Porównanie wpływu humianu sodowego naturalnego, syntetycznego oraz otrzymanego z barwników wydzielanych przez grzyby pleśniowe na wzrost pomidorów i oddychanie drożdży

The compared effects of sodium humates (natural, syntetic and obtained from colouring matters excreted by *Penicillia*) on tomato plants growth and respiration of yeasts

L. BADURA

WSTĘP

Przeprowadzając badania nad wyjaśnieniem mechanizmu działania humianu sodowego na wzrost roślin S. Gumiński (1950) oraz S. i Z. Gumińscy (1953 a i b) stwierdzili, iż efekt fizjologiczny humianu uwidacznia się szczególnie silnie dopiero wtedy, gdy rośliny znajdują się w niekorzystnych dla nich warunkach bytowania. Takimi niekorzystnymi warunkami, jak początkowo przypuszczali, byłaby niedostateczna ilość tlenu w pożywce, względnie, jak wykazały dalsze badania, niedostatek przyswajalnych form pewnych pierwiastków, a zwłaszcza żelaza (W. Czerwiński oraz S. Gumiński, prace w druku). Działanie Na-humianu uwidaczniało się bardzo silnie w kulturach nie wietrzonych (przez przelewanie) w przyroście masy w stosunku do przyrostu masy roślin kontrolnych.

Podobny efekt fizjologiczny wywiera w tych samych warunkach nie tylko humian naturalny uzyskany z gleby, lecz również „humian” syntetyczny otrzymany przez odpowiednie traktowanie pochodnych fenolowych typu: hydrochinon, p-benzochinon, kw. galusowy itp. (W. Eller i K. Koch 1920, W. Eller 1922, S. Gumiński i Z. Gumińska 1953 a i b, W. Flaig 1955, W. Flaig i współpr. 1955, Z. Gumińska 1958), względnie skarmelizowana sacharoza, a nawet wyciągi z nierozłożonych liści bukowych i dębowych. W tym ostatnim wypadku czynnikiem stymulującym jest przypuszczalnie zawarta w tych liściach pirokatechina i kwas galusowy (S. i Z. Gumińscy 1953 a i b). H. Krzemieniewska i L. Badura (1954) wykazali bowiem, iż świeże liście bukowe, traktowane podobnie jak przy otrzymaniu humia-

nu z gleby, dają znaczne ilości substancji analogicznej do naturalnych kwasów huminowych.

Przebadane produkty utlenienia i polimeryzacji pochodnych fenolowych zachowują się nie tylko jednakowo względem kwasów i zasad, dając rozpuszczalne w ługach ciemnobrunatne związki z wyglądu i fizjologicznego działania, analogiczne do humianu otrzymanego z gleby, lecz również posiadają ciężar cząsteczkowy podobny do ciężarów drobinowych naturalnych kwasów huminowych (E. Welte i współpracownicy 1954).

Już stosunkowo wcześniej M. W. Beijerinck (1900), F. Münter (1913), A. Krainsky (1914) zwracali uwagę, że niektóre mikroorganizmy wydzielają związki humuso-podobne. Obserwacje przeprowadzone w następnych latach wykazały, że pewne barwniki wydzielane przez promieniowce czy grzyby są pochodnymi fenolu i pod wpływem zasady ulegają utlenieniu i polimeryzacji na ciemnobrunatne ciała podobne do kwasów huminowych. Również oczyszczone preparaty takich związków otrzymanych z barwników promieniowców i grzybów pod względem budowy chemicznej wykazują daleko idące podobieństwo do naturalnych preparatów Na-humianu (W. Flaig i wspólr. 1952, W. Laatsch i wspólr. 1952, K. Küster 1952, 1955).

Interesujące jest pytanie, czy owe barwniki spreparowane w sposób identyczny jak wyciągi gleby, a posiadające dużą analogię pod względem chemicznej budowy do humianu naturalnego, będą wywierały podobny fizjologiczny efekt jak naturalny, względnie syntetycznie otrzymany z p-benzochinonu „humian”.

W pracy tej postawiono sobie za zadanie wydzielenie takich barwników i sprawdzenie ich fizjologicznej aktywności.

OGÓLNA METODYKA

Wyizolowane z gleby grzyby z rodzaju *Penicillium* Link., oczyszczone i zidentyfikowane na podstawie monografii K. B. Rapera i Ch. Thoma (1949), hodowano w kolbkach Erlenmajera o pojemności 500 ml na pożywce mineralnej Czapka (w 1 kolbce 200 ml pożywki). Po trzech tygodniach dodawano do hodowli niewielką ilość ługu sodowego tak, aby końcowe pH pożywki wynosiło około 7,5, a następnie po rozpuszczeniu się brunatnego osadu przez filtrowanie oddzielano pożywkę od kożucha grzyba. Do klarownego czerwobrunatnego roztworu dodawano następnie kilka kropel HCl w celu wytrącenia brunatnego osadu. Ponownie przesączano, a brunatny osad rozpuszczano w lekko zalkalizowanej wodzie destylowanej. Otrzymano w rezultacie ciemnobrunatnoczerwony roztwór Na-„humianu”. Roztwór ten, podobnie jak w pracach S. Gumińskiego z naturalnym humianem, autoklawowano

przez 30 minut przy nadciśnieniu 1 Atm. Po oznaczeniu suchej masy tak przygotowanego roztworu dodawano go w tej samej ilości wagowej (50 mg s.m. humianu na 1 litr pożywki) jak naturalnego i syntetycznie otrzymanego z p-benzochinonu „humianu” sodu do pożywki H a m p e (Cyt. przez S. G u m i ń s k i e g o 1950), w której następnie hodowano pomidory. W doświadczeniach z drożdżami dodawano humianu sodu do pożywki Dzierzbickiego w ilości odpowiadającej końcowemu stężeniu 0,1 %.

Doświadczenia z pomidorami prowadzono w szklarni w miesiącu czerwcu 1962 r. Kultury wodne pomidorów założono w 4 kombinacjach (1. kontrola, 2. Na-humian naturalny, 3. Na-„humian” syntetyczny z p-benzochinonu, 4. Na-„humian” otrzymany z barwników grzybowych) w 2 wariantach — w kulturach wietrzonych i nie wietrzonych (przez przelewanie). Każda kombinacja posiadała 5 indywidualnych powtórzeń. Wyniki suchej masy roślin opracowano statystycznie przy pomocy metody podbloków.

W doświadczeniach z drożdżami wpływ humianu naturalnego i otrzymanego z barwników grzybowych stwierdzano na podstawie ilości wydzielanego CO₂. Doświadczenie prowadzono w 5 powtórzeniach dla każdej kombinacji.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

Przede wszystkim należało przeprowadzić wstępne obserwacje nad wydzielaniem przez wyizolowane gatunki grzybów takich barwników, które by wytrącały się w środowisku kwaśnym, a następnie rozpuszczały w lekko alkalicznym roztworze. W tym celu infekowano płynne pożywki Czapka o pH 6,0 następującymi gatunkami: *Penicillium implicatum* Biourge, *P. lilacinum* Thom, *P. brevi-compactum* Direckx, *P. purpurogenum* Stoll, *P. godlewskii* Zaleski, *P. citrinum* Thom, *P. cyclopium* Westling, *P. restrictum* Gilman et Abbott. Spośród tych gatunków jedynie *Penicillium implicatum* wydzielalo ciemnobrunatny barwnik o poszukiwanych właściwościach. Czerwony barwnik wydzielalo również *Penicillium purpurogenum*, lecz barwnik ten nie wytrącał się pod wpływem kwasu solnego. Pozostałe gatunki z rodzaju *Penicillium* nie wydzielaly barwnika, względnie dawały barwnik w kolorze żółtym.

