcję emisji amoniaku. Z przeprowadzonego doświadczenia inkubacyjnego, którego czas trwania wynosił

19 dni wiadomo, że zastosowanie 2-NPT w połączeniu z mocznikiem spowodowało zmniejszenie poziomu emisji amoniaku o 89% w porównaniu do mocznika (Ni i in., 2018).

Hydrochinon (HQ) to związek organiczny, który w swojej budowie posiada pierścień benzenowy i przyłączone do niego dwie cząsteczki hydroksylowe. Powstaje w wyniku redukcji chinonu. Mechanizm hamowania aktywności ureazy przez hydrochinon polega na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy z grupą tiolową należącą do  $\lambda$  cysteiny, która jest składową mobilnego białka „flap”. Zahamowanie aktywności enzymu następuje w wyniku działania rodników, które poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego blokują mobilne białko „flap” w pozycji otwartej. Proces inaktywacji jest nieodwracalny (Mazzei i in., 2022). O skuteczności hydrochinonu jako inhibitora ureazy pisali Zhao i Zhou już w 1991 roku. W doświadczeniu wazonowym opisywanym przez Xu i in. (2020) wykazano, że najniższą emisję amoniaku uzyskano z obiektów, do których zaaplikowano hydrochinon razem z dicyjanodiamidem (DCD, inhibitorem nityfikacji). Aplikacja HQ z DCD spowodowała także wzrost poboru azotu przez rośliny. Junejo (2013) wykazał redukcję emisji amoniaku o 25% w wyniku zastosowania mocznika otoczkowanego hydrochinonem. Ponadto wykazano, że HQ wpływa na emisję  $N_2O$ . W trakcie 6-letniego doświadczenia polowego, w którym badano emisję  $N_2O$  z zaaplikowanego mocznika w połączeniu z dicyjanodiamidem odnotowano zmniejszenie emisji  $N_2O$  z obiektów, w których aplikowano mocznik w połączeniu z HQ i DCD o 26,4% (Dong i in., 2018). W doświadczeniu przeanalizowano wiele czynników, które mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki. Były to między innymi: zastosowana dawka nawozu, zawartość materii organicznej w glebie, wilgotność gleby, temperatura oraz cykl naprzemiennego zamrażania i rozmrażania gleby (Qin i in., 2021). Nie zauważono, aby zastosowanie HQ i DCD wpłynęło na wzrost biomasy kukurydzy. Nie zaobserwowano, również wpływu użytych inhibitorów na zawartość różnych form azotu w glebie ( $NH_4^+$ -N,  $NO_3^-$ -N) oraz na plonowanie roślin. Podobne doświadczenie zostało wcześniej opisane przez Wang i jego współpracowników (2015), wówczas uzyskano redukcję emisji  $N_2O$  z gleby z dodatkiem inhibitorów o 16%.

Użycie tiosiarczanu amonu (ATS) z nawozem RSM (roztwór saletrano-mocznikowy) spowodowało zahamowanie aktywności ureazy na różnych poziomach, od 18 do 48%, zależnie od takich parametrów gleby jak: pH, zawartość ilu, węgla organicznego oraz węglanów (Sullivan i Havlin, 1992). Zauważono, że wyższa temperatura gleby, niska wilgotność oraz mała zawartość ilu w glebie sprzyjały zahamowaniu aktywności ureazy w glebie, w której użyto ATS w połączeniu z RSM.

Warto wspomnieć o tym, że niewłaściwe używanie komercyjnie dostępnych syntetycznych inhibitorów ureazy niesie za sobą negatywne konsekwencje zarówno dla

środowiska, jak i prowadzonych upraw. Mogą być one toksyczne dla mikroorganizmów glebowych, ze szczególnym uwzględnieniem tych mikroorganizmów, które towarzyszą przemianom wchodzącym w cykl obiegu azotu w przyrodzie. Wpływ inhibitorów ureazy na mikroorganizmy może obejmować zmniejszenie ich aktywności oraz zmiany w strukturze mikrobiomu (Li i in., 2019). Wspomniani autorzy wykazali, że stosowanie inhibitorów ureazy (NBPT i hydrochinon) może zwiększać grupę mikroorganizmów prokariotycznych wykazujących aktywność ureolityczną, utrudniając w ten sposób ograniczanie strat azotu w wyniku ulatniania się amoniaku. Niektóre inhibitory ureazy, np. NBPT oraz NPPT mogą w trakcie rozkładu uwalniać do gleby związki o charakterze zakwaszającym, co może prowadzić do nadmiernego obniżenia pH gleby oraz negatywnego wpływu na prowadzone uprawy (Zanin i in., 2015). Ponadto, syntetyczne inhibitory ureazy mogą pozostawać w glebie przez długi czas, co może prowadzić do ich akumulacji i w perspektywie długoczasowej wywierać negatywny wpływ na środowisko (Byrne i in., 2020). Biorąc pod uwagę potencjalne zagrożenia, jakie niesie za sobą długofalowe używanie syntetycznych inhibitorów ureazy, rozpoczęto poszukiwania inhibitorów ureazy pochodzenia naturalnego, których użytkowanie powinno nieść za sobą mniejsze zagrożenia.

#### **2.4.2. Naturalne inhibitory ureazy**

Inhibitory ureazy pochodzenia naturalnego to substancje lub związki występujące w przyrodzie, które wykazują zdolność hamowania aktywności enzymu ureazy. Przykładami inhibitorów ureazy, które mogą być pozyskane z surowców roślinnych są: allicyna pozyskiwana z czosnku, kwercetyna i jej glikozydy, które mogą być pozyskane z cebuli oraz powszechnie obecne flawonoidy. Obecnie prowadzone są liczne badania nad wspomnianymi inhibitorami. Mają one na celu lepsze zrozumienie ich mechanizmów działania i potencjału zastosowań, szczególnie w kontekście związanym z rolnictwem i ochroną środowiska.

Fernando i Roberts (1976) donoszą o niemalże całkowitej inhibicji aktywności ureazy dzięki zastosowaniu ekstraktu z nasion migdałeczніка chebulowca (*Terminalia chebula*) oraz ekstraktu z kory akacji (*Accacia decurrens*). Uznaje się, że za opisane wyżej właściwości odpowiedzialne są związki z grupy polifenoli.

Allicyna jest siarkoorganicznym związkiem chemicznym o charakterystycznym zapachu, który jest pozyskiwany z czosnku. Enzym allinaza przekształca allinę w allicynę w momencie uszkodzenia tkanki czosnku. Allicyna wykazuje właściwości bakteriobójcze przeciwko licznym bakteriom, zarówno gram-ujemnym, jak i gram-dodatnim, a także przeciwgrzybiczne oraz antywirusowe (Ankri i Mirelman, 1999). Budowa strukturalna allicyny

umożliwia jej wchodzenie w reakcje z grupami -SH pochodzącymi od różnych enzymów. Dlatego właśnie podejrzewano, że allicyna może być skutecznym inhibitorem ureazy. Założenie to zostało potwierdzone w doświadczeniu, w którym zastosowano mocznik, trzy różne stężenia allicyny (5, 10, 15% wagowych allicyny względem mocznika) oraz NBPT. Spośród zastosowanych stężeń allicyny najwyższą skutecznością w hamowaniu aktywności ureazy charakteryzował się 5% roztwór. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że NBPT wykazał się o 75% lepszą skutecznością (Mathialagan i in., 2017).

W doświadczeniu opisanym przez Shabana i in. (2010) wykazano skuteczność metanolowego ekstraktu otrzymanego z cebuli w inhibicji aktywności ureazy (wyzolowanej z nasion kanawalii mieczokształtnej). Po wyizolowaniu kwercetyny oraz jej glikozydów z cebuli, zbadano ich wpływ na aktywność ureazy. Zauważono, że aktywność enzymu spadła o 53% w przypadku zastosowania kwercetyny, oraz o 48% w przypadku zastosowania awikularyny. Oba te związki należą do grupy flawonoidów.

Wybrane, komercyjnie dostępne flawonoidy (w opisywanym doświadczeniu przebadano 9 naturalnie występujących flawonoidów) zostały przebadane przez Awillia i in. (2016). Badaczom udało się uzyskać obiecujące wyniki badań, które wskazywały na to, że trzy z badanych substancji charakteryzowały się zdolnościami do hamowania aktywności enzymu ureazy (w zakresie od 86,9 do 88,8%, przy czym kwas acetohydroksamowy, zastosowany jako odniesienie wykazał 76% inhibicji ureazy). Flawonoidy to związki chemiczne zawierające w swojej strukturze grupy wodorotlenowe (-OH). Najprawdopodobniej, to właśnie grupy hydroksylowe oddziałują z atomami niklu obecnymi w centrum aktywnym ureazy powodując ich dezaktywację. Zarówno ilość grup -OH, jak i ich umiejscowienie w strukturze związków flawonowych wpływa na zdolność do hamowania aktywności ureazy.

W publikacji Wang i in. (2023) opisano skuteczność związku organicznego 2-cyklopent-1-enu (CCO) pochodzącego z rumianku (*Chamomila recutita L.*), który może hamować aktywność ureazy w glebie, a także proces nityfikacji. Pozyskany z rumianku związek chemiczny może zatem działać jako dwufunkcyjny inhibitor, który powoduje zmniejszenie strat azotu (w omawianym doświadczeniu o 32,5%) będących konsekwencją stosowania nawozów, a także zwiększenie efektywności wykorzystania azotu. Co więcej, zastosowanie CCO znacząco zmniejszyło liczebność archeonów i bakterii utleniających amoniak w glebie.

Naukowcy stale poszukują nowych źródeł inhibitorów ureazy. Z ekonomicznego punktu widzenia, najlepiej byłoby wykorzystać w tym celu pozostałości z przetwórstwa

roślinnego i /lub zwierzęcego lub odpady powstające w procesie przetwarzania. W wyniku przeprowadzonych badań, w których zbadano właściwości skórki z jabłek zauważono, że poziom inhibicji ureazy rośnie wprost proporcjonalnie do zawartości polifenoli w skórkach (Pastene i in., 2009). Podobny wniosek wysnuli Fernando i Roberts (1976), którzy w badaniach ekstrahowali związki fenolowe z czarnej herbaty, korzenia akacji oraz otoczki nasion *Terminalia chebula*.

Innym przykładem substancji, których stosowanie wykazuje pozytywny wpływ na glebę i rośliny, i które mogą być stosowane jako inhibitor ureazy, są kwasy humusowe. Kwasy humusowe są związkami organicznymi, które powstają w wyniku rozkładu resztek roślinnych, pozostałości zwierząt i mikroorganizmów, a także są produktami aktywności metabolicznej mikroorganizmów wykorzystujących powyższe substraty. Kwasy humusowe, które stanowią podstawowy składnik materii organicznej gleby są bardzo bogate w cukry, minerały, białka, aminokwasy i hormony roślinne, których obecność zwiększa zdolność sorpcyjną gleby, ułatwiając tym samym dostęp roślinom do wody i składników pokarmowych i stymulując ich wzrost. Ponadto, kwasy humusowe przyczyniają się do utrzymania stałego pH gleby. Budowa strukturalna kwasów humusowych charakteryzuje się obecnością wielu grup funkcjonalnych, których obecność przyczynia się do wysokiej pojemności wymiany kationowej oraz do hamowania aktywności ureazy w glebie (Liu i in., 2019; Zhang i in., 2019). Zastosowanie kwasów humusowych nie tylko wzbogaca glebę w substancje organiczne i mineralne, zwiększa pobieranie azotu przez rośliny, zatrzymuje rozpuszczalne w wodzie nawozy mineralne w strefie korzeniowej i zmniejsza ich wypłukiwanie, ale też poprawia dostępność składników pokarmowych i wody dla roślin, a co za tym idzie stymuluje wzrost roślin (wyższa produkcja biomasy) poprzez przyspieszanie podziałów komórek, zwiększenie stopnia rozwoju systemu korzeniowego i zwiększenie suchej masy plonu i zwiększa naturalną odporność roślin na choroby i szkodniki (Atiyeh i in., 2002; Olaetxea i in., 2021; Rose i in., 2014). Co więcej, zastosowanie kwasów humusowych w roli biostymulatorów skutkowało poprawą struktury gleby, możliwości zatrzymywania wody w glebie, a także zwiększeniem CEC oraz liczebności mikroorganizmów glebowych (Cataldo i in., 2022). Wzrost CEC gleby obserwowany po powierzchniowej aplikacji płynnych kwasów humusowych przyczynił się do zmniejszenia strat azotu (Kasim i in., 2009). Niewątpliwą zaletą wynikającą z zastosowania kwasów humusowych jest fakt, iż mogą być pozyskiwane z obornika, kompostu, ze złożu wydobywanych w kopalniach odkrywkowych, czy z pozostałości pozostałych z wydobycia węgla (Ampong i in., 2022; Garcia i in., 2019; Pereira i in., 2021; Rose i in., 2014).

Tematyka naturalnych inhibitorów ureazy jest w fazie rozkwitu. Prowadzonych jest wiele nadań naukowych, które mają na celu znalezienie substancji pochodzenia naturalnego, których użycie w połączeniu nawozem na bazie mocznika pozwoliłoby uzyskać niższą emisję amoniaku do środowiska. Co ciekawe, naturalne inhibitory ureazy znajdują zastosowanie nie tylko w sektorze rolnictwa, a również w medycynie (Biglar i in., 2012; Golbabaie i in., 2013; Mahernia in., 2015; Modolo i in., 2015).

## **2.5. Wpływ ekstraktów roślinnych na wzrost roślin i mikroorganizmy glebowe**

Ekstrakty roślinne mają znaczący wpływ na mikroorganizmy glebowe, wzrost i choroby roślin. Są one pozyskiwane z różnych części roślin, zarówno nadziemnych - takich jak liście, łodygi oraz kwiaty, jak i z części podziemnych. Zastosowanie wyciągów z roślin w rolnictwie przynosi wiele korzyści, przez co staje się coraz bardziej powszechne (Ahmad i in., 2022; Godlewska i in., 2021). W doświadczeniu, w którym sprawdzono wpływ ekstraktu z trawy morskiej na rośliny winorośli udowodniono, że aplikacja wspomnianego ekstraktu wpłynęła na lepszy wzrost korzeni, zwiększenie długości i powierzchni liści winorośli, a także polepszenie jakości i wielkości plonu o 14,7% (Cataldo i in., 2022).

Ekstrakty roślinne poprawiają właściwości fizyczne i chemiczne gleby, co prowadzi do zwiększenia możliwości produkcyjnych prowadzonej uprawy. Przykładem substancji, która wpływa na poprawę stanu gleby jest ekstrakt z liści miodły indyjskiej (*Azadirachta indica*, neem). Wyniki doświadczenia, które przeprowadzono z wykorzystaniem sałaty jako rośliny testowej wykazały, że zastosowanie ekstraktu z liści neem prowadziło do zwiększenia stężenia makroskładników (fosforu, potasu, wapnia i magnezu) oraz jonów amonowych w glebie. Zaobserwowano również spowolnienie tempa przebiegu nityfikacji oraz spadek stężenia jonów azotanowych w porównaniu z kontrolą. Ekstrakty z liści neem istotnie zmniejszyły świeżą i suchą masę pędów (i suchą masę korzeni) w porównaniu z kontrolą, co związane było ze znacznym zmniejszeniem zawartości jonów  $\text{NO}_3^-$  w tkance pędów i znacznym wzrostem zawartości jonów  $\text{NH}_4^+$  w tkankach, a także ze wzrostem zawartości glinu w glebie (Sriraj i in., 2022).

Choroby roślin są bardzo istotnym zagrożeniem dla produkcji rolnej. Mogą być one wywoływane przez fitopatogenne grzyby należące do różnych rodzajów, powodując straty ekonomiczne w rolnictwie. Udowodniono skuteczność ekstraktów otrzymywanych z roślin, których zastosowanie w uprawach może przyczynić się do zmniejszenia strat spowodowanych przez porażenie roślin szkodliwymi gatunkami grzybów. Kurkuma (*Curcuma longa*) jest uznawana za bardzo wartościową roślinę zielną stosowaną w tradycyjnej medycynie chińskiej.

Wykazano, że ekstrakty z kurkumy hamują aktywność patogenów przenoszonych przez glebę, takich jak *Fusarium graminearum* i *Alternaria alternate* (Chen i in., 2018).

Flawonoidy to związki polifenolowe obecne w roślinach, które znane są ze swoich różnorodnych funkcji biologicznych. Związki te można znaleźć w nasionach, korzeniach, kwiatach, warzywach i owocach, a także w barwnikach obecnych w roślinach - chlorofilu i karotenoidach (Dias i in., 2021; Roy i in., 2022). Udowodniono ich korzystny wpływ na wzrost aktywności dehydrogenazy, a także na regulację społeczności drobnoustrojów (Siczek i in., 2014). Flawonoidy mogą korzystnie wpływać na ryzosferę, przyciągając pożyteczne mikroorganizmy z rodzajów *Pseudomonas* i *Bacillus*, a tym samym poprawiając produktywność plonów i jakość gleby (Bag i in., 2022), a także chroniąc rośliny przed szkodnikami i chorobami. Wykazano, że w zależności od struktury flawonoidy mogą zarówno stymulować, jak i hamować ekspresję genów *Rhizobium*, pośredniczyć w oddziaływaniach allelopatycznych między roślinami, a także chelatować składniki odżywcze w glebie (Hassan i Mathesius, 2012). Związki te pełnią bardzo złożone funkcje w interakcjach zachodzących między roślinami a mikroorganizmami glebowymi. Flawonoidy mogą wykazywać właściwości inhibujące aktywność enzymów glebowych. Istnieją doniesienia naukowe mówiące zarówno o stymulującym (luteolina wydzielana przez korzenie lucerny działa jako induktor *Rhizobium meliloti*, a hesperetyna wydzielana przez korzenie grochu działa stymulująco na *Rhizobium leguminosarum*, zaobserwowano również działanie flawonoidów na zwiększenie poziomu kolonizacji mikoryzowej w korzeniach melona, poprawę sporulacji, zwiększenie wzrostu strzępek i szybkości kiełkowania arbuskularnych grzybów mikoryzowych (*Gigaspora margarita*, *Gigaspora macrocarpum* oraz *Gigaspora etunicatum*), jak i hamującym (zahamowanie sporulacji *Glomus etunicatum* i *Glomus macrocarpum* przez formonetynę oraz zahamowanie wzrostu strzępek przez galanginę) wpływie flawonoidów na mikroorganizmy glebowe (Bag i in., 2022; Jacoby i in., 2017; Jain i Nainawatee, 2002; Shah i Smith, 2020; Wang i in., 2022). Wiadomo, że związki te mogą wpływać na liczebność, aktywność i różnorodność bakterii (Cesco i in., 2012).

Co więcej, wykazano, że zastosowanie ekstraktów roślinnych ma również wpływ na zawartość barwników fotosyntetycznych, np. chlorofilu, które odgrywają kluczową rolę w procesie fotosyntezy. Zastosowanie bionawozu fosforowego w połączeniu z ekstraktem z wodorostów spowodowało zwiększenie plonów o 8,04% w pierwszym i 6,96% w drugim sezonie trwania doświadczenia w porównaniu do kontroli, do której nie aplikowano dodatków w postaci bionawozów i ekstraktu z wodorostów. Ekstrakt z wodorostów, który stosowany jest



jako nawóz organiczny wpływa na zwiększenie odporności roślin na stres abiotyczny (Vafa i in., 2022; Sharma i in., 2019).

Oceniono wpływ wyciągu z alg morskich na wzrost i plonowanie truskawek oraz społeczność drobnoustrojów w uprawach polowych i szklarniowych różnych odmian truskawki. Zastosowanie ekstraktu przyczyniło się do zwiększenia liczebności i aktywności metabolicznej bakterii w uprawach polowych. Zaobserwowano wzrost wskaźników bioróżnorodności: bogactwa gatunkowego, różnorodności i równocенności Shannona. Co więcej, zaobserwowano polepszenie wzrostu korzeni i części nadziemnych truskawek, a także zwiększanie plonu owoców po zastosowaniu ekstraktu (Alam i in., 2012).

Zastosowanie wyciągów roślinnych ma znaczący wpływ na glebę i jej mikrobiom, a także na wzrost i kondycję roślin. Wspomniane efekty są najprawdopodobniej spowodowane obecnością związków bioaktywnych w surowcach, z których pozyskiwane są ekstrakty. Ekstrakty roślinne stanowią obiecującą drogę rozwoju zrównoważonych i przyjaznych dla środowiska praktyk rolniczych.

### **3. Cel pracy i hipoteza badawcza**

Cel badań: Ocena możliwości zastosowania ekstraktów otrzymanych z surowców roślinnych wyselekcjonowanych na podstawie przeglądu literatury naukowej, które zaaplikowane łącznie z nawozem mocznikowym spowodują obniżenie emisji amoniaku z gleby. Otrzymane ekstrakty roślinne będą możliwe do zastosowania wspólnie z mocznikiem produkowanym w Grupie Azoty PUŁAWY.

#### **Cele szczegółowe obejmowały:**

1. Wybór surowców roślinnych oraz weryfikacja ich skuteczności jako inhibitorów ureazy.
2. Określenie wpływu mocznika z dodatkiem otrzymanych ekstraktów roślinnych na emisję amoniaku, aktywność ureazy a także zawartość form azotu (N ogólny, formy amonowa i azotanowa) w glebie w doświadczeniu inkubacyjnym.
3. Zbadanie wpływu mocznika z dodatkiem otrzymanych substancji pochodzenia roślinnego na emisję amoniaku, aktywność ureazy oraz zawartość form azotu w glebie w doświadczeniu wazonowym z pszenicą jarą.
4. Ocenę wpływu nawożenia mocznikiem z dodatkiem ekstraktów z roślin na wzrost roślin pszenicy (biomasa, zawartość makroskładników i chlorofilu, tempo fotosyntezy).
5. Ocenę wpływu mocznika z dodatkiem wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych na mikroorganizmy glebowe (liczebność oraz skład taksonomiczny bakterii i grzybów).

Hipoteza badawcza: Zastosowanie ekstraktów roślinnych razem z mocznikiem pozwoli na redukcję emisji amoniaku o co najmniej 20% w porównaniu do kontroli – nawozu bez dodatku substancji pochodzenia roślinnego. Efekt na plonowanie roślin po zastosowaniu ekstraktów roślinnych razem z mocznikiem będzie co najmniej taki sam, jaki uzyskuje się po aplikacji samego mocznika. Aplikacja ekstraktów roślinnych wraz z mocznikiem do gleby wpływa na zmiany liczebności i składu taksonomicznego oraz bioróżnorodności bakterii i grzybów.

## 4. Metodyka badań

### 4.1. Ekstrakty roślinne badane w doświadczeniach

Do badań wytypowano następujące owoce, które zgodnie z informacjami uzyskanymi z dostępnej literatury naukowej charakteryzowały się wysoką zawartością związków polifenolowych: malina (*Rubus* L.), borówka (*Vaccinium* L.), jeżyna (*Rubus* L.) oraz morwa czarna (*Morus nigra* L.) (Awllia i in., 2016; Li i in., 2017; Lopez-Corona i in., 2022). Świeże owoce maliny, borówki i jeżyny zostały zakupione od lokalnego producenta, zostały one zamrożone w temperaturze  $-18^{\circ}\text{C}$  i w takiej formie były przechowywane przez okres 3 miesięcy do czasu rozpoczęcia badań. Morwa czarna została zakupiona w formie suszonych owoców (BioPlanet, Polska). Dodatkowo, w przeprowadzonych badaniach przetestowano działanie allicyny, która była wykorzystana w opisanych w literaturze naukowej badaniach poświęconych inhibitorom ureazy (Mathialagan i in., 2017). W tym celu wykorzystano komercyjnie dostępny suplement diety ALLICIN MAX (Allimax International Limited, Wielka Brytania) w postaci kapsułek (180 mg allicyny w 1 kapsułce). Zawartość jednej kapsułki preparatu ALLICIN MAX została rozpuszczona w 20 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (16 ml metanolu i 4 ml wody, tak aby zachować stosunek metanol:woda 8:2).

Do otrzymania ekstraktów roślinnych z owoców zastosowano ekstrakcję alkoholową, która jest wiodącą metodą ekstrakcji stosowaną w przypadku owoców o wysokiej zawartości związków polifenolowych (Bar i in., 2022). Wybór ekstrakcji alkoholowej jako metody ekstrakcji stosowanej w prowadzonych badaniach podyktowany był doniesieniami literaturowymi mówiącymi o tym, że w celu wyekstrahowania jak największej ilości związków polifenolowych z surowca należy użyć metanolu bądź etanolu jako ekstrahenta (Al.-Mamun i in. 2016; Bar i in. 2022; Budiman i in., 2017). Również Rana (2021) rozważał słuszność wyboru metanolu jako ekstrahenta w prowadzonym eksperymencie. Przed procesem ekstrakcji świeże owoce zostały poddane suszeniu. Owoce suszono w suszarce w dwóch etapach: pierwszy etap obejmował suszenie w temperaturze  $80^{\circ}\text{C}$ , drugi w temperaturze  $100^{\circ}\text{C}$  (oba etapy trwały 24 godziny). Suszone owoce morwy czarnej nie były poddawane procesowi dodatkowego suszenia. Zgodnie z metodyką ekstrakcji alkoholowej do naczyń ekstrakcyjnych naważono 1 g suchych i rozdrobnionych owoców i zalano mieszaniną ekstrakcyjną – metanol : woda (zmieszany w stosunku objętościowym 8:2). Zachowano przy tym proporcję, tak aby na każde 0,5 g suszonych owoców przypadało 10 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (Mahernia i in., 2015). Naczynie, w którym prowadzono proces ekstrakcji uszczelniono parafilmem i inkubowano w cieplarni w temperaturze  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  przez 24 godziny. Po tym czasie

ekstrakt przesączono przy użyciu zestawu składającego się z pompy próżniowej oraz lejka Buchnera w celu oddzielenia 2 frakcji: stałej i ciekłej. Do sączenia wykorzystano sączki Sartolon Polyamid (Sartorius, Niemcy) o wielkości porów 0,45  $\mu\text{m}$ . Otrzymane ekstrakty przechowywano w temperaturze  $5\pm 1^\circ\text{C}$  do czasu ich dalszego wykorzystania.

#### 4.1.1. Analizy ekstraktów roślinnych

Uzyskane ekstrakty roślinne w stężeniach: 5%, 10%, 25% i 100% oraz allicyna (preparat ALLICIN MAX) zostały przebadane pod kątem zdolności do hamowania aktywności enzymu ureaza. W tym celu do próbki dodano 1,35 ml buforu fosforanowego (pH 7,4), następnie dodano 0,05 ml ureazy (10U) (Sigma-Aldrich, USA) oraz 0,1 ml ekstraktu w badanych stężeniach lub roztworu allicyny. Mieszaninę inkubowano w  $37^\circ\text{C}$  przez 5 min. Po tym czasie do roztworu dodano 0,5 ml 0,72 M roztworu mocznika. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w  $37^\circ\text{C}$  przez 30 min. Do nowej próbki pobrano 1 ml mieszaniny reakcyjnej i dodano kolejno 9 ml wody, 5 ml odczynnika A, 2 ml roztworu dichlorocyjanuranu sodu. Całość inkubowano w  $37^\circ\text{C}$  przez 30 min. W próbie ślepej 1 ml mieszaniny reakcyjnej zastąpiono 1 ml wody destylowanej. Zmierzono absorbancję próbek na spektrometrze UV-Vis przy długości fali  $\lambda=690\text{ nm}$ . Oznaczenie wykonano w 3 powtórzeniach.

Dodatkowo, w przypadku ekstraktów o stężeniach: 5%, 10% i 25% otrzymanych z owoców morwy, maliny, jeżyny i borówki oznaczono całkowitą zawartość związków polifenolowych przy wykorzystaniu odczynnika Folina-Ciocalteu. W tym celu do kolb miarowych o pojemności 10 ml dodano 4 ml wody destylowanej i 0,5 ml badanych ekstraktów. Następnie do każdej kolby dodano 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu i wymieszano. Po upływie 2 minut dodano 2 ml 20% roztworu węglanu sodu. Kolby uzupełniono wodą destylowaną do objętości 10 ml, wymieszano, a następnie inkubowano w temperaturze  $40^\circ\text{C}$  przez 30 min. W próbie ślepej 0,5 ml badanego ekstraktu zastąpiono 0,5 ml wody destylowanej. Zmierzono absorbancję próbek przy długości fali  $\lambda=760\text{ nm}$ . Oznaczenie wykonano w 3 powtórzeniach. Całkowitą zawartość związków polifenolowych wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej dla kwasu galusowego. Roztwory do wykonania krzywej wzorcowej przygotowano na bazie roztworu roboczego kwasu galusowego (w wodzie) o stężeniu  $2\text{ g l}^{-1}$ .

## 4.2. Charakterystyka gleb użytych w doświadczeniu

W przeprowadzonych doświadczeniach (inkubacyjnym i wazonowym) wykorzystano dwa typy gleby. Pierwszy, gleba płowa o składzie granulometrycznym gliny piaszczystej pochodził z pola doświadczalnego znajdującego się na terenie Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie (IA PAN), województwo lubelskie. Gleba charakteryzowała się odczynem kwaśnym (pH w KCl 5,4), bardzo wysoką zawartością przyswajalnych form fosforu (20,4 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g gleby), średnią zawartością potasu (11,8 mg K<sub>2</sub>O/100 g gleby) i bardzo wysoką zawartością magnezu (7,3 mg K<sub>2</sub>O/100 g gleby), zawartość substancji organicznej wynosiła 1,64% powietrznie suchej masy gleby, a zawartość azotu ogólnego 0,82 mg kg<sup>-1</sup>.

Drugi typ gleby, gleba bielkowa o składzie granulometrycznym piasku gliniastego został pobrany z pól doświadczalnych Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowego Instytutu Badawczego w Grabowie nad Wisłą (RZD IUNG-PIB), województwo mazowieckie. Gleba charakteryzowała się odczynem zasadowym (pH w KCl 7,4), średnią zawartością przyswajalnych form fosforu (14,8 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g gleby), niską zawartością potasu (8,2 mg K<sub>2</sub>O/100 g gleby) oraz średnią zawartością magnezu (4,1 mg K<sub>2</sub>O/100 g gleby), zawartością substancji organicznej wynosiła 2,24% powietrznie suchej masy gleby, a zawartość azotu ogólnego na poziomie 0,80 mg kg<sup>-1</sup>.

Glebę pobrano wiosną z warstwy 0-20 cm. Materiał glebowy przed wykorzystaniem w doświadczeniach został przesiany przez sita o średnicy oczek 2 mm w celu usunięcia drobnych kamieni, a także niepożądanych pozostałości roślinnych, takich jak korzenie oraz zeschnięte części roślin.

## 4.3. Doświadczenie inkubacyjne

Doświadczenie inkubacyjne prowadzono przez 14 kolejnych dni w Instytucie Agrofizyki PAN. Przygotowano cylindry wykonane z poli(chlorku winylu) (PVC) o średnicy 15 cm i wysokości 30 cm, które wypełniono glebą o gęstości 1,3 g cm<sup>-3</sup> i wilgotności wagowej: gleba płowa 18% i gleba bielkowa 14% do wysokości 20 cm. Dodatkowo przygotowano cylindry przeznaczone do poboru gleby do oznaczeń enzymatycznych. Doświadczenie przeprowadzono w następujących terminach 12.04 – 25.04.2021 na glebie płowej, 29.03-11.04.2021 na glebie bielkowej. W doświadczeniu zbadano łącznie 8 obiektów, każdy

w 4 powtórzeniach (tabela 2). Każdy z 8 obiektów był testowany zarówno na glebie płowej, jak i bielicowej.

Tabela 2 Obiekty w doświadczeniu inkubacyjnym

	Nazwa obiektu
1	kontrola
2	NBPT
3	borówka 10%
4	borówka 25%
5	malina 10%
6	malina 25%
7	morwa 10%
8	morwa 25%

Do każdego wazonu zaaplikowano granulowany mocznik. W przeprowadzonym doświadczeniu inkubacyjnym zastosowano stosunkowo wysoką dawkę azotu, co umożliwiło zaobserwowanie różnic w emisji  $\text{NH}_3$  pomiędzy poszczególnymi obiektami. Nawóz aplikowano w maksymalnej dopuszczalnej dawce  $240 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Do wazonów zaaplikowano ekstrakty roślinne uzyskane z owoców borówki, maliny i morwy czarnej, każdy w dwóch stężeniach: 10% i 25% i objętości 45 ml. Wyboru ekstraktów (oraz ich stężeń) użytych w doświadczeniu inkubacyjnym dokonano na podstawie wyników uzyskanych z wcześniej przeprowadzonej oceny zdolności do hamowania aktywności enzymu ureaza. Dodatkowo, przygotowano wazon, do których zaaplikowano mocznik otoczkowany triamidem kwasu N-(n-butylo) tiofosforowego (NBPT) w stężeniu 680 ppm, dzięki czemu możliwe było porównanie właściwości badanych ekstraktów roślinnych z komercyjnie dostępnym inhibitorem ureazy NBPT.

Najpierw z cylindra zebrano 2-centymetrową warstwę gleby i możliwie równomiernie rozprowadzono granule mocznika, które przykryto cienką warstwą uprzednio zebranej gleby. Następnie zaaplikowano 45 ml ekstraktu i przykryto pozostałą glebą. W obiektach, do których zaaplikowano sam mocznik (obiekty kontrolnych) oraz mocznik z dodatkiem NBPT, zaaplikowano dodatkowo po 45 ml wody.

W trakcie prowadzenia doświadczenia utrzymywano stałą wilgotność podłoża odpowiadającą wartości siły ssącej gleby (pF) 1,9. Pomiaru siły ssącej gleby dokonano przy użyciu tensjometru. Kontrola wilgotności polegała na utrzymywaniu stałej masy wazonu i uzupełnianiu jej ubytków wodą co 48 godzin. Temperatura otoczenia mieściła się w zakresie 19-23°C.

#### 4.3.1. Pomiar emisji amoniaku z gleby

Pomiar emisji amoniaku przeprowadzono w układzie zamkniętym, który składał się z wazonu wypełnionego glebą do 20 cm wysokości oraz kopuły pomiarowej o średnicy 15 cm i wysokości 15 cm. Pomiaru prowadzono codziennie o tej samej porze przez 13 kolejnych dni. Komora pomiarowa była wyposażona w termometr, końcówkę sondy pomiarowej analizatora GASMET DX4040 (ENVAG, Niemcy) oraz wentylator, który wymuszał ujednorodnienie składu powietrza wewnątrz komory. Zarówno wazon, jaki i komora pomiarowa wykonane były z poli(chlorku winylu) (PVC). Układ uszczelniono za pomocą gumowej uszczelki. Przewody łączące komorę pomiarową z analizatorem GASMET DX4040 wykonane były z teflonu, dodatkowo wyposażono je w filtr dyskowy, który stanowił zabezpieczenie przed przedostaniem się niepożądanych drobnych cząstek stałych do komory pomiarowej aparatu.



