Wstępne badania nad aktywnością biologiczną niektórych frakcji humusu

Preliminary Studies on the Biologic Activity of some Humic Fractions

JERZY TROJANOWSKI

(Wpłynęło dn. 20.X.53 r.)

Dotychczasowe badania nad działaniem związków humusowych na organizm roślinny nie prowadzą do jednoznacznych wyników. Brak metod rozdzielania i wyodrębniania substancji humusowych w stanie niezmienionym chemicznie i wolnym od soli mineralnych, zmuszał badaczy do używania w doświadczeniach mieszanin substancji próchnicznych o nieznanym dokładnie składzie. Zarówno skład chemiczny jak i własności fizyko-chemiczne tych mieszanin zmieniają się przypadkowo w zależności od wyboru surowca wyjściowego i metody wyodrębnienia.

W nowszej literaturze, poświęconej temu problemowi, można wyróżnić następujące główne kierunki badań:

1) Obecności s t y m u l a t o r ó w w z r o s t u w próchnicy dopatrują się niżej wymienieni badacze:

W. B. B o t t o m l e y (4) wykazał stymulujący wpływ próchnicy na rozwój rzęsy (r. 1920).

B. N i k l e w s k i i J. D u d a (14) obserwowali działania chemotropiczne wyciągu z obornika i z torfu na korzeń gorczycy (r. 1936).

E. G. P r i n g s h e i m (17) wykrył w próchnicy glebowej obecność czynnika wzrostowego, niezbędnego dla niektórych wiciowców (r. 1936).

A. K u t h y i J. P e c z n i k (11) przyjmują, na podstawie badań nad działaniem wodnego wyciągu obornika na kiełkowanie owsa, że w wyciągu tym są obecne substancje wzrostowe (r. 1941).

S. G u m i Ń s k i (8) wyraża przypuszczenie, że rozpuszczalna próchnica glebowa może być czynnikiem wzrostowym dla niektórych glonów i pierwotniaków. (1947).

M. A. B i b e r i N. S. B o g o l i u b o w (1) wykazali stymulujący wpływ „kwasów humusowych“ na wzrost korzeni kiełkującej kukurydzy. Efekt był wyraźniejszy, jeżeli użyto jako materiału wyjściowego czarnoziem zamiast torfu (r. 1951).

2) Wielu badaczy przypisuje własnościom fizyko-chemicznym humusu doniosły wpływ na wzrost roślin. Pogląd ten wypowiadają m. in.

B. Dirks (5) uważa wielkość potencjału redukcyjno-oksydacyjnego gleby za czynnik warunkujący normalny wzrost roślin. Rolę nawozów organicznych upatruje wymieniony autor w utrzymywaniu tego potencjału na odpowiednim dla roślin uprawnych poziomie. Dirks wypowiada równocześnie pogląd, że w glebie nagromadzają się substancje należące do kompleksu humusu, trujące dla roślin (1940).

J. Wojciechowski (24) próbował wyłączyć ze składu pożywek sole żelaza i zastąpić je mieszaniną „kwasów humusowych“. Wojciechowski podaje pozytywny wynik tej próby, przeprowadzonej na kulturach wodnych sałaty, tłumacząc go własnościami redukcyjno-oksydacyjnymi użytych substancji (1948).

S. Gumiński (9) twierdzi na podstawie pracy nad wodnymi kulturami pomidorów, że dodatek tzw. „humianu sodowego“ umożliwiał normalny wzrost roślin w kulturach niewietrzonych. Jeżeli nie dodano tej substancji, rośliny w kulturach wodnych źle się rozwijały. Wietrzenie natomiast równoważyło brak wymienionego preparatu w pożywce (1950).

I. A. Geller (7) podaje w swej pracy ciekawy przyczynek do poznania warunków redukcyjno-oksydacyjnych w glebie. Autor ten stwierdził obniżenie potencjału redoks gleby w obrębie rizosfery roślin uprawnych (1952).

A. F. Tjulini i T. A. Małomachowa (20) przeprowadzili doświadczenia nad adsorpcją kwasu fosforowego przez glebę. Stwierdzili oni, że ilościowy efekt tej adsorpcji zależy od obecności nawozów organicznych. Autorzy podkreślają duże znaczenie związków żelaza z humusem dla przebiegu tej adsorpcji. (1952).

W. Williams (23) przypisuje próchnicy decydujący wpływ na utrzymanie gruzelkowatej struktury gleby, oraz podkreśla jej doniosłą rolę w życiu mikroflory glebowej.

3) Inna grupa badaczy uważa humus za czynnik sprzyjający odżywianiu roślin, z większą rolą pobierania soli mineralnych. Ten pogląd reprezentują:

R. Lieske (12) otrzymywał wzrost plonów pszenicy, buraków i ziemniaków pod działaniem humusu z węgla brunatnego (1932).

A. W. Błagowieszczenski i A. A. Prosorowska (3) stwierdzili dodatni wpływ humusu na pobieranie azotu i potasu przez len (1934).

B. Niklewski (13) oraz B. Niklewski i J. Wojciechowski (15) podają, że wyciąg z torfu lub obornika przyspiesza pobieranie niektórych soli mineralnych przez rośliny wyższe a także stymuluje wzrost systemu korzeniowego i aparatu chlorofilowego.

4) Od przytoczonych wyżej poglądów bardzo różnią się wyniki ogłoszone przez:

E. E. Uspenskiego (22), który stwierdza, że rozpuszczone w wodzie jeziornej substancje humusowe wiążą szkodliwy dla glonów nadmiar soli żelazowych i w tym tylko leży ich znaczenie dla rozwoju glonów (1927).