W celu przekonania się, czy wydzielanie barwnika jest uwarunkowane podłożem, przeprowadzono analogiczne doświadczenie przy użyciu pożywki Czapka z dodatkiem peptonu. Już wcześniej W. F l a i g i współpracownicy (1952) zwrócili uwagę, że dodatek peptonu względnie pojedynczych aminokwasów stymuluje nagromadzanie się ciemnobrunatnych związków w kulturach *Streptomyces*. Wyniki porównawcze wydzielonych barwników na pożywce Czapka bez peptonu i z peptonem zestawione są w tabeli 1. Z zestawienia tego wynika, iż pepton wpływał wy-

rażnie na ilość nagromadzanego się w podłożu barwnika. Ponadto w wypadkach dwóch gatunków *P. lilacinum* i *P. citrinum* otrzymano na peptonie barwniki wytrącające się w kwasie solnym, czego nie udało się zaobserwować na czystej pożywce Czapka.

Tabela 1 — Table 1

Wydzielanie barwników utleniających i polimeryzujących się w ługu
Excretion of colouring matters oxidizing and polymerizing in alcalies

Nazwa gatunku Name of the species	Wydzielanie barwników Excretion of colouring matters		Uwagi
	— pepton	+ pepton	
<i>Penicillium brevi-compactum</i>	—	—	
<i>P. citrinum</i>	—	++	barwnik żółty wytr. HCl
<i>P. cyclopium</i>	—	—	
<i>P. godlewskii</i>	—	±	barwnik w środowisku kwaśnym żółty, w środowisku alkalicznym czerwony
<i>P. implicatum</i>	+++	+++	barwnik brunatnoczerwony, w HCl łatwo wytrącalny, osad, w NaOH rozpuszczalny
<i>P. lilacinum</i>	—	+++	" " " "
<i>P. purpurogenum</i>	—	—	barwnik czerwony słabo dyfundujący do podłoża, nie wytrąca się w HCl
<i>P. restrictum</i>	—	±	barwnik żółty słabo wytrącający się w HCl

Do otrzymania większej ilości humianu z barwników wydzielanych w procesie metabolizmu wybrano *Penicillium implicatum*. Aby z kolei wyeliminować ewentualne dodatkowe działanie peptonu, hodowle prowadzono na czystej pożywce Czapka. Po otrzymaniu dostatecznej ilości tak sporządzonego Na-„humianu” przystąpiono do dalszych doświadczeń z roślinami.

Młode siewki pomidorów, wykiełkowane w kwarcowym piasku, umieszczano po 3 roślinki na każdy słoik, w 40 jednolitrowych słoikach wypełnionych pożywką Hampe'go z dodatkiem mikroelementów A-Z Hoaglanda uzupełnionych molibdenem. pH pożywki stabilizowano kwasem fosforowym do poziomu 6,4. Związków huminowych i humino-podobnych dodawano w jednakowej ilości 50 mg suchej masy na litr pożywki. Ułożono 4 kombinacje w 2 wariantach:

I. 1. Wietrzona pożywka bez humianu

2. „ „ z Na-humianem naturalnym otrzymanym z kompostu

3. „ „ z Na-„humianem” syntetycznym otrzymanym z p-benzochinonu
4. „ „ z Na-„humianem” otrzymanym z barwników grzybowych
- II. 5. Nie wietrzona pożywka bez humianu
6. „ „ z Na-humianem naturalnym otrzymanym z kompostu
7. „ „ z Na-„humianem” syntetycznym otrzymanym z p-benzochinonu
8. „ „ z Na-„humianem” otrzymanym z barwników grzybowych

Kultury początkowo wietrzono (przez przelewanie) raz dziennie, a po upływie półtora tygodnia dwa razy dziennie. Całe doświadczenie trwało miesiąc. Po skończeniu doświadczenia oznaczano suchą masę korzeni i pędów, a średnie wyniki z badanych kombinacji zestawiono w tabeli 2.