Rysunek 4 Analizator gazów GASMET DX 4040

Analizator gazów GASMET DX4040 (Rysunek 4) umożliwia pomiar stężenia  $\text{NH}_3$  w zakresie od 0 do 100 ppm. Zasada jego działania opiera się na zdolności wieloatomowych cząstek gazu do pochłaniania promieniowania podczerwonego. Aparat wykorzystuje metodę FTIR (ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy), czyli spektroskopię fourierowską w podczerwieni. Urządzenie prowadzi jednoczesny pomiar całego spektrum gazów, które następnie poddawane są analizie przez komputer wyposażony w oprogramowanie CALCMET. W bibliotece urządzenia znajdują się widma poszczególnych gazów, do których porównywane są obrazy uzyskane w wyniku prowadzonych pomiarów (Daéid, 2005).

Układ pomiarowy wykorzystany w doświadczeniu inkubacyjnym umożliwił prowadzenie pomiarów w czasie rzeczywistym. Pomiar z każdego wazonu trwał niecałe 4 minuty i obejmował 15 odczytów, każdy co 15 sekund. Odczyty uzyskane w toku pomiarów zostały przeliczone na strumienie emisji amoniaku wyrażone w jednostce  $\text{mg m}^{-2} \text{h}^{-1}$ .

#### **4.3.2. Analiza aktywności ureazy w glebie**

Aktywność enzymu ureaza oznaczono spektrofotometrycznie metodą Zantua i Bremner (1977). W tym celu naważono 5 g uprzednio przesianej na sicie o średnicy 2 mm gleby. Do każdej próbki dodano 0,75 ml toluenu i odczekano 15 minut. Po tym czasie do próbek badanych dodano 5 ml roztworu mocznika, a do próbek kontrolnych 5 ml wody destylowanej. Próbki inkubowano przez 18 godz. w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Do próbek dodano 25 ml 0,03 M kwasu octowego i najpierw je wytrząsano przez 20 minut, a następnie wirowano z prędkością 4000 obr/min przez 10 min. Pobrano 1 ml przesączu, do którego dodano 1 ml winianu sodowo-potasowego, 1 ml odczynnika Nesslera i uzupełniono wodą destylowaną do objętości 50 ml. W próbie ślepej 1 ml przesączu zastąpiono 1 ml winianu sodowo-potasowego. Zmierzone absorbancję próbek przy długości fali  $\lambda=410 \text{ nm}$ , a wyniki przeliczono na  $\text{mg N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ suchej masy gleby h}^{-1}$ .

Gleba do analizy aktywności ureazy została pobrana w terminach, kiedy odnotowano wysoką emisję amoniaku. Próbki do analizy zostały pobrane z warstwy 0-5 cm w 2, 6, 7, 8 i 12 dniu trwania doświadczenia z glebą płową oraz w 3, 4, 6, 8 i 12 dniu trwania doświadczenia z glebą biellicową. Przesunięcie terminów poboru próbek między oboma doświadczeniami wynikały z obserwowanych w trakcie prowadzenia pomiarów różnic emisji amoniaku. Analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach.



### 4.3.3. Analiza zawartości azotu w glebie

Z każdego wazonu pobrano próbki gleby z dwóch warstw profilu (0-10 cm i 10-20 cm). W celu oznaczenia zawartości azotu ogólnego metodą Kjeldahla w pobranych próbkach gleby przeprowadzono mineralizację na gorąco w stężonym kwasie siarkowym z dodatkiem perhydrolu. Dodatkowo, w pobranych próbkach gleby przeprowadzono oznaczenie zawartości przyswajalnych form azotu (N-NH<sub>4</sub> i N-NO<sub>3</sub>) metodą ciągłej analizy przepływowej (CFA) z detekcją spektrofotometryczną, które zostało poprzedzone ekstrakcją 1% roztworem K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Opisanie wyżej analizy zawartości azotu w próbkach gleby zostały wykonane w Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Lublinie.

### 4.4. Doświadczenie wazonowe

Doświadczenie wazonowe prowadzono w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie przez okres 67 dni w okresie od czerwca do sierpnia 2022, do fazy kłoszenia pszenicy. Cylindry wykonane z PVC o średnicy 15 cm i wysokości 30 cm wypełniono glebą do wysokości 27 cm. W doświadczeniu wykorzystano opisanie wcześniej (podrozdz. 3.2.) dwa typy gleby o gęstości 1,3 g cm<sup>-3</sup>.

Przed siewem pszenicy zastosowano nawożenie uzupełniające makroskładnikami (K, P, Mg) mające na celu uzupełnienie niedoborów występujących w wykorzystywanym do doświadczenia materiale glebowym. Dawki ustalono na podstawie przeprowadzonych wcześniej analiz zawartości przyswajalnych form tych składników w glebie. Odczyn gleby doprowadzono do pożądanego poziomu (zgodnie z zaleceniami, pH gleby przygotowanej pod wysiew pszenicy powinien się mieścić w zakresie 6,5-7,0). W tym celu zaaplikowano wapno granulowane firmy SUMIN, w którym wapń występuje w postaci CaCO<sub>3</sub>. Rośliną testową była pszenica jara odmiany Rusalka uzyskana z Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o., Grupa IHAR. Charakterystycznymi cechami tej odmiany pszenicy są stabilne plonowanie oraz wczesny termin kłoszenia. Ilość ziaren została wyliczona na podstawie optymalnej gęstości siewu zalecanej przez Producenta wynoszącej od 450 do 550 kielkujących ziaren na m<sup>2</sup>. Ziarna (w ilości 13 na każdy wazon) zaaplikowano na głębokość 3 cm i przykryto glebą. Po wschodach usunięto nadmiarową ilość siewek, pozostawiając 8 w każdym z wazonów.

W doświadczeniu wazonowym zastosowano nawożenie mocznikiem w ilości 140 kg N ha<sup>-1</sup>, które podzielono na 2 dawki. Pierwsza dawka azotu (90 kg N ha<sup>-1</sup>) została zaaplikowana przedsięwzięcie łącznie z badanymi ekstraktami roślinnymi 25% ekstraktem

z borówki suszonej oraz 10% ekstraktem z morwy czarnej suszonej (objętość ekstraktu wynosiła 17,5 ml), drugą dawkę nawozu ( $50 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) zaaplikowano w fazie strzelania w źdźbło łącznie z ekstraktem (10 ml). Aplikacja pierwszej dawki ekstraktów została przeprowadzona w analogiczny sposób jak miało to miejsce w doświadczeniu inkubacyjnym. Z cylindra zebrano 2-centymetrową warstwę gleby i równomiernie rozprowadzono granule mocznika, które przykryto cienką warstwą uprzednio zebranej gleby. Następnie zaaplikowano 17,5 ml ekstraktu i przykryto pozostałą glebą. Drugą dawkę nawozu oraz ekstraktu zaaplikowano na powierzchni gleby. W wazonach kontrolnych (nawożonych mocznikiem) zastąpiono ekstrakty równoważną objętością wody. Wybór ekstraktów użytych w doświadczeniu wazonowym został dokonany po przeanalizowaniu wyników uzyskanych w doświadczeniu inkubacyjnym. Wybrano 25% ekstrakt z borówki, którego zastosowanie spowodowało największe obniżenie skumulowanej emisji amoniaku na glebie płowej oraz 10% ekstrakt z morwy czarnej, który okazał się najbardziej efektywny na glebie biellicowej.

Doświadczenie prowadzono w kontrolowanych warunkach temperatury i oświetlenia. W terminie 5.06-29.06.2022 temperatura w ciągu dnia utrzymywana była na poziomie  $22^{\circ}\text{C}$ , w ciągu nocy wynosiła  $16^{\circ}\text{C}$ . W tym terminie długość dnia i nocy wynosiła 12 godzin. Przez okres kolejnych 42 dni temperatura w ciągu dnia wynosiła  $24^{\circ}\text{C}$ , a w nocy  $18^{\circ}\text{C}$ . Długość dnia i nocy wynosiła odpowiednio 14 godzin i 10 godzin. Wilgotność gleby utrzymywana była na stałym poziomie (wilgotność wagowa dla gleby płowa 18% i gleby biellicowej 14%, analogicznie jak w doświadczeniu inkubacyjnym), co kontrolowano poprzez uzupełnianie wodą ubytków masy poszczególnych wazonów co 48 godzin. Dodatkowo, w celu zapewnienia jednorodnego wpływu ewentualnych zmian parametrów oświetlenia i temperatury co 48 godzin w sposób losowy zmieniano położenie wazonów. W doświadczeniu wazonowym zbadano łącznie 6 obiektów, każdy w 4 powtórzeniach (Tabela 3).

Tabela 3 Obiekty w doświadczeniu wazonowym

	Nazwa obiektu
	Gleba płowa
1	kontrola
2	borówka 25%
3	morwa czarna 10%
	Gleba bielkowa
4	kontrola
5	borówka 25%
6	morwa czarna 10%

Dodatkowo przygotowano wazony do poboru próbek glebowych przeznaczonych do oznaczeń aktywności ureazy.

#### **4.4.1. Analizy gleby**

##### Pomiar emisji amoniaku

Pomiary emisji amoniaku rozpoczęto 06.06.2022 i prowadzono je zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.3.1 przez okres 13 dni.

##### Aktywność ureazy

Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w podrozdz. 4.3.2. Próbki gleby pobrano w 4, 9, 18, 47 i 76 dniu trwania doświadczenia wazonowego. Analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

##### Oznaczenia zawartości azotu w glebie

Oznaczenie zawartości azotu ogólnego, azotu azotanowego i amonowego w próbkach gleby przeprowadzono w Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Lublinie zgodnie z metodyką opisaną w podrozdz. 4.3.3. Próbki gleby zostały pobrane bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia, z trzech warstw: 0-6 cm, 6-11 cm oraz 11-27 cm. Analizy przeprowadzono w czterech powtórzeniach.

#### **4.4.2. Analizy mikrobiomu**

Próbki gleby przeznaczone do analizy mikrobiomu (bakterie i grzyby) pobrano ostatniego, 67. dnia doświadczenia wazonowego, z warstwy 0-10 cm i przechowywano je w temp -20°C przed rozpoczęciem analiz. Wszystkie wymienione niżej analizy mikrobiomu (izolacja DNA, NGS, analiza bioinformatyczna) zostały przeprowadzone przez Genomed S.A. w Warszawie.

##### Izolacja DNA

DNA z próbek gleby zostało wyizolowane przy użyciu zestawu do izolacji DNA genomowego Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). Wyizolowane DNA zawieszono w wodzie wolnej od nukleaz, a następnie oczyszczono za pomocą zestawu Anty-Inhibitor Kit (A&A Biotechnology, Polska). Stężenie DNA zmierzono fluorymetrycznie z użyciem barwnika PicoGreen w próbkach o objętości 45 µl.

##### Sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS)

Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS) umożliwia wyodrębnić i porównać zbiorowiska bakterii i grzybów. Analizę metagenomiczną bakterii i grzybów przeprowadzono na bazie odpowiednio hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16S rDNA oraz ITS1. Do amplifikacji regionu V3-V4 16 S rDNA użyto starterów 341F (5' – TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG) oraz 785R (5' – GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C), a do amplifikacji regionu ITS1 użyto starterów ITS1FI2 (5' – TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GAA CCW GCG GAR GGA TCA) oraz 5.8S (5' – GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GCG CTG CGT TCT TCA TCG). Te specyficzne sekwencje primerów zostały również wykorzystane do przygotowania biblioteki, a do przeprowadzenia reakcji PCR użyto Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (Biolabs, Nowa Anglia). Warunki reakcji PCR obejmowały etap początkowej denaturacji w 95°C przez 3 minuty, następnie 25 cykli: 95°C przez 30 sekund, 55°C przez 30 sekund i 75°C przez 30 sekund i ostatni etap w temperaturze 72°C trwający 5 minut. Sekwencjonowanie wykonano na aparacie MiSeq przy użyciu zestawu v3 Illumina (Illumina, USA) stosując technologię odczytów sparowanych (ang. paired-end, PE) 2 x 300 par zasad. Przeprowadzono również automatyczną wstępną analizę danych na sekwenatorze MiSeq

przy użyciu oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6, która obejmowała automatyczne demultipleksowanie próbek oraz wygenerowanie plików fastq zawierających surowe odczyty.

#### Analiza bioinformatyczna

Przeprowadzono analizę bioinformatyczną, która umożliwiła sklasyfikowanie odczytów do odpowiednich poziomów taksonomicznych. W tym celu wykorzystano oprogramowanie QIIME (grzyby) oraz QIIME 2 (bakterie) wraz z bazą sekwencji referencyjnych UNITE v8.2 (grzyby) i Silva 138 (bakterie), dodatkowo w przypadku analizy bakterii wykorzystano pakiet DADA2, dzięki któremu udało się zarówno wyszczególnić sekwencje pochodzenia biologicznego od tych, które nowo powstały w procesie sekwencjonowania, jak i wyodrębnić unikalne sekwencje biologicznego pochodzenia ASV (ang. amplicon sequence variant). W przypadku grzybów wyodrębniono OTU (operacyjne jednostki taksonomiczne, ang. operational taxonomic units).

Specyficzne i wspólne dla badanych obiektów doświadczalnych gatunki mikroorganizmów przedstawiono na wykresach Venn. Wyniki zostały wygenerowane na podstawie procentu udziału liczby zliczeń danego taksonu w stosunku do sumy zliczeń wszystkich taksonów w danej próbce (relative abundance). Dane do analizy musiały spełniać następujące kryteria:

- próbki, których wartość relative abundance była niższa niż 0,1% nie zostały uwzględnione w analizie,
- założenie, że aby zaklasyfikować daną grupę doświadczalną do danego taksonu, dwa z trzech powtórzeń musiały wykazywać obecność tego taksonu.

#### **4.4.3. Analizy roślin**

##### Oznaczenie zawartości chlorofilu w próbkach roślinnych

Zawartość chlorofilu w liściach pszenicy oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu aparatu CCM 300 (OPTI-SCIENCES, USA). Urządzenie (Rysunek 5) przeprowadza pomiar fluorescencji chlorofilu przy długości fal 735 nm i 700-710 nm. Zakres pomiarowy urządzenia zawiera się między 41 a 675 mg m<sup>-2</sup>. Aparat CCM 300 umożliwia przeprowadzenie natychmiastowych, nieinwazyjnych pomiarów.



Rysunek 5 Chlorofilomierz CCM 300

Pomiary zawartości chlorofilu przeprowadzono w 2 terminach: w 24. dniu doświadczenia, w fazie krzewienia pszenicy (BBCH 20-29) oraz w 67 dniu. eksperymentu, w fazie kłoszenia pszenicy (BBCH 50-59), na drugim w pełni wykształconym liściu. Każdy pomiar przeprowadzono w 4 powtórzeniach.

#### Pomiar intensywności fotosyntezy

Pomiar intensywności fotosyntezy został przeprowadzony przy użyciu zestawu pomiarowego DualPAM 100 i GFS-300 (Heinz Walz GmbH, Niemcy) przedstawianego na Rysunku 6. Pomiary wymiany gazowej opierały się na zasadzie, zgodnie z którą zmiany stężeń  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  są określane gdy powietrze przechodzi przez komorę pomiarową, wewnątrz której znajduje się liść. Zastosowanie przenośnego systemu wymiany gazowej i fluorescencji GFS-300 umożliwiało dokładną kontrolę warunków prowadzonych pomiarów. Możliwe było kontrolowanie takich parametrów jak:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , temperatura, światło, wentylacja i przepływ.

Pomiary przeprowadzono w fazie kłoszenia pszenicy, tj. w 67 dniu trwania doświadczenia. Pomiary prowadzone były przy stężeniu  $\text{CO}_2$  wynoszącym 440 ppm, stężeniu  $\text{H}_2\text{O}$  wynoszącym 16000 ppm i strumieniu światła aktywnego fotosyntetycznie na poziomie 150  $\mu\text{E}$ . Wilgotność powietrza wynosiła ok. 60%, a temperatura w komorze pomiarowej wynosiła 22°C. Seria pomiarowa dla każdej próbki trwała około 130 sekund i obejmowała 10 pomiarów. Wykonano 3 serie pomiarowe dla każdego badanego obiektu. Układ pomiarowy był przepłukiwany między kolejnymi seriami pomiarowymi przez okres 60 sekund. Każdy pomiar przeprowadzono w 4 powtórzeniach.



Rysunek 6 Zestaw pomiarowy DualPAM 100 i GFS-300 do pomiaru intensywności fotosyntezy

### Oznaczenie masy roślin

Po zakończeniu doświadczenia wazonowego określono plon świeżej masy części nadziemnych roślin oraz zawartość suchej masy roślin z wykorzystaniem metody suszarkowo-wagowej (70°C).

### Oznaczenie zawartości makroskładników w materiale roślinnym

Zawartość makroskładników (N, P, K, Ca i Mg) w materiale stanowiącym części nadziemne roślin oznaczono po mineralizacji na mokro w stężonym kwasie siarkowym z dodatkiem utleniacza w postaci nadtlenku wodoru. Do oznaczeń zawartości azotu wykorzystano metodą Kjeldahla, fosfor oznaczono spektrofotometrycznie metodą wanadowo-molibdenową, potas i wapń oznaczono przy wykorzystaniu metody emisyjnej spektrofotometrii atomowej, a magnez metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Oznaczenia zostały przeprowadzone w Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Lublinie.

#### 4.5. Analiza statystyczna

W celu analizy i oceny uzyskanych wyników wykorzystano podstawowe metody statystyczne. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W celu sprawdzenia normalności rozkładu wykorzystano test Shapiro-Wilka, test Levene'a przeprowadzono w celu sprawdzenia jednorodności wariancji. Do określenia istotności różnic ( $p < 0,05$ ) pomiędzy poszczególnymi obiektami zastosowano test Tukeya.

W celu określenia wpływu zastosowanych ekstraktów roślinnych na zróżnicowanie zbiorowisk drobnoustrojów obliczono następujące wskaźniki bioróżnorodności: bogactwo gatunków, równości Pielou, odrębność taksonomiczną oraz wskaźniki Margalefa, Shannona i Simpsona. Ponadto przeprowadzono analizę skupień (Cluster analysis) z zastosowaniem metody średnich połączeń. W tym celu dane dotyczące liczebności mikroorganizmów (bakterii i grzybów) uprzednio standaryzowano i transformowano (pierwiastek kwadratowy), a następnie utworzono macierz podobieństwa Bray-Curtisa. Ponadto przeprowadzono test SIMPROF aby ocenić, które z utworzonych na dendrogramie skupień różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ) (Clarke i in., 2014). Przeprowadzono również permutacyjną wieloczynnikową analizę wariancji (PERMANOVA) (podano wartości F i p) aby ocenić, czy zastosowane ekstrakty oraz typ gleby miały istotny wpływ na skład zbiorowisk bakterii i grzybów.

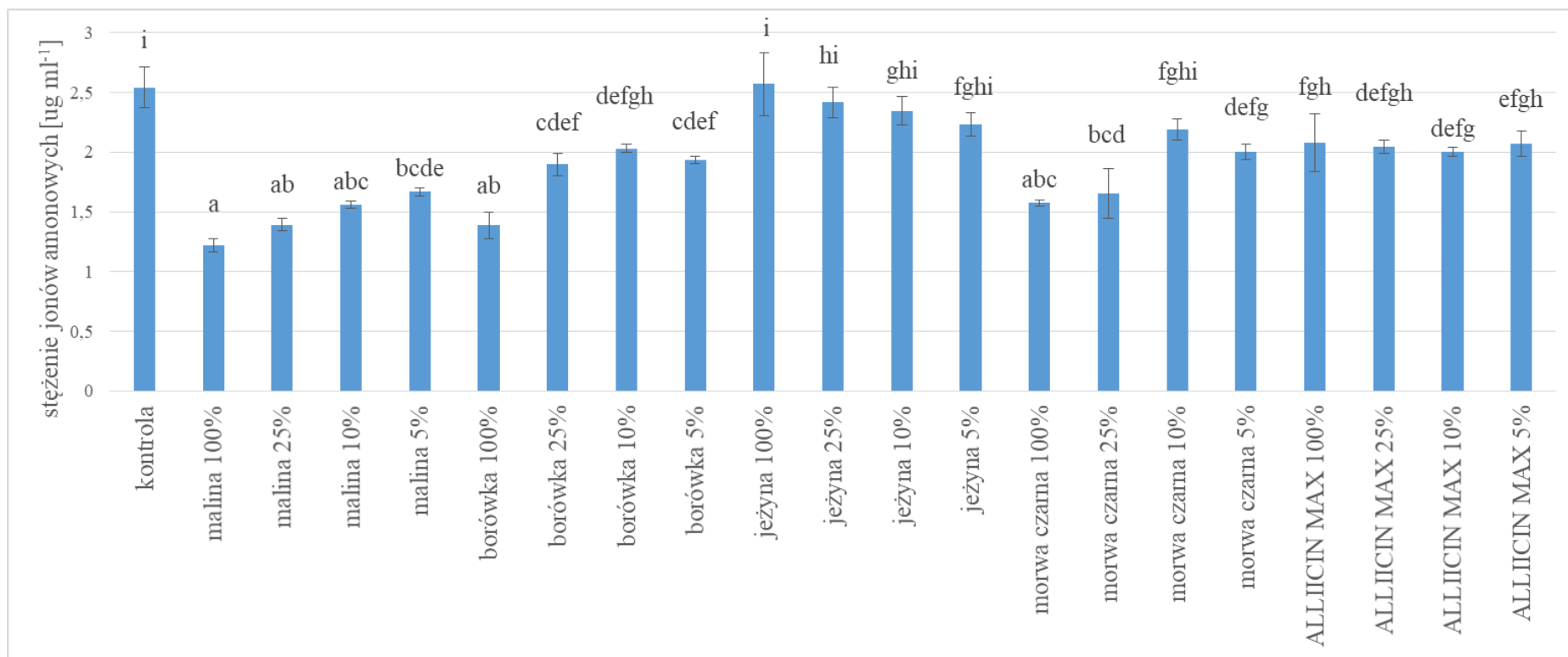
Analizy statystyczne wyników przedstawionych w rozprawie wykonano z wykorzystaniem programów Statistica ver. 10 (StatSoft, Polska), PRIMER 7 z PERMANOVA+ (PRIMER-e, Nowa Zelandia) oraz RStudio (RCore Team, Austria) (pakiety: eulerr, microbiome, microbiomeutilities oraz phyloseq).



## 5. Wyniki

### 5.1 Badania wstępne – pomiar inhibicji ureazy oraz zawartości związków polifenolowych

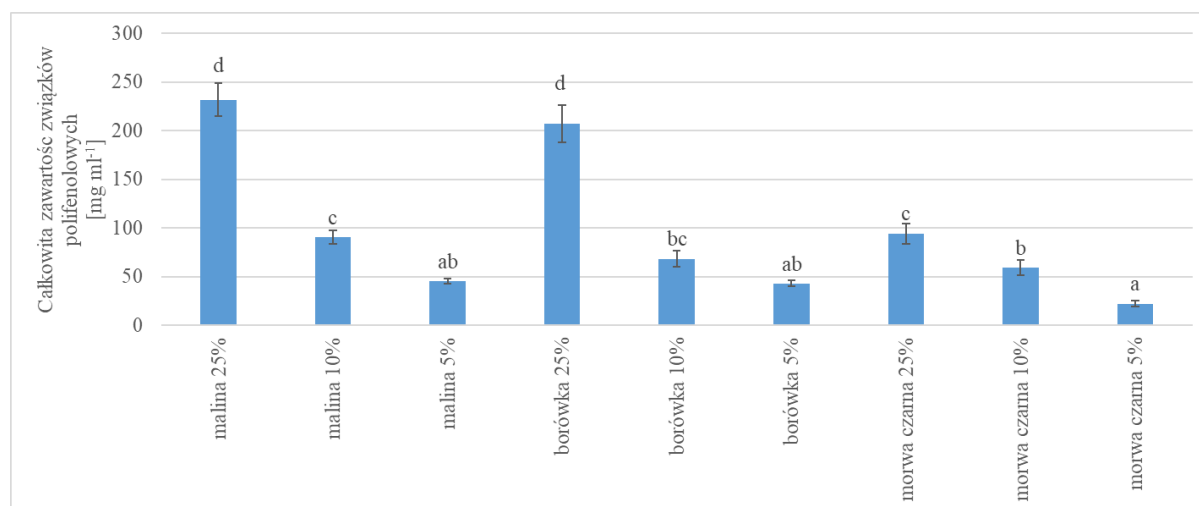
Po zapoznaniu się z dostępną literaturą naukową poruszającą tematykę inhibitorów enzymu ureazy pochodzenia roślinnego przeprowadzono badania wstępne z wykorzystaniem wybranych ekstraktów pochodzenia roślinnego mające na celu sprawdzenie ich zdolności do hamowania aktywności ureazy. W tym celu przeprowadzono oznaczenie z wykorzystaniem metody opisanej w podrozdz. 4.1.1. Wyniki zaprezentowano na Rysunku 7. Pożądanym efektem wynikającym z zastosowania ekstraktów otrzymanych z suszonych roślin było uzyskanie niższego stężenia jonów amonowych w badanych próbkach w porównaniu do stężenia uzyskanego w próbkach kontrolnych (mocznik bez dodatku ekstraktów). Istotnie niższe stężenie jonów amonowych uzyskano w większości próbek, z wyjątkiem próbek z ekstraktem z jeżyny (wszystkie analizowane stężenia) oraz w próbkach z ekstraktem z morwy czarnej w stężeniu 10%. Największy poziom redukcji stężenia jonów amonowych w badanych próbkach względem kontroli zaobserwowano w 100% ekstrakcie z maliny, wynosił on 52%. Kolejno, najbardziej efektywnymi ekstraktami owocowymi okazały się borówka 100% i malina 25% (redukcja o 45%), malina 10% i morwa czarna 100% (odpowiednio 39% i 38%). Pozostałymi ekstraktami, które wykazywały zdolności do hamowania aktywności ureazy były: malina 5% (34%), borówka 5%, 10% i 25% (odpowiednio 24%, 20% i 25%), morwa czarna 25% (35%) oraz komercyjnie dostępny preparat zawierający allicynę ALLICIN MAX we wszystkich badanych stężeniach (19-21%). Ekstrakty z maliny (10-100%), borówki (100%) i morwy (100%) wykazały większą (statystycznie istotną) efektywność w hamowaniu ureazy niż allicyna.



Rysunek 7 Stężenie jonów amonowych w próbkach z dodatkiem mocznika i badanych ekstraktów roślinnych

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

W ekstraktach otrzymanych z owoców maliny, borówki i morwy czarnej (5, 10 i 25%), które wykazały skuteczność w hamowaniu aktywności enzymu ureazy, przeprowadzono oznaczenie całkowitej zawartości związków polifenolowych. Zweryfikowano zależność zawartości związków polifenolowych od rodzaju badanego ekstraktu i jego stężenia. W zaprezentowanych wynikach (Rysunek 8) zauważono wyraźne zróżnicowanie w uzyskanych poziomach zawartości związków polifenolowych w badanych ekstraktach.



Rysunek 8 Całkowita zawartość związków polifenolowych w ekstraktach otrzymanych z owoców maliny, borówki i morwy czarnej.

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

Na Rysunku 8 nie przedstawiono wyników całkowitej zawartości związków polifenolowych w ekstraktach o stężeniu 100% ze względu na bardzo wysoką ich zawartość, która przekraczała zdolność rozdzielczą spektrofotometru używanego do oznaczeń. W licznych publikacjach naukowych opisano doświadczenia mające na celu sprawdzenie czy rozmaite substancje pochodzenia roślinnego wykazują cechy biostymulatorów (Abbas i in., 2013; Mohamed i in., 2021; Rouphael i Colla, 2020; van der Watt i Pretorius, 2011). W związku z tym, że wysokie stężenie substancji aktywnych obecnych w roślinach może stanowić zagrożenie dla upraw (Plaskova i Mlcek, 2023), w realizowanych badaniach testowano skuteczność rozcieńczonych ekstraktów roślinnych. Najczęściej stosowane stężenia ekstraktów to te do 10% (Godlewska i in., 2021). Kolejnym powodem, dla którego zrezygnowano z wykorzystania 100% ekstraktów w kolejnych etapach badań są względy ekonomiczne. Potencjalna produkcja rozcieńczonych ekstraktów generowałaby zdecydowanie niższe koszty, a co za tym idzie produkt oferowany dla Klienta miałby zdecydowanie bardziej przystępną cenę.

Zauważono, że zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach roślinnych rośnie proporcjonalnie do ich stężenia. Największą zawartość polifenoli zaobserwowano w 25% ekstraktach otrzymanych z owoców maliny oraz borówki, istotnie mniejszą w 25% ekstrakcie z morwy. W 5% ekstraktach oznaczono najniższą zawartość związków polifenolowych.

Analiza uzyskanych wyników z przeprowadzonych badań wstępnych pozwoliła wytypować ekstrakty do doświadczenia inkubacyjnego. Wybrano 10% i 25% ekstrakty z owoców borówki, maliny i morwy czarnej, gdyż te ekstrakty obniżały aktywność ureazy oraz charakteryzowały się wyższą zawartością całkowitą związków polifenolowych niż ekstrakty o stężeniu 5%.

## **5.2. Doświadczenie inkubacyjne**

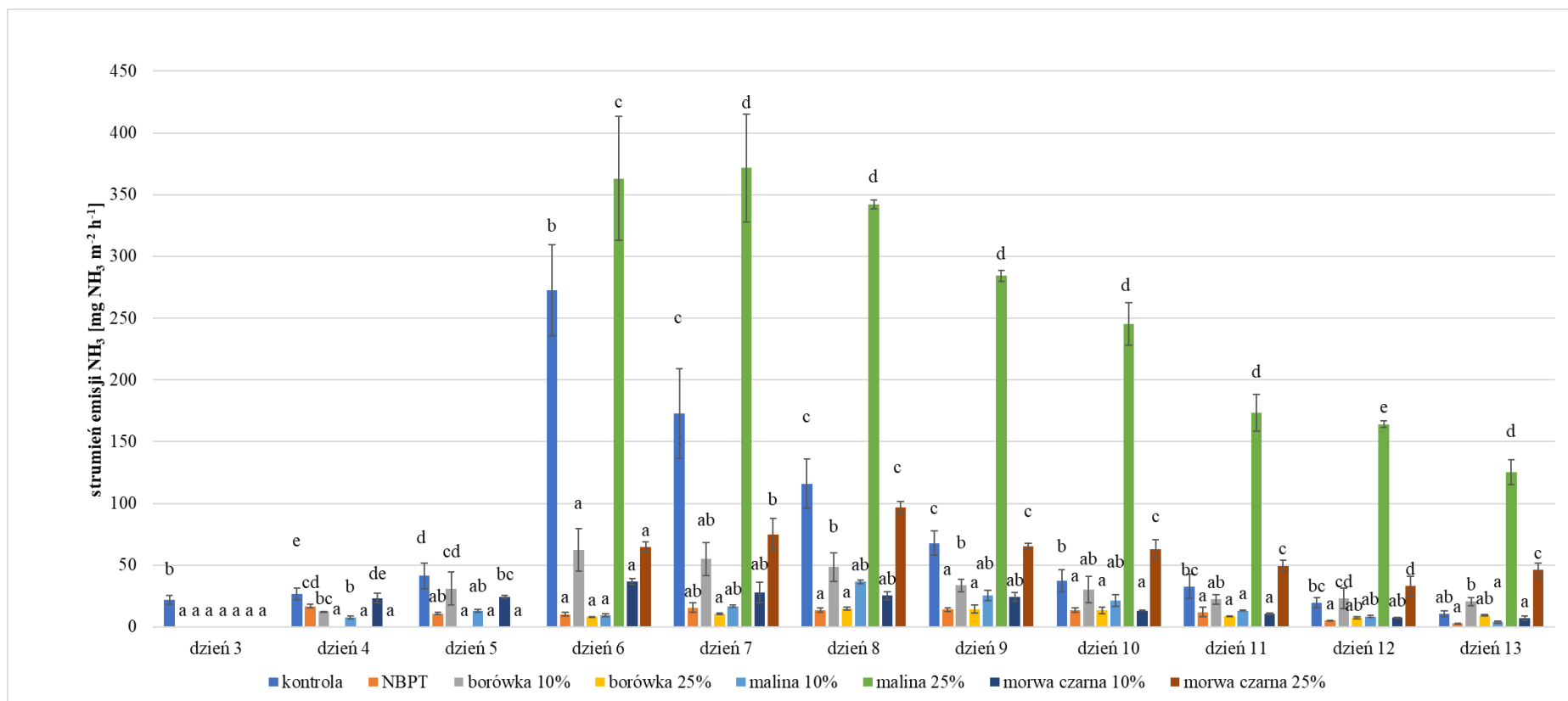
W przeprowadzonym doświadczeniu inkubacyjnym zbadano szesnaście obiektów, każdy w czterech powtórzeniach, z wykorzystaniem dwóch typów gleby (gleba płowa i bielkowa): kontrolę, NBPT, borówkę 10% i 25%, malinę 10% i 25% oraz morwę czarną 10% i 25%.

### **5.2.1. Emisja amoniaku z gleby w doświadczeniu inkubacyjnym**

Emisja amoniaku uzyskana z gleby, do której zaaplikowano badane ekstrakty, wykazywała istotne różnice, które wynikały zarówno ze składu zaaplikowanej formułki, jak i typu gleby użytej w doświadczeniu oraz terminu, w którym prowadzono pomiary emisji. Na Rysunku 9 przedstawiono emisję amoniaku z poszczególnych obiektów podczas dwutygodniowego doświadczenia inkubacyjnego prowadzonego na glebie płowej. Trzeciego, czwartego i piątego dnia pomiarów, najwyższą emisję uzyskano z obiektu kontrolnego, a emisje uzyskane z obiektów, na które zaaplikowano badane ekstrakty roślinne były na ogół istotnie niższe. Analizując dynamikę zmian emisji amoniaku obserwowanych w toku prowadzonego doświadczenia zauważono, że emisje amoniaku z obiektu, na którym zaaplikowano 25% ekstrakt z maliny, począwszy od szóstego dnia były istotnie statystycznie wyższe niż z pozostałych obiektach doświadczalnych. Co więcej, szóstego i siódmego dnia doświadczenia zaobserwowano, że emisje uzyskane z obiektów, na których zastosowano mocznik otoczkowany NBPT oraz mocznik z dodatkiem 10% i 25% ekstraktów z borówki, 10% ekstraktu z maliny oraz 10% i 25% ekstraktów z morwy były niższe niż emisje uzyskane

z obiektu kontrolnego. Emisje uzyskane z obiektów: NBPT, borówka 10% i 25%, malina 10% i morwa czarna 10% w dniu ósmym były istotnie niższe od emisji uzyskanych z obiektu z mocznikiem. Dziewiątego dnia istotnie niższe straty amoniaku zauważono z obiektów po aplikacji NBPT, obu badanych ekstraktów z borówki oraz 10% ekstraktów z maliny oraz morwy czarnej w porównaniu do strat amoniaku obserwowanych z obiektu kontrolnego i obiektów po aplikacji 25% ekstraktów z maliny i morwy czarnej. W dziesiątym dniu istotnie niższe wartości emisji amoniaku uzyskano z obiektów po aplikacji NBPT, 25% ekstraktu z borówki oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej w porównaniu do emisji uzyskanych z obiektu kontrolnego. W dniu 11. straty amoniaku z obiektów: NBPT, borówka 2%, malina 10% i morwa czarna 10% były istotnie niższe niż straty uzyskane z obiektu kontrolnego. Natomiast dwunastego dnia eksperymentu najniższą emisję amoniaku uzyskano z obiektu po aplikacji NBPT.

W przypadku wszystkich badanych obiektów z glebą pługą maksymalną emisję amoniaku zaobserwowano między 6. a 8. dniem doświadczenia. Maksimum emisji amoniaku dla próby kontrolnej (mocznika) zaobserwowano w 6. dniu doświadczenia, pik emisji osiągnął wartość  $272 \text{ mg NH}_3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Pozostałe obiekty, dla których również zaobserwowano pik emisji amoniaku w 6. dniu doświadczenia to mocznik z dodatkiem 10% ekstraktów z morwy czarnej (pik emisji 7 razy mniejszy od piku uzyskanego na obiekcie kontrolnym) oraz borówki 10% (pik 4 razy mniejszy). W 7. dniu zarejestrowano najwyższe wartości emisji z obiektów, do których aplikowano mocznik z dodatkiem 25% ekstraktu z maliny oraz NBPT. Maksymalną emisję amoniaku z pozostałych obiektów, tj. z mocznika z dodatkiem 25% ekstraktów z borówki oraz morwy, a także mocznika z dodatkiem 10% ekstraktu z maliny zaobserwowano w 8. dniu. Nie zaobserwowano wyraźnych przesunięć pików emisji amoniaku z badanych obiektów w porównaniu do obiektu kontrolnego.



Rysunek 9 Emisja amoniaku z badanych formułacji zaaplikowanych na glebie płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia inkubacyjnego.

Z wyników zaprezentowanych w Tabeli 4 wynika, że najwyższą skumulowaną emisją amoniaku charakteryzował się obiekt z mocznikiem z dodatkiem 25% ekstraktu z maliny. Najniższy skumulowany poziom emisji amoniaku zaobserwowano w przypadku zastosowania mocznika z dodatkiem 25% ekstraktu z borówki (prawie dziesięciokrotnie niższy od emisji uzyskanej z obiektu kontrolnego). Zbliżone wyniki (nie różniące się statystycznie od obiektu z 25% ekstraktem z borówki) uzyskano po zastosowaniu ekstraktów z maliny i morwy o stężeniu 10% oraz NBPT. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wszystkie badane ekstrakty z wyjątkiem 25% ekstraktu z maliny wpłynęły istotnie na obniżenie emisji amoniaku z badanych obiektów (w zakresie od 45 do 90%) w porównaniu z obiektem kontrolnym.

Tabela 4 Skumulowana emisja amoniaku z gleby płowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu inkubacyjnym

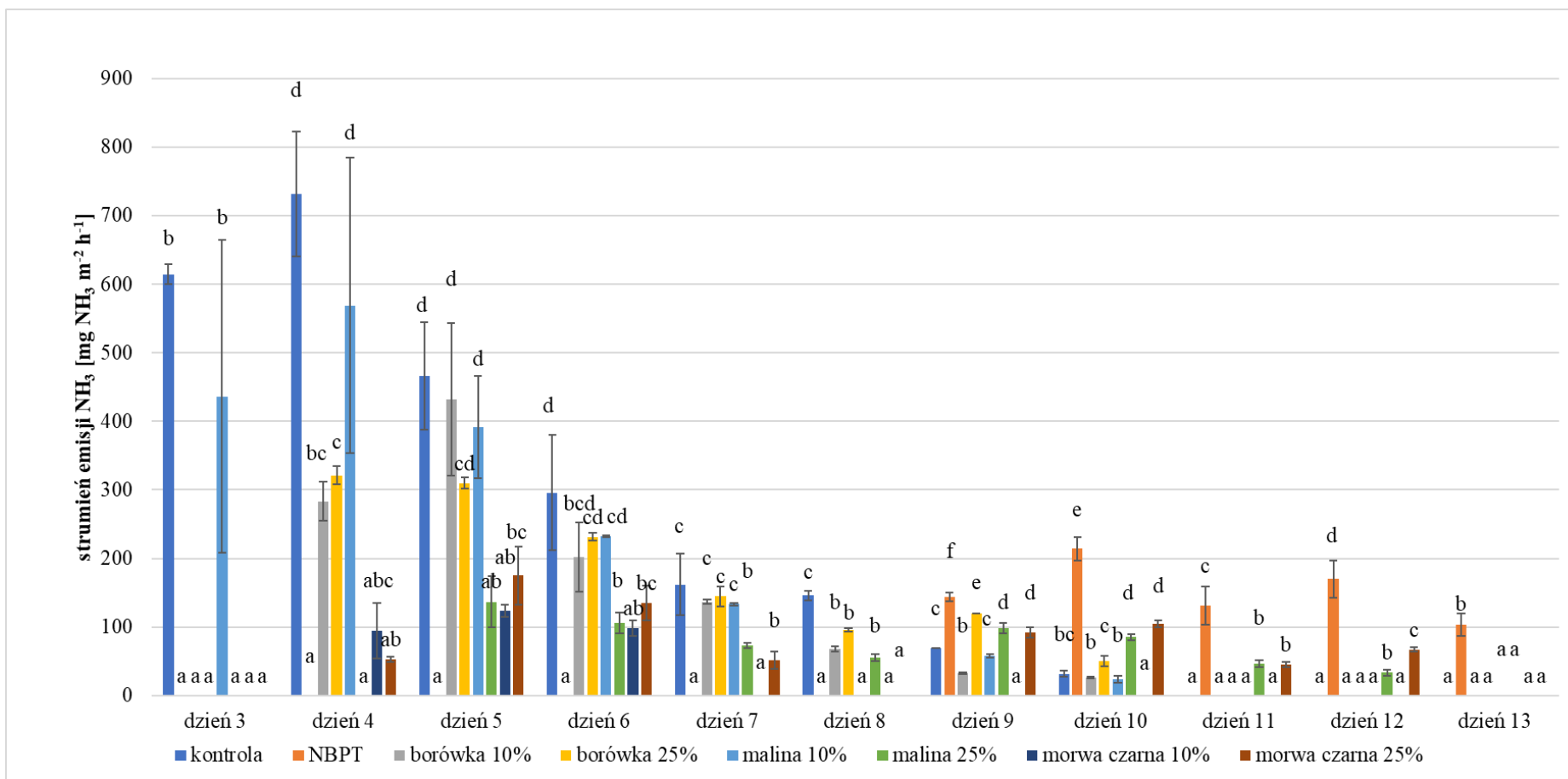
Obiekt	Skumulowana emisja NH <sub>3</sub> [mg NH <sub>3</sub> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	Zmiana skumulowanej emisji w stosunku do kontroli [%]
kontrola	889 <sup>d</sup>	-
NBPT	115 <sup>a</sup>	-87
borówka 10%	338 <sup>bc</sup>	-62
borówka 25%	87 <sup>a</sup>	-90
malina 10%	155 <sup>a</sup>	-83
malina 25%	2069 <sup>e</sup>	+133
morwa czarna 10%	200 <sup>ab</sup>	-78
morwa czarna 25%	493 <sup>c</sup>	-45

Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

Na Rysunku 10 przedstawiono emisję amoniaku z poszczególnych obiektów podczas doświadczenia inkubacyjnego prowadzonego na glebie bielcowej. Trzeciego dnia trwania

doświadczenia emisje uzyskane z obiektów: NBPT, borówka 10% i 25%, malina 25% oraz morwa czarna 10% i 25% były istotnie niższe od emisji uzyskanych z obiektu kontrolnego oraz obiektu, na który zaaplikowano mocznik z dodatkiem 10% ekstraktu z maliny (Rysunek 10). W przypadku próby kontrolnej pik emisji amoniaku uzyskany z gleby biellicowej zaobserwowano w 4. dniu doświadczenia, osiągnął on wartość  $732 \text{ mg NH}_3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . W 4. dniu doświadczenia zaobserwowano również najwyższą wartość emisji amoniaku z obiektu nawożonego mocznikiem z dodatkiem 10% ekstraktu z maliny. W 5. dniu eksperymentu zaobserwowano piki emisji z obiektów: mocznik z dodatkiem 25% ekstraktu z owoców maliny oraz 10% i 25% ekstraktów z borówki i morwy czarnej. Piątego i szóstego dnia doświadczenia aplikacja obu ekstraktów z morwy czarnej oraz 25% ekstraktu z maliny spowodowała istotne obniżenie emisji  $\text{NH}_3$  względem kontroli. Siódmego dnia doświadczenia najniższą emisję amoniaku uzyskano z obiektów NBPT oraz morwa czarna 10%. Co więcej, uzyskane wartości emisji ze wspomnianych obiektów były istotnie niższe od emisji uzyskanych z obiektu kontrolnego. W ósmym dniu największą redukcję emisji amoniaku w porównaniu do kontroli zaobserwowano z obiektów po aplikacji NBPT, 10% ekstraktów z owoców maliny i morwy czarnej oraz 25% ekstraktu z morwy czarnej. Dziewiątego dnia obniżenie emisji względem kontroli zaobserwowano z obiektów morwa czarna 10% i borówka 10%. Co więcej, zaobserwowano przesunięcie piku emisji amoniaku z gleby nawożonej mocznikiem z dodatkiem NBPT w porównaniu do obiektu kontrolnego, który wystąpił w 10. dniu doświadczenia. Począwszy od 9. a skończywszy na ostatnim, 13. dniu doświadczenia istotnie wyższe straty amoniaku w odniesieniu do pozostałych obiektów obserwowano z obiektu, na który zaaplikowano mocznik z dodatkiem NBPT.





Rysunek 10 Emisje amoniaku z badanych formułacji zaaplikowanych na glebę biellicową

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia inkubacyjnego.

Największą skumulowaną emisję amoniaku uzyskano z próby kontrolnej, osiągnęła ona wartość 2517 mg NH<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (Tabela 5). Redukcję (statystycznie istotną) emisji amoniaku w porównaniu do obiektu kontrolnego zaobserwowano we wszystkich obiektach doświadczalnych. Najbardziej korzystne pod względem ograniczenia emisji amoniaku wyniki uzyskano w obiektach, do których zaaplikowano mocznik z dodatkiem 10% i 25% ekstraktów z morwy (redukcja o odpowiednio 87% i 71% w porównaniu do mocznika), 25% ekstraktu z maliny (72%) oraz mocznik z dodatkiem NBPT (70%). Natomiast najniższy poziom redukcji emisji amoniaku w porównaniu do mocznika (istotny statystycznie) odnotowano z obiektu, do którego zaaplikowano 10% ekstrakt z maliny suszonej (27%). Ponadto analiza statystyczna wykazała, że żaden z analizowanych ekstraktów nie był bardziej skuteczny w ograniczeniu emisji amoniaku od komercyjnego inhibitora NBPT.

Tabela 5 Skumulowana emisja amoniaku z gleby biellicowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu inkubacyjnym

Obiekt	Skumulowana emisja NH <sub>3</sub> [mg NH <sub>3</sub> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	Zmiana skumulowanej emisji w stosunku do kontroli [%]
kontrola	2517 <sup>e</sup>	-
NBPT	762 <sup>abc</sup>	-70
borówka 10%	1180 <sup>bc</sup>	-53
borówka 25%	1271 <sup>c</sup>	-49
malina 10%	1843 <sup>d</sup>	-27
malina 25%	635 <sup>ab</sup>	-75
morwa czarna 10%	316 <sup>a</sup>	-87
morwa czarna 25%	724 <sup>abc</sup>	-71

Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

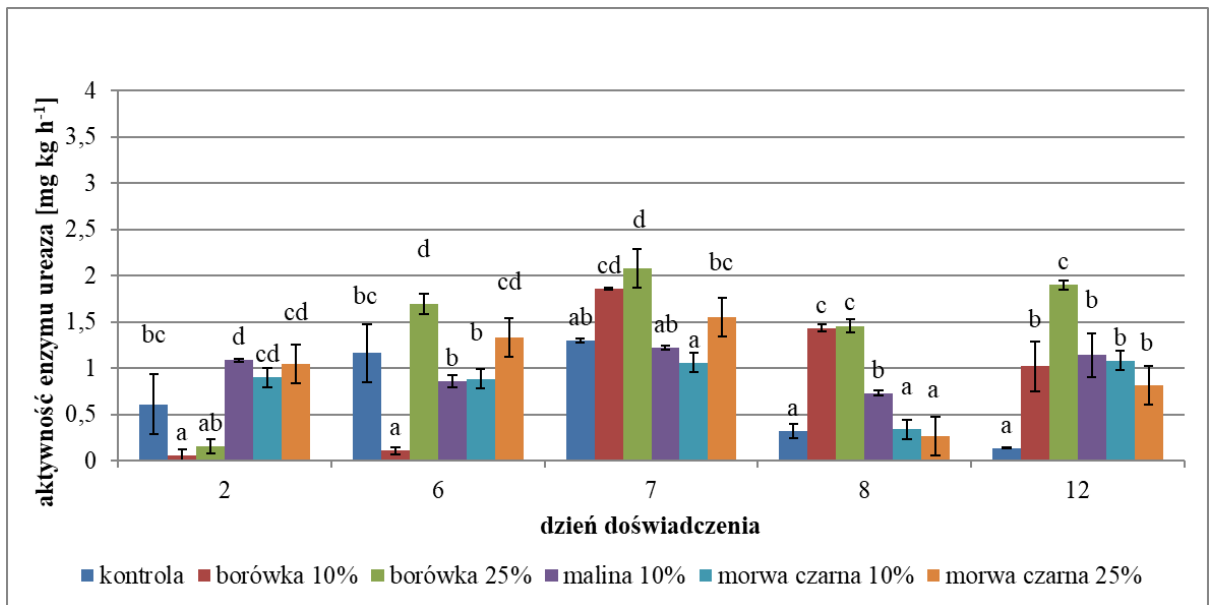
Porównując emisje amoniaku uzyskane na obu typach gleby użytych w trakcie doświadczenia inkubacyjnego można zauważyć wyraźne różnice w poziomach obserwowanych emisji oraz w tempie zachodzenia procesu hydrolizy mocznika. Maksymalna wielkość strumienia emisji amoniaku odnotowana w trakcie doświadczenia prowadzonego na glebie biellicowej była wyższa (w zakresie 45-98%) od maksymalnej wielkości strumienia emisji odnotowanej w trakcie eksperymentu prowadzonego na glebie płowej. Wyjątek stanowił obiekt malina 25%, który na glebie płowej generował istotnie wyższe straty amoniaku (o 172%) niż na glebie biellicowej. Co więcej, zauważono, że gleba biellicowa charakteryzowała się właściwościami, które wpłynęły na przyspieszenie tempa hydrolizy mocznika, a co za tym idzie szybsze odnotowanie maksymalnych wartości emisji amoniaku z badanych obiektów w porównaniu do gleby płowej.

### **5.2.2. Aktywność ureazy w glebie**

Glebę do oznaczeń aktywności enzymu ureaza w doświadczeniu z glebą płową pobrano w 2., 6., 7., 8. i 12. dniu trwania eksperymentu. W przypadku doświadczenia z glebą biellicową poboru próbek dokonano w dniach 3., 4., 6., 8. i 12. Różnica w terminach poboru próbek przeznaczonych do badań aktywności ureazy wynikała z różnic obserwowanych w emisjach amoniaku uzyskanych w prowadzonym doświadczeniu. Dynamika zmian aktywności ureazy w glebach płowej i biellicowej została przedstawiona na Rysunkach 11. i 12.

Analizując wyniki uzyskane z oznaczeń enzymatycznych przeprowadzonych na glebie płowej zaobserwowano zróżnicowanie w aktywności ureazy dla badanych ekstraktów. W 2. i 6. dniu doświadczenia istotnie niższe wartości aktywności enzymu w porównaniu do próbki kontrolnej zaobserwowano w próbkach z ekstraktem z borówki 10% (odpowiednio o 90 i 91%). W przypadku wszystkich obiektów najwyższe wartości aktywności ureazy zaobserwowano w 7. dniu. Wówczas nie zaobserwowano, żeby w którejkolwiek próbce otrzymano istotnie niższe wartości aktywności ureazy w porównaniu do kontroli. W ostatnim

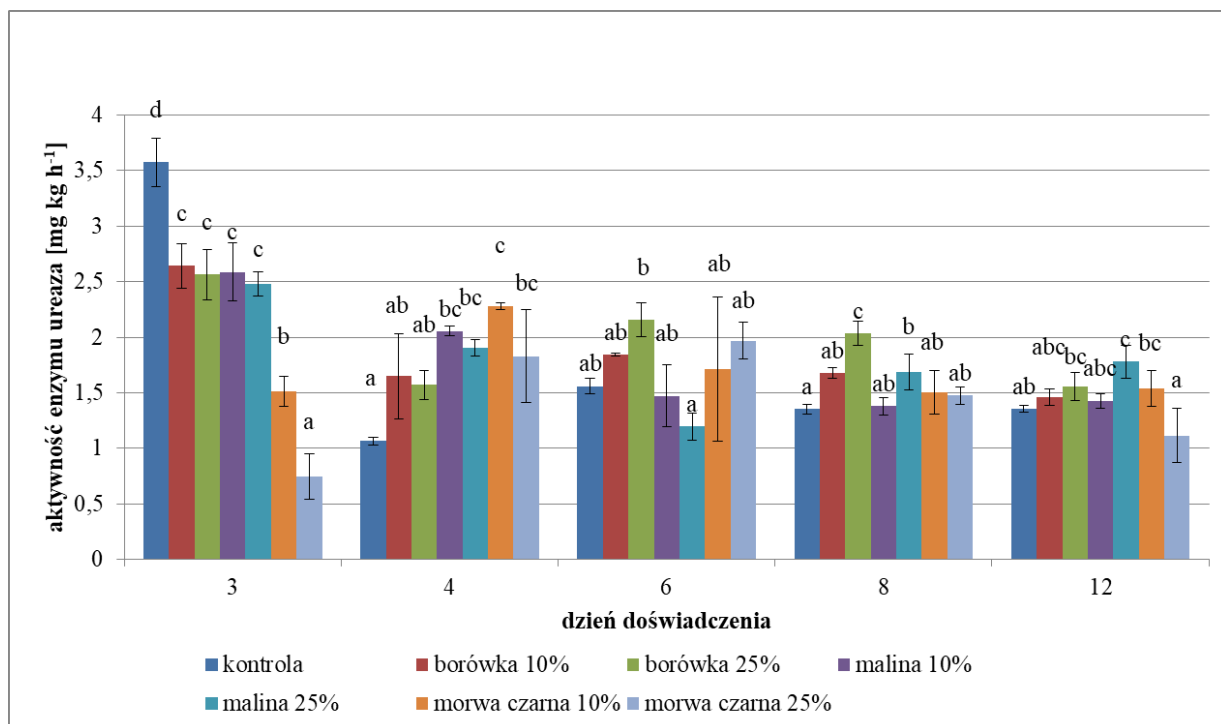
dniu pomiarów aktywność ureazy w glebie z mocznikiem była istotnie niższa niż w glebie z dodatkiem ekstraktów roślinnych.



Rysunek 11 Aktywność enzymu ureazy w glebie płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia inkubacyjnego.

W glebie bielcowej trzeciego dnia eksperymentu zaobserwowano istotnie niższą aktywność ureazy we wszystkich badanych próbkach w porównaniu do kontroli (Rysunek 12). Największą inhibicję aktywności enzymu zaobserwowano po zastosowaniu 25% ekstraktu z morwy czarnej – redukcja o 79%. Zastosowanie 10% ekstraktu z morwy czarnej spowodowało obniżenie aktywności ureazy o 58%, natomiast pozostałe ekstrakty spowodowały obniżenie aktywności ureazy w zakresie od 26% do 31%. W pozostałych dniach pomiarów aktywność ureazy po zastosowaniu ekstraktów nie różniła się od kontroli, bądź też w przypadku niektórych obiektów była istotnie wyższa (np. po zastosowaniu 25% ekstraktu z borówki).



Rysunek 12 Aktywność enzymu ureazy w glebie bielcowej

Śłupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia inkubacyjnego.

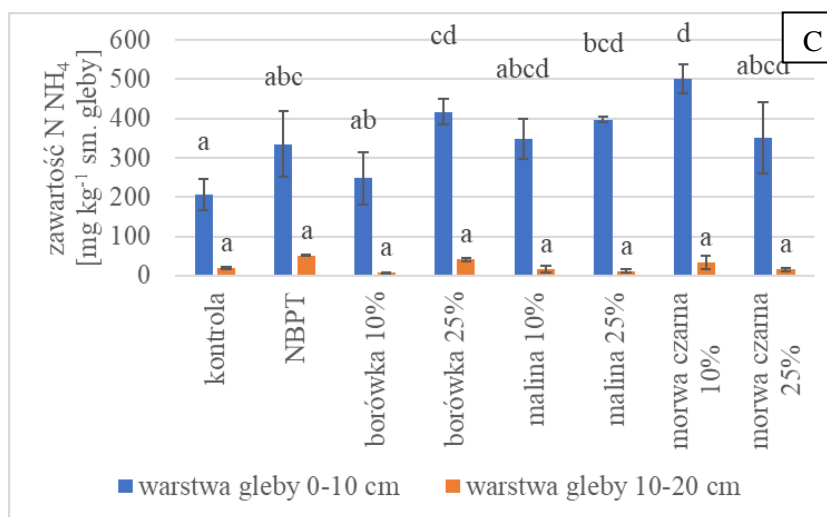
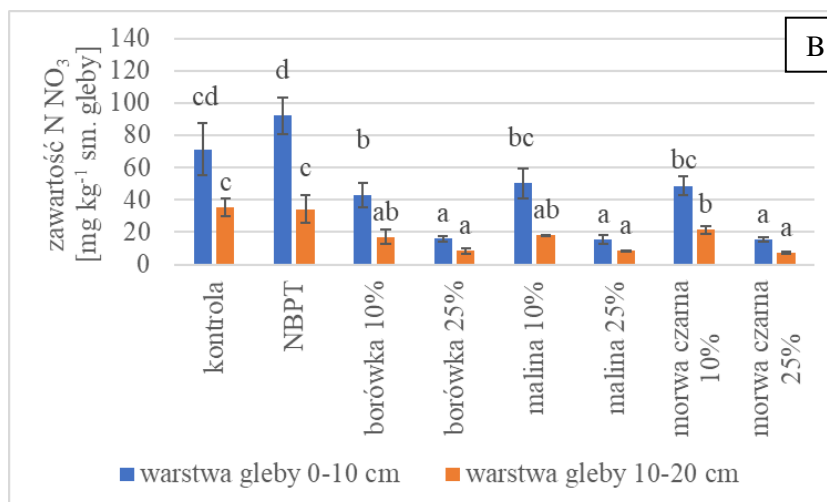
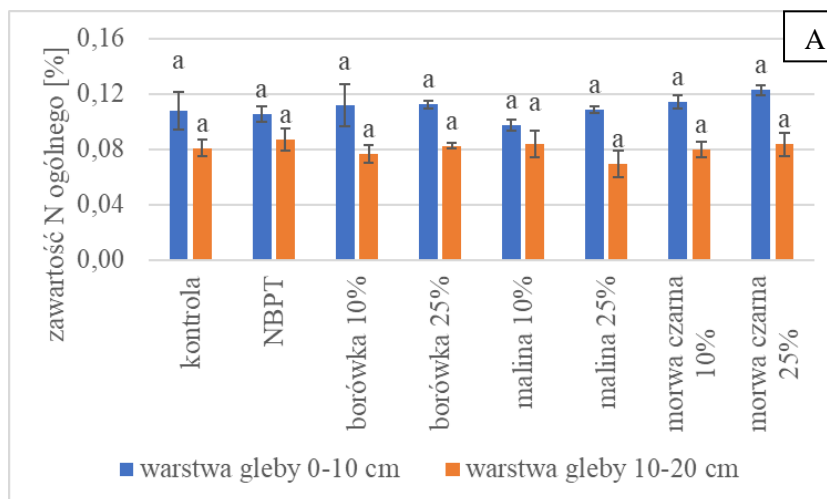
Zaobserwowano wyższy poziom aktywności enzymatycznej gleby bielcowej w porównaniu do gleby płowej.

### 5.2.3. Zawartości azotu w glebie

Zawartość azotu ogółem oraz form azotu: azotanowej i amonowej w dwóch badanych warstwach gleby, tj. 0-10 cm oraz 10-20 cm przedstawiono na Rysunkach 13A-C i 14A-C. W każdym z badanych przypadków zaobserwowano różnice w poziomach zawartości badanych form azotu między poszczególnymi warstwami gleby płowej. Nie zauważono natomiast istotnego wpływu badanych ekstraktów roślinnych na zawartość azotu ogólnego w obu badanych warstwach gleby płowej (Rysunek 13A) i bielcowej (Rysunek 14A).

Stężenie formy azotanowej (Rysunek 13B) w obu warstwach gleby płowej było istotnie niższe w obiektach, do których zaaplikowano mocznik z dodatkiem ekstraktów niż w glebie z samym mocznikiem. W górnej warstwie gleby obniżenie stężenia jonów azotanowych wahało się od 31% po zastosowaniu 10% ekstraktu z malin do 78% po zastosowaniu 25% ekstraktu z malin. W dolnej warstwie gleby zastosowanie ekstraktów prowadziło do obniżenia zawartości N-NO<sub>3</sub> w zakresie od 40% do 80%.

Zawartość azotu amonowego była istotnie zróżnicowana pomiędzy obiektami jedynie w górnej warstwie gleby (Rysunek 13C). Najniższą zawartość azotu amonowego odnotowano w próbkach kontrolnych. Istotnie wyższą zawartość tego składnika względem obiektu kontrolnego zarejestrowano w glebie płowej z dodatkiem 25% ekstraktów z borówki czarnej i maliny oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej. Najwyższe stężenie formy amonowej azotu oznaczono w obiektach, do których zaaplikowano mocznik z dodatkiem ekstraktu z morwy czarnej o stężeniu 10%, co więcej, odnotowana zawartość jonów amonowych w tych próbkach była dwukrotnie wyższa od zawartości jonów amonowych w kontroli.



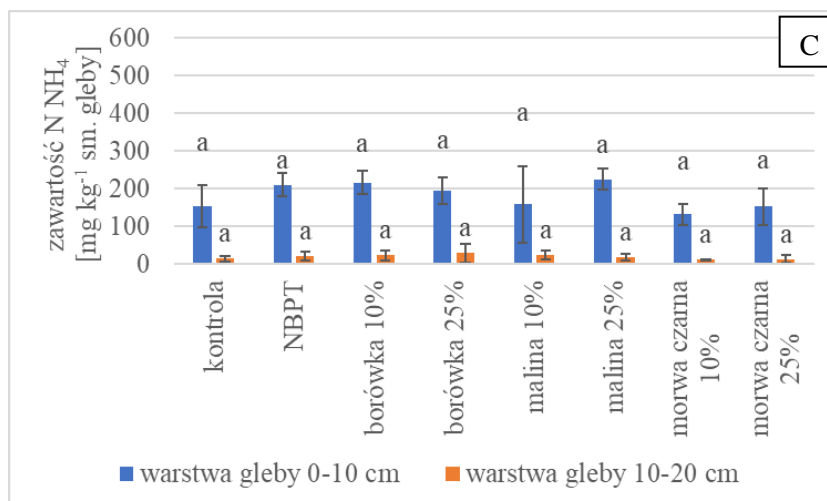
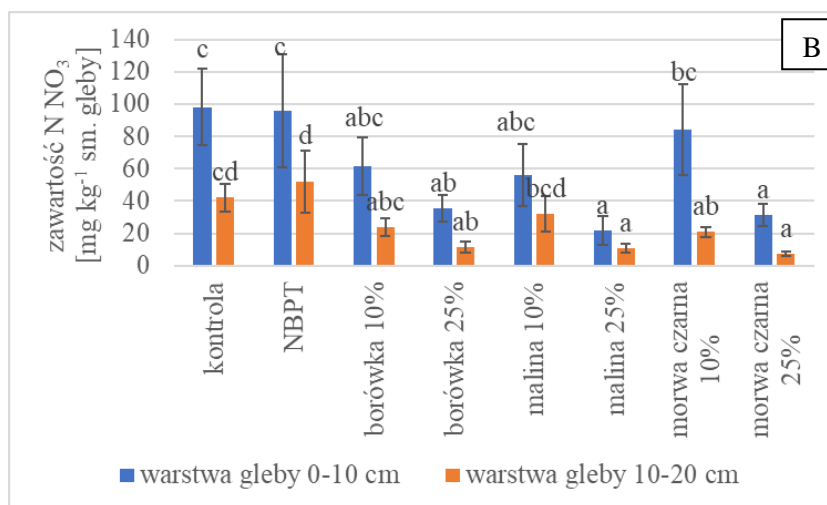
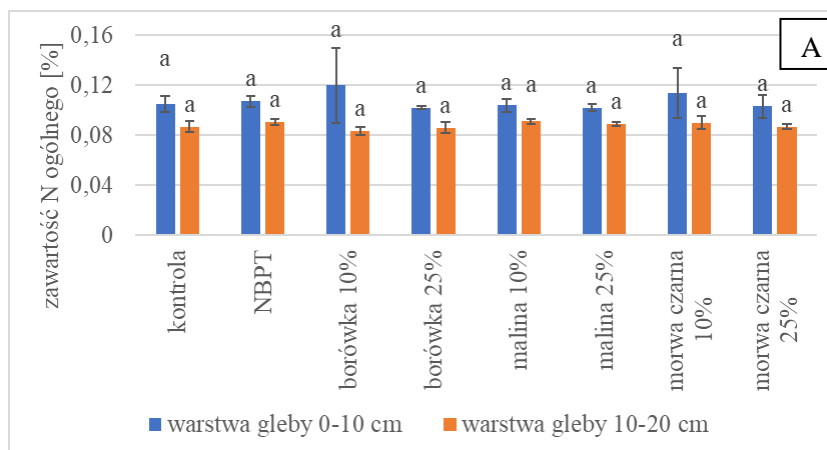
Rysunek 13 Zawartość azotu ogólnego (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w glebie płowej w doświadczeniu inkubacyjnym

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami. Analiza statystyczna została przeprowadzona oddzielnie dla obu warstw gleby.

W glebie bielcowej nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w zawartościach azotu amonowego (Rysunek 14C) pomiędzy poszczególnymi obiektami.

Wyniki analiz zawartości formy azotanowej azotu zaprezentowano na Rysunku 14B. Wierzchnia warstwa gleby (0-10 cm) była wyraźnie bardziej zasobna w tę formę azotu. Najwyższą zawartość jonów azotanowych w górnej warstwie gleby zaobserwowano w próbkach gleby pobranych z obiektu kontrolnego, a porównywalne wartości (wykazujące brak statystycznie istotnych różnic) odnotowano w obiektach, do których dodano NBPT, ekstrakty z morwy, maliny i borówki o stężeniu 10%. Zawartości azotanów w warstwie gleby 0-10 cm były istotnie niższe w próbkach gleby z dodatkiem 25% ekstraktów borówki, maliny i morwy czarnej w porównaniu do kontroli o około 78%. W dolnej warstwie gleby (10-20 cm) użycie większości badanych ekstraktów roślinnych spowodowało istotne obniżenie zawartości jonów  $\text{NO}_3^-$  w porównaniu do kontroli w zakresie od 50% do 83% (wyjątek stanowiły obiekty z 10% borówką i maliną).





Rysunek 14 Zawartość azotu ogólnego (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w glebie bielicy w doświadczeniu inkubacyjnym

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami. Analiza statystyczna została przeprowadzona oddzielnie dla obu warstw gleby.

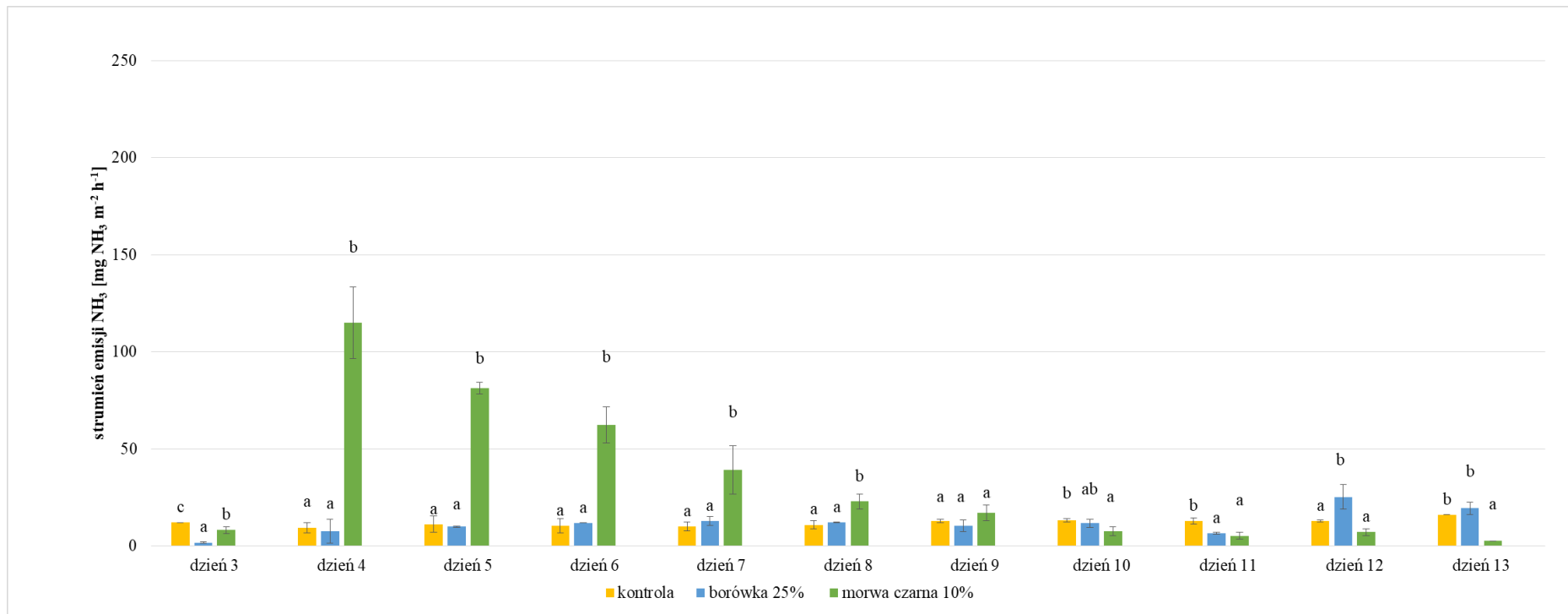
### **5.3. Doświadczenie wazonowe**

W doświadczeniu wazonowym przetestowano wpływ 25% ekstraktu z borówki oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej na emisję amoniaku, aktywność ureazy, a także wzrost i biomasę roślin. Obiektem kontrolnym był mocznik. Wspomniane ekstrakty zostały wyselekcjonowane po przeanalizowaniu wyników uzyskanych w toku przeprowadzonego doświadczenia inkubacyjnego.

#### **5.3.1. Emisja amoniaku z gleby w doświadczeniu wazonowym**

Obserwowana dynamika strat azotu z badanych obiektów na glebie płowej wykazywała wyraźne różnice w poszczególnych dniach trwania doświadczenia. Maksymalne wartości emisji amoniaku zaobserwowano w czwartym, dwunastym i trzynastym dniu eksperymentu, zależnie od obiektu (Rysunek 15). W ciągu całego okresu pomiarowego emisja amoniaku z obiektu kontrolnego utrzymywała się na porównywalnym poziomie, a pik emisji odnotowano w ostatnim dniu doświadczenia. Po zastosowaniu 25% ekstraktu z borówki, między trzecim a siódmym dniem pomiarów, zarejestrowano wzrost poziomu emisji amoniaku, w kolejnych dniach emisja amoniaku miała zmienny charakter, aż do dnia 12., kiedy zarejestrowano najwyższą wartość strat azotu. Maksymalną emisję amoniaku z obiektu po aplikacji 10% ekstraktu z morwy czarnej zaobserwowano 4. dnia trwania doświadczenia. W kolejnych dniach emisja stopniowo malała.