F. Terlikowski i Byczkowski (19) są zdania, że kompost wpływa dodatnio na plon roślin uprawnych tylko dzięki obecności soli mineralnych w jego składzie (1938).

Już na podstawie tego krótkiego przeglądu niektórych nowszych prac nasuwa się przypuszczenie, że w próchnicy zawarte są różne czynniki, których aktywność biologiczna pojawia się lub zanika w zależności od obranej metodyki doświadczenia.

Dla rozwiązywania tych problemów istotne jest opracowanie takich metod izolacji poszczególnych substancji humusowych, aby można było eksperymentować ze znanymi i chemicznie określonymi preparatami.

Wstępem do rozwiązania tego zagadnienia są prace:

W. A. C. F o r s y t h'a (6), w której zastosowano metodę analizy adsorpcyjnej do rozdzielania frakcji wodnej humusu,

oraz J. T r o j a n o w s k i e g o (21), w której przystosowano metodę chromatograficzną do rozdzielania frakcji alkoholowej humusu.

Niżej opisane doświadczenia miały na celu wstępne zbadanie aktywności biologicznej niektórych substancji, wyodrębnionych z frakcji wodnej i alkoholowej próchnicy, w warunkach niedoboru żelaza oraz przy normalnej zawartości żelaza w kulturach wodnych. Jako roślina doświadczalna służyła sałata (odmiana majowa).

PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW HUMUSOWYCH.

I. F r a k c j a a l k o h o l o w a .

Substancje humusowe, dające się ekstrahować z torfu alkoholem były wyodrębnione głównie w oparciu o metodę chromatograficzną, przystosowaną do tego celu przez autora (21). Dla oczyszczenia od soli mineralnych stosowano elektrodializę.

Surowcami wyjściowymi do badań były 2 torfy niskie i 2 torfy wysokie. Przygotowanie poszczególnych preparatów z torfów odbywało się w następujących stadiach:

1) Wysuszony na powietrzu i rozdrobniony torf był uwalniany od substancji bitumicznych przez ekstrakcję eterem naftowym w temp. pokojowej. Dla całkowitego usunięcia bitumów konieczne było 40-to krotne powtórzenie ekstrakcji, przy użyciu 4-ro krotnej objętości eteru naftowego w stosunku do masy torfu przy każdym powtórzeniu.

2) Po wysuszeniu na powietrzu, wyekstrahowany eterem naftowym torf uwalniany był od soli wapnia i żelaza przez wypłukanie 0,2 n HCl i wodą destylowaną.

3) Po wysuszeniu przemytego wodą torfu na powietrzu, poddano go wyczerpującej ekstrakcji alkoholem etylowym (96%). Łącznie na 1 kg suchej masy torfu zużywano ok. 75 litrów alkoholu. Alkohol z poszczególnych ekstraktów był oddestylowywany aż do osiągnięcia temp. wrzenia 60° pod ciśnieniem 100 mm sł. Hg. Destylacja odbywała się w atmosferze azotu, ponieważ według W. A. B i b e r a (2) roztwory substancji humusowych mogą się utleniać na powietrzu.

4) Rozdzielenie wyciągów alkoholowych na frakcje uzyskano na kolumnach chromatograficznych; dokładny opis tego sposobu rozdzielania

substancji próchnicznych znajduje się w poprzednio ogłoszonej pracy autora (21). Jako adsorbent używany był tlenek magnezu „ciężki”. Chromatogram rozwijano roztworem kwasu olejowego w alkoholu etylowym 96%, sporządzonym w stosunku objętościowym 1:7,5. W świetle ultrafioletowym obserwowano barwne warstwy fluoryzujące, których ułożenie i odcień fluorescencji były zależne od surowca wyjściowego. Do badań nad efektem biologicznym wyodrębniono I i II warstwę chromatogramu licząc od góry. W obrębie tych warstw była zaadsorbowana przeważająca ilość substancji zawartych w roztworze wyjściowym. Dalsze warstwy chromatogramu pozostawiono do późniejszego zbadania.

Barwy fluorescencyjne wyodrębnionych warstw były następujące:

Torf niski z Białowieży	I warstwa — brązowo rdzawa.
„ „ „ „	II warstwa — żółta.
Torf niski z Zemborzyc	I warstwa — brązowa.
„ „ „ „	II warstwa — ciemno żółta.
Torf wysoki z Chlebowa	I warstwa — brązowa.
„ „ „ „	II warstwa — jasno brązowa.
Torf wysoki z Białowieży	I warstwa — ciemno brunatna.
„ „ „ „	II warstwa — żółtawo brązowa.

5) Rurę szklaną z chromatogramem przecinano na części wyróżniające się w świetle ultrafioletowym. Poszczególne warstwy były wydobywane mechanicznie i zbierane oddzielnie.

Elucja adsorbenta następowała zwykle przez zalanie alkoholem etylowym, do którego powoli wkraplano kwas solny. Reakcja odbywała się w naczyniu zamkniętym; zawartość była stale mieszana mechanicznie. Tempo wkraplania kwasu było tak uregulowane, aby kwasowość roztworu nie przekroczyła pH 2. Adsorbent rozpuszczał się całkowicie, a uwolnione substancje humusowe zabarwiały alkohol na brązowo. Podczas reakcji przepuszczano przez naczynie strumień azotu.

W celu usunięcia kwasu olejowego, używanego do rozwijania chromatogramu, wytrząsano otrzymany roztwór wielokrotnie z eterem nadtlenkowym. Aby umożliwