

S. GUMIŃSKI

## FIZJOLOGICZNA EFEKTYWNOŚĆ ZWIĄZKÓW PRÓCHNICZNYCH JAKO KOMPLEKSU SORPCYJNEGO

Stwierdzenie faktu, iż wersenian sodu (EDTA) działa w niewietrzonych kulturach wodnych roślin podobnie skutecznie jak humian sodowy, podczas gdy w kulturach przewietrzanych oba związki nie wykazują działania stymulującego (Gumiński, Gumińska i Badura 1962), kazało nam zwrócić uwagę na kompleksotwórcze właściwości związków próchnicznych. Przy rozpatrywaniu tego zagadnienia należało również pamiętać o drugim równocześnie zaobserwowanym fakcie, mianowicie tym, że zarówno przy pomocy humianu jak i wersenianu można było zapobiegać niekorzystnemu dla siewek oddziaływaniu pożywki, w której uprzednio rosły już rośliny. Ten niekorzystny wpływ następczy jednych roślin na drugie pojawiał się kapryśnie w niektórych kulturach wodnych z niewytłumaczonych bliżej przyczyn. Zbieżne działanie humianu i wersenianu potraktowaliśmy jako wskazówkę do wyświetlenia, zarówno natury hamującego czynnika domniemanych „wydzielin korzeniowych“, jak też i dla zrozumienia mechanizmu działania humianu.

Zważywszy na to, iż wersenian chelatyzuje kationy dwu- i wielowartościowe i że podobne właściwości przypisuje się humianowi, oraz mając na uwadze możliwość blokowania tych kationów przez domniemane wydzieliny korzeniowe, przeprowadzono doświadczenia wegetacyjne w kulturach wodnych, stosując pożywki z różnymi stężeniami wapnia, magnezu i żelaza. Doświadczenia przeprowadzono na siewkach pomidorów przy użyciu pożywki o pH lekko kwaśnym, zawierającej wszystkie uznane za niezbędne makro- i mikroelementy. W każdym słoju o pojemności 1 litra rosły 3 siewki. Kultury prowadzono w szklarni z dobrym naświetleniem naturalnym i przy odpowiedniej dla pomidorów temperaturze i wilgotności powietrza. Czas wzrostu wynosił 3—4 tygodni, każdy obiekt doświadczalny (kombinacja) składał się z 5—6 równoległych powtórzeń. Przy końcu doświadczenia oznaczano suchą masę pędów i korzeni oraz przeprowadzano odpowiednie analizy pożywki.

Uzyskano następujące wyniki: 1) Charakterystyczny efekt dodatni (wzrost roślin i zieloność liści) humianu i wersenianu w kulturach niewietrzonych okazał się zależny od dawek wapnia; przy dużych dawkach skuteczniejszy był wersenian, natomiast przy zmniejszonych dawkach znacznie lepiej działał humian. 2) Przy silnie

zmniejszonych dawkach magnezu lepiej ratował w kulturach nie wietrzonych wersenian niż humian; przy wyższych dawkach magnezu działanie obu substancji wyrównywało się. 3) Zarówno wersenian jak i humian ratował rośliny przed niedostatkiem żelaza i to tak w kulturach niewietrzonych jak i wietrzonych. Analizy powierzchniowych warstw pożywki wykazały, iż w niewietrzonych i nieporuszanych kulturach żelazo osadza się na dnie naczynia (fosforan żelazowy), i siewki, których małe korzenie nie sięgają osadu, giną z powodu zupełnego braku żelaza. Natomiast w pożywkach z dodatkiem humianu względnie wersenianu pokaźne ilości żelaza utrzymują się w roztworze i na tym właśnie polega zbieżne działanie humianu i wersenianu w kulturach niewietrzonych, a właściwie nieporuszanych. Przy dużych dawkach wapnia humian jest prawdopodobnie dlatego mniej skuteczny niż przy małych, ponieważ wapń w znacznej mierze strąca humiany (Gumiński, Gumińska i Sulej 1965 oraz Czerwiński, 1965).

Powyższe wyniki nasunęły myśl, iż „wydzielina korzeniową“ która hamuje wzrost siewek i której działanie zwalcza zarówno humian jak wersenian może być dwutlenek węgla, względnie mogą być jony  $\text{HCO}_3^-$ . Przypuszczenie to opierało się o chemiczną reakcję jonów wodorowęglanowych z jonami żelazowymi.