Jedynie trzeciego i jedenastego dnia eksperymentu zastosowanie 25% ekstraktu z borówki spowodowało istotne obniżenie poziomu emisji amoniaku (odpowiednio o 85% i 49%) w porównaniu do kontroli, natomiast w dniach: trzecim, dziesiątym, jedenastym i trzynastym zaobserwowano istotnie niższą emisję amoniaku po aplikacji 10% ekstraktu z morwy czarnej w porównaniu do obiektu nawożonego samym mocznikiem (odpowiednio o 32%, 41%, 60% i 84%). W dniach od czwartego do ósmego zaobserwowano istotnie wyższe emisje amoniaku z obiektu z dodatkiem morwy czarnej w porównaniu do obiektu kontrolnego.



Rysunek 15 Emisja amoniaku z badanych ekstraktów zaaplikowanych na glebę płową

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia wazonowego.

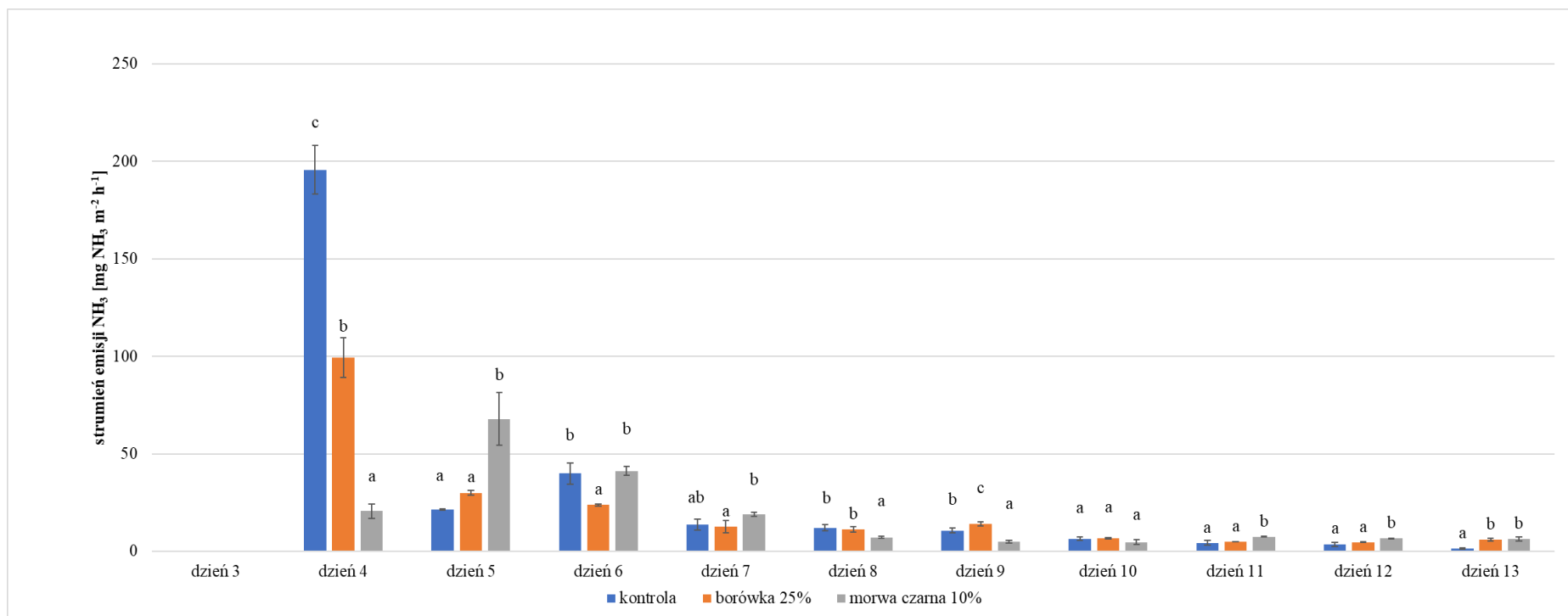
Zaobserwowano wzmożenie emisji amoniaku po zastosowaniu ekstraktu z morwy czarnej o stężeniu 10% (Tabela 6). Skumulowana emisja amoniaku uzyskana ze wspomnianego obiektu była niemalże 3-krotnie większa od skumulowanej emisji uzyskanej z obiektu kontrolnego. Nie obserwowano istotnego wpływu 25% ekstraktu otrzymanego z owoców borówki na skumulowaną emisję amoniaku.

Tabela 6 Skumulowana emisja amoniaku z gleby płowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu wazonowym

Obiekt	Skumulowana emisja NH <sub>3</sub> [mg NH <sub>3</sub> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	Zmiana skumulowanej emisji w stosunku do kontroli [%]
Kontrola	132 <sup>a</sup>	-
Borówka 25%	129 <sup>a</sup>	-2
Morwa czarna 10%	369 <sup>b</sup>	+179

Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

Emisja amoniaku z gleby biellicowej została przedstawiona na Rysunku 16. W poszczególnych dniach prowadzenia pomiarów rejestrowano istotne różnice w poziomach emisji pomiędzy obiektami. W 4. dniu zaobserwowano największe różnice emisji pomiędzy poszczególnymi obiektami, ponadto tego dnia zaobserwowano pik emisji z obiektu kontrolnego i z obiektu, do którego zaaplikowano 25% ekstrakt z borówki. Generalnie od 4. dnia doświadczenia wartości emisji amoniaku rejestrowane z obiektu kontrolnego oraz z obiektu z 25% ekstraktem z borówki były coraz niższe. W przypadku tych obu obiektów odnotowano drastyczny spadek emisji między dniami 4. a 5. Doglebowa aplikacja 10% ekstraktu z morwy czarnej spowodowała początkowy wzrost emisji amoniaku (do piątego dnia eksperymentu, kiedy obserwowano najwyższe straty azotu). W kolejnych dniach doświadczenia emisja amoniaku po aplikacji ekstraktu z morwy czarnej malała do dnia 8., od którego zaczęto obserwować ustabilizowanie emisji, a rejestrowane poziomy emisji amoniaku wykazywały niewielkie różnice.



Rysunek 16 Emisja amoniaku z badanych ekstraktów zaaplikowanych na glebę biellicową

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia wazonowego.

W przypadku gleby biellicowej wartości skumulowanej emisji amoniaku były najwyższe dla obiektu kontrolnego (Tabela 7), a istotnie niższe wartości uzyskano po aplikacji obu ekstraktów roślinnych (redukcja o 40 i 31% w przypadku odpowiednio morwy i borówki).

Tabela 7 Skumulowana emisja amoniaku z gleby biellicowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu wazonowym

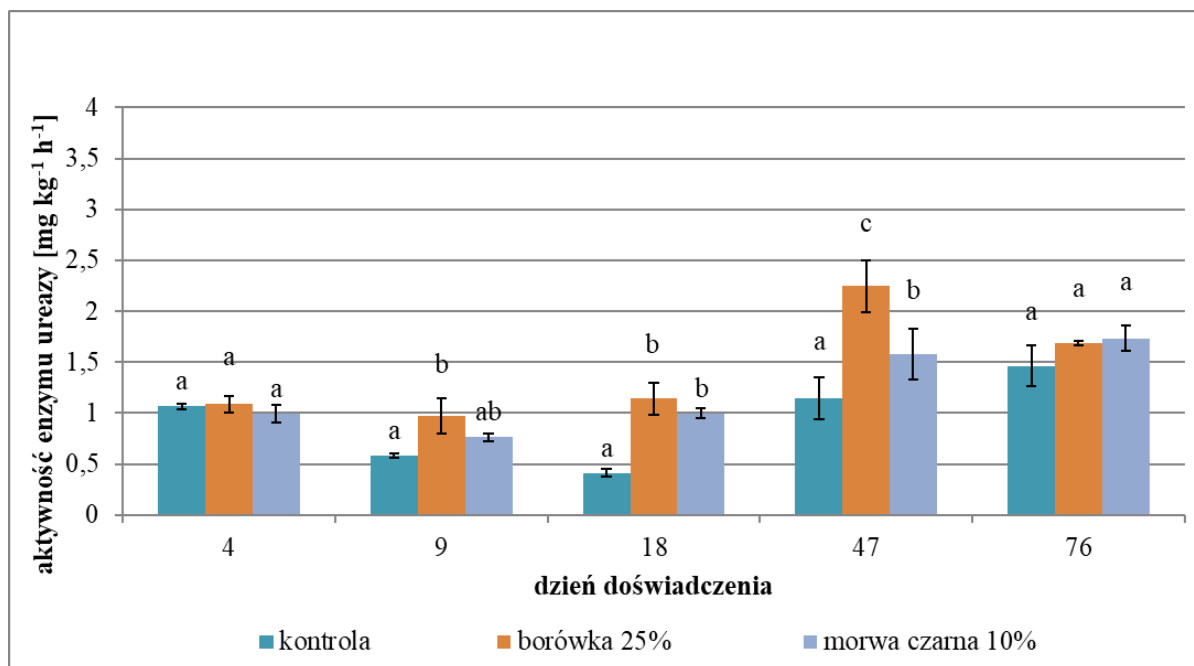
Obiekt	Skumulowana emisja NH <sub>3</sub> [mg NH <sub>3</sub> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	Zmiana skumulowanej emisji w stosunku do kontroli [%]
Kontrola	309 <sup>b</sup>	-
Borówka 25%	213 <sup>a</sup>	-31
Morwa czarna 10%	185 <sup>a</sup>	-40

Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

### 5.3.2. Aktywność ureazy w glebie

Próbki gleby przeznaczone do oznaczenia aktywności enzymu ureazy pobrano w 5 terminach. Trzy pierwsze terminy (4., 9. i 18. dzień) miały miejsce po aplikacji pierwszej dawki, a próbki z 47. dnia doświadczenia zostały pobrane po aplikacji drugiej dawki nawozu. Ostatni pobór próbek wykonano w dniu zakończenia eksperymentu.

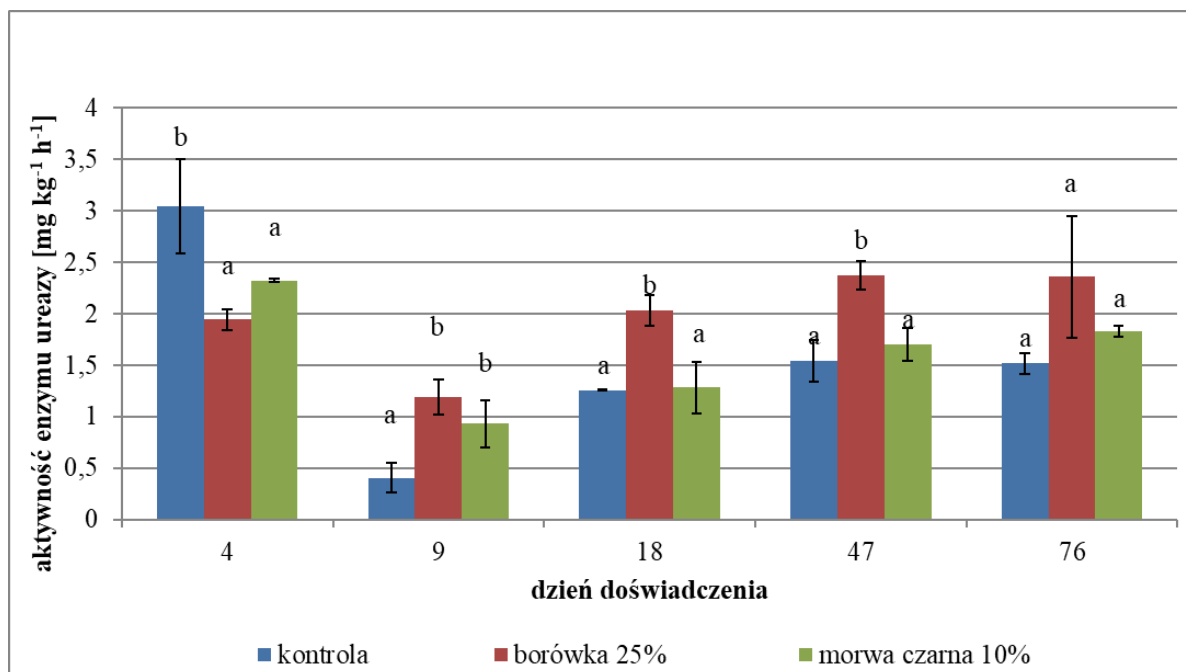
W przypadku gleby płowej nie zaobserwowano zróżnicowania aktywności ureazy w badanych próbkach pobranych w pierwszym i ostatnim terminie (Rysunek 17). W pozostałych terminach na ogół aktywność ureazy utrzymywała się na wyższym poziomie po zastosowaniu ekstraktów w porównaniu do obiektu kontrolnego. Niezależnie od obiektu, zaobserwowano znaczny wzrost aktywności ureazy po aplikacji drugiej dawki nawozu (47 dzień). Wysoki poziom aktywności ureazy utrzymywał się do końca trwania doświadczenia wazonowego.



Rysunek 17 Aktywność enzymu ureazy w glebie płowej

Ślupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia wazonowego.

W glebie bielcowej zaobserwowano inną dynamikę aktywności ureazy niż w przypadku gleby płowej (Rysunek 18). W glebie nawożonej mocznikiem oraz w glebie z dodatkiem 10% ekstraktu z morwy czarnej odnotowano najwyższe wartości aktywności enzymu w pierwszym terminie poboru próbek, tj. w 4 dniu doświadczenia. W obiekcie z dodatkiem 25% ekstraktu z borówki najwyższą wartość aktywności ureazy odnotowano w 47. dniu, czyli po aplikacji drugiej dawki nawozu. We wszystkich obiektach najniższą wartość aktywności ureazy zaobserwowano 9. dnia eksperymentu. Statystyczne różnice w aktywności ureazy pomiędzy badanymi obiektami odnotowano w 4., 9., 18. i 47. dniu. W czwartym dniu eksperymentu aktywność ureazy była zredukowana przez oba ekstrakty w porównaniu do kontroli (różnice istotne statystycznie), natomiast w kolejnych dniach na ogół aktywność była większa po aplikacji ekstraktu z borówki w odniesieniu do kontroli.



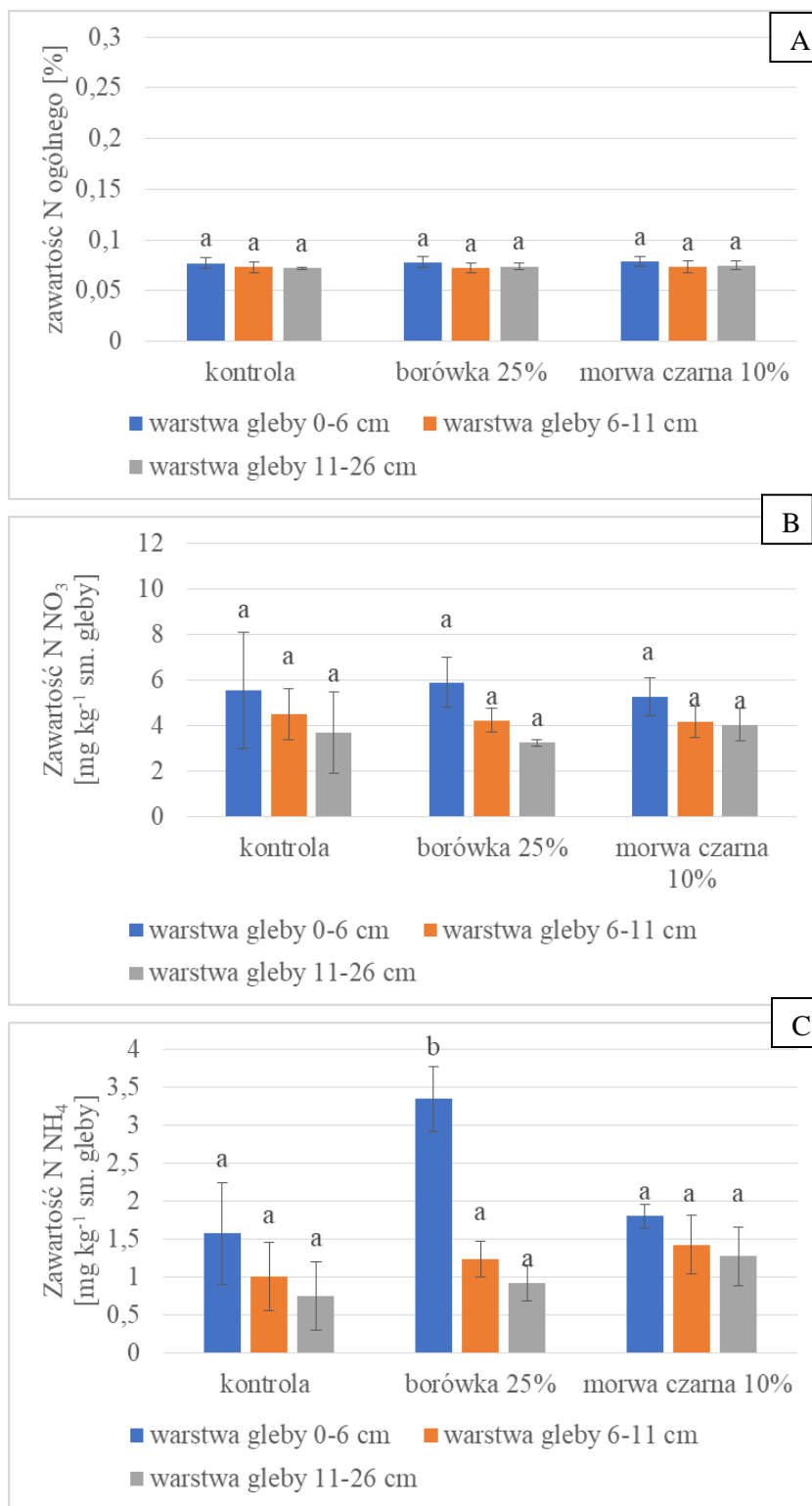
Rysunek 18 Aktywność enzymu ureazy w glebie biellicowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danym dniu doświadczenia wazonowego.

### 5.3.3. Zawartości azotu w glebie

Na Rysunkach 19A-C przedstawiono zawartości azotu ogółem, azotu azotanowego oraz azotu amonowego we wszystkich trzech badanych warstwach profilu gleby płowej. Zawartość azotu ogółem utrzymywała się na zbliżonym poziomie zarówno we wszystkich obiektach, jak i we wszystkich trzech badanych warstwach profilu (Rysunek 19A). Nie zaobserwowano również zróżnicowania pomiędzy obiektami w stężeniu jonów azotanowych w glebie płowej (Rysunek 19B). Stężenie jonów amonowych było istotnie zróżnicowane jedynie w górnej warstwie profilu glebowego (Rysunek 19C). Największą (istotnie większą w porównaniu do pozostałych obiektów) zawartością tej formy azotu charakteryzował się obiekt, do którego zaaplikowano 25% ekstrakt otrzymany z owoców borówki (ponad 2-krotnie wyższe stężenie niż w obiekcie kontrolnym).

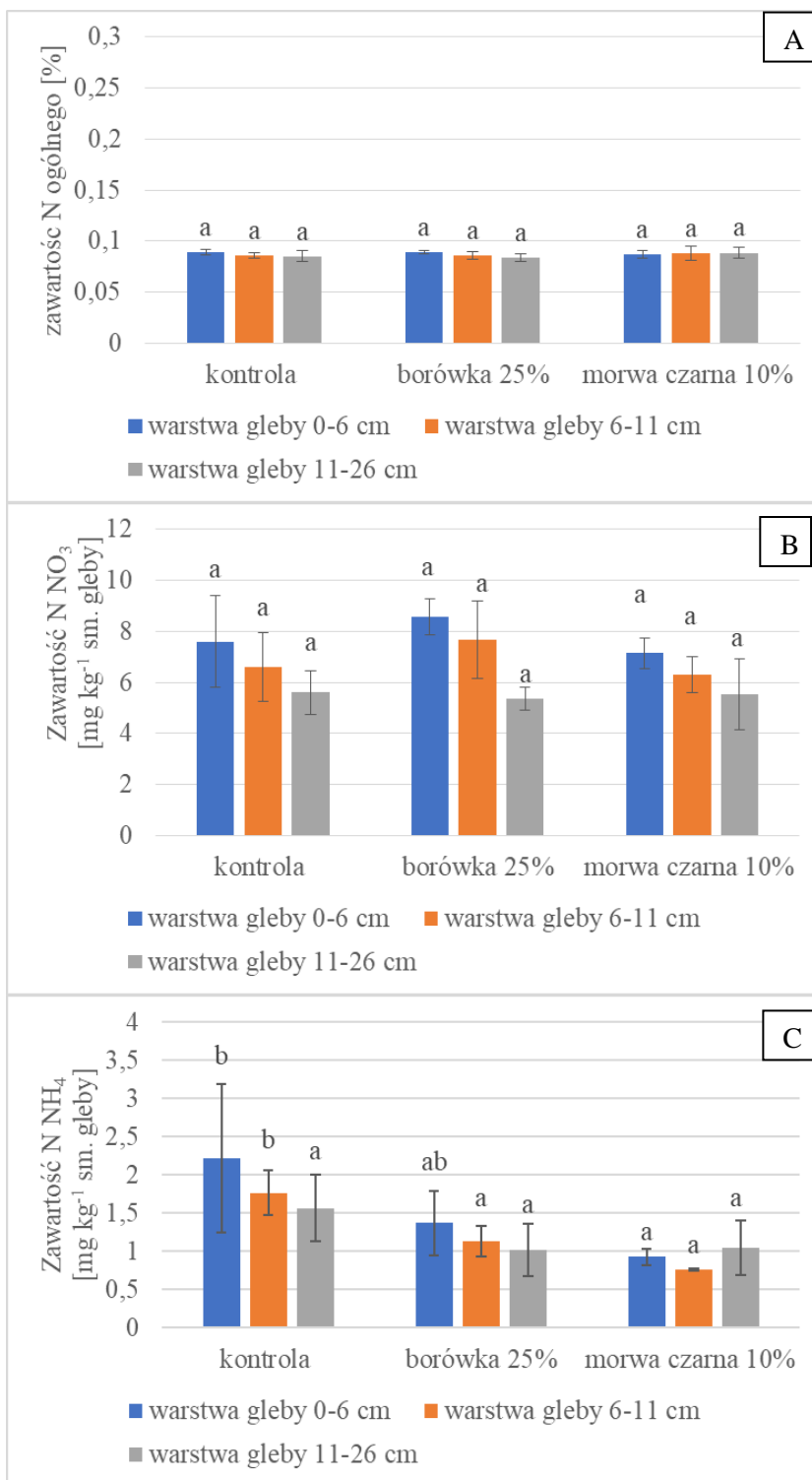




Rysunek 19 Zawartość azotu ogólnego (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w trzech warstwach gleby płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danej warstwie gleby.

W przypadku gleby biellicowej zawartość azotu ogółem oraz jonów azotanowych utrzymywała się na zbliżonym poziomie we wszystkich badanych obiektach, niezależnie od rozpatrywanej warstwy gleby (Rysunek 20A-B). Nie zaobserwowano zróżnicowania w zawartościach wymienionych wyżej form azotu w analizowanych próbkach gleby. Zauważono istotne różnice w zawartościach azotu amonowego w warstwach 0-6 cm oraz 6-11 cm (Rysunek 20C). W górnej warstwie gleby znajdowało się istotnie więcej jonów  $\text{NH}_4^+$  w glebie kontrolnej niż w obiekcie, do którego zaaplikowano 10% ekstrakt z morwy czarnej, a w środkowej warstwie największą zawartość jonów amonowych zaobserwowano w obiekcie kontrolnym.



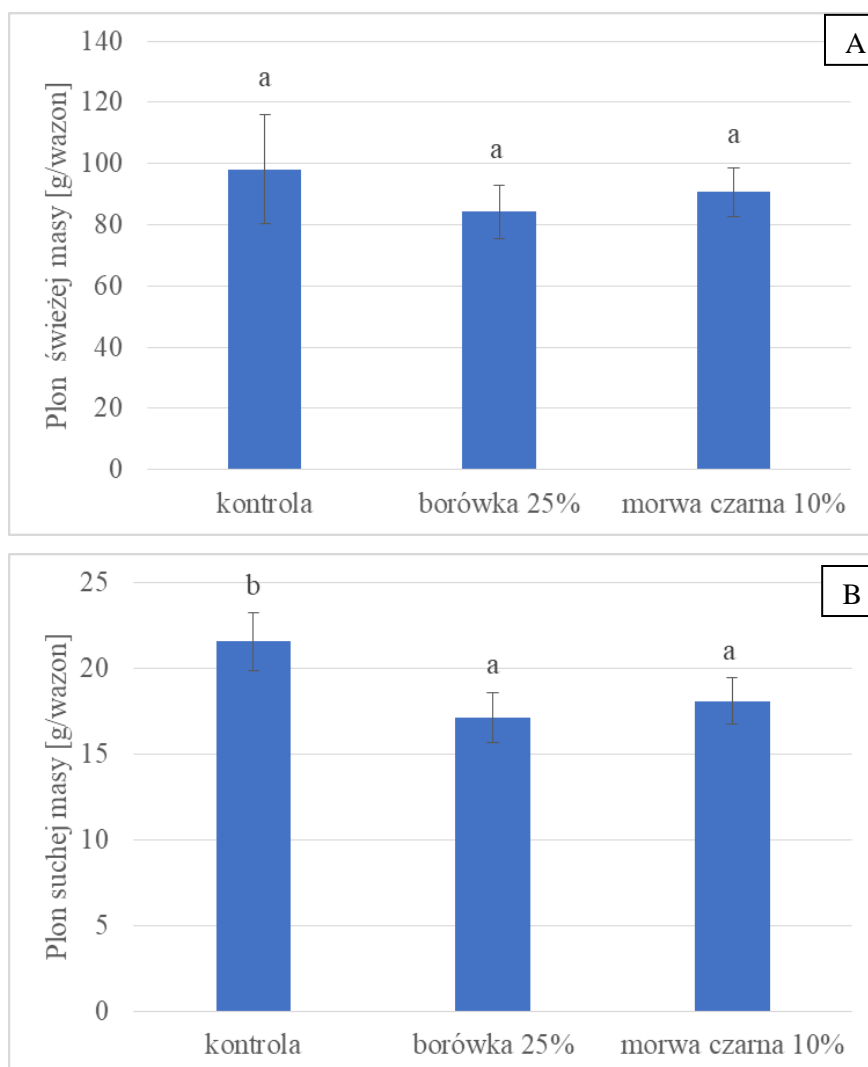
Rysunek 20 Zawartość azotu ogółem (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w trzech warstwach gleby biellicowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami w danej warstwie gleby.

### 5.3.4. Plon biomasy oraz zawartość makroskładników w roślinach

W celu zebrania informacji nt. wpływu badanych ekstraktów roślinnych na wzrost i rozwój roślin porównano wielkości plonów świeżej i suchej biomasy (Rysunek 21A-B), a także zawartości makroskładników w roślinach.

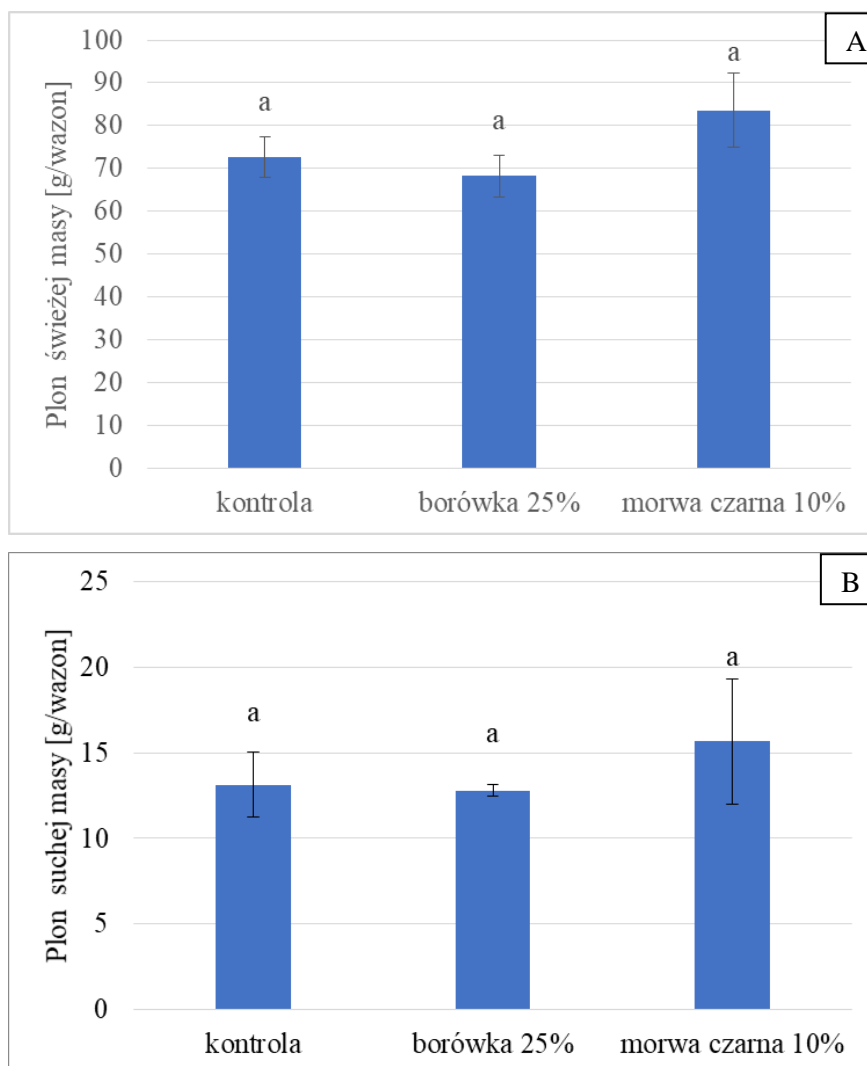
W przypadku gleby płowej nie zauważono zróżnicowania świeżej masy roślin między obiektami (Rysunek 21A). Zaobserwowano jednak istotne statystycznie różnice w plonie suchej masy (Rysunek 21B). Największy plon suchej masy uzyskano z obiektu kontrolnego, był on o 14% wyższy od plonu suchej masy uzyskanego z obiektu nawożonego mocznikiem z dodatkiem 25% ekstraktu z borówki oraz o 8% wyższy od plonu suchej masy z obiektów nawożonych mocznikiem z dodatkiem 10% ekstraktu z morwy czarnej.



Rysunek 21 Plon świeżej (A) i suchej masy (B) roślin w glebie płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

W glebie biellicowej nie zaobserwowano zróżnicowania w plonie świeżej (Rysunek 22A) oraz suchej masy roślin (Rysunek 22B) pomiędzy badanymi obiektami.

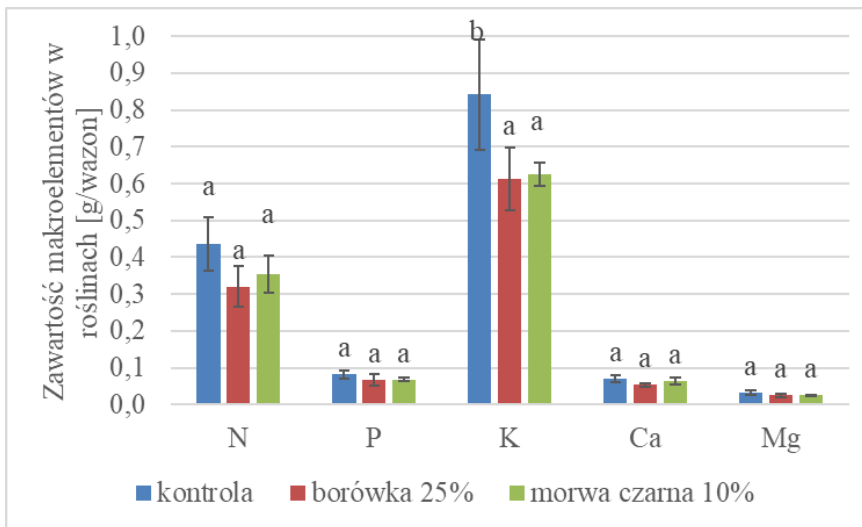


Rysunek 22 Plon świeżej (A) i suchej masy (B) roślin w glebie biellicowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

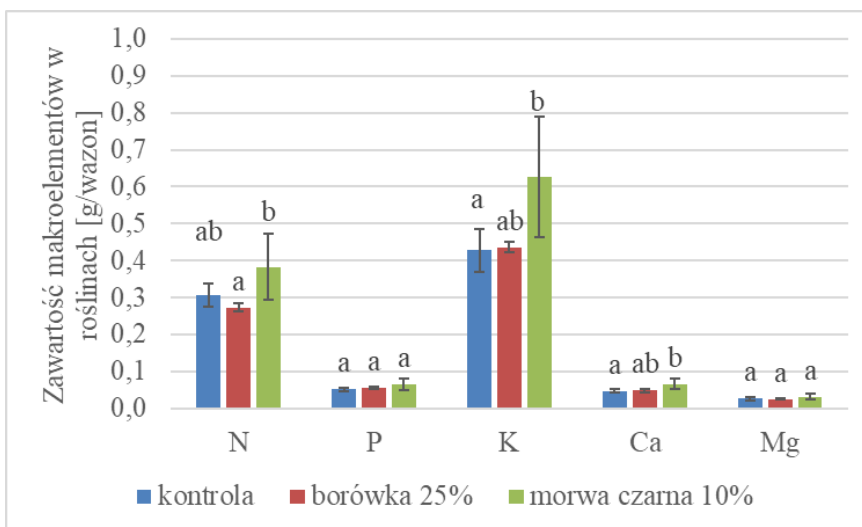
Zauważono, że aplikacja badanych ekstraktów otrzymanych z owoców maliny i morwy czarnej wpłynęła na istotne zmniejszenie zawartości potasu w roślinach (Rysunek 23). Nie zaobserwowano różnic w zawartościach pozostałych makroskładników w roślinach między obiektami, na które zaaplikowano badane ekstrakty roślinne a obiektem kontrolnym (na glebie płowej). Nawożenie mocznikiem oraz ekstraktem z morwy czarnej prowadziło do wzrostu zawartości potasu i wapnia w roślinach w porównaniu z nawożeniem mocznikiem w obiektach przygotowanych z wykorzystaniem gleby biellicowej (Rysunek 24). Ponadto zastosowanie

ekstraktu z morwy przyczyniło się do zwiększenia zawartości azotu w roślinach w porównaniu do obiektu, w którym zastosowano mocznik z dodatkiem ekstraktu z borówki (gleba bielkowa).