Doświadczenie to zgadza się z dotychczasowymi wynikami S. Gumińskiego i współpracowników (1960, 1962), którzy obserwowali w analogicznych układach doświadczeń stymulujący wpływ Na-humianu naturalnego i syntetycznego w kulturach nie wietrzonych.

Równocześnie w tym doświadczeniu wykazano, iż identyczne działanie fizjologiczne jak humian naturalny czy syntetyczny posiadają odpowiednio spreparowane barwniki grzybowe.

Następnie przeprowadzono doświadczenie nad wpływem humianu otrzymanego z barwników grzybowych na przebieg fermentacji alkoholowej wywoływanej przez drożdże. A. Dzierzbicki (1909) stwierdził, że próchnica naturalna dodawana w stężeniu 0,1% w przeliczeniu na suchą masę przyspiesza proces fermentacji alkoholowej. Zewnętrznym objawem tego przyspieszenia może być intensywniejsze wydzielanie CO_2 . Z pracy S. i Z. Gumińskich (1953) oraz autora (Z. Gumińska, S. Gumiński, L. Badura 1962) wynika, że pod wpływem humianu sodu zwiększa się ilość komórek drożdżowych. Z nie opublikowanych własnych badań wynika również, że w pewnych wypadkach podobnie stymulującą rolę mogą pełnić „humiany” otrzymane syntetycznie.

Doświadczenie prowadzono w erlenmajerkach zawierających 100 ml pożywki Dzierzbickiego (1909) zamykanych specjalnym wentylem umożliwiającym tylko jednostronną wymianę gazową. Erlenmajerki wraz z pożywką o pH 6,5 infekowano 1 ml zawiesiny drożdżowej rasy D 43, a następnie ważono na początku i co 24 godziny i z różnicy ciężaru (utrata CO_2) wnioskowano o intensywności danego procesu.

Doświadczenie prowadzono w następujących układach: 1 — Kontrola, 2 — 0,1% Na-humian naturalny, 3 — 0,1% Na-„humian” otrzymany z barwników grzybowych. Średnie wyniki z pięciu powtórzeń zilustrowane są na wykresie 1.

Wykres 1. Wpływ humianu naturalnego i otrzymanego z barwników na ilość wydzielanego CO_2 . Stężenie humianów w pożywce wynosi 0,1%

1 — kontrola; 2 — Na-„humian” otrzymany z barwników; 3 — Na-humian naturalny

Graph. 1. Effect of humates (natural nad obtained from colouring matters) on the quantity of excreted CO_2 . Concentration of humates in medium is equal to 0,1 %

1 — control; 2 — Na-„humate” obtained from colouring matters; 3 — natural Na-humate

Z wykresu można odczytać, że zgodnie z dotychczasowymi badaniami humian sodu stymulował wyraźnie w stosunku do kontroli wydzielanie dwutlenku węgla oraz to, że pewne, choć słabsze stymulujące działanie dało się zaobserwować także w wypadku użycia „humianu” z barwników grzybowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z przeprowadzonych doświadczeń zarówno nad roślinami zielonymi (pomidorami), jak i roślinami niższymi (drożdżami) wynika, że wydzielany do podłoża w trakcie rozwoju pewnych gatunków grzybów barwnik, po utlenieniu i spolimeryzowaniu, może pełnić analogiczne funkcje fizjologiczne jak naturalny Na-humian. Byłby to jeszcze jeden dowód na udział wielu czynników w powstawaniu tego tak złożonego połączenia, jakim jest próchnica zawarta w glebach. Trudno w ramach tej pracy szeroko dyskutować nad wszystkimi możliwymi drogami prowadzącymi do powstawania tych związków, jednakże należy przypomnieć ogólne hipotezy wyjaśniające to zagadnienie. W obecnej chwili zarysowują się trzy równorzędne możliwości. Jedna to powstawanie próchnicy z mikrobiologicznego rozkładu związków organicznych, a w szczególności lignin i celulozy, druga możliwość to uwalnianie się pewnych pochodnych fenolo-

wych zawartych w samych roślinach, trzecia zaś związana jest z syntezą i wydzielaniem pewnych związków o budowie cyklicznej w procesie rozwoju samych mikroorganizmów.