Badanie wpływu jonów wodorowęglanowych na rośliny przeprowadzono w ten sposób, iż do pożywki kultur wodnych dodawano codziennie małe dawki  $\text{NaHCO}_3$ . Jak wiadomo wodorowęglany są nietrwałymi związkami i przy odczynie kwaśnym szybko się rozkładają; codzienne dodawanie nowych porcji pozwalało na rozwiązanie tej trudności. Otrzymane wyniki potwierdziły nasze przypuszczenia: wodorowęglany pogłębiały chlorozę oraz inhibicję wzrostu siewek pomidorów w kulturach niewietrzonych, a humian skutecznie zapobiegał temu zjawisku (Gumiński i Badurowa 1965).

Zachęcenі tymi wynikami przeprowadziliśmy dokładniejszą analizę wpływu wodorowęglanów na rośliny oraz ochronnego działania humianu. Doświadczenia przeprowadzone przez M. Badurową i A. Suder-Moraw polegały na tym, iż badano wpływ różnych dawek dziennych  $\text{NaHCO}_3$  na siewki pomidorów w kulturach wodnych oraz na samą pożywkę. Po trzytygodniowej wegetacji oznaczono suchą masę korzeni pędów oraz zawartość żelaza i fosforu w częściach nadziemnych roślin. W pożywkach oznaczono pH oraz zbadano stężenie żelaza w powierzchniowych warstwach płynu. W wyniku tych badań stwierdzono odwrotną korelację pomiędzy wielkością dawek wodorowęglanu i wzrostem roślin oraz intensywnością zieleni liści; równocześnie wykazano przyspieszenie wytrącania się żelaza z roztworu pożywki pod wpływem  $\text{NaHCO}_3$ . Ponadto stwierdzono, że mniejsze dawki  $\text{NaHCO}_3$  (do 0,001 g na litr pożywki dziennie) nie zmieniały pH pożywki wpływając równocześnie silnie hamująco na wzrost roślin i pogłębiając wybitnie ich chlorozę. Natomiast dziesięciokrotnie wyższe dawki spowodowały w ciągu wegetacji wzrost odczynu pożywki niewietrzonej o 2 stopnie pH, wywołując jeszcze silniejszy efekt toksyczny. Humian całkowicie niwelował szkodliwe działanie wodorowęglanów na rośliny przy niższych dawkach  $\text{NaHCO}_3$  i wydatnie łagodził działanie

najwyższej dawki, tej która spowodowała zmianę pH pożywki. Równocześnie wykazano stabilizujące działanie humianu w stosunku do żelaza w roztworze (humian przeciwdziałał wytrącaniu żelaza z roztworu przez jony wodorowęglanowe i fosforanowe). Pod wpływem wodorowęglanów spadał poziom żelaza w liściach roślin rosnących w kulturach niewietrzonych, a stosunek P/Fe znacznie się podnosił, co jest charakterystyczne dla chlorozy żelazowej. Natomiast w obecności humianu wpływ wodorowęglanu został zanulowany; poziom żelaza nie został obniżony (z wyjątkiem najwyższej dawki  $\text{NaHCO}_3$ ), a stosunek P/Fe nie uległ podwyższeniu w stosunku do kontroli.

Równocześnie z tymi badaniami podjął L. Badura pracę nad wyświetleniem mechanizmu działania związków próchnicznych na wzrost kolonii drożdżowych i na proces fermentacji alkoholowej, przeprowadzanej przez te grzyby.