Rysunek 23 Zawartość makroelementów w suchej masie roślin w glebie płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami



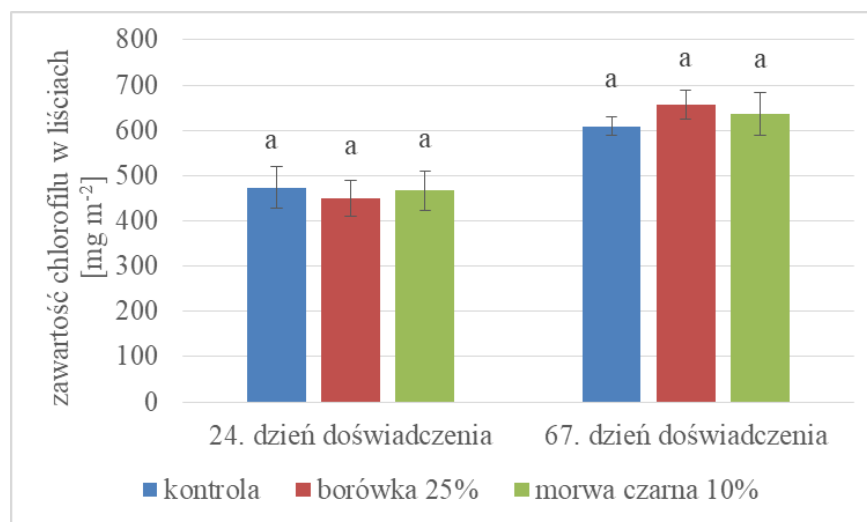
Rysunek 24 Zawartość makroelementów w suchej masie roślin rosnących w glebie bielkowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

### 5.3.5 Zawartość chlorofilu w liściach

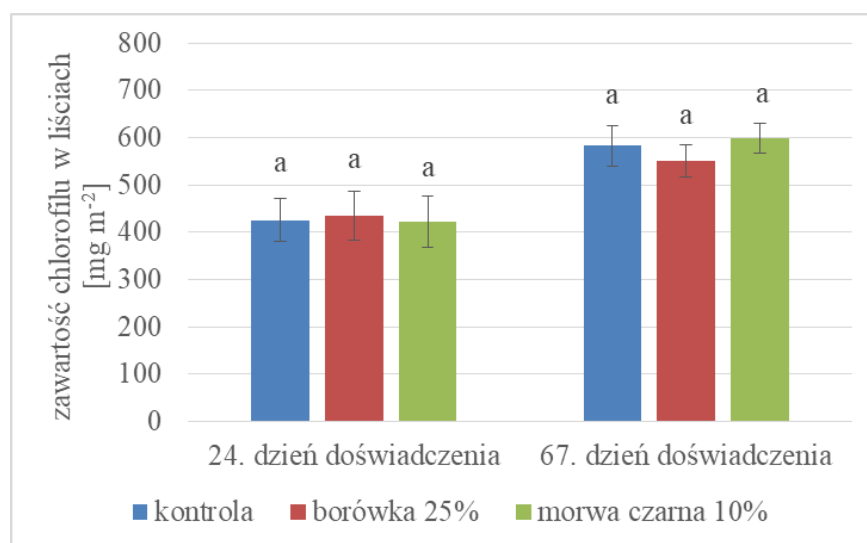
W celu określenia stanu odżywienia rośliny azotem przeprowadzono pomiar zawartości chlorofilu w liściach. Główną funkcją chlorofilu jest absorpcja światła słonecznego podczas fotosyntezy.

W przypadku gleby płowej, jak i bielcowej nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w zawartości chlorofilu po zastosowaniu badanych ekstraktów roślinnych (Rysunki 25 i 26).



Rysunek 25 Zawartość chlorofilu w liściach pszenicy rosnącej na glebie płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami



Rysunek 26 Zawartość chlorofilu w liściach pszenicy rosnącej na glebie bielcowej

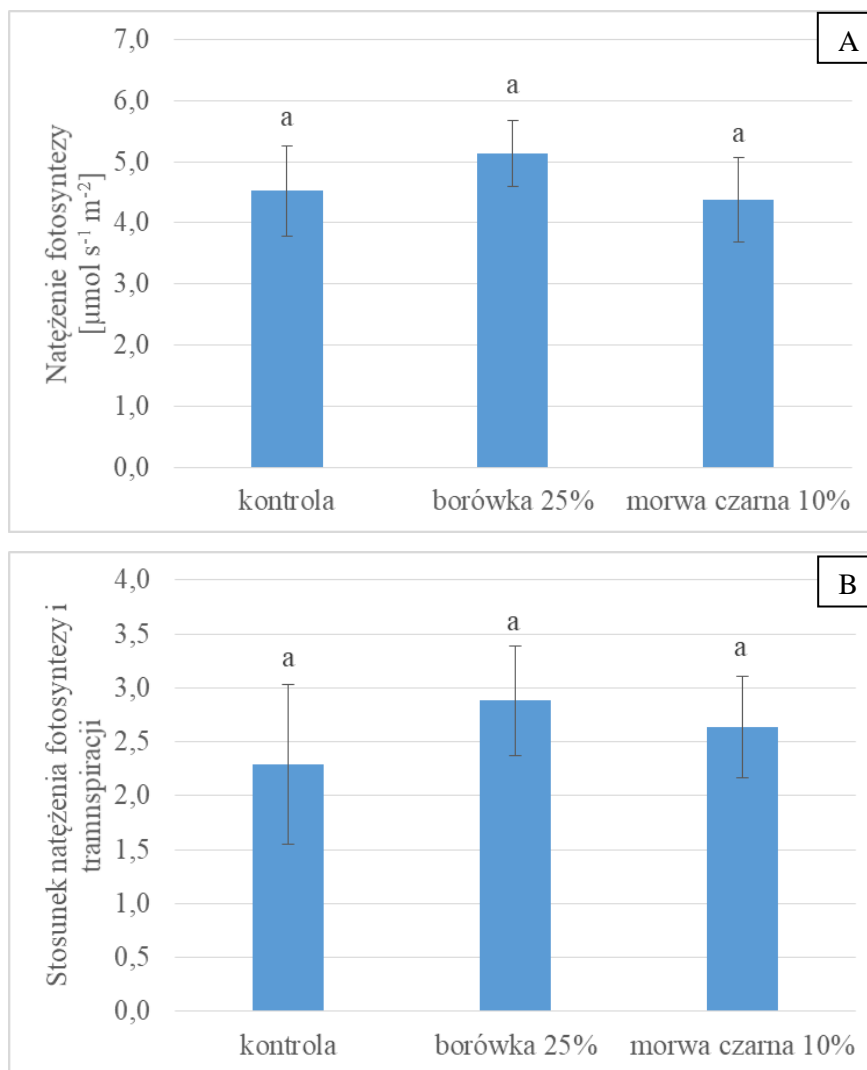
Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

### 5.3.6. Intensywność fotosyntezy

W celu określenia wpływu badanych ekstraktów roślinnych na rośliny przeprowadzono pomiary natężenia fotosyntezy i określono stosunek natężenia fotosyntezy do transpiracji. Fotosynteza ma wiele znaczących skutków dla życia na Ziemi. Po pierwsze, jest głównym źródłem tlenu w atmosferze, a co więcej jest kluczowym procesem w łańcuchu pokarmowym, ponieważ rośliny są podstawowym źródłem pożywienia dla większości organizmów na Ziemi. Transpiracja jest procesem, w którym rośliny tracą wodę w postaci pary wodnej przez aparaty szparkowe znajdujące się głównie na powierzchni liści. Jest to kluczowy proces, umożliwiający roślinom pobieranie wody i ich chłodzenie. Istotnym faktem jest to, że transpiracja może być również związana z pewnymi niekorzystnymi skutkami. Jeśli roślina traci zbyt dużo wody przez transpirację, może dojść do przesuszenia i uszkodzenia rośliny. Dlatego regulacja transpiracji jest ważnym mechanizmem dla roślin, a mechanizm działania aparatów szparkowych może być kontrolowany zależnie od warunków środowiskowych, takich jak dostępność wody i światła.

Analiza statystyczna wyników natężenia fotosyntezy roślin rosnących na glebie płowej wykazała brak istotnych różnic pomiędzy badanymi obiektami (Rysunek 27A). Zaobserwowano jednak wyższą wartość (o 26%) stosunku natężenia fotosyntezy do transpiracji w obiektach nawożonych mocznikiem z dodatkiem 25% ekstraktu z borówki w porównaniu do kontroli (Rysunek 27B).

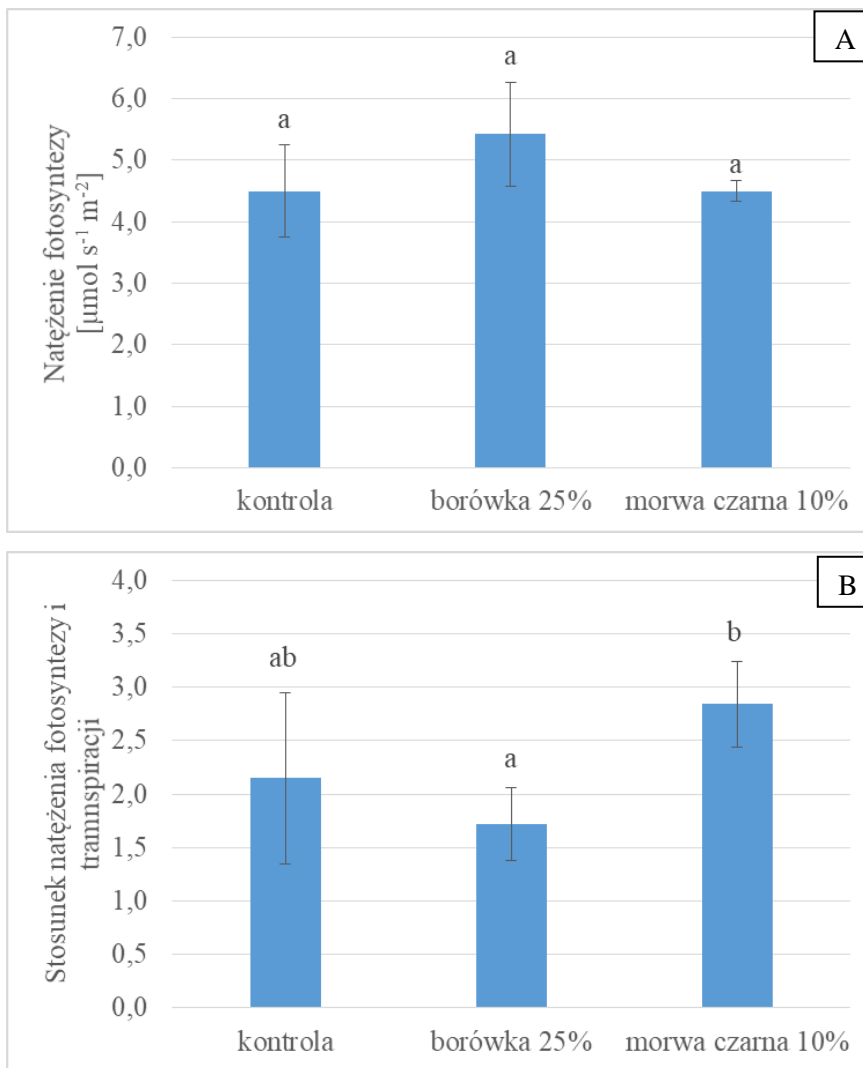




Rysunek 27 Natężenie fotosyntezy (A) oraz stosunek natężenia fotosyntezy do transpiracji (B) w pszenicy rosnącej na glebie płowej

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

W glebie biellicowej nie zaobserwowano zróżnicowania wyników natężenia fotosyntezy po zastosowaniu ekstraktów otrzymanych z owoców borówki i morwy czarnej (Rysunek 28A). Najwyższą wartość natężenia fotosyntezy odnotowano w obiektach, do których zaaplikowano 25% ekstrakt z borówki. W przypadku stosunku natężenia fotosyntezy do transpiracji zaobserwowano, że aplikacja ekstraktu z morwy czarnej spowodowała istotny wzrost wartości tego parametru w porównaniu do obiektu z ekstraktem z borówki (Rysunek 28B).



Rysunek 28 Natężenie fotosyntezy (A) oraz stosunek natężenia fotosyntezy i transpiracji (B) w pszenicy rosnącej na glebie bielcowej

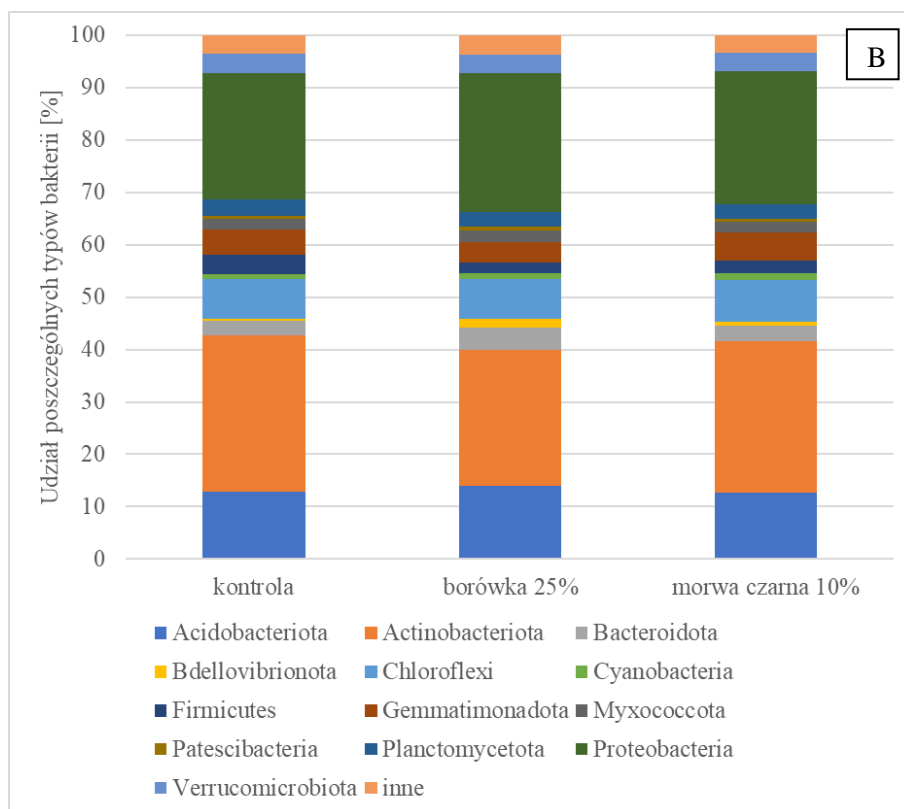
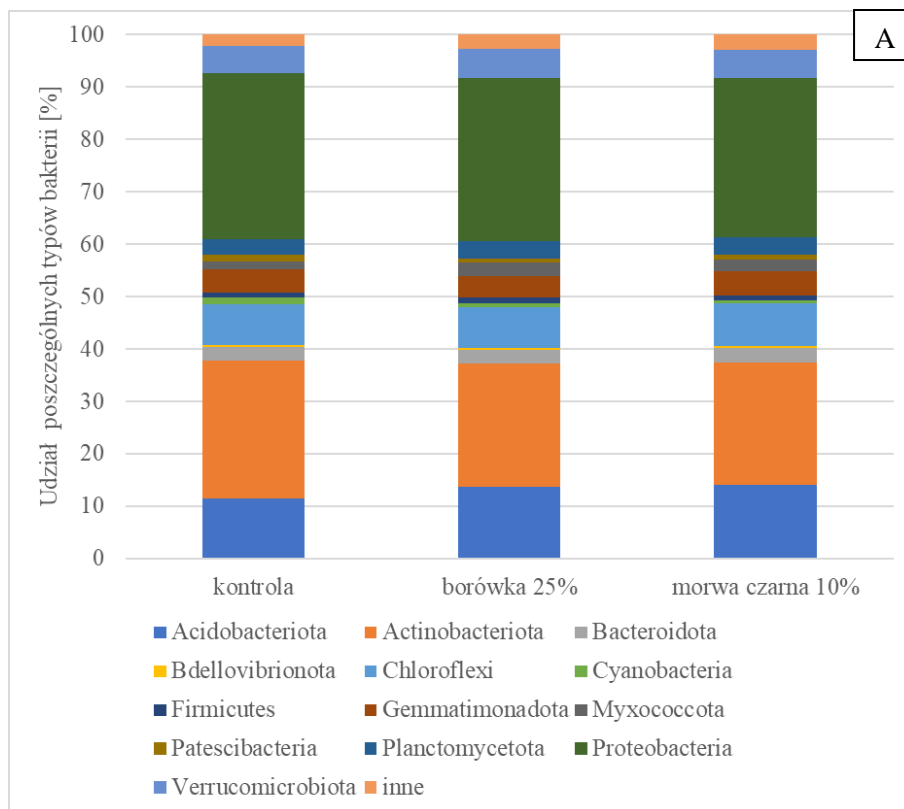
Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

## **5.4. Wpływ ekstraktów roślinnych na mikrobiom gleby**

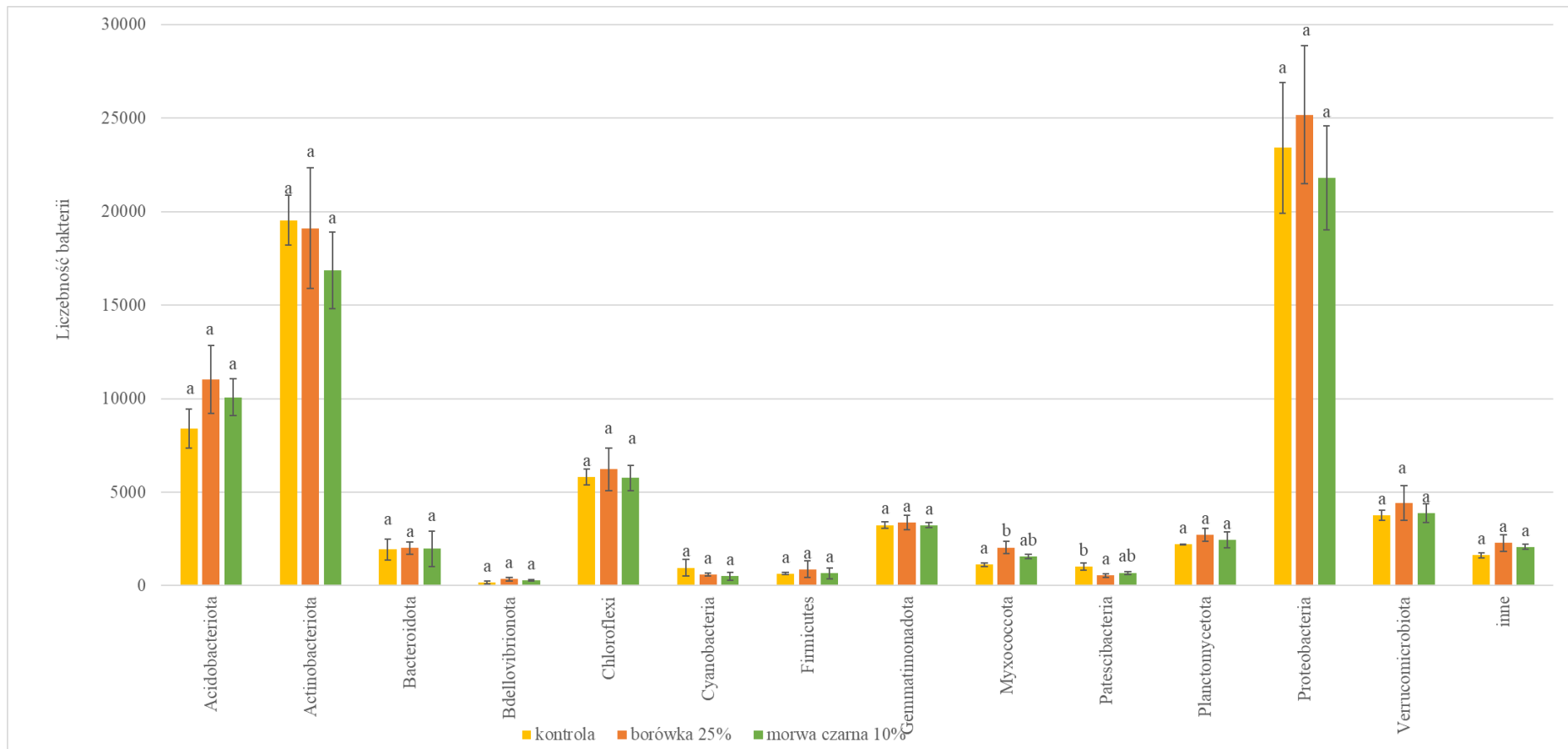
### **5.4.1. Liczebność i struktura zbiorowisk bakterii i grzybów w glebie**

Wyniki przeprowadzonego sekwencjonowania nowej generacji (NGS) umożliwiły zobrazować strukturę mikroorganizmów glebowych. Na Rysunkach 29A i 29B przedstawiono różnice w składzie bakterii na obu typach gleby w zależności od użytych ekstraktów roślinnych.

Dominującymi typami bakterii w obu badanych typach gleby były Actinobacteriota (23,5-29,8%, zależnie od obiektu) oraz Proteobacteria (24,1-31,7%, w zależności od obiektu). W glebie płowej zaobserwowano istotne statystycznie różnice w liczebności Myxococcota, liczebność bakterii należących do tego typu była istotnie większa w glebie z dodatkiem ekstraktu z borówki niż w glebie pobranej w obiekcie kontrolnego. Zastosowanie 25% ekstraktu z borówki na glebie płowej wpłynęło na 2-krotne zmniejszenie liczebności Patescibacteria w porównaniu do kontroli (Rysunek 30). Nie zaobserwowano wpływu użytych ekstraktów roślinnych na liczebność pozostałych zidentyfikowanych typów bakterii w glebie. W glebie bielcowej jedynym istotnym zaobserwowanym efektem wynikającym z aplikacji ekstraktów otrzymanych z owoców borówki był 4-krotny wzrost liczebności Bdellovibrionota oraz 1,4-krotny wzrost liczebności Patescibacteria w porównaniu do obiektu z mocznikiem (Rysunek 31).

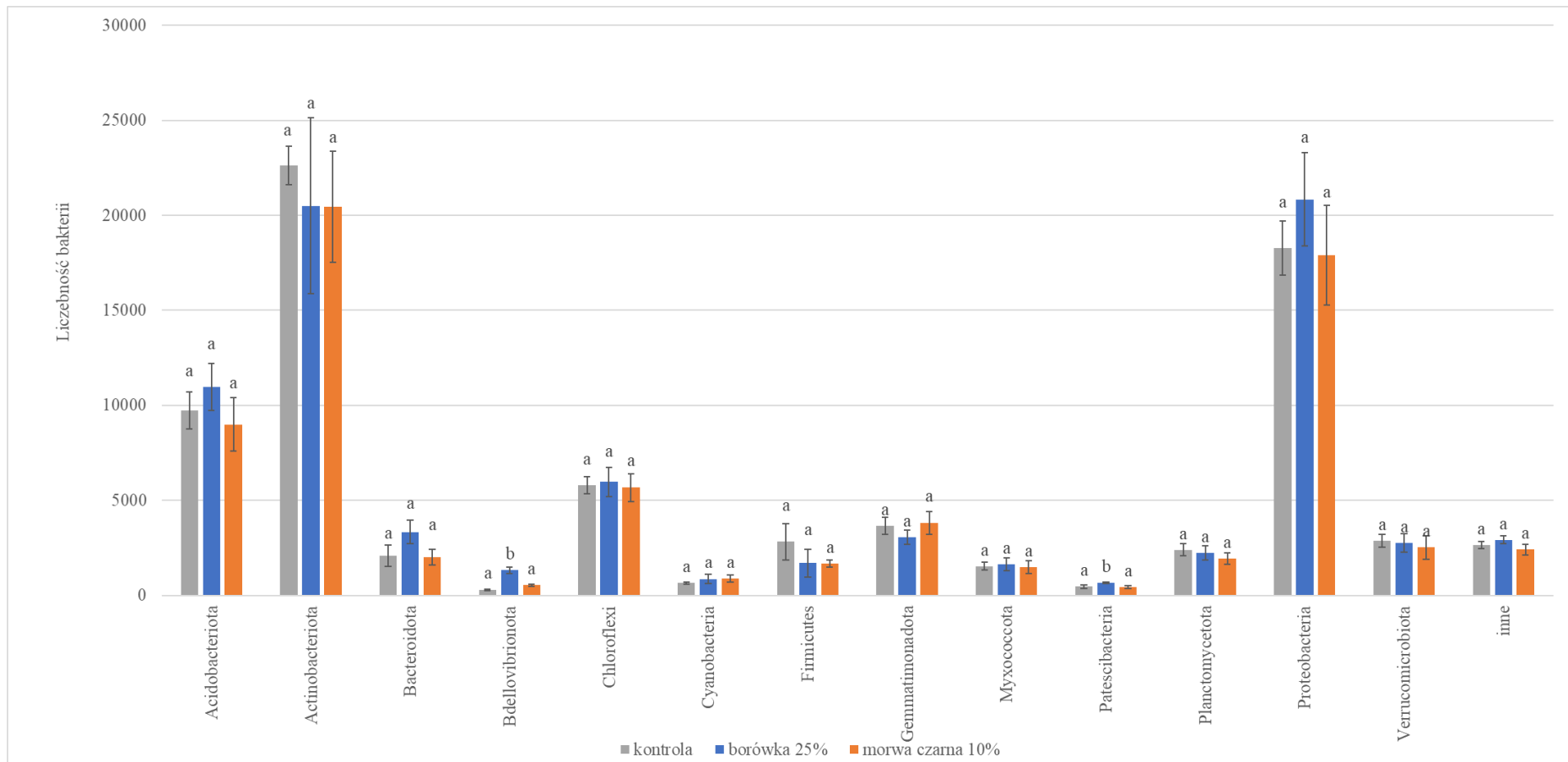


Rysunek 29 Udział (%) poszczególnych typów bakterii w glebie płowej (A) i biellicowej (B). Bakterie, których względna obfitość wynosiła poniżej 1% umieszczono w grupie „inne”



Rysunek 30 Liczebność poszczególnych typów bakterii w glebie płowej. Bakterie, których względna obfitość wynosiła poniżej 1% umieszczono w grupie „inne”

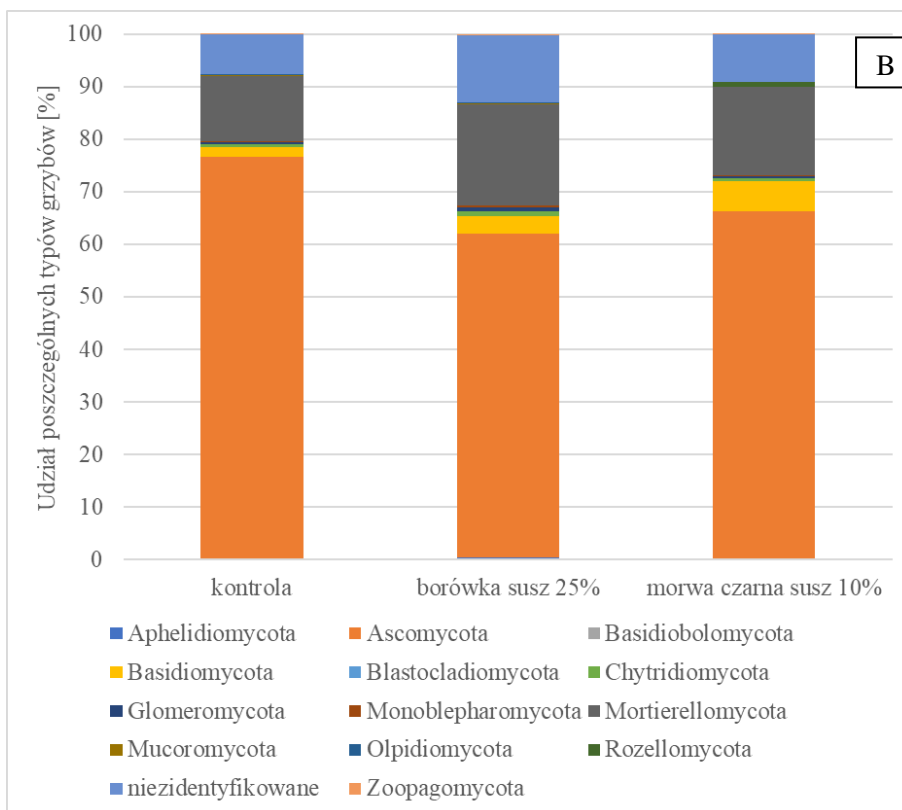
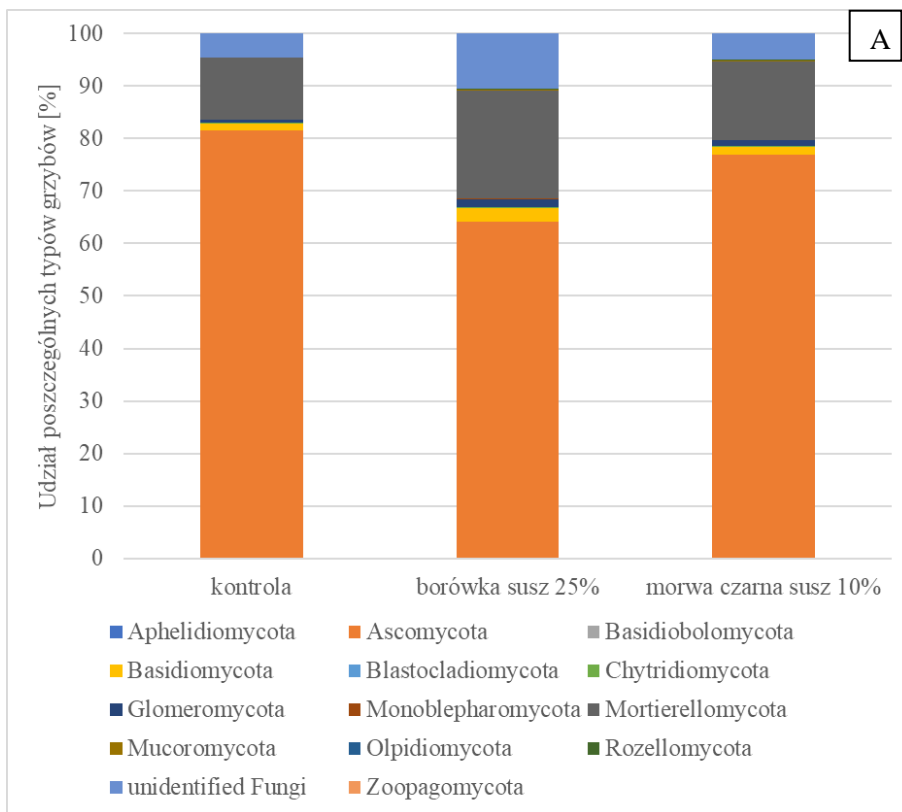
Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami



Rysunek 31 Liczebność poszczególnych typów bakterii w glebie bielcowej. Bakterie, których względna obfitość wynosiła poniżej 1% umieszczono w grupie „inne”

Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami

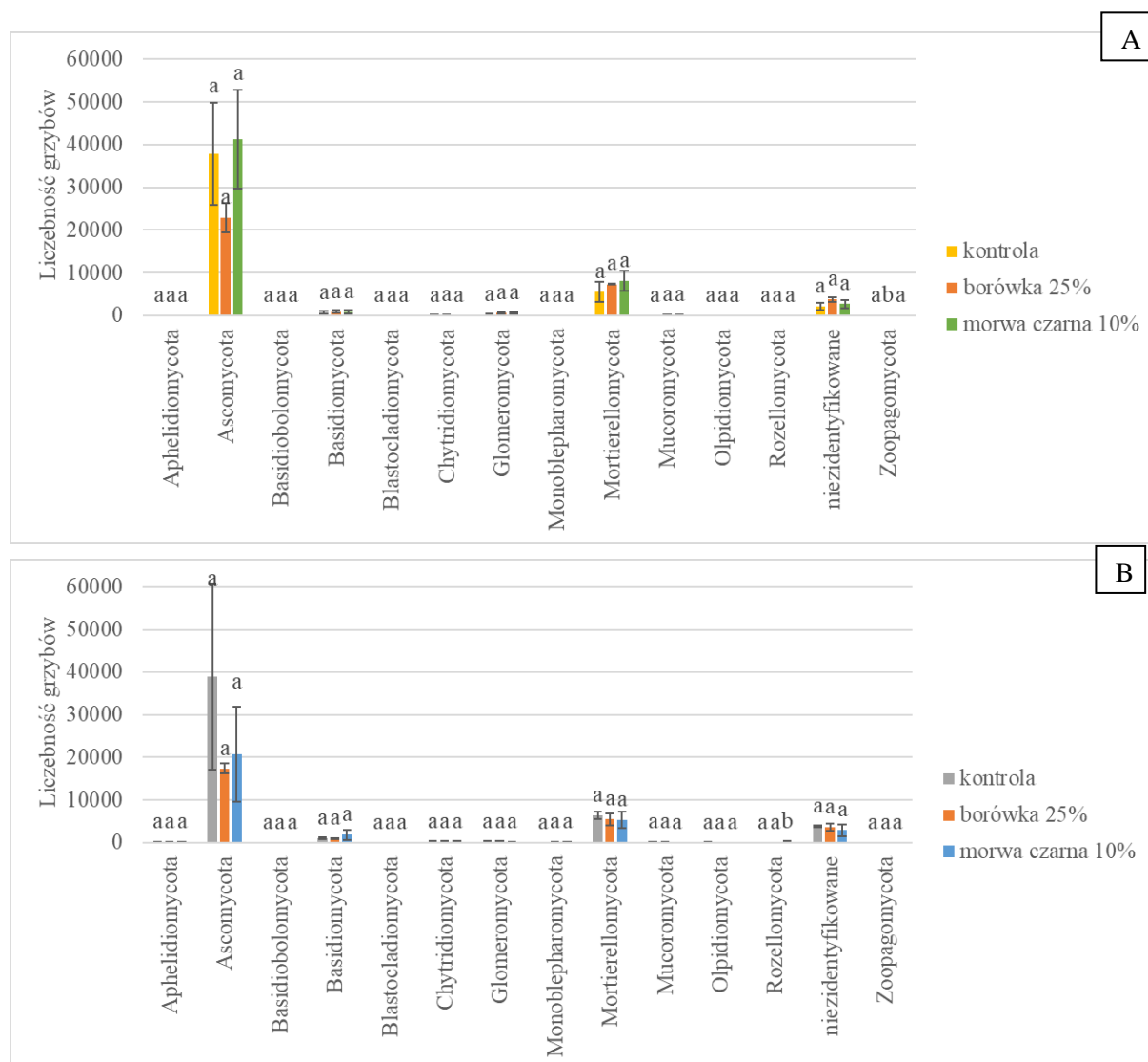
Analizując Rysunek 32 (A-B) zaobserwowano, że wśród zidentyfikowanych grzybów dominował Ascomycota (61,6-81,5%). Udział bakterii należących do tego typu był wyższy w przypadku gleby kontrolnej niż w obu glebach z ekstraktami, szczególnie z ekstraktem z borówki. Drugi pod względem obfitości typ stanowił Mortierellomycota (11,83-20,54%), którego udział w glebie kontrolnej był znacznie niższy niż po zastosowaniu ekstraktu z borówki.