Tabela 2 — Table 2

Średnia sucha masa pędów i korzeni w zależności od rodzaju kultury
Average dry weight of shoots and roots depending upon the medium

Rodzaj kultury The medium		Średni ciężar 3 roślin (z jednego słoja) w mg Average weight of 3 plants (from one glass) in mg			
		Pędy Shoots	Przedział ufności Confidence interval	Korzenie Roots	Przedział ufności Confidence interval
Wietrzone — Aerated	Bez Na-humianu Without Na-humate	1784	354	251	35,4
	+ Na-humian naturalny + Natural Na-humate	1574		240	
	+ Na-„humian” syntetyczny + Synhetic Na-„humate”	1873		240	
	+ Na-„humian” z barwników + Na-„humate” obtained from colouring matters	1880		246	
Nie wietrzone — Non-aerated	Bez Na-humianu Without Na-humate	161	209	20	33,5
	+ Na-humian + Natural Na-humate	1045		113	
	+ Na-„humian” syntetyczny + Synthetic Na-„humate”	1252		139	
	+ Na-„humian” z barwników + Na-„humate” obtained from coluring matters	1030		115	

Jak wynika z doświadczeń poprzednio cytowanych autorów i wyników doświadczeń zawartych w tej pracy, wszystkie te trzy składowe posiadają nie tylko analogiczną budowę chemiczną, lecz wywierają ten sam fizjologiczny efekt.

WNIOSKI

1. Z przebadanych 9 gatunków z rodzaju *Penicillium* jeden gatunek — *P. implicatum* wydzieliał w większych ilościach barwnik rozpuszczalny w ługach i wytrącający się w kwasach.

2. Dodatek peptonu stymulował wydzielania barwnika w hodowli *Penicillium implicatum*.

3. Otrzymany z barwnika Na-„humian” wywierał podobny efekt fizjologiczny jak naturalny humian sodu.

Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytetu Wrocławskiego

(Wpłynęło: 15.I.1964)

SUMMARY

The chief purpose of the present paper was to establish whether the colouring matters exuded by fungi, oxidized and then polymerized in alkalies, by methods applied in obtaining natural sodium humate from compost, will exert on plants an effect analogical to that showed by natural humate.

After having investigated 9 species of the genus *Penicillium* (table 1) we selected one species — *Penicillium implicatum* whose colouring matter exuded into the medium was easily oxidized and polymerized. In this way we obtained sodium „humate” which was used for comparative experiments on the growth of tomato plants and liberation of carbon dioxide in the process of alcoholic fermentation.

The experiment with tomatoes was conducted in water cultures. The plants were raised under conditions identical to those given by S. Gumiński and Z. Gumińska (1953 a and b). The studies on the effect of humate on alcoholic fermentation were carried out with the help of a method given by A. Dzierżbicki (1909).

Results obtained from vegetative experiment on tomato plants are given in table 2. From the obtained data, it follows that the „humate” received from colouring matters exerts a physiological effect similar to that shown by natural humate or by humate obtained synthetically from p-benzochin.

From the experiment carried out on yeasts it also follows that the effect of humate obtained from colouring compounds on the intensity of fermentation is similar to that showed by natural humate. The intensity rate was measured as the quantity of CO₂ excreted in the course of the experiment. Results are presented on graph 1. From the obtained data we can infer that humate, either natural, synthetic or obtained from colouring matter exerts similar physiological effects on plants.