W dawniejszych pracach stwierdzono stymulujący wpływ związków próchnicznych na fermentację powodowaną przez drożdże (Dzierzbicki 1909) oraz na rozmnażanie się komórek drożdży (Gumiński i Gumińska 1953a); nie wiadomo było jednak na jakiej drodze do tej stymulacji dochodzi. W szczególności zbadać należało, czy zjawisko powodowane jest przez same związki próchniczne, czy też istotną rolę grają ciała akcesoryczne zawarte w próchnicy, takie jak: hormony, witaminy, czy mikroelementy; jeśli zaś istotne znaczenie miałyby same związki próchniczne, to jakie ich właściwości decydowały o ich aktywności fizjologicznej. Autor rozważył szereg możliwości rozwiązań i starał się dojść prawdy, stosując różne doświadczenia, u podstaw których stały kolejne hipotezy robocze. Hodował on drożdże na pożywce Dzierzbickiego względnie na tzw. pożywce syntetycznej G i porównywał wpływ humianu sodowego (naturalnego) otrzymanego z kompostu (Gumiński 1950) oraz syntetycznego (modelowego), sporządzonego ze skarmelizowanej glukozy (Hewitt 1952), względnie z p-benzochinonu (Gumiński i Gumińska 1953b) z wpływem kwasu  $\beta$ -indoliloctowego, witamin z grupy B, agaru oraz szeregu mikroelementów, a w szczególności popiołu naturalnego humianu. Wyniki świadczyły o tym, że efekt fizjologiczny humianu powodowany jest w istocie działaniem samych związków próchnicznych, i że nie można tego efektu identyfikować z działaniem zawartych w humianie substancji akcesorycznych. Zostało to udowodnione ponad wszelką wątpliwość przez zastosowanie syntetycznych (modelowych) związków huminowych. Autor nie uzyskał danych przemawiających za tym, że humian bierze udział bezpośrednio w procesie fermentacyjnym (jako układ oksydo-redukcyjny). Możliwość działania humianu jako koloidu także nie znalazła potwierdzenia w doświadczeniach. Natomiast bardzo wyraźnie uwidocznił się wpływ ochronny humianu wobec szkodliwych dla drożdży stężeń miedzi oraz żelaza. Jaskrawo uwidocznił się również dodatni wpływ humianu na podziały komórkowe drożdży i fermentację przy nieodpowiednim pH pożywki, przy czym humian nie zmieniał odczynu podłoża (nie korygował go). O ile przy pH odległym od optymalnego dodatni wpływ humianu był bardzo silny, o tyle w miarę zbliżania się do punktu optymalnego coraz bardziej malał, schodząc prawie do zera.

W świetle tych wyników autor tłumaczy efekt fizjologiczny humianu jego właściwościami sorpcyjnymi, mając na uwadze funkcję jonowymienną oraz chemosorpcję (Badura 1965). Biorąc pod uwagę znany fakt, iż pobieranie i wydzielanie jonów przez komórkę uzależnione jest w wysokim stopniu od pH jej otoczenia, tłumaczenie autora wydaje się bardzo trafne.

Wyniki powyżej opisanych badań zachęciły nas do podjęcia próby bliższego wysświetlenia wpływu związków próchnicznych na symbiozę bakterii brodawkowych z roślinami motylkowymi. Według Brodowskiej (1939) związki próchniczne wpływają korzystnie na brodawkowanie w korzeniach roślin motylkowych oraz stymulują proces wiązania wolnego azotu przez tę wspólną symbiotyczną. W naszej pracowni E. Tatkowska podjęła porównawcze badania nad wpływem naturalnego humianu sodowego, uzyskanego z kompostu i humianu sodowego syntetycznego (modelowego) przygotowanego z glikozy, obserwując wpływ tych substancji na symbiozę korzeni koniczyny czerwonej z *Rhizobium trifolii*. Doświadczenia są prowadzone w kulturach wodnych (w szklarniach) oraz w aseptycznych kulturach agarowych (w fototermostacie), przy czym bada się wpływ humianów na brodawkowanie i wiązanie wolnego azotu oraz suchą masę roślin w obecności lub nieobecności poszczególnych mikroelementów. Dotychczas przekonano się iż zarówno humian naturalny jak i modelowy wzmagają dodatni wpływ jonów miedzi na wyżej wzmiankowane wykładniki symbiozy.

Powrócono też i do starego zagadnienia wpływu związków próchnicznych na glony, pragnąc zużytkować uzyskane ostatnio w doświadczeniach z roślinami wyższymi oraz drożdżami informacje, dla lepszego zrozumienia mechanizmu działania związków huminowych na glony. St. Kyć przeprowadził szereg doświadczeń aseptycznych z kulturami *Scenedesmus quadricauda* w pożywkach sporządzonych według Uspenskigo (1927) oraz Pringsheima (1926). Czyste kultury tych glonów otrzymaliśmy z pracowni prof. Práta, za co mu na tym miejscu uprzejmie dziękujemy. Badano wpływ humianu naturalnego i modelowego przy różnym oświetleniu, przy różnych dawkach żelaza oraz przy różnych pH pożywki z uwzględnieniem przebiegu zjawiska w czasie. Wpływ badanych substancji określano przez liczenie komórek glonów pod mikroskopem oraz przez ważenie ich suchej masy. Doświadczenia prowadzono w fototermostacie.