Rysunek 32 Udział (%) poszczególnych typów grzybów występujących w badanych glebie płowej (A) i bielcowej (B)



Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotny wzrost liczebność grzybów należących do typu Zoopagomycota w glebie płowej po zastosowaniu ekstraktu z borówki (Rysunek 33A). W glebie bielcowej zaobserwowano wzrost liczebności grzybów Rozellomycota w wyniku zastosowania nawożenia mocznikiem z dodatkiem 10% ekstraktu z morwy czarnej (Rysunek 33B).



Rysunek 33 Liczebność poszczególnych typów grzybów w glebie płowej (A) i bielcowej (B) Słupki pionowe oznaczają odchylenie standardowe, natomiast różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

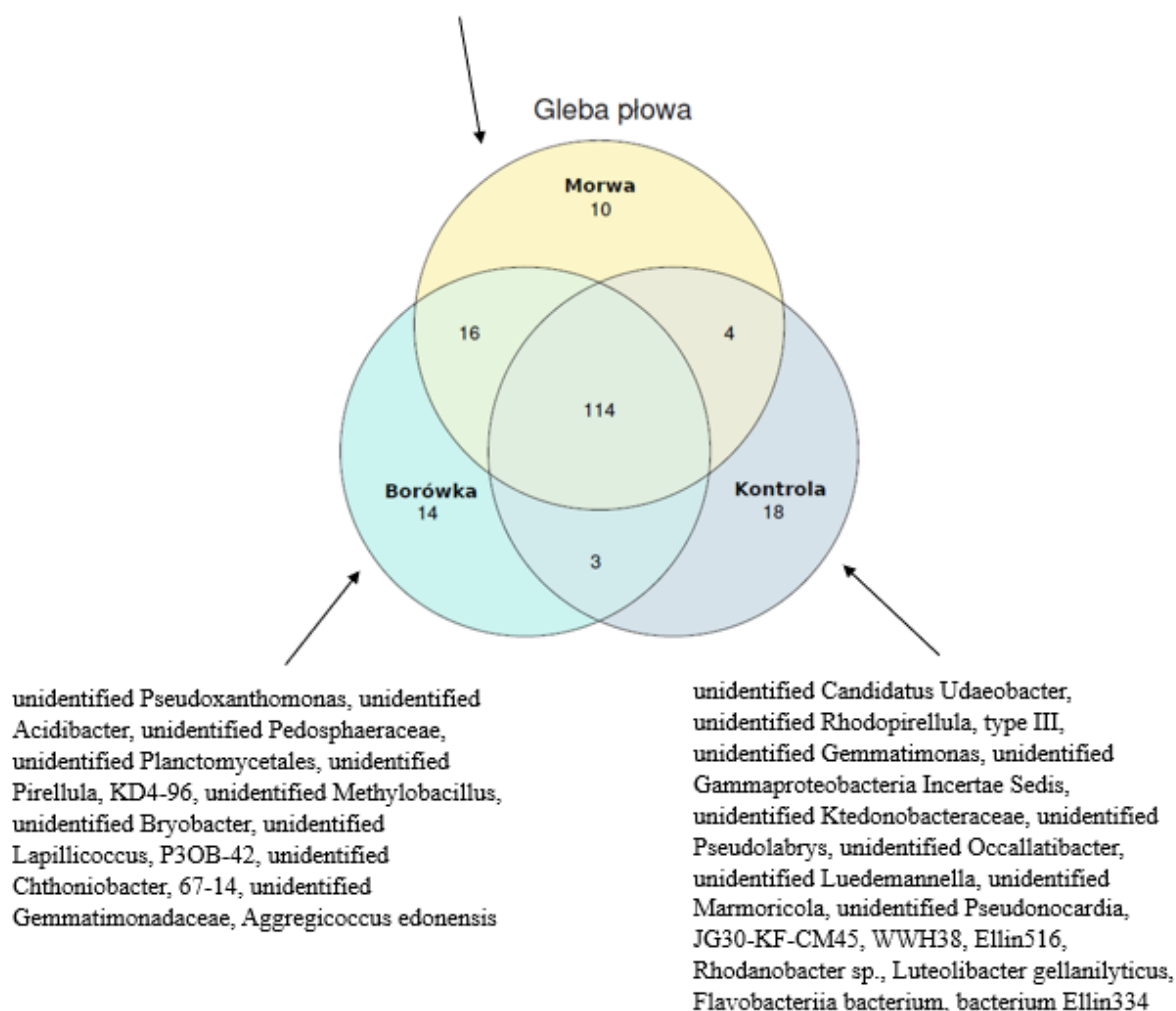
### 5.4.3. Zróznicowanie gatunków bakterii i grzybów

Informacje nt. gatunków bakterii i grzybów występujących w glebie są niezwykle istotne dla prawidłowego zrozumienia funkcjonowania ekosystemów. Na Rysunkach 34 i 35 przedstawiono zróznicowanie gatunków bakterii obecnych w glebie płowej i bielcowej

nawożonych mocznikiem (kontrola) oraz mocznikiem z dodatkiem obu badanych ekstraktów roślinnych.

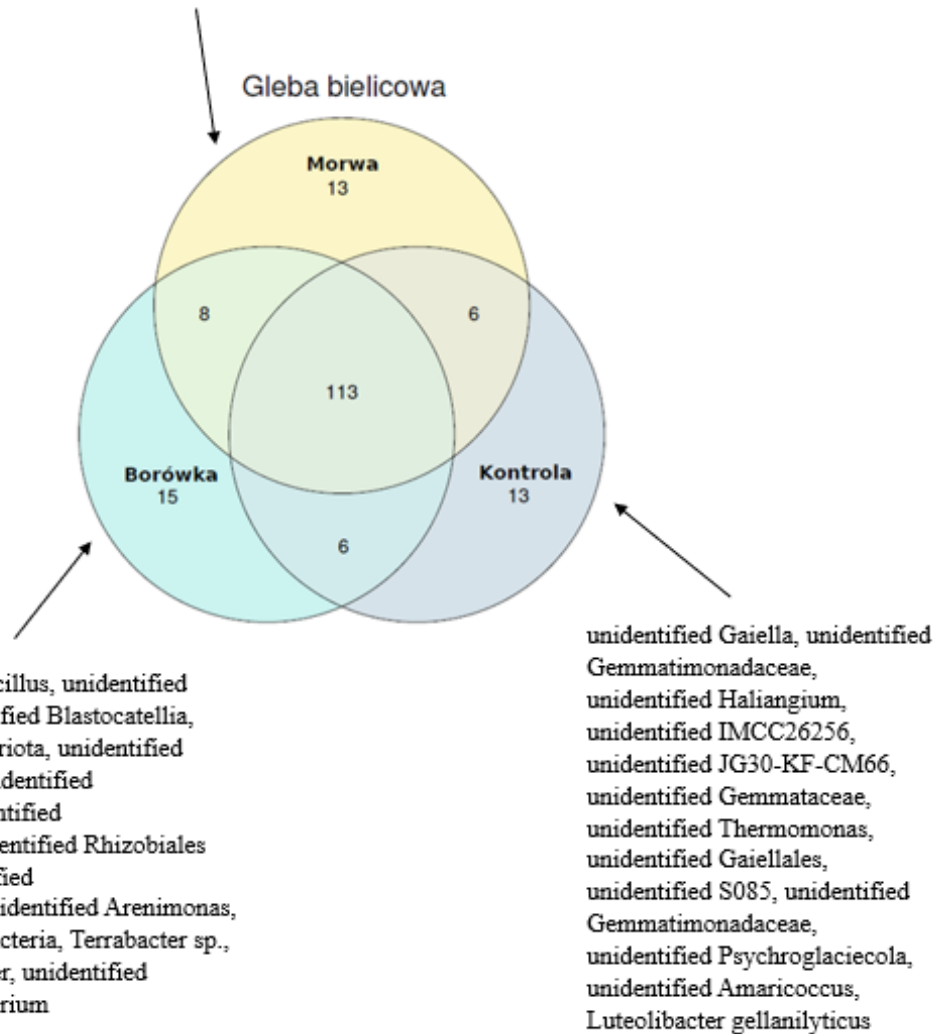
W przypadku gleby płowej najwięcej charakterystycznych bakterii (18) zidentyfikowano w próbach gleby kontrolnej (nawożonej mocznikiem), najmniej po zastosowaniu ekstraktu z morwy (10). Jak przedstawiono na Rysunku 34 dla stosowanych strategii nawożenia zaobserwowano 114 gatunków bakterii występujących we wszystkich wariantach doświadczenia. W glebie biellicowej (Rysunek 35) większą liczbę gatunków bakterii specyficznych odnotowano w próbkach gleby, do których zaaplikowano 10% ekstrakt z borówki (15) niż w pozostałych obiektach. Zidentyfikowano 113 wspólnych gatunków bakterii występujących jednocześnie we wszystkich badanych próbkach gleby biellicowej.

SM2D12, unidentified Nitrospira, unidentified Xanthobacteraceae, env.OPS\_17, unidentified Methyloligellaceae, unidentified Alphaproteobacteria, unidentified Diplorickettsiaceae, unidentified Fimbriimonadaceae, unidentified Latescibacterota, Arenimonas daejeonensis



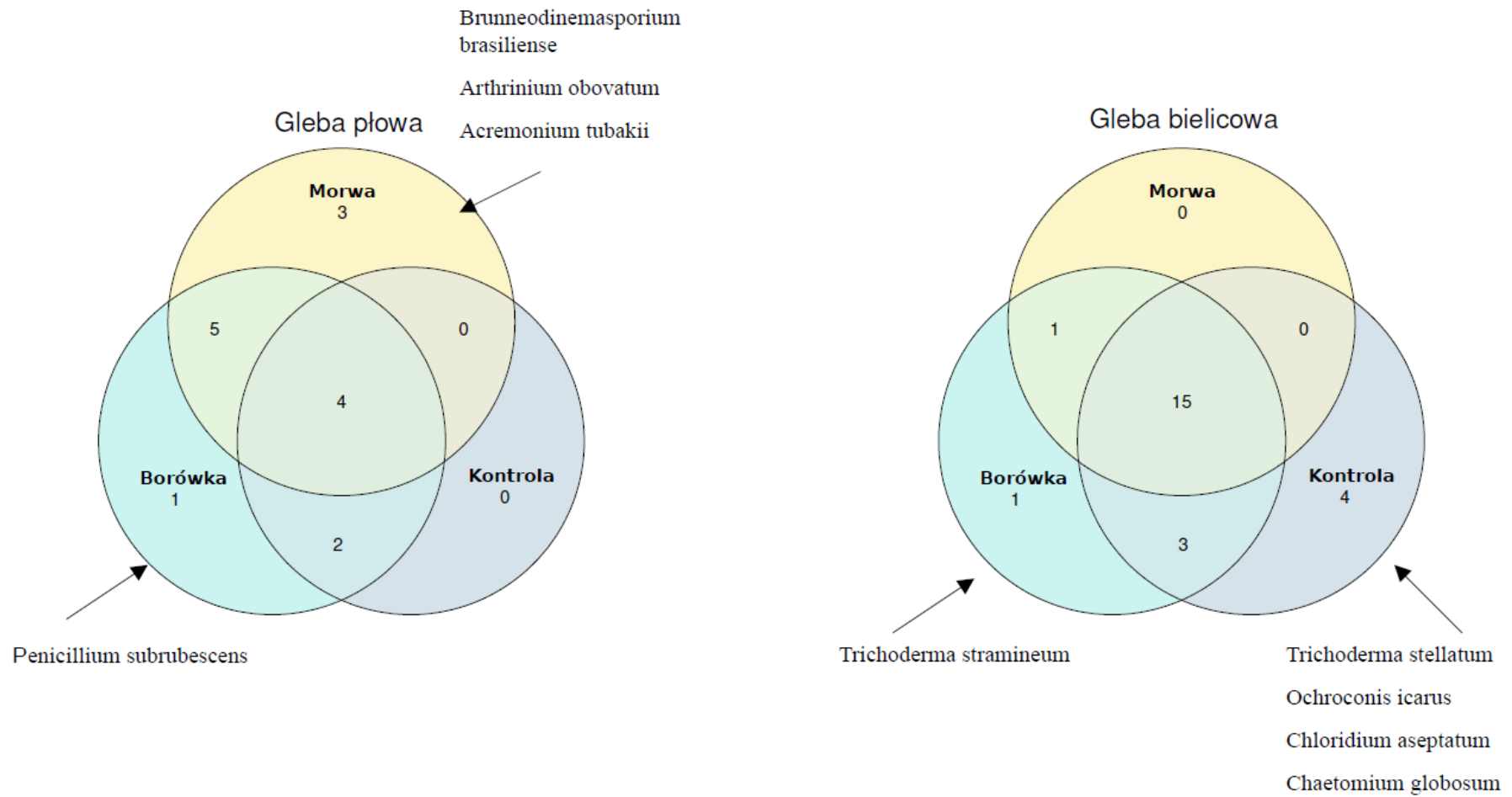
Rysunek 34 Diagramy Venna ilustrujące liczbę wspólnych i charakterystycznych dla poszczególnych obiektów wariantów sekwencji ampikonu (ASV) bakterii zidentyfikowanych na poziomie gatunku w glebie płowej

unidentified Lysobacter, unidentified Massilia,  
 unidentified Gemmatimonas, unidentified TK10,  
 unidentified LWQ8, unidentified Luteolibacter,  
 unidentified KD4-96, unidentified Pseudolabrys,  
 unidentified Candidatus unidentified  
 Alysiosphaera, unidentified IMCC26256,  
 unidentified Acidimicrobiia, unidentified  
 Fimbriimonadaceae, unidentified KD4-96



Rysunek 35 Diagramy Venna ilustrujące liczbę wspólnych i charakterystycznych dla poszczególnych obiektów wariantów sekwencji amplikonu (ASV) bakterii zidentyfikowanych na poziomie gatunku w glebie bielicowej

Na Rysunku 36 przedstawiono liczbę gatunków grzybów występujących w próbkach pobranych z poszczególnych obiektów prowadzonego doświadczenia wazonowego. W przypadku gleby płowej zidentyfikowano 4 wspólne gatunki grzybów, występujące niezależnie od rodzaju aplikowanego nawozu. Zastosowanie zarówno mocznika w połączeniu z 10% ekstraktem z morwy czarnej, jak i mocznika w połączeniu z 25% ekstraktem z borówki spowodowało pojawienie się specyficznych gatunków grzybów. W glebie bielcowej zidentyfikowano 15 wspólnych gatunków grzybów, a najwięcej gatunków specyficznych zaobserwowano w glebie kontrolnej.



Rysunek 36 Diagramy Venna ilustrujące liczbę wspólnych i charakterystycznych dla poszczególnych obiektów operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU) gatunków grzybów zidentyfikowanych w glebie płowej i bielkowej

### 5.4.3. Bioróżnorodność mikroorganizmów

Zaprezentowane w tabelach 8 i 9 wskaźniki bioróżnorodności pozwalają na kompleksową analizę różnorodności biologicznej w danym ekosystemie, co jest istotne w zrozumieniu jego struktury i funkcjonowania. Wskaźnik bogactwa gatunków (ang. Species Richness, S) jest miarą zidentyfikowanych gatunków obecnych w próbce. Nie uwzględnia ilości osobników danego gatunku ani ich równomierności w populacji. Wskaźnik równości Pielou (ang. Pielou's Evenness Index, J') informuje nas o tym w jaki sposób rozmieszczone są liczebności między różnymi gatunkami w danym zbiorowisku czy populacji. To dodatkowy wskaźnik, który uzupełnia informację o różnorodności danej próbki. Wskaźnik ten zależy od ilości osobników każdego gatunku i ich rozkładu liczebności. Wskaźnik Pielou przyjmuje wartości od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak równomierności (jeden gatunek dominuje), a 1 oznacza pełną równomierność (wszystkie gatunki mają taką samą liczebność). Odrębność taksonomiczna (Delta\*) wyraża, ile nowych jednostek taksonomicznych (np. gatunków) można dodać do zbioru, zanim ten zbiór nie osiągnie 100% odrębności. Wskaźnik Margalefa (d) jest stosowany do mierzenia różnorodności gatunków w próbce. Wartość tego wskaźnika zależy od liczby gatunków obecnych w próbce i liczby osobników każdego z tych gatunków. Wskaźnik ten pozwala porównywać różnorodność w różnych populacjach lub środowiskach. Wskaźnik Shannona ( $H(\log e)$ ) jest miarą różnorodności informacyjnej w zbiorowościach biologicznych, takich jak populacje czy ekosystemy. Wyższa wartość wskaźnika Shannona wskazuje na większą różnorodność gatunków lub równomierne rozkłady liczebności między różnymi gatunkami. Wskaźnik Simpsona (oznaczany jako 1-Lambda') jest miarą dominacji gatunków w zbiorowości. Oznacza prawdopodobieństwo, że dwa losowo wybrane osobniki należą do różnych gatunków. Wartość wskaźnika Simpsona maleje wraz z wzrostem różnorodności gatunków, co oznacza, że im wyższa wartość tego wskaźnika, tym mniejsza różnorodność w populacji.

Tabela 8 Wskaźniki bioróżnorodności bakterii w glebie

	Wskaźnik bogactwa gatunków, S	Wskaźnik Margalefa, d	Wskaźnik równości Pielou, J'	Wskaźnik Shannona, H'(log e)	Wskaźnik Simpsona, 1-Lambda'	Odrębność taksonomiczna, Delta*
Gleba płowa						
kontrola	819 <sup>a</sup>	73,0 <sup>a</sup>	0,853 <sup>a</sup>	5,72 <sup>a</sup>	0,992 <sup>a</sup>	94,6 <sup>a</sup>
borówka 25%	925 <sup>a</sup>	81,8 <sup>b</sup>	0,865 <sup>b</sup>	5,91 <sup>b</sup>	0,994 <sup>a</sup>	95,0 <sup>b</sup>
morwa czarna 10%	869 <sup>a</sup>	77,7 <sup>ab</sup>	0,863 <sup>b</sup>	5,84 <sup>b</sup>	0,994 <sup>a</sup>	95,1 <sup>b</sup>
Gleba bielkowa						
kontrola	1012 <sup>a</sup>	89,9 <sup>a</sup>	0,875 <sup>a</sup>	6,05 <sup>a</sup>	0,995 <sup>a</sup>	95,2 <sup>a</sup>
borówka 25%	1050 <sup>a</sup>	93,0 <sup>a</sup>	0,873 <sup>a</sup>	6,07 <sup>a</sup>	0,995 <sup>a</sup>	95,4 <sup>a</sup>
morwa czarna 10%	962 <sup>a</sup>	86,1 <sup>a</sup>	0,873 <sup>a</sup>	6,00 <sup>a</sup>	0,995 <sup>a</sup>	95,2 <sup>a</sup>

Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.



Tabela 9 Wskaźniki bioróżnorodności grzybów w glebie

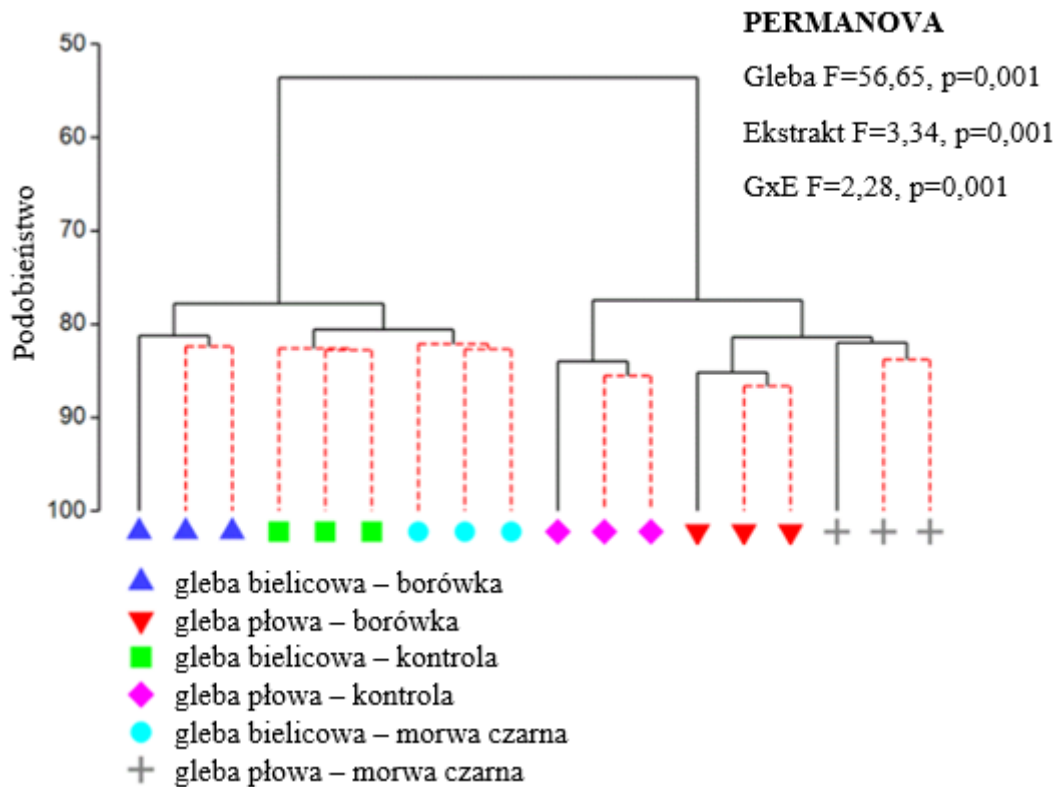
	Wskaźnik bogactwa gatunków, S	Wskaźnik Margalefa, d	Wskaźnik równości Pielou, J'	Wskaźnik Shannona, H'(log e)	Wskaźnik Simpsona, 1-Lambda'	Odrębność taksonomiczna, Delta*
Gleba płowa						
kontrola	171 <sup>a</sup>	15,9 <sup>a</sup>	0,318 <sup>a</sup>	1,64 <sup>a</sup>	0,514 <sup>a</sup>	92,0 <sup>a</sup>
borówka 25%	177 <sup>a</sup>	16,7 <sup>a</sup>	0,450 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>	0,737 <sup>a</sup>	92,8 <sup>a</sup>
morwa czarna 10%	185 <sup>a</sup>	16,9 <sup>a</sup>	0,358 <sup>a</sup>	1,87 <sup>a</sup>	0,583 <sup>a</sup>	92,4 <sup>a</sup>
Gleba bielkowa						
kontrola	199 <sup>a</sup>	18,4 <sup>a</sup>	0,511 <sup>a</sup>	2,70 <sup>a</sup>	0,745 <sup>a</sup>	90,1 <sup>a</sup>
borówka 25%	181 <sup>a</sup>	17,6 <sup>a</sup>	0,663 <sup>a</sup>	3,45 <sup>a</sup>	0,908 <sup>a</sup>	90,1 <sup>a</sup>
morwa czarna 10%	186 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>	0,587 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup>	0,857 <sup>a</sup>	90,6 <sup>a</sup>

Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami.

Zastosowanie ekstraktów roślinnych spowodowało wzrost wartości wskaźników bioróżnorodności dla zbiorowisk bakterii w glebie płowej. Zaobserwowano istotny wzrost wskaźników równości Pielou, Shannona, odrębności taksonomicznej oraz Margalefa (różnorodności gatunków) po zastosowaniu zarówno 25% ekstraktu z borówki, jak i 10% ekstraktu z morwy (oprócz wskaźnika Margalefa) w porównaniu do gleby nawożonej tylko mocznikiem. W glebie bielcowej nie zaobserwowano, aby dodatek któregośkolwiek z badanych ekstraktów roślinnych spowodował zmianę wartości któregośkolwiek z przedstawionych wskaźników bioróżnorodności.

Nie zaobserwowano wpływu badanych ekstraktów roślinnych na zmianę wartości wskaźników bioróżnorodności grzybów zarówno na glebie płowej, jak i bielcowej.

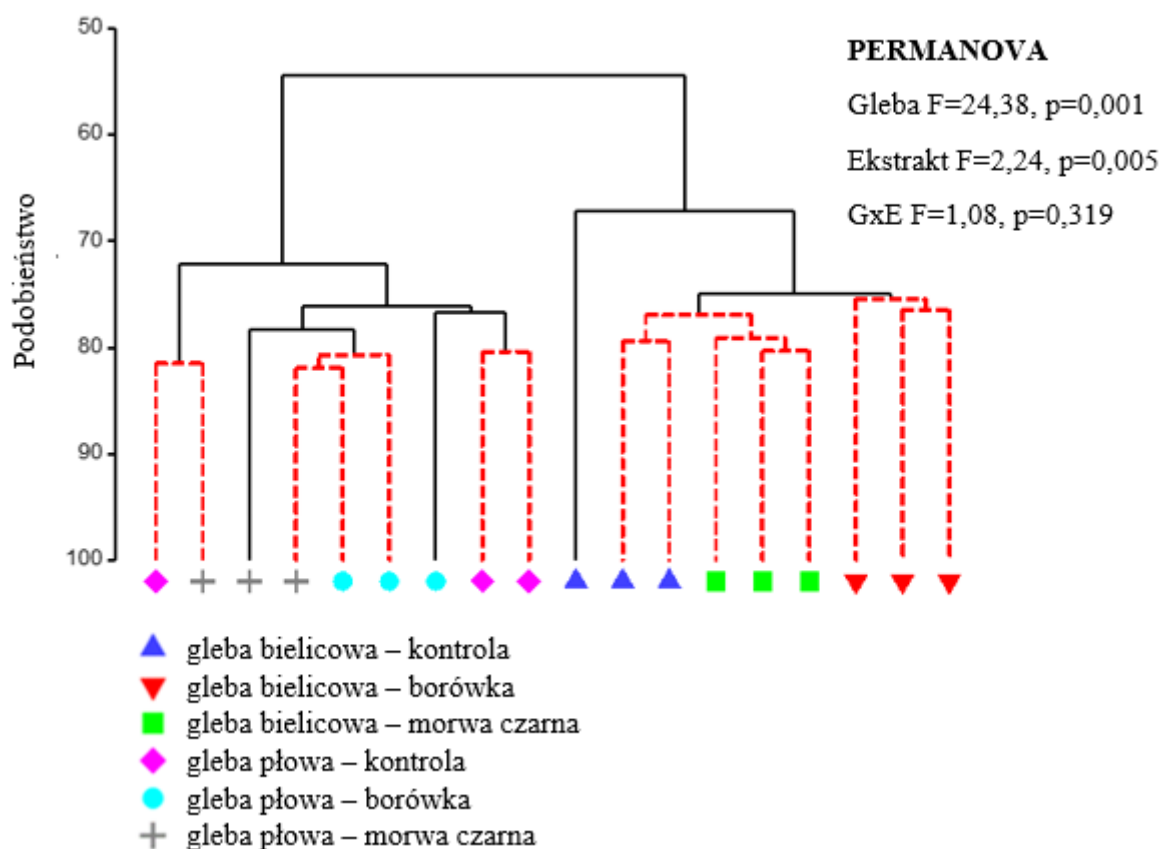
Skład zbiorowiska bakterii był w głównym stopniu determinowany przez typ gleby, co potwierdziły wyniki analizy skupień. Badane gleby wykazały 54% podobieństwa pod względem składu gatunków bakterii (Rysunek 37). W glebie bielcowej oraz na ogół w glebie płowej powtórzenia z każdego obiektu tworzyły jedną grupę (istotnie różną od pozostałych), przy czym w glebie bielcowej większe podobieństwo wykazał obiekt kontrolny z obiektem zawierającym ekstrakt z morwy niż obiektem zawierającym ekstrakt z borówki, natomiast w glebie płowej obiekt kontrolny utworzył oddzielną grupę a próbki gleby zawierające ekstrakty tworzyły drugą grupę (przy czym wewnątrz tej grupy różniły się między sobą istotnie). Co ważne, analiza PERMANOVA wykazała istotny wpływ zarówno typu gleby, jak i ekstraktów na zbiorowisko bakterii.



Rysunek 37 Analiza skupień (metoda średnich połączeń) dla gatunków bakterii w glebach bielnicowej i płowej nawożonych mocznikiem z dodatkiem ekstraktów roślinnych (przedstawiono po trzy powtórzenia dla każdego obiektu)

Czerwone linie wskazują skupiska, które nie różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ) według testu SIMPROF (999 permutacji). Załączono wyniki analizy wielowymiarowej PERMANOVA (wartości F i p) dla typu gleby, rodzaju ekstraktu oraz interakcji między tymi czynnikami (G×E).

Podobnie jak w przypadku analizy składu gatunkowego bakterii, tak też pod względem składu gatunkowego grzybów próbki dwóch analizowanych typów gleby wykazały niskie podobieństwo (54%) i tworzyły dwie oddzielne grupy na dendrogramie (Rysunek 38). Próbki gleby bielnicowej tworzyły dwa skupienia (różniące się statystycznie): obiekt z dodatkiem ekstraktu z borówki tworzył jedno skupienie, a w drugim znalazły się obiekty kontrolny i z dodatkiem ekstraktu z morwy. Jeżeli chodzi o glebę płową, to próbki z poszczególnych obiektów nie tworzyły tak wyraźnych skupisk. Wyniki analizy PERMANOVA potwierdzają istotny wpływ typu gleby i ekstraktów na skład gatunkowy grzybów.



Rysunek 38 Analiza skupień (metoda średnich połączeń) dla gatunków grzybów w glebach bielkowej i płowej nawożonych mocznikiem z dodatkiem ekstraktów roślinnych (przedstawiono po trzy powtórzenia dla każdego obiektu)

Czerwone linie wskazują skupiska, które nie różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ) według testu SIMPROF (999 permutacji). Załączono wyniki analizy wielowymiarowej PERMANOVA (wartości F i p) dla typu gleby, rodzaju ekstraktu oraz interakcji między tymi czynnikami (G×E).

## 6. Dyskusja

Użycie nawozów na bazie mocznika stale rośnie, w związku z czym należy dołożyć wszelkich starań, aby zredukować negatywny wpływ wynikający ze stosowania nawozów mineralnych na środowisko związany z emisją amoniaku. Prace nad poszukiwaniami substancji wykazujących właściwości hamujące aktywność enzymu ureazy są przyszłością rozwoju przemysłu związanego z segmentem rolnictwa. Dotychczas, najbardziej powszechnie stosowanymi inhibitorami ureazy były NBPT oraz NPPT, które wykazują bardzo wysoką efektywność. Należy mieć jednak na uwadze fakt, że do tej pory nie poznano konsekwencji dla środowiska wynikających z długoterminowego stosowania wspomnianych inhibitorów (Zanin i in., 2015).

Obserwując obecnie obowiązujące trendy w rolnictwie nietrudno zauważyć, że poszukiwane są biokomponenty do już istniejących nawozów, bądź też podejmowane są próby zastosowania substancji pochodzenia naturalnego, które wykazywałyby zbliżone, bądź nawet lepsze działanie przy ich łącznej aplikacji z obecnie stosowanymi nawozami. Istnieją doniesienia literaturowe mówiące o możliwości wykorzystania ekstraktów roślinnych jako komponentów nawozowych (Chojnacka i in. 2014, Hamidi i in. 2022, Michalak i in. 2016, Zhang i in. 2016).

### 6.1. Substancje aktywne występujące w roślinach i ich działanie na ureazę

Polifenole stanowią grupę potencjalnych inhibitorów ureazy (Al-Rooqi i in., 2023; Samori i in. 2019; Xiao i in., 2007), które dzięki swoim właściwościom przeciwutleniającym są stosowane jako biologicznie aktywne dodatki do żywności (Macegoniuk, 2013). W ramach niniejszej rozprawy do wstępnego etapu badań wybrano owoce o wysokiej zawartości związków polifenolowych, tj. malinę, borówkę, jeżynę i morwę czarną (Alvarez i in., 2016) oraz allicynę, substancję aktywną występującą w czosnku.

Flawonoidy są dotychczas najbardziej poznanymi przedstawicielami grupy związków polifenolowych. Wcześniejsze badania wykazały, że ekstrakty uzyskane z różnych części roślin (liści, owoców, skórki owoców, cebulkach, korze, czy nasionach), które zawierają polifenole, wykazują się właściwościami hamującymi aktywność ureazy (Awllia i in., 2016; Fernando i Roberts, 1976; Pastene i in., 2009; Shabana i in, 2010) Zakres inhibicji enzymu był zróżnicowany i wahał się od 12% do nawet 100%. Najprawdopodobniej grupy hydroksylowe –OH obecne w strukturze flawonoidów oddziałują z jonami niklu obecnymi w centrum aktywnym ureazy powodując ich dezaktywację. W doświadczeniu prowadzonym przez Awllia

(2016) najbardziej efektywnymi inhibitorami enzymu ureazy okazały się ekstrakty pozyskane z morwy czarnej (86,9-88,8% inhibicji). Wyniki badań własnych wykazały, że największą skuteczność wykazały owoce maliny (52% i 45% inhibicji przy zastosowaniu odpowiednio 100% i 25% ekstraktów otrzymanych z malin), jednak poziom redukcji stężenia jonów amonowych obserwowany przy zastosowaniu pozostałych badanych ekstraktów był równie obiecujący (4-39%).

Allicyna jest organicznym związkem siarki, który jest pozyskiwany z czosnku. Przeprowadzone w laboratorium GA ZAP własne badania wstępne potwierdziły właściwości allicyny opisane przez Mathialagan (2017). Przy zastosowaniu roztworów otrzymanych z suplementu diety ALLICIN MAX wykazano redukcję ilości jonów amonowych powstających w wyniku reakcji mocznika z ureazą w zakresie od 18% do 21%, zależnie od stężenia. Budowa strukturalna cząsteczki allicyny umożliwia jej wejście w reakcję z grupami tiolowymi należącymi do różnych enzymów, m.in. ureazy, powodując dezaktywację centrum aktywnego enzymu. W badaniach własnych nie odnotowano istotnego wpływu stężenia ekstraktu allicyny otrzymanego z komercyjnie dostępnego suplementu diety ALLICIN MAX na hamowanie aktywności ureazy. Tymczasem w wyniku prowadzonego przez Mathialagan (2017) doświadczenia zauważono, że spośród przebadanych ekstraktów otrzymanych z allicyny pochodzącej z preparatu ALLICIN MAX najbardziej efektywnym roztworem noszącym cechy inhibitora ureazy okazał się ten w najniższym stężeniu (5%). Odmienne wyniki dotyczące wpływu stężenia allicyny na skuteczność hamowania aktywności enzymu z przeprowadzonych badań własnych niż badań opisanych we wspomnianej publikacji naukowej mogą wynikać z zastosowania różnych metod badawczych. W badaniach własnych użyto czysty enzym ureazę, a badacze oznaczali aktywność enzymu obecnego w próbkach gleby.

## **6.2. Emisja amoniaku z gleby**

Amoniak, który jest uwalniany do środowiska w wyniku stosowania nawozów mineralnych ma negatywny wpływ zarówno na środowisko naturalne, jak i ludzkie zdrowie. Szacuje się, że źródłem 19,0-20,3% całkowitej emisji amoniaku z rolnictwa są nawozy mineralne, a w głównej mierze mocznik (Skorupka i Nosalewicz 2021). Mocznik jest jednym z najbardziej powszechnie stosowanych nawozów mineralnych, a straty w postaci emisji amoniaku, które towarzyszą jego aplikacji sięgają nawet 40% (Cantarella i in. 2018). Powszechność jego stosowania wynika zarówno z wysokiej zawartości azotu (46%),

jak i stosunkowo niskiej ceny. W związku z tym, że obserwowany jest wysoki poziom strat azotu z mocznika, a zarazem zmniejszenie jego dostępności dla roślin, niezwykle istotne jest poszukiwanie rozwiązań, które umożliwią redukcję poziomu emisji amoniaku. Wymogi legislacyjne stawiane przez Unię Europejską wymuszają na producentach nawozów mineralnych obniżenie poziomu emisji amoniaku o co najmniej 30% do 2030 roku (Dyrektywa (UE) 2016/2284). Jednym z możliwych rozwiązań jest zastosowanie inhibitorów ureazy, np. NBPT, którego użycie w znaczącym stopniu redukuje ilość uwalnianego amoniaku (Cantarella i in. 2018, Mira i in. 2017, Sanz-Cobena i in. 2010).

W przeprowadzonych w ramach tej pracy doświadczeniach inkubacyjnym i wazonowym zaobserwowano straty azotu w postaci emisji amoniaku ze wszystkich badanych obiektów. Zaobserwowano, że zastosowanie NBPT powoduje redukcję poziomu skumulowanej emisji amoniaku na poziomie 87% dla obiektów z glebą płową (pH 5,4 i zawartość materii organicznej 1,64% ) i 70% dla obiektów z glebą bielicową (pH 7,4 i zawartość materii organicznej 2,24% ) w doświadczeniu inkubacyjnym. Zaobserwowane różnice w emisji  $\text{NH}_3$  między badanymi typami gleb mogły częściowo wynikać z różnic w ich odczynie. Efektywność nawozu modyfikowanego NBPT w bardzo dużym stopniu zależy od odczynu gleby. Z danych opracowanych przez Rząd Australijski wynika, że połowiczny czas hydrolizy NBPT w środowisku wodnym o odczynie silnie kwaśnym (pH 3) wynosił ok. 60 minut, tymczasem w środowisku charakteryzującym się silnie zasadowym odczynem (pH 11) połowiczny czas hydrolizy wynosił 16 dni (Secondary Notification Assessment NA/467S for N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT), 2011). Związane jest to z faktem, iż niski odczyn środowiska, do którego aplikowany jest NBPT może spowodować proces degradacji wiązań amidowych obecnych w NBPT oraz zmniejszenie możliwości zablokowania aktywności ureazy. We wcześniejszych badaniach czas degradacji praktycznie całej zaaplikowanej dawki NBPT w glebie charakteryzującej się odczynem lekko kwaśnym (pH 6,2) wyniósł 5-6 dni (Engel i in., 2015). Tymczasem w glebie o odczynie zasadowym (pH 8,2) zaobserwowano akumulację NBPT<sub>o</sub>, związku, który powstaje w pierwszym etapie hydrolizy triamidu kwasu N-(n-butyl) tiofosforowego, czyli w trakcie jego utleniania. NBPT<sub>o</sub> wykazuje właściwości silnie hamujące aktywność ureazy (Byrne i in., 2020). Skuteczność NBPT w ograniczaniu emisji amoniaku jest opisana w licznych publikacjach naukowych. Najbardziej rozbudowaną metaanalizę wpływu NBPT na ulatnianie amoniaku oraz wydajność produkcji roślinnej przedstawili Silva i in. (2017). Zauważyli oni, że zastosowanie NBPT opóźniło pojawienie się maksimum emisji amoniaku oraz zwiększenie uzyskanych plonów. Według innych danych literaturowych NBPT może opóźnić hydrolizę

mocznika od 7 do 10 dni (Zaman i in. 2008). Zróżnicowana zawartość materii organicznej w badanych w ramach tej rozprawy glebach mogły być kolejnym czynnikiem przyczyniającym się do różnic w emisji amoniaku. Zgodnie z doniesieniami Mikkelsen (2009) wyższa zawartość materii organicznej w glebach ilastych sprzyja utrzymywaniu stałego pH gleby, co w konsekwencji zmniejsza ryzyko wystąpienia strat azotu.

Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki potwierdzają fakt, że poziom obserwowanej emisji amoniaku jest zależny od typu i struktury gleby, na którą zastosowano nawóz mączkowy. W badaniach własnych zaobserwowano istotnie wyższą skumulowaną emisję amoniaku z gleby biellicowej (o pH 7,4) niż z gleby płowej (pH 5,4), co znalazło potwierdzenie w literaturze (Sangoi i in. 2003). Gleba płowa ma bardziej zwartą strukturę gliny piaszczystej od gleby biellicowej, w której dominującą frakcją jest piasek gliniasty. Należy wziąć pod uwagę fakt, że im większa zawartość frakcji piasku w strukturze gleby, tym mniejsza zdolność do wymiany kationów. Gleby o wyższej zawartości frakcji ilastej są mniej narażone na starty azotu w postaci emisji amoniaku (Adegoke i in. 2022).

W doświadczeniu inkubacyjnym zbadano wpływ stężenia ekstraktu na skuteczność redukcji emisji amoniaku. W przeprowadzonych własnych doświadczeniach zarówno inkubacyjnym, jak i wazonowym udało się potwierdzić skuteczność niemalże wszystkich badanych ekstraktów z suszonych owoców w redukcji emisji amoniaku. Uzyskany poziom inhibicji był bardzo zróżnicowany i mieścił się w zakresie 30-88%. Uzyskane wyniki w doświadczeniu nie są jednak jednoznaczne. W przypadku gleby płowej zaobserwowano niemalże dwukrotnie większą skuteczność 10% ekstraktu z morwy czarnej w porównaniu do 25% ekstraktu z morwy czarnej. W przypadku gleby biellicowej bardziej skuteczny okazał się 10% ekstrakt z morwy czarnej. Podobne wyniki uzyskał Mathialagan (2017), który zaobserwował największe tempo przebiegu reakcji hydrolizy mocznika po aplikacji roztworów allicyny w najwyższym z badanych stężeń. Najbardziej skuteczną inhibicję ureazy spowodował dodatek 5% roztworu allicyny (najniższego badanego stężenia).

W doświadczeniu wazonowym zastosowano mącznik w dwóch dawkach ( $90 \text{ kg N ha}^{-1}$  i  $50 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). Celem takiego działania było wdrożenie rozwiązania mającego na celu ograniczenie strat azotu w postaci emisji amoniaku. Takie rozwiązanie jest opisane w Kodeksie Dobrej Praktyki Rolniczej. Terminy nawożenia zostały dobrane w taki sposób, aby zapewnić roślinom źródło azotu w krytycznych fazach wzrostu roślin, tj. w fazie krzewienia i kłoszenia. Wg. informacji podanych przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa to właśnie w tych fazach wzrostu pszenicy roślina wykazuje największą dynamikę pobierania składników pokarmowych. Łącznie zaaplikowano  $140 \text{ kg N ha}^{-1}$ , a dawka nawozu została



dobrana w taki sposób, by nie przekroczono maksymalnej dopuszczalnej dawki nawożenia azotem w uprawie pszenicy jarej zalecanej przez IUNG PIB w Puławach. O mniejszej emisji amoniaku towarzyszącej aplikacji nawozu z podziałem na dawki pisali m.in.: Piwowar (2020), Skorupka i Nosalewicz (2021) i Watson i in. (2008).

### 6.3. Aktywność ureazy

Polifenole to związki występujące w wielu roślinach, które znajdują zastosowanie w medycynie oraz przemyśle spożywczym. Do związków polifenolowych zalicza się m.in. flawonoidy i izowflawonoidy. Przeprowadzono wiele badań naukowych z wykorzystaniem polifenoli, dzięki czemu zdobyto informacje na temat ich bardzo dużej aktywności biologicznej. Związki te wykazują działanie hamujące enzymy, antybakteryjne, przeciwzapalne, a nawet antynowotworowe (Bag i in., 2022; Mierziak i in., 2014; Siczek i in., 2017; Shah i Smith, 2020; Xiao i in. 2007). Z przeglądu literatury wynika, że na aktywność ureazy wpływa wiele substancji aktywnych pochodzenia roślinnego. Skuteczność flawonoidów jako inhibitorów enzymu ureazy została potwierdzona w doświadczeniu przeprowadzonym przez Awlia (2016). W opisanym eksperymencie zbadano wpływ 9 komercyjnie dostępnych flawonoidów na aktywność enzymu ureazy. Spośród przebadanych przez Awlia (2016) związków chemicznych najbardziej skutecznym okazały się te, które otrzymano z morwy czarnej (*Morus mesozygia*). W doświadczeniu użyto 3 związki, pozyskane z morwy czarnej. Uzyskany stopień inhibicji aktywności enzymu wahał się w zakresie 86,9-88,8% i był zależny od użytego związku. Każdy ze wspomnianych związków charakteryzował się innym mechanizmem inhibicji aktywności enzymu. Skuteczność wspomnianych związków była najprawdopodobniej związana z obecnością 2 lub więcej grup hydroksylowych w budowie ich cząsteczki, które przyłączały się do centrum aktywnego enzymu dezaktywując go.

Amidohydrolaza mocznika, czyli ureaza jest kluczowym enzymem biorącym udział w obiegu azotu w przyrodzie, który występuje zarówno w bakteriach, grzybach, jak i roślinach. Cechuje ją zdolność do przyspieszenia przebiegu hydrolizy mocznika o sto bilionów razy (Modolo i in. 2015). Szybkość przebiegu reakcji katalizowanej enzymatycznie jest mierzona poprzez zmianę stężenia substratu w czasie (Harris i Keshwani, 2009). Aktywność ureazy glebowej ocenia się na podstawie przyrostu stężenia jonów amonowych, które są produktem rozpadu mocznika w czasie.

W ramach prac realizowanych w trakcie doktoratu przeprowadzono doświadczenie inkubacyjne, które miało na celu sprawdzenie, czy badane ekstrakty roślinne zastosowane w dwóch stężeniach, tj. 10% i 25% spowodują zmniejszenie aktywności ureazy oraz zaobserwowanie jak wygląda dynamika tego procesu. W doświadczeniu zbadano wpływ wybranych ekstraktów roślinnych na aktywność enzymu ureazy. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na obniżenie aktywności ureazy po zastosowaniu 10% ekstraktu z borówki suszonej na glebie płowej w 2. i 6. dniu trwania doświadczenia. W glebie bielicowej zaobserwowano obniżenie aktywności ureazy po zastosowaniu wszystkich badanych ekstraktów w 3. dniu trwania doświadczenia, co sugeruje opóźnienie przebiegu hydrolizy mocznika.

W związku z tym, że istnieją doniesienia literaturowe mówiące o tym, że odmienne właściwości gleby mogą warunkować tempo zachodzenia procesu hydrolizy mocznika (Cabrera 1991, Zhao 2022), doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch typów gleby. W przypadku gleb o wyższym pH i wysokiej zawartości frakcji piasku tempo zachodzenia procesu jest szybsze, przez co uwalniana jest większa ilość amoniaku (Diaz 2021). Przeprowadzone badania własne wykazały, że aktywność ureazy w glebie bielicowej charakteryzującej się wyższą wartością pH była na ogół wyższa niż w glebie płowej. Maksymalna aktywność ureazy odnotowana dla próby kontrolnej (zarówno w doświadczeniu inkubacyjnym, jak i wazonowym) na glebie bielicowej była ponad dwukrotnie większa od maksymalnej aktywności enzymu na glebie płowej. W przypadku próby kontrolnej zaobserwowano również szybsze pojawienie się maksimum aktywności enzymu. W glebie płowej wykazano hamujący wpływ 10% ekstraktu z borówki suszonej w 2. i 6. dniu trwania doświadczenia. W przypadku gleby bielicowej aplikacja wszystkich badanych ekstraktów spowodowała istotne obniżenie aktywności enzymu w 3. dniu trwania doświadczenia.

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wazonowego potwierdziły, że aktywność ureazy w glebie bielicowej była wyższa niż w glebie płowej. Co więcej, zaobserwowano wyraźny wzrost aktywności ureazy po aplikacji drugiej dawki nawozu, co oczywiście było związane z dodaniem substratu w postaci mocznika. W doświadczeniu wazonowym na glebie bielicowej zaobserwowano obniżenie aktywności ureazy po aplikacji obu badanych ekstraktów roślinnych w czwartym dniu eksperymentu.

#### 6.4. Zawartość azotu w glebie

W związku z tym, że działanie inhibitorów ureazy może regulować przemianę mocznika do amoniaku, a następnie amoniaku do azotanów (Fu, 2019), po zakończeniu doświadczeń inkubacyjnego i wazonowego pobrano próbki z różnych warstw gleby i oznaczono w nich zawartość azotu ogólnego, a także zawartości jonów azotanowych i amonowych. Nie zaobserwowano wpływu badanych ekstraktów roślinnych na zawartość azotu ogólnego w badanych próbkach. W doświadczeniu inkubacyjnym zaobserwowano tendencję do wyższej zawartości azotu ogólnego w górnej warstwie gleby w porównaniu do warstwy dolnej w obu badanych glebach.

W toku przeprowadzonych własnych badań inkubacyjnych odnotowano zmniejszenie zawartości azotanów w obu badanych typach gleb po aplikacji ekstraktów z borówki (dla obu stężeń w przypadku gleby płowej i 25% ekstraktu w przypadku gleby bielkowej) oraz 25% ekstraktów z maliny i morwy czarnej. Podobne wyniki otrzymali Al Ansari i Abdulkareem (2013), którzy zaobserwowali spadek zawartości jonów  $\text{NO}_2^-$  w próbkach gleby po aplikacji ekstraktów roślinnych w porównaniu do próbek gleby do których zaaplikowano DCD. Naukowcy tłumaczyli, że obserwowane zjawisko może być związane z procesami wiązania azotu, ułatwianiem amoniaku oraz procesami nityfikacji spowodowanymi m.in. przez związki polifenolowe i inne substancje aktywne, które są uwalniane do gleby (Al Ansari i Abdulkareem, 2013).

W doświadczeniu inkubacyjnym zauważono wzrost stężenia jonów amonowych w górnej warstwie gleby płowej po zastosowaniu 25% ekstraktów z owoców borówki i maliny, a także 10% ekstraktu z morwy czarnej w porównaniu do gleby z samym mocznikiem. Mogło to być związane z faktem, iż nastąpiło ograniczenie emisji amoniaku po aplikacji ekstraktów. Tymczasem w doświadczeniu wazonowym zaobserwowano zmniejszenie zawartości jonów amonowych w środkowej warstwie gleby pobranej z obiektów po aplikacji obu badanych ekstraktów w porównaniu do obiektu kontrolnego. Podobnie Al Ansari i Abdulkareem (2013) obserwowali zjawisko akumulacji jonów  $\text{NH}_4^+$  i spadku zawartości jonów  $\text{NO}_3^-$  w glebie po aplikacji ekstraktów wodnych otrzymanych z kaparów, ostropestu, trawy *Imperata cylindrica* oraz granatu.

Zauważono wyraźne zróżnicowanie w poziomach zawartości jonów azotanowych i amonowych pomiędzy doświadczeniem inkubacyjnym a wazonowym. W doświadczeniu wazonowym poziom zawartości jonów azotanowych i amonowych w glebie był 1-2 rzędy wielkości mniejszy. Związane to było z faktem, iż w doświadczeniu wazonowym rośliny

pobierały azot z gleby niezbędny do przebiegu procesów metabolicznych i wzrostu (Modolo i in. 2015).

## 6.5. Analiza roślin

Na podstawie uzyskanych wyników badań nie stwierdzono istotnego zróżnicowania świeżej biomasy pszenicy jarej nawożonej mocznikiem z dodatkiem badanych ekstraktów roślinnych w przypadku obu badanych gleb. Zauważono jednak zmniejszenie suchej masy roślin rosnących na glebie płowej z dodatkiem 25% ekstraktu z borówki. Nie zaobserwowano również zróżnicowania zawartości chlorofilu i natężenia fotosyntezy pomiędzy obiektami doświadczalnymi. Należy nadmienić, że wzrost roślin w doświadczeniu wazonowym prowadzono do fazy kłoszenia pszenicy, a przeprowadzenie doświadczenia do fazy pełnej dojrzałości dałoby zapewne bardziej pełny obraz tego, w jaki sposób zastosowanie ekstraktów z mocznikiem wpływają na wzrost roślin i plon ziarna pszenicy. Dokładne zrozumienie wpływu badanych ekstraktów na wzrost i plonowanie roślin wymagałoby przeprowadzenia dalszych badań, w tym badań polowych. Wyniki otrzymane przez innych autorów dotyczące wzrostu roślin po zastosowaniu substancji roślinnych są zróżnicowane. Sriraj (2022) opisał badania, w których zastosowanie ekstraktu z liści neem wpłynęło na zmniejszenie świeżej i suchej masy pędów sałaty. Godlewska i in. (2021) nie zaobserwowali wpływu niektórych badanych ekstraktów roślinnych na wielkość plonu rzodkiewki oraz zawartość chlorofilu w jej liściach. W innych pracach naukowych stwierdzono przyspieszenie rozwoju korzeni, poprawę pobierania składników mineralnych, a także wzrostu wegetatywnego określonego przez długość i powierzchnię liści winogron, co więcej zaobserwowano również zwiększenie plonu o 14,7% i polepszenie jakości winogron po przeprowadzeniu nawożenia dolistnego za pomocą ekstraktu z trawy morskiej (Cataldo i in., 2022). Również Ertani (2011) w doświadczeniu z kukurydzą zaobserwował wpływ ekstraktu z borówki na wzrost korzeni o 15% oraz suchej masy liści w zakresie 38-80%. Wzrost biomasy kukurydzy zaobserwowano także po zastosowaniu biostymulatora na bazie lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.). Stwierdzono, że biostymulator otrzymany z lucerny indukował aktywność enzymów związanych z metabolizmem azotu, co skutkowało bardziej efektywnym przyswajaniem azotu i lepszym wzrostem uprawianych roślin (Ertani i in., 2012). W innym doświadczeniu biostymulatory otrzymane z lucerny siewnej i skórki czerwonych winogron przyczyniły się do wzrostu świeżej masy liści i plonu papryki Habanero (*Capsicum chinensis* L.). Zauważono, że biostymulatory sprzyjały wzrostowi roślin i produkcji metabolitów wtórnych, np. fenoli (Ertani in., 2014).

W innym doświadczeniu opisano wpływ wyizolowanych składników aktywnych z mango (*Mangifera indica*) na polepszenie wzrostu pomidorów (Etagare i in., 2015).

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano wpływ badanych ekstraktów roślinnych na spadek zawartości potasu w roślinach pszenicy na glebie płowej oraz na wzrost zawartości potasu i wapnia w pszenicy rosnącej na glebie bielicowej. Nie zaobserwowano istotnego wpływu ekstraktów roślinnych na zawartość pozostałych oznaczonych makroelementów (N, P, K i Mg) w roślinach w porównaniu do nawożenia mocznikiem bez ekstraktów. W opracowaniu May i in. (2021), które miało na celu zweryfikowanie wpływu ekstraktów pozyskanych ze zdrowych roślin soi zaaplikowanych na rośliny tego samego gatunku uprawiane w późniejszym terminie wykazał, że spośród wszystkich badanych makroelementów (N, P, K, Ca, Mg i S) zaobserwowano istotne różnice jedynie w przypadku zawartości potasu w ziarnach soi. Związane jest to z faktem, iż mikroorganizmy stymulujące wzrost roślin mogą również korzystnie wpłynąć na kiełkowanie, wzrost sadzonek, a także pobieranie potasu przez soję (May i in., 2021).

## **6.6. Wpływ ekstraktów roślinnych na mikrobiom gleby**

Zastosowanie metody sekwencjonowania nowej generacji umożliwiło określenie struktury zbiorowisk mikroorganizmów występujących w glebie. Opracowane wyniki własne dostarczyły informacji na temat różnic występujących w składzie taksonomicznym bakterii i grzybów, które były obserwowane w zależności od użytych w doświadczeniu wazonowym ekstraktów roślinnych.

Analiza przeprowadzonych badań własnych wykazała wpływ badanych ekstraktów roślinnych otrzymanych z owoców borówki na wzrost liczebności bakterii należących do typów Bdellovibrionota (w glebie bielicowej), Myxococcota (w glebie płowej) i Patescibacteria (w obu badanych typach gleby). Nie zaobserwowano wpływu badanych ekstraktów roślinnych na liczebność pozostałych zidentyfikowanych typów bakterii. Zaobserwowano również istotny wpływ badanych ekstraktów roślinnych na wzrost liczebności grzybów należących do typów Rozellomycota (po aplikacji 10% ekstraktu z morwy czarnej na glebie bielicowej) oraz Zoopagomycota (po aplikacji 25% ekstraktu z morwy czarnej na glebie płowej). W toku przeprowadzonych badań własnych zaobserwowano także wzrost wartości wskaźników bioróżnorodności bakterii występujących w glebie płowej po aplikacji zarówno 25% ekstraktu z borówki, jak i 10% ekstraktu otrzymanego z morwy czarnej, przy czym ekstrakty nie wpływały istotnie na wartości wskaźników bioróżnorodności grzybów. Na podstawie

przeprowadzonych analiz (analiza skupień, PERMANOVA, wskaźniki bioróżnorodności) wynika, że zbiorowisko bakterii było bardziej podatne na działanie ekstraktów niż zbiorowisko grzybów. Ponadto warto podkreślić, że typ gleby w znacznie większym stopniu kształtował mikrobiom gleby (dotyczy to zarówno bakterii i grzybów) niż ekstrakty roślinne (co wyraźnie wykazała analiza skupień).

Otrzymane wyniki w ramach niniejszej rozprawy są zgodne z wynikami dotychczasowych badań, które również wykazały zmiany w strukturze mikroorganizmów glebowych wskutek zastosowania ekstraktów roślinnych. Wpływ ekstraktów roślinnych otrzymanych z uboczki (*Larrea* spp.) na strukturę zbiorowisk bakterii i grzybów występujących w glebie został opisany w publikacji del Mar Montiel-Rozas i in. (2020), gdzie zaobserwowano wzrost wskaźnika Shannona po aplikacji ekstraktu z uboczki. Etaware i in. (2019) w przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych opisali wpływ surowych ekstraktów roślinnych otrzymanych z mango indyjskiego (*Mangifera indica*) oraz jatrofy przeczyszczającej (*Jatropha curcas*) na zahamowanie wzrostu patogennych grzybów z gatunków *Aspergillus sclerotirium*, *Aspergillus glaucus* oraz *Aspergillus terreus*, które wywoływały poważne choroby upraw pomidorów w Nigerii. Co więcej, w opisanych wyżej doświadczeniach naukowcy zauważyli wpływ wspomnianych ekstraktów roślinnych na zwiększenie obwodu łodygi oraz powierzchni liści uprawianych pomidorów (Etaware i in., 2019). Również Paul i Sharma (2002) opisali skuteczność ekstraktów roślinnych pozyskanych z liści neem w walce z patogenem grzybowym wywołującym plamistość liści u jęczmienia. Skuteczność ekstraktu z neem była porównywalna do skuteczności komercyjnie dostępnego fungicydu Bavistin przeznaczonego do walki z chorobą jęczmienia.

Warto dodać, że obserwowano też niekorzystny wpływ niektórych ekstraktów na mikroorganizmy glebowe, co dowodzi, że jakość, skład chemiczny ekstraktów roślinnych decyduje w głównej mierze o kierunku ich oddziaływania na mikrobiom gleby. Ekstrakt otrzymany z kory *Pinus radiata* prowadził do zmniejszenia biomasy mikroorganizmów w glebie (Suescun i in., 2012), co związane było z wysoką zawartością fenoli i skondensowanych tanin w ekstrakcie, które najprawdopodobniej wykazują właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze. W innej pracy Schütz i in. (2021) obserwowali zmniejszenie wartości wskaźników bioróżnorodności po aplikacji kwercetyny i benzoksazolinonu w porównaniu do kontroli. Ponadto, zauważono istotne różnice w strukturze bakterii między badanymi próbkami zależne od rodzaju zaaplikowanego metabolitu roślinnego. Wykazano, że kwercetyna istotnie wpływała na zbiorowiska bakterii występujące w badanych próbkach, podczas gdy wpływ benzoksazolinonu i graminy był mniejszy (Schütz i in., 2021).

## 7. Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych z przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Wybrane na podstawie przeglądu literatury ekstrakty różniły się między sobą zdolnością do hamowania aktywności ureazy w zależności od użytego do ekstrakcji materiału i stężenia ekstraktu w przeprowadzonych badaniach w roztworze wodnym.
2. Zarówno w doświadczeniu inkubacyjnym, jak i wazonowym uzyskano znaczącą redukcję emisji amoniaku z gleby nawożonej mocznikiem z dodatkiem większości otrzymanych ekstraktów roślinnych w porównaniu do gleby nawożonej samym mocznikiem. Spośród ekstraktów analizowanych w doświadczeniu inkubacyjnym, najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu 25% ekstraktu z borówki na glebie płowej oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej na glebie bielkowej. W doświadczeniu wazonowym dodatek badanych ekstraktów roślinnych spowodował znaczne obniżenie emisji amoniaku z gleby bielkowej, natomiast w przypadku gleby płowej aplikacja mocznika z ekstraktem z morwy skutkowałą zwiększeniem strat N w porównaniu z obiektem kontrolnym.
3. Ograniczenie strat azotu w postaci emisji amoniaku z gleby po aplikacji ekstraktów roślinnych z mocznikiem było porównywalne lub mniejsze (zależnie od użytego ekstraktu i typu gleby) niż po zastosowaniu komercyjnego inhibitora ureazy NBPT w doświadczeniu inkubacyjnym.
4. Wielkość emisji amoniaku uzależniona była od typu gleby. W doświadczeniu inkubacyjnym na glebie bielkowej (o odczynie zasadowym) zaobserwowano istotnie większą emisję amoniaku niż na glebie płowej (o odczynie kwaśnym).
5. W doświadczeniu inkubacyjnym zastosowanie ekstraktów roślinnych łącznie z mocznikiem spowodowało zmniejszenie stężenia jonów azotanowych w obu badanych warstwach gleby płowej. Ponadto zaobserwowano wzrost stężenia jonów amonowych w górnej warstwie gleby płowej po zastosowaniu 25% ekstraktów z borówki i maliny oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej.
6. Nawożenie mocznikiem oraz ekstraktem z morwy miało korzystny wpływ na zawartość potasu i wapnia w roślinach pszenicy rosnącej na glebie bielkowej. W przypadku gleby płowej nawóz z ekstraktami przyczyniał się do zmniejszenia zawartości potasu w roślinach. Zastosowanie ekstraktów nie wpływało na intensywność fotosyntezy oraz zawartość chlorofilu w pszenicy.

7. Głównym czynnikiem warunkującym mikrobiom gleby był typ gleby a nie rodzaj użytego ekstraktu roślinnego.
8. Wykazano, że badane ekstrakty roślinne w większym stopniu oddziaływały na zbiorowisko bakterii niż grzybów w glebie. Zastosowanie ekstraktów roślinnych na glebie płowej wpłynęło na wzrost bioróżnorodności bakterii w odniesieniu do gleby bez ekstraktów.



## Spis Rysunków

Rysunek 1 Cykl obiegu azotu w przyrodzie, T. Umiński „Ekologia, środowisko, przyroda”, 1995.....	15
Rysunek 2 Przebieg reakcji hydrolizy mocznika .....	22
Rysunek 3 Budowa cząsteczki enzymu ureaza .....	23
Rysunek 4 Analizator gazów GASMET DX 4040 .....	39
Rysunek 5 Chlorofilomierz CCM 300 .....	46
Rysunek 6 Zestaw pomiarowy DualPAM 100 i GFS-300 do pomiaru intensywności fotosyntezy .....	47
Rysunek 7 Stężenie jonów amonowych w próbkach z dodatkiem mocznika i badanych ekstraktów roślinnych.....	50
Rysunek 8 Całkowita zawartość związków polifenolowych w ekstraktach otrzymanych z owoców maliny, borówki i morwy czarnej. ....	51
Rysunek 9 Emisja amoniaku z badanych formułacji zaaplikowanych na glebie płowej.....	54
Rysunek 10 Emisje amoniaku z badanych formułacji zaaplikowanych na glebę bielicową .....	57
Rysunek 11 Aktywność enzymu ureazy w glebie płowej.....	60
Rysunek 12 Aktywność enzymu ureazy w glebie bielicowej .....	61
Rysunek 13 Zawartość azotu ogólnego (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w glebie płowej w doświadczeniu inkubacyjnym .....	63
Rysunek 14 Zawartość azotu ogólnego (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w glebie bielicowej w doświadczeniu inkubacyjnym .....	65
Rysunek 15 Emisja amoniaku z badanych ekstraktów zaaplikowanych na glebę płową .....	67
Rysunek 16 Emisja amoniaku z badanych ekstraktów zaaplikowanych na glebę bielicową.....	69
Rysunek 17 Aktywność enzymu ureazy w glebie płowej.....	71
Rysunek 18 Aktywność enzymu ureazy w glebie bielicowej .....	72
Rysunek 19 Zawartość azotu ogółem (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w trzech warstwach gleby płowej.....	73
Rysunek 20 Zawartość azotu ogółem (A), formy azotanowej (B) i amonowej (C) w trzech warstwach gleby bielicowej .....	75
Rysunek 21 Plon świeżej (A) i suchej masy (B) roślin w glebie płowej .....	76
Rysunek 22 Plon świeżej (A) i suchej masy (B) roślin w glebie bielicowej.....	77
Rysunek 23 Zawartość makroelementów w suchej masie roślin w glebie płowej .....	78
Rysunek 24 Zawartość makroelementów w suchej masie roślin rosnących w glebie bielicowej.....	78
Rysunek 25 Zawartość chlorofilu w liściach pszenicy rosnącej na glebie płowej.....	79
Rysunek 26 Zawartość chlorofilu w liściach pszenicy rosnącej na glebie bielicowej .....	79
Rysunek 27 Natężenie fotosyntezy (A) oraz stosunek natężenia fotosyntezy do transpiracji .....	81
Rysunek 28 Natężenie fotosyntezy (A) oraz stosunek natężenia fotosyntezy i transpiracji (B) w pszenicy rosnącej na glebie bielicowej .....	82

Rysunek 29 Udział (%) poszczególnych typów bakterii w glebie płowej (A) i bielicowej (B). Bakterie, których względna obfitość wynosiła poniżej 1% umieszczono w grupie „inne” .....	84
Rysunek 30 Liczebność poszczególnych typów bakterii w glebie płowej. Bakterie, których względna obfitość wynosiła poniżej 1% umieszczono w grupie „inne” .....	85
Rysunek 31 Liczebność poszczególnych typów bakterii w glebie bielicowej. Bakterie, których względna obfitość wynosiła poniżej 1% umieszczono w grupie „inne” .....	86
Rysunek 32 Udział (%) poszczególnych typów grzybów występujących w badanych glebie płowej (A) i bielicowej (B).....	88
Rysunek 33 Liczebność poszczególnych typów grzybów w glebie płowej (A) i bielicowej (B) .....	89
Rysunek 34 Diagramy Venna ilustrujące liczbę wspólnych i charakterystycznych dla poszczególnych obiektów wariantów sekwencji amplikonu (ASV) bakterii zidentyfikowanych na poziomie gatunku w glebie płowej .....	91
Rysunek 35 Diagramy Venna ilustrujące liczbę wspólnych i charakterystycznych dla poszczególnych obiektów wariantów sekwencji amplikonu (ASV) bakterii zidentyfikowanych na poziomie gatunku w glebie bielicowej .....	92
Rysunek 36 Diagramy Venna ilustrujące liczbę wspólnych i charakterystycznych dla poszczególnych obiektów operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU) gatunków grzybów zidentyfikowanych w glebie płowej i bielicowej .....	94
Rysunek 37 Analiza skupień (metoda średnich połączeń) dla gatunków bakterii w glebach bielicowej i płowej nawożonych mocznikiem z dodatkiem ekstraktów roślinnych (przedstawiono po trzy powtórzenia dla każdego obiektu) .....	99
Rysunek 38 Analiza skupień (metoda średnich połączeń) dla gatunków grzybów w glebach bielicowej i płowej nawożonych mocznikiem z dodatkiem ekstraktów roślinnych (przedstawiono po trzy powtórzenia dla każdego obiektu) .....	100

## Spis Tabel

Tabela 1 Podział inhibitorów ureazy ze względu na ich pochodzenie.....	25
Tabela 2 Obiekty w doświadczeniu inkubacyjnym.....	38
Tabela 3 Obiekty w doświadczeniu wazonowym.....	43
Tabela 4 Skumulowana emisja amoniaku z gleby płowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu inkubacyjnym.....	55
Tabela 5 Skumulowana emisja amoniaku z gleby bielicowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu inkubacyjnym.....	58
Tabela 6 Skumulowana emisja amoniaku z gleby płowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu wazonowym .....	68
Tabela 7 Skumulowana emisja amoniaku z gleby bielicowej po aplikacji ekstraktów w doświadczeniu wazonowym .....	70
Tabela 8 Wskaźniki bioróżnorodności bakterii w glebie .....	96
Tabela 9 Wskaźniki bioróżnorodności grzybów w glebie .....	97

## Literatura

1. **Abbas, S. M., 2013.** The influence of biostimulants on the growth and on the biochemical composition of *Vicia faba* CV. Giza 3 beans. *Romanian Biotechnological Letters*, 18, 8061–8068.
2. **Adegoke, T. O., Moon, T., Ku, H. H., 2022.** Ammonia emission from sandy loam soil amended with manure compost and urea. *Applied Biological Chemistry*, 65, 83. DOI: 10.1186/s13765-022-00752-4
3. **Ahmad, A., Blasco, B., Martos, V., 2022.** Combating salinity through natural plant extracts based biostimulants: a review. *Sec. Plant Metabolism and Chemodiversity*, 13. DOI: 10.3389/fpls.2022.862034
4. **Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., Hodges, M., 2012.** Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. *Can. J. Plant Sci.*, 93,2336.  
5. DOI: 10.4141/CJPS2011-260
6. **Al-Ansari, A. M., Abdulkareem, M. A., 2013.** Some plant extracts retarde nitrification in soil. *Acta agriculturae Slovenica*, 103, 1, 5-13. DOI: 10.14720/aas.2014.103.1.01
7. **Al-Mamun, M. A., Husna, J., Khatun, M., Hasan, R., Kamruzzaman, M., Hoque, K. M. F., Abu Reza, M., Ferdousi, Z., 2016.** Assessment of antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of two vegetable species of *Amaranthus* in Bangladesh. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 157. DOI: 10.1186/s12906-016-1130-0
8. **Al-Rooqi, M. M., Mughal, E. U., Raja, Q. A., Hussein, E. M., Naeem, N., Sadiq, A., Asghar, B., Moussa, Z., Ahmed, S. A., 2023.** Flavonoids and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: a review. *RSC Advances*, 13, 3210-3233. DOI: 10.1039/D2RA08284E
9. **Alvarez, R., Araya, H., Navarro-Lisboa, R., Lopez de Dicastillo, C., 2016.** Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Fruits and Vegetables Using a Modified Enzymatic Extraction. *Food Technology & Biotechnology*, 54 (4), 462-467. DOI: 10.17113/ftb.54.04.16.4497
10. **Ankri S. and Mirelman D., 1999.** Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.*, 1 (2), 125-129. DOI: 10.1016/S1286-4579(99)80003-3
11. **Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, A. A, Arancon, N. Q., Metzger, J. D., 2002.** The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84 (1), 7-4. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00017-2