Department of Plant Physiology
University of Wrocław
ul. Kanonia 6/8

LITERATURA

1. Beijerinck M. W., 1900, Über Chinonbildung durch *Sreptotrix* chromogena und Lebensweise dieses Mikroben, Zentrbl. f. Bakt. Abt. II, 6: 2—12.
2. Dzierzbicki A., 1909, Kilka spostrzeżeń nad wpływem związków próchnicowych na rozwój drożdży i fermentację alkoholową, Bull. Inter. Acad. Sci. Cracovia, Cl. Sc. Math. et Natur, 651—660.
3. Eller W., 1922, Die Synthesen der Huminsäuren, Bren. Chem 3 (4): 55—56.
4. Eller W., Koch K., 1920, Syntetische Darstellung von Huminsäuren, Ber. deutsch. Chem. Gaz. 53: 1469—76.
5. Flaig W., 1955, Über den Einfluss von Spuren von Humusstoffen bzw. deren Modellsubstanzen auf das Pflanzenwachstum, Landw. Forschung 8: 133—140.
6. Flaig W., Küster E., Segler-Holzweissig G., Beutelspacher H., 1952, Zur Kenntniss der Huminsäuren V, Über die Bildung von huminsäure-ähnlichen Stoffen aus Streptomycceten-Kulturen, Zeitschr. f. Pflanzenzehr. Ding. Bod. 57/102: 42—51.
7. Flaig W., Reinemund K., 1955, Zur Kenntniss der Huminsäuren VI, Zeitsch. f. Pflanzenähr. Ding. Bod. 68 (113): 255—269.
8. Gumiński S., 1950, Badania nad warunkami i mechanizmem działania związków próchnicznych na organizm roślinny, Acta Soc. Bot. Pol. 20: 589—620.
9. Gumiński S., 1960, Wpływ humianu sodowego oraz zbliżonych substancji na oddychanie korzeni i nasion, Acta Agrobotanica 9: 123—127.
10. Gumiński S., Gumińska Z., 1953, Dalsze badania nad mechanizmem działania próchnicy na organizm roślinny, Acta Soc. Bot. Pol. 22: 46—63.
11. Gumiński S., Gumińska Z., 1953, Chemiczne podstawy podobnego działania fizjologicznego próchnicy oraz wyciągów wodnych z liści niektórych roślin, Acta Soc. Bot. Pol. 22: 771—785.
12. Gumińska Z., 1958, Utlenione związki próchniczne jako stymulatory kiełkowania nasion, Acta Soc. Bot. Pol. 27: 501—522.
13. Gumińska Z., Gumiński S., Badura L., 1962, Über direkte und indirekte Wirkung der Humusverbindungen auf den pflanzlichen Organismus, Acta Soc. Bot. Pol. 31: 265—268.
14. Krainsky A., 1914, Die *Aktinomyceten* und ihre Bedeutung in der Natur, Zentrbl. f. Bakt. Abt. II, 41: 647—688.
15. Krzemieniewska H., Badura L., 1954, Z badań nad mikroflorą lasu bukowego, Acta Soc. Bot. Pol. 23: 545—587.
16. Küster E., 1952, Umwandlung von Mikroorganismen Farbstoffen in Humusstoffe, Zeitsch. f. Pflanzenähr. Ding. Bod. 57 (102): 51—57.
17. Küster E., 1955, Humusbildung und Phenolooxydasen bei *Streptomycceten*, Zeitsch. f. Pflanzenähr. Ding. Bod. 69 (114): 137—142.
18. Leatsch W., Hoope L., Bienieck O., 1952, Über Huminsäuren des Pilzes *Spicaria elegans*, Zeitsch. f. Pflanzenähr. Ding. Bod. 58 (103): 258—268.
19. Münter F., 1913, Über *Aktinomyceten* des Bodens, Zentrbl. f. Bakt. Abt. II. 36: 365—381.
20. Raper K. B., Thom Ch., 1949, A Manual of the *Penicillia*. Will. and Wilk. Co. Baltimore.
21. Welte E., Niemann A., Ziechman W., 1954, Über Huminsäuren II (Molekular und Äquivalentgewicht), Naturwiss. 41: 334—335.