Po wykluczeniu działania humianów jako filtrów światła stwierdzono, że humian ułatwia wykorzystanie żelaza przez glony a przy nadmiernym stężeniu jonów żelazowych w pożywce chroni glony od zatrucia. Stwierdzono również (podobnie jak Badura w doświadczeniach z drożdżami), że humian chroni glony od wpływu niekorzystnego pH pożywki, nie korygując jednak odczynu pożywki. Wykreślono krzywe optymalnych stężeń humianu, wykazując, że krzywe te nie są identyczne dla kryteriów liczby komórek i suchej masy glonów.

Z badań Trojanowskiego (1954) oraz innych autorów wiadomo było, iż związki huminowe można rozfrakcjonować na kolumnie adsorpcyjnej i że tak uzyskane frakcje wykazują różną efektywność fizjologiczną. Wyłoniło się teraz

pytanie, czy można będzie znaleźć korelację pomiędzy kompleksotwórczymi względnie sorpcyjnymi właściwościami poszczególnych frakcji i ich aktywnością fizjologiczną? Fizykochemiczną stroną tego zagadnienia zajęła się E. Unger. Autorka traktowała humian sodowy (w pojęciu szerszym tj. łącznie z hymatomelanianem) mieszaniną acetonu z wodą (2 : 1) i przepuszczała przez kolumnę tlenku glinu. Otrzymane frakcje (nierozpuszczalną w acetonie z wodą, rozpuszczalne i zaadsorbowane na różnych poziomach kolumny oraz przechodzącą przez kolumnę) badała pod względem siły wiązania jonów żelazowych, porównując ją z siłą wiązania znanych chelatorów: 8-hydroksychinoliny i kupferonu. Wyniki pracy Unger (1965) wykorzystujemy obecnie dla testowania fizjologicznej aktywności poszczególnych frakcji przy pomocy doświadczeń wegetacyjnych. Typowy test kultur wietrzonych i niewietrzonych siewek pomidorów wykazał, że przed chlorozą i obumieraniem z powodu braku żelaza w kulturach nieprzewietrzanych (nie poruszanych) ratuje rośliny jedynie całość humianu (substancja nie rozfrakcjonowana) oraz ta frakcja, która rozpuściła się w mieszaninie acetonu z wodą i przeszła przez kolumnę nie adsorbując się na tlenku glinu. Frakcja ta wykazała nawet znacznie wyższą aktywność biologiczną, aniżeli całość humianu. W dodatkowych badaniach stwierdziliśmy, że frakcja ta i jedynie ona wydatnie powstrzymuje opadanie w pożywce osadu nierozpuszczalnego fosforanu żelazowego. Ponadto stwierdziliśmy, zgodnie z badaniami Unger, że frakcja ta zdolna jest pochłaniać znaczne ilości jonów żelazowych, które stosunkowo silnie wiąże. Tworzy ona zatem połączenia z żelazem, stosunkowo stabilne w roztworze soli mineralnych. Tak więc wydaje się, że znaleźliśmy korelację pomiędzy fizykochemicznymi właściwościami określonej frakcji związków próchnicznych i jej biologiczną aktywnością w naszych warunkach doświadczalnych.

Na obecnym etapie badań wyrażamy pogląd, iż korzystne efekty biologiczne, powodowane przez makromolekularne związki huminowe polegają na usuwaniu trudności życiowych powstających przy niedomiarze lub nadmiarze fizjologicznym stężeń kationów dwu- lub wielowartościowych, a w szczególności żelaza w środowisku (roztworze) otaczającym komórkę roślinną. Tym pośrednim wpływem poprzez żelazo tłumaczymy sobie obecnie efekty oddechowe, stwierdzone przez nas w dawniejszych pracach.

Ten punkt widzenia nie stoi jednak w sprzeczności z poglądem tych badaczy, którzy dopatrują się podstawy fizjologicznej aktywności związków próchnicznych w ich właściwościach oksydo-redukcyjnych, podobnie jak i my poprzednio tłumaczyliśmy wyniki naszych badań. Pragniemy podkreślić, że nasza obecna interpretacja dotyczy jedynie działania makromolekularnych związków huminowych, ściślej mówiąc tzw. humianu sodowego. Otóż z badań Práta (1964) wynika, że jest co najmniej wątpliwe, czy te związki mogą wnikać do żywej komórki; natomiast istnieją poważne poszlaki co do tego, iż niskomolekularne kwasy fulwowe wnikają do komórek, a tym samym mogą brać bezpośrednio udział w przemianie materii. Że zaś substancje wyjściowe dla biosyntezy związków próchnicznych względnie produkty ich rozkładu, za jakie uważamy wielofenole i ich pochodne, wnikają