12. **Awllia J.J.A., Al-Ghamdi M., Huwait E., Javaid S., Atia-tul-Wahab, Rasheed S. and Choudhary M.I., 2016.** Flavonoids as Natural Inhibitors of Jack Bean Urease Enzyme. *Letters in Drug Design and Discovery*, 13. DOI: 10.2174/1570180812666150914220050
13. **Awllia, J. A. J., AL-Ghamdi, M., Huwait, E., Javaid, S., Rasheed, A. S., Choudhary, M. I., 2016.** Flavonoids as natural inhibitors of Jack Bean urease enzyme. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2016, 13, 000-000. DOI: 10.13140/RG.2.1.2499.8168
14. **Bag, S., Mondal, A., Majumder, A., Mondal, S. K., Banik, A., 2022.** Flavonoid mediated selective cross-talk between plants and beneficial soil microbiome. *Phytochem Rev*, 21, 1739-1760. DOI: 10.1007/s11101-022-09806-3
15. **Bar, M., Binduga, U. E., Szychowski, K. A., 2022.** Methods of isolation of active substances from garlic (*Allium Sativum* L.) and its impact on the composition and biological properties of garlic extracts. *Antioxidants*, 11, 1345. DOI: 10.3390/antiox11071345
16. **Basosi, R., Spinelli, D., Fierro, A., Jez, S., 2014.** Mineral nitrogen fertilizers: Environmental Impact of production and use.
17. **Bernardi C.C., Mota E.P., Cardoso R.D., Monte M.B.M. and Oliveira P.P.A., 2014.** Ammonia volatilization from soil, dry-matter yield, and nitrogen levels of Italian Ryegrass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45 (2), 153-162. DOI: 10.1080/00103624.2013.854804
18. **Biglar, M., Soltani, K., Nabati, F., Bazl, R., Mojab, F., Amanlou, M., 2012.** A preliminary investigation of the Jack-Bean urease inhibition by randomly selected traditionally used herbal medicine. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (3), 831-837.
19. **Budiman, A., Aulifa, D. L., Kusuma, A. S. W., Sulastri, A., 2017.** Antibacterial and antioxidant activity of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment. *Pharmacogn J.*, 9 (5), 611-614. DOI: 10.5530/pj.2017.5.97
20. **Byrne, M.P., Tobin, J.T., Forrestal, P.J., Danaher, M., Nkwonta, C.K., Richards, K., Cummins, E., Hogan A.A., O'Callaghan T.F., 2020.** Urease and nitrification inhibitors – as mitigation tools for greenhouse gas emissions in sustainable dairy systems: A review. *Sustainability*, 12, 6018. DOI: 10.3390/su12156018
21. **Byrne, M.P., Tobin, J.T., Forrestal, P.J., Danaher, M., Nkwonta, C.K., Richards, K., Cummins, E., Hogan A.A., O'Callaghan T.F., 2020.** Urease and nitrification

- inhibitors – as mitigation tools for greenhouse gas emissions in sustainable dairy systems: A review. *Sustainability*, 12, 6018. DOI: 10.3390/su12156018
22. **Cabrera, M. L., Kissel, D. E., Bock, B. R., 1991.** Urea hydrolysis in soil: Effects of urea concentration and soil pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 12, 1121-1124. DOI: 10.1016/0038-0717(91)90023-D
  23. **Cameron, K. C., Di, J. J., Moir, J., 2013.** Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. *Annals of Applied Biology*, 162. DOI: 10.1111/aab.12014
  24. **Cantarella, H., Otto, R., Soares, J.R., de Brito Silva, A.G., 2018.** Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *J. Adv. Res.*, 13, 19-27. DOI: 10.1016/j.jare.2018.05.008
  25. **Cataldo, E., Fucile, M., Matii, G. B., 2022.** Biostimulants in viticulture: a sustainable approach against biotic and abiotic stresses. *Plants*, 11 (2), 162. DOI: 10.3390/plants11020162
  26. **Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton, R., Terzano, R., Neumann, G., Weiskopf, L., Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P., 2012.** Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biol Fertil Soils*, 48, 123-149. DOI: 10.1007/s00374-011-0653-2
  27. **Chen, C., Zhang, F., Chen, Q., Chen, C., Yu, X., Liu, G., Bao, J., Long, Z., 2018.** Antifungal activity, main active components and mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 13(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0194284.
  28. **Chittora, D., Meena, M., Barupal, T., Swapnil, P., Sharma, K., 2020.** Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 22. DOI: 10.1016/j.bbrep.2020.100737
  29. **Chojnacka, K., Michalak, I., Dmytryk, A., Wilk, R., Gorecki, H., 2014.** Innovative natural plant growth biostimulants. *Advances In Fertilizer Technology II Biofertilizer*. Studium Press LLC. Houston, 451-489.
  30. **Chunmei X., Liping C., Song C., Guang C., Danying W., Xifu Z., 2020.** Rhizosphere Aeration Improves Nitrogen Transformation in Soil, and Nitrogen Absorption and Accumulation in Rice Plants. *Rice Science*, 27 (2), 162-174. DOI: 10.1016/j.rsci.2020.01.007
  31. **Clarke, K.R., Gorley, R.N., Somerfield P.J., Warwick R.M., 2014.** Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 3rd edition. *PRIMER-E*: Plymouth

32. **Clay D.E., Malzer G.L. and Anderson J.L., 1990.** Ammonia volatilization from urea as influenced by soil temperature, soil water content, and nitrification and hydrolysis inhibitors. *Soil Science Society of America Journal*, 54 (1), 263-266. DOI: 10.2136/sssaj1990.03615995005400010042x
33. **Daéid, N. N., 2005.** Fourier transform infrared spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*.
34. **Dias, M. C., Pinto, A. C. G. A., Silva, A. M. S., 2021.** Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26 (17). DOI: 10.3390/molecules26175377
35. **Diaz, D. R., 2021.** management practices affecting nitrogen loss from urea. *K-State Research and Extension*. DOI: 10.1016/j.geoderma.2019.114099
36. **Dong D., Kou Y., Yang W., Chen G., Xu H., 2018.** Effects of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrifying/denitrifying microbial communities in a rainfed maize soil: A 6-year field observation. *Soil & Tillage Research*, 180, 82–90. DOI: 10.1016/j.still.2018.02.010
37. **Drury, C.F., Yang, X., Reynolds, W.D., Calder, W., Oloya, T.O., Woodley, A.L., 2017.** Combining urease and nitrification inhibitors with incorporation reduces ammonia and nitrous oxide emissions and increases corn yields. *J. Environ. Qual.*, 46, 939-949. DOI: 10.2134/jeq2017.03.0106
38. **Dyrektywa (UE) 2016/2284.** Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/2284 z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie redukcji krajowych emisji niektórych rodzajów zanieczyszczeń atmosferycznych, zmiany dyrektywy 2003/35/WE oraz uchylecia dyrektywy 2001/81/WE/
39. **Engel, R.E.; Towey, B.D.; 2015.** Degradation of the urease inhibitor NBPT as affected by soil pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 79, 1674-1683. DOI: 10.2136/sssaj2015.05.0169
40. **Ertani A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., Nardi S., 2014.** *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Breeding*, 5. DOI: 10.3389/fpls.2014.00375
41. **Ertani, A., Muscolo, A., Nardi, S., Schaivon, M., 2012.** Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant and Soil*, 364 (1). DOI: 10.1007/s11104-012-1335-z

42. **Ertani, A., Schiavon, M., Altissimo, A., Franceschi, C., Nardi, S., 2011.** Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays* Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 174, 3, 496-503. DOI: 10.1002/jpln.201000075
43. **Etaware, P. M., Etaware, E. U., Olaoluwa, O. O., OJ, O., Aiyelaagbe, O. O., Odebode, A. C., 2019.** The impact crude plant extracts: as potential biofertilizers and treatment against tomato plant infection. Research, 10, 7. DOI: 10.35248/2157-7471.19.10.481
44. **FAO, 2019.** World fertilizer trends and outlook to 2022.
45. **Fenn L.B. and Hosner I.R., 1985.** Ammonia volatilization from ammonium or ammonium-forming nitrogen fertilizers. Advances in Soil Science, 1, 123-169.
46. **Fernando V. i Roberts G.R., 1976.** The partial inhibition of soil urease by naturally occurring polyphenols. Plan and soil, 44, 81-86.
47. **Follet R., 2008.** Chapter 2. Transformation and Transport Processes. Nitrogen in the Environment: Sources, Problems, and Management, Second edition.
48. **Fu, H.; Lou, Z.; Hu, S.; 2020.** A temporal-spatial analysis and future trends of ammonia emissions in China. Sci. Total Environ., 731, 138897. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138897
49. **Gil M.V., Carballo M.T., Calvo L.F., 2008.** Fertilization of maize with compost from cattle manure supplemented with additional mineral nutrients. Waste Management, 28 (8), 1432–1440. DOI: 10.1016/j.wasman.2007.05.009
50. **Gilbert P.M., Harrison J., Heil C.A., Seitzinger S., 2006.** Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. Biogeochemistry, 77(3), 441-463. DOI: 10.1016/j.wasman.2007.05.009
51. **Godlewska, K., Ronga, D., Michalak, I., 2021.** Plant extracts - importance in sustainable agriculture. Italian Journal of Agronomy, 16 (2). DOI: 10.4081/ija.2021.1851
52. **Golbabaee, S., Bazl, R., Golestanian, S., Nabati, F, Omrany, Z. B., Yousefi, B., Hajiaghae, R., Rezazadeh, S., Amanlou, M., 2013.** Urease inhibitory activities of  $\beta$ -boswellic acid derivatives. Daru, 21(1):2. DOI: 10.1186/2008-2231-21-2
53. **Hamidi, N. A. S. M., Wan Mohamad, I. W. M. K., Nasir, N. A. M., Shaifudin, M. S., Ghazali, M. S. M., 2022.** Potential application of plant-based derivatives as green components in functional coatings: a review. Cleaner Materials, 4. DOI: 10.1016/j.clema.2022.100097



54. **Harris, T. K., Keshwani, M. K., 2009.** Measurement of enzyme activity. *Methods Enzymol.*, 463, 57-71. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63007-X.
55. **Hassan, S., Mathesius, U., 2012.** The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63 (9), 3429-3444. DOI: 10.1093/jxb/err430
56. **He Z.L., Alva A.K., Calvert D.V. and Banks D.J., 1999.** Ammonia volatilization from different fertilizer sources and effects of temperature and soil pH. *Soil Science*, 164 (10). DOI: 10.1097/00010694-199910000-00006
57. **He Z.L., Alva A.K., Calvert D.V. and Banks D.J., 1999.** Ammonia volatilization from different fertilizer sources and effects of temperature and soil pH. *Soil Science*, 164 (10). DOI: 10.1097/00010694-199910000-00006
58. **Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., Kopriva, S., 2017.** The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Front. Plant Sci.* DOI: 10.3389/fpls.2017.01617
59. **Jain, V., Nainawatee, H. S., 2002.** Plant Flavonoids: Signals to Legume Nodulation and Soil Microorganisms. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 11(1). DOI: 10.1007/BF03263127
60. **Jarosz, Z., Faber, A., 2022.** Projekcja regionalnego zróżnicowania emisji amoniaku ze zużycia mineralnych nawozów azotowych. *Studia i raporty IUNG-PIB*, 67(21), 121-130. DOI: 10.26114/sir.iung.2022.67.09
61. **Junejo, N., Khanif, M. Y., Dharejo, K. A., Abdu, A., 2013.** Effect of hydroquinone and copper coated urea on ammonia volatilization loss and n mineralization from tropical soil: Laboratory study. *African Journal of Agricultural Research*, 8 (18), 1983-1985. DOI: 10.5897/AJAR11.1297
62. **Kafarski, P., Talma M., 2018.** Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J. Adv. Res.*, 13, 101-112. DOI: 10.1016/j.jare.2018.01.007
63. **Kalembasa, S., Szukała, J., Faligowska, A., Kalembasa, D., Symanowicz, B., Becher, M., Gebus-Czupyt, B., 2020.** Quantification of biologically fixed nitrogen by white lupin (*Lupinus albus L.*) and its subsequent uptake by winter wheat using the <sup>15</sup>N isotope dilution method. *Agronomy*, 10, 1392. DOI: 10.3390/agronomy10091392
64. **Kappaun K., Piovesan A.R., Carlini C.R. and Ligabue-Braun R., 2018.** Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 3–17. DOI: 10.1016/j.jare.2018.05.010

65. **Khan, M. A., Khan, H., Tariq, S. A., Pervez S., 2014.** Urease inhibitory activity of aerial parts of *Artemisia scoparia*: exploration in an *In Vitro* study. *Ulcers.*, DOI: 10.1155/2014/184736
66. **Kiss S., Simihăian M., 2002.** Improving efficiency of urea fertilizers by inhibition of soil urease activity. 1st ed. Kluwer Academic Publishers, Doordrech.
67. **Kissel D.E. and Cabrera M.L., 2005.** Ammonia. References Module in Earth Systems and Environmental Sciences. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 56-64.
68. **Kissel, D.E., Cabrera, M.L., Vaio, N., Craig, J.A., Rema, J.A., Morris, L.A., 2004.** Rainfall timing and ammonia loss from urea in a loblolly pine plantation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 68, 1744-1750. DOI: 10.2136/sssaj2004.1744
69. **Klimczyk M., Siczek A., Schimmelpfennig L., 2021.** Improving the efficiency of urea-based fertilization leading to reduction in ammonia emission. *Science of the Total Environment*, 771. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145483
70. **Klimczyk M., Siczek A., Schimmelpfennig L., 2021.** Improving the efficiency of urea-based fertilization leading to reduction in ammonia emission. *Science of the Total Environment*, 771. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145483
71. **Kodeks doradczy dobrej praktyki rolniczej dotyczący ograniczania emisji amoniaku, 2019.** Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.
72. **Kowal, D., 2009.** Metody wytwarzania granulowanych nawozów wieloskładnikowych z wykorzystaniem mocznika (Methods for producing granular compound fertilizers using urea). Rozprawa doktorska, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie.
73. **Kuś, J., Fotyma, M., 1992.** Stan i perspektywy rolnictwa ekologicznego. *Fragmenta Agronomica*, 09 (2), 75-86.
74. **Li, Q., Cui, X., Liu, X., Roelcke, M., Pasda, G., Zerulla, W., Wissemeier, A., Chen, X., Goulding, K., Zhang, F., 2017.** A new urease-inhibiting formulation decreases ammonia volatilization and improves maize nitrogen utilization in North China Plain. *Sci. Rep.*, 7, 43853. DOI: 10.1038/srep43853
75. **Li, Q., Yang A., Wang, Z., Roelcke, M., Chen, X., Zhang, F., Pasda, G., Zerulla, W., Wissemeier, A.H., Liu, X., 2015.** Effect of a new urease inhibitor on ammonia volatilization and nitrogen utilization in wheat in north and northwest China. *Field Crops Res.*, 175, 96-105. DOI: 10.1016/j.fcr.2015.02.005

76. **Li, W., Xiao, Q., Hu, C., Liu, B., Sun, R., 2019.** A comparison of the efficiency of different urease inhibitors and their effects on soil prokaryotic community in a short-term incubation experiment. *Geoderma*, 354. DOI: 10.1016/j.geoderma.2019.07.035
77. **Li, Y., Li, Z., Cui, S., Zhang, Q., 2020.** Trade-off between soil pH, bulk density and other soil physical properties under global no-tillage agriculture. *Geoderma*, 61.
78. **Litskas, V. D., 2023.** Environmental Impact Assessment for Animal Waste, Organic and Synthetic Fertilizers. *Nitrogen*, 4 (1), 16-25. DOI: 10.3390/nitrogen4010002
79. **Liu X., Zhang M., Li Z., Zhang C., Wan C., Zhang Y., Lee D.J., 2019.** Inhibition of urease activity by humic acid extracted from sludge fermentation liquid. *Bioresource Technology*, 290. DOI 10.1016/j.biortech.2019.121767
80. **Macegoniuk, K., 2013.** Inhibitors of bacterial and plants urease. *Acta Universitatis Lodzianis Folia Biologica et Oecologica*, 9 (1). DOI: 10.2478/fobio-2013-0004
81. **Mahernia, S., Bagherzadeh, K., Mojab, F., Amanlou, M., 2015.** Urease inhibitory activities of some commonly consumed herbal medicines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(3), 943-947.
82. **Marchesan E., Grohs M., Walter M., Silca L.S., Formentini T.C., 2013.** Agronomic performance of rice to the use of urease inhibitor in two cropping systems. *Revista Ciência Agronômica*, 44 (3). DOI: 10.1590/S1806-66902013000300023
83. **Mathialagan R., Mansor N., Al-Khateeb B., Mohamad M.H. and Shamsuddin M.R., 2017.** Evaluation of Allicin as Soil Urease Inhibitor. *Procedia Engineering*, 184, 449 – 459. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.04.116
84. **May, A., Coelho, L. F., de Silva, E. H. F. M., Vieira Junior, N. A., da Silva Viana, R., Verdial, M., Gonzaga, A. R., Boratto, V. N, M., Boratto, I. V., Carvalho, P., 2021.** Use of plant extracts from healthy soybean and potato plants for treatments of plants of the same species. *Research, Society and Development*, 10, 12. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.20351
85. **Mazzei, L., Cianci, M., Ciurli, S., 2022.** Inhibition of urease by Hydroquinones: a structural and kinetic study. *Chemistry a European Journal*, 28, 64. DOI: 10.1002/chem.202201770
86. **Michalak, I., Chojnacka, K., Saeid, S., 2017.** Plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO<sub>2</sub> algal extracts. *Molecules*, 22 (1). DOI: 10.3390/molecules22010066

87. **Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A., 2014.** Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19, 16240-16265. DOI: 0.3390/molecules191016240
88. **Mikkelsen, R.; 2009.** Ammonia emissions from agricultural operations: Fertilizer. *Better Crops*, 93, 9-11.
89. **Mira, A.B.; Cantarella, H.; Souza-Netto, G.J.M.; Moreira, L.A.; Kamogawa, M.Y.; Otto, R.; 2017.** Optimizing urease inhibitor usage to reduce ammonia emission following urea application over crop residues. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 248, 105-112. DOI: 10.1016/j.agee.2017.07.032
90. **Modolo, L. V., da-Silva, C. J., Brandão, D. S., Chaves, I. S., 2018.** A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. *J. Adv. Res.*, 13, 29-37. DOI: 10.1016/j.jare.2018.04.001
91. **Modolo, L. V., de Souza, A. X., Horta, L. P., Araujo, D. P., de Fatima, A., 2015.** An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 6, 35-44. DOI: 10.1016/j.jare.2014.09.001
92. **Morales-Morales, E. J., Rubi-Arriaga M., López-Sandoval J. A., Martínez-Campos, Á. R., Morales-Rosales, E. J., 2019.** Urea (NBPT) an alternative in the nitrogen fertilization of annual crops. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10, 8. DOI: 10.29312/remexca.v10i8.1732
93. **Mulyani N.S., Suryadi M.E., Dwiningsih S. and Haryanto H., 2001.** Nitrogen dynamics on rice field soils. *Indonesian Soil and climate Journal*. 19. DOI: 10.2017/jti.v0i19.297
94. **Ni, K., Kage, H., Pacholski, A., 2018.** Effects of novel nitrification and urease inhibitors (DCD/TZ and 2-NPT) on N<sub>2</sub>O emissions from surface applied urea: An incubation study. *Atmos. Environ.*, 175, 75-82. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2017.12.002
95. **Olaetxea, M., Mora, V., Baigorri, R., Zamarreño, A. M., Garcia-Mina, J. M., 2020.** The singular molecular conformation of humic acids in solution influences their ability to enhance root hydraulic conductivity and plant growth. *Molecules*, 26, 3. DOI: 10.3390/molecules26010003
96. **Olech, Z., Zaborska, W., Kot, M., 2014.** Jack bean urease inhibition by crude juices of *Allium* and *Brassica* plants. Determination of thiosulfinates. *Food Chemistry*, 145, 154-160. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.044

97. **Pal'ove-Balang, P., Mistrik, I., 2007.** Impact of low pH and aluminium on nitrogen uptake and metabolism in roots of *Lotus japonicus*. *Biologia*, 62, 6, 715-719. DOI: 10.2478/s11756-007-0133-1
98. **Papangkorn J., Isaraphan C., Phinhongthong S., Opaprakasit M. and Opaprakasit P., 2008.** Controlled-Release Material for Urea Fertilizer from Polylactic Acid. *Advanced Materials Research*, 55-57, 897-900. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.55-57.897
99. **Pastene E., Troncoso M., Figueroa G., Alarcon J. and Hernan S., 2009.** Association between Polymerization Degree of Apple Peel Polyphenols and Inhibition of *Helicobacter pylori* Urease. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (2), 416-424. DOI: 10.1021/jf8025698
100. **Pelster D.E., Chantigny M.H., Angers D.A., Bertrand N., MacDonald J.D., Rochette P., 2018.** Can soil clay content predict ammonia volatilization losses from subsurface-banded urea in eastern Canadian soils? *Canadian Journal of Soil Science*, 98 (3): 556-565. DOI: 10.1139/cjss-2018-0036
101. Piwowar, A., 2020. Farming practices for reducing ammonia emissions in polish agriculture. *Atmosphere*, 11, 12, 1353. DOI: 10.3390/atmos11121353
102. **Plaskova, A., Mlcek, J., 2023.** New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. *Front Nutr*. DOI: 10.3389/fnut.2023.1118761.
103. **Pretorius, J.C., Van der Watt, E., 2011.** Natural products from plants: Commercial prospects in terms of antimicrobial, herbicidal and bio-stimulatory activities in an integrated pest management system. N.K. Dubey (eds.), *Natural Products in Plant Pest Management: Oxfordshire: CAB International*, 42-90
104. **Przelaskowska, A., Klaja, J., 2014.** Pomiary pojemności wymiany kationowej (CEC) w badaniach skał osadowych. *Nafta-Gaz*, 7.
105. **Qin, H., Wang, D., Xing, X., Tang, Y., Wei, X., Chen, X., Zhang, W., Chen, A., Li, L., Liu, Y., Zhu, B., 2021.** A few key *nirK*- and *nosZ*-denitrifier taxa play a dominant role in moisture-enhanced N<sub>2</sub>O emissions in acidic paddy soil. *Geoderma*, 385. DOI: 10.1016/j.geoderma.2020.114917
106. **Rana, S., Kumar, S., Rana, A., Padwad, Y., Bhushan, S., 2021.** Biological activity of phenolics enriched extracts from industrial apple pomace. *Industrial Crops & Products*. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113158

107. **Reeza A., Ahmed O., Majid N., Jalloh M. B., 2009.** Reducing Ammonia Loss from Urea by Mixing with Humic and Fulvic Acids Isolated from Coal. *American Journal of Environmental Sciences*, 5 (3), 420-426. DOI: 10.3844/ajessp.2009.420.426
108. **Robertson, G.P. and Groffman P.M., 2015.** Nitrogen transformations. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*, fourth edition, 421-446. Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
109. **Rose, M., Patti, A., Little, K., Brown, A., Jackson, W., Cavagnaro, T., 2014.** A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*, 124. DOI: 10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4
110. **Rouphael, Y., Colla, G., 2020.** Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci.* 11, 40. DOI: 10.3389/fpls.2020.00040
111. **Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., Alshahrani, M. Y., Islam, S., Islam R., 2022.** Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International*. DOI: 10.1155/2022/5445291
112. **Samori, C., Mazzei, L., Ciurli S., Cravotto, G., Grillo, G., Guildi, E., Pasteris, A., Tabasso, S., Galletti, P., 2019.** Urease inhibitory potential and soil ecotoxicity of novel “polyphenols–deep eutectic solvents” formulations. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 7, 18, 15558–15567. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b03493
113. **Sangoi, L., Ernani, P. R., Rampazzo, C., 2003.** Volatilização de N-NH<sub>3</sub> em decorrência da forma de aplicação de uréia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. *Ci. Rural*, 33, 687-692. DOI: 10.1590/S0103-84782003000400016
114. **Sanz-Cobena A., Abalos D., Mejjide A. Sanchez-Martin L., Vallejo A., 2013.** Soil moisture determines the effectiveness of two urease inhibitors to decrease N<sub>2</sub>O emission. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 21, 1131–1144. DOI: 10.1007/s11027-014-9548-5
115. **Schutz, V., Frindte, K., Cui, J., Zhang, P., Hacquard, S., Schulze-Lefert, P., Knief, C., Schulz, M., Dörmann P., 2021.** Differential impact of plant secondary metabolites on the soil microbiota. *Front Mircrobiol.* 28, 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.666010

116. **Secondary Notification Assessment NA/467S for N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT), 2011.** Australian Government, Department of Health and Ageing NICNAS.
117. **Sha, Z., Li, Q., Lv, T., Misselbrook, T. H, Liu, X., 2019.** Response of ammonia volatilization to biochar addition: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*. 655 (10), 1387-1396. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.316
118. **Shabana S., Kawai A., Kai K., Akiyama K. and Hayashi H., 2010.** Inhibitory Activity against Urease of Quercetin Glycosides Isolated from *Allium cepa* and *Psidium guajava*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 74 (4), 878-880. DOI: 10.1271/bbb.90895
119. **Shah, A., Smith, D. L., 2020.** Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in biotic and abiotic stress responses and microbial associations. *Agronomy*, 10, 1209. DOI: 10.3390/agronomy10081209
120. **Shah, A., Smith, D. L., 2020.** Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy*, 10, 1209. DOI: 10.3390/agronomy10081209
121. **Shahrajabian, M.H., Chaski, C., Polyzos, N., Petropoulos, S.A., 2021.** Biostimulants Application: a low input cropping management tool for sustainable farming of vegetables. *Biomolecules*, 11, 698. DOI: 10.3390/biom11050698
122. **Shan L., He Y., Chen J., Huang Q., 2015.** Ammonia volatilization from a Chinese cabbage field under different nitrogen treatments in the Taihu Lake Basin, China. *Journal of Environmental Sciences*, 38, 14-23. DOI: 10.1016/j.jes.2015.04.028
123. **Shan, R., Han, J., Gu, J., Yuan, H., Luo, B., Chen, Y., 2020.** A review of recent developments in catalytic applications of biochar-based materials. *Resources, Conservation & Recycling*, 162. DOI: 10.1016/j.resconrec.2020.105036
124. **Sharma, S., Chen, C., Khatri, K., Rathore, M. S., Pandey, S. P., 2019.** *Gracilaria dura* extract confers drought tolerance in wheat by modulating abscisic acid homeostasis. *Plant Physiol Biochem.*, 136, 143-154. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.01.015
125. **Sherman, J., Young, E., Jokela, W., Kieke, B., 2022.** Manure application timing and incorporation effects on ammonia and greenhouse gas emission in corn. *Agriculture*, 12 (11), 1952. DOI: 10.3390/agriculture12111952
126. **Siczek, A., Frąç, M., Nawrocka, A., Wielbo, J., Kidaj, D., 2014.** The response of rhizosphere microbial properties to flavonoids and Nod factors. *Acta Agriculturae*

Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science.  
DOI: 10.1080/09064710.2014.975835

127. **Siczek, A., Fraç, M., Wielbo, J., Kidaj, D., 2017.** Benefits of flavonoids and straw mulch application on soilmicrobial activity in pea rhizosphere. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13762-017-1434-8
128. **Sidi N., Aris A.Z., Talib S.N., Johan S., Yusoff T.S.T.M and Ismail M.Z., 2015.** Influential factors on the cation exchange capacity in sediment of Merambong Shoal, Johor. *Procedia Environmental Sciences*, 30, 186-189. DOI: 10.1016/j.proenv.2015.10.033
129. **Silva, A.G.B., Sequeira, C.H., Sermarini, R.A., Otto, R., 2017.** Urease inhibitor NBPT on ammonia volatilization and crop productivity: a meta-analysis. *Agron. J.*, 109, 1-13. DOI: 10.2134/agronj2016.04.0200
130. **Skorupka, M.; Nosalewicz, A.; 2021.** Ammonia volatilization from fertilizer urea - A new challenge for agriculture and industry in view of growing global demand for food and energy crops. *Agriculture*, 11, 822. DOI: 10.3390/agriculture11090822
131. **Sommer S.G., Olesen J.E. and Denmead O., 2004.** Ammonia Emission from Mineral Fertilizers and Fertilized Crops. *Advances in Agronomy*, 82, 557-622. DOI: 10.1016/S0065-2113(03)82008-4
132. **Sriraj, P., Toomsan, B., Butnan, S., 2022.** Effects of neem leaf extract on the soil properties, growth, yield, and inorganic nitrogen contents of lettuce. *Horticulturae*, 8 (12), 1104. DOI: 10.3390/horticulturae8121104
133. **Suescun, F., Paulino, L., Zagal, E., Ovalle C., Munoz, C., 2012.** Plant extracts from the Mediterranean zone of Chile potentially affect soil microbial activity related to N transformations: A laboratory experiment. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant*, 62, 556-564. DOI: 10.1080/09064710.2012.676668
134. **Sullivan D.M., Havlin J.L., 1992.** Soil and Environmental Effects on Urease Inhibition by Ammonium Thiosulfate. *Soil Science Society of America Journal*, 56 (3), 950-956. DOI: 10.2136/sssaj1992.03615995005600030044x
135. **Sun X., Zhong T., Zhang L., Zhang K. and Wu W., 2019.** Reducing ammonia volatilization from paddy field with rice straw derived biochar. *Science of the Total Environment*, 660, 512–518. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.450
136. **Svane, S., Siguardson, J. J., Finkenwirth, F., Eitinger, T., Karring, H., 2020.** Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the



- modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports*, 10. DOI: 10.1038/s41598-020-65107-9
137. **Vafa, Z. N., Sohrabi, Y., Mirzaghaderi, G., Heidari, G., 2022.** The effect of rhizobia in improving the protective mechanisms of wheat under drought and supplementary irrigation conditions. *Front. Sustain. Food Syst, Sec. Crop Biology and Sustainability*, 6. DOI: 10.3389/fsufs.2022.1073240
138. **Veresoglou, S. D., Menexes, G., 2010.** Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant and Soil* volume 337, 469–480. DOI: 10.1007/s11104-010-0543-7
139. **Walczak, J., Jarosz, Z., Jugowar, J.L., Krawczyk, W., Mielcarek, P., Skowrońska, M., 2019.** Wdrażanie dyrektywy NEC oraz konkluzji BAT w zakresie redukcji emisji amoniaku z rolnictwa (Implementation of the NEC directive and BAT conclusions regarding the reduction of ammonia emissions from agriculture). FDPA, Pub. Scholar, Polska.
140. **Wang H., Köbke S. and Dittert K., 2020.** Use of urease and nitrification inhibitors to reduce gaseous nitrogen emissions from fertilizers containing ammonium nitrate and urea. *Global Ecology and Conservation*, 22. DOI: 10.1016/j.gecco.2020.e00933
141. **Wang X., Zhang L., Zou J., Liu S., 2015.** Optimizing net greenhouse gas balance of a bioenergy cropping system in southeast China with urease and nitrification inhibitors. *Ecol. Eng.*, 83, 191–198. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.05.047
142. **Wang, L., Chen, M., Lam, P., Dini-Andreote, F., Dai, L., Wei, Z., 2022.** Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome*, 10, 233. DOI: 10.1186/s40168-022-01420-x
143. **Wang, S., Li, J., Wang, W., Zhang, L., Wu, Z., 2023.** Chamomile plant material effects on soil nitrogen dynamics and ammonia-oxidizers to mitigate greenhouse gas emissions from maize fields. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 341. DOI: 10.1016/j.agee.2022.108206
144. **Watson, C.J.; Akhonzada, N.A.; Hamilton, J.T.G.; Matthews, D.I.; 2008.** Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Use Manage*, 24, 246-253. DOI: 10.1111/j.1475-274

145. **Wesołowska M., Rymarczyk J., Góra R., Baranowski P., Sławiński C., Klimczyk M., Supryn G., Schimmelpfennig L., 2021.** New slow-release fertilizers – economic, legal and practical aspects: a Review. *International Agrophysics*, 35, 11-24. DOI: 10.31545/intagr/131184
146. **Xiao, Z., Shi, D., Li, H., Zhang, L., Cu, C., Chu, H., 2007.** Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 11, 3703-3710. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.03.045
147. **Xu, X., Zhou, L., Van Cleemput, O., Wang, Z., 2000.** Fate of urea-<sup>15</sup>N in a soil-wheat system as influenced by urease inhibitor hydroquinone and nitrification inhibitor dicyandiamide. *Planr and Soil*, 22-, 261-270. DOI: 10.1023/A:1004715827085
148. **Zaman, M., Nguyen, M. L., Blennerhassett, J. D., Quin, B. F., 2008.** Reducing NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N losses from a pasture soil with urease or nitrification inhibitors and elemental S-amended nitrogenous fertilizers. *Biol Fertil Soils*, 44, 693–705. DOI:10.1007/s00374-007-0252-4
149. **Zanin, L., Venuti, S., Tomasi, N., Zamboni, A., De Brito Francisco, R.M., Varanini, Z., Pinton, R., 2016.** Short-term treatment with the urease inhibitor n-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) alters urea assimilation and modulates transcriptional profiles of genes involved in primary and secondary metabolism in maize seedlings. *Front. Plant Sci.*, 7, 845. DOI: 10.3389/fpls.2016.00845
150. **Zantua, M.I, Bremner, J.M., 1977.** Stability of urease in soils. *Soil Biol. Biochem.*,9, 135-140. DOI: 10.1016/0038-0717(77)90050-5
151. **Zhang S., Yuan L., Li W., Lin Z., Li Y., Hu S. and Zhao B., 2019.** Effects of urea enhanced with different weathered coal-derived humic acid components on maize yield and fate of fertilizer nitrogen. *Journal of Integrative Agriculture*, 18 (3), 656–666. DOI: 10.1016/S2095-3119(18)61950-1
152. **Zhang, Y., Liang, X., Yang, X., Liu, H., Yao, J., 2014.** An eco-friendly slow-release urea fertilizer based on waste mulberry branches for potential agriculture and horticulture applications. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2, 7, 1871–1878. DOI: 10.1021/sc500204z
153. **Zhao T.X.Z., Arshad M., Li N., Zare E. and Triantafilis J., 2020.** Determination of the optimal mathematical model, sample size, digital data and transect spacing to map CEC (Cation exchange capacity) in a sugarcane field. *Computers and Electronics in Agriculture*, 173. DOI: 10.1016/j.compag.2020.105436

154. **Zhao, R., Liu, J., Xu, N., He, T., Meng, J., Liu, Z., 2022.** Urea hydrolysis in different farmland soils as affected by long-term biochar application. *Front. Environ. Sci., Sec. Soil Processes*, 10. DOI: 10.3389/fenvs.2022.950482
155. **Zhao, X., Zhou, L., 1991.** Effect of the urease inhibitor, hydroquinone on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.*, 23, 11, 1089-1091. DOI: 10.1016/0038-0717(91)90049-P
156. **Zhenghu D. and Honglang X., 2000.** Effects of soil properties on ammonia volatilization. *Soil science and plant nutrition*, 46 (4), 845-852. DOI: 10.1080/00380768.2000.10409150
157. **Zhu H., Yang J., Yao R., Wang X., Xie W., Zhu W., Liu X., Cao Y. and Tao J., 2020.** Interactive effects of soil amendments (biochar and gypsum) and salinity on ammonia volatilization in coastal saline soil. *CATENA*, 190. DOI: 10.1016/j.catena.2020.104527