do komórek i biorą udział w przemianie materii, możemy uważać za pewne na podstawie prac Flaiga (1955 oraz Unger 1962). Należałoby również zbadać, czy znaleziona przez nas frakcja związków huminowych, rozpuszczalna w mieszaninie acetonu z wodą i nie dająca się zaadsorbować na tlenku glinu, ta sama, która wykazała tak silną aktywność biologiczną, zdolna jest przekroczyć barierę plazmatyczną. Teoretycznie nie jest wykluczone, że ta szczególna frakcja, wyodrębniona z całości związków huminowych okaże się do tego zdolna. Gdyby tak było, wówczas można by było jej przypisać bezpośrednie znaczenie w przemianie materii wewnątrz komórki.

## LITERATURA

- Badura L., 1965. O mechanizmie „stymulującego” wpływu humianu sodu na proces fermentacji alkoholowej i rozmnażanie drożdży. *Acta Soc. Bot. Polon.* **34**: 287—328.
- Brodowska-Dworakowska H., 1939. Wpływ próchnicy rozpuszczalnej na infekcję grochu przez bakterie brodawkowe. *Acta Soc. Bot. Polon.* **16**: 1—28.
- Czerwiński W., Znaczenie humianu sodowego w kulturach wodnych pod kątem widzenia czynnika minimum. *Acta Soc. Bot. Polon.* (w druku).
- Dzierzbicki A., 1909. Einige Beobachtungen über den Einfluss der Humusstoffe auf die Entwicklung der Hefe und auf die Alkoholgärung. *Bull. Internat. Acad. Sci. Cracovie Cl. Sci. Math. et Nat.* 651—660.
- Flaig W., 1955. Chinone als Modellsubstanzen von Huminsäurevorstufen. *Z. Pflanzenern. Düng. Bod.* **63**: 43—50.
- Gumińska Z., Gumiński S., u. Badura L., 1962. Über die direkte und indirekte Wirkung der Humusverbindungen auf den pflanzlichen Organismus. Vorläufige Mitteilung. *Acta Soc. Bot. Polon.* **31**: 265—268.
- Gumiński S., 1950. Badania nad mechanizmem i warunkami działania związków próchnicznych na organizm roślinny. *Acta Soc. Bot. Polon.* **20**: 589—620.
- Gumiński S. i Badurowa M., 1965. Znaczenie humianu sodowego w kulturze wodnej w obecności dwutlenku węgla, dwuwęglanów i siarkowodoru w pożywce. *Acta Soc. Bot. Polon.* **34**: 83—96.
- Gumiński S. i Gumińska Z., 1953a. Dalsze badania nad mechanizmem działania próchnicy na organizm roślinny. *Acta Soc. Bot. Polon.* **22**: 45—63.
- Gumiński S. i Gumińska Z., 1953b. Chemiczne podstawy podobnego działania fizjologicznego próchnicy oraz wyciągów wodnych z liści niektórych gatunków roślin. *Acta Soc. Bot. Polon.* **22**: 771—785.
- Gumiński S., Gumińska Z. and Sulej J., 1965. Effect of humate, agar-agar and EDTA on the development of tomato seedlings in aerated and non aerated water cultures. *J. Exp. Bot.* **16**: 151—162.
- Hevitt E. J., 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham, Roy Bucks.
- Prát S., 1964. Humus a jeho význam. Praha, Československa Akademie Věd.
- Pringsheim E. G., 1926. Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. V Mitteilung, Methoden und Erfahrungen. *Beitr. Biol. Pflanz.* **14**: 283—311.
- Trojnowski J., 1954. Wstępne badania nad aktywnością biologiczną niektórych frakcji humusu. *Acta Soc. Bot. Polon.* **23**: 143—160.
- Unger E., 1962. Wpływ niektórych wielofenoli na asymilację i oddychanie moczarki kanadyjskiej *Elodea canadensis* i liści bożodrzewu *Ailanthus glandulosa*. *Acta Soc. Bot. Polon.* **31**: 3—24.
- Unger E., 1965. Badania nad zdolnością wiązania żelaza przez niektóre związki próchniczne. *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu, Rolnictwo* **19**, nr 60: 83—96.
- Uspenski E. E., 1927. Eisen als Faktor für die Verbreitung niederer Wasserpflanzen. *Pflanzenforschung* **9**: 1—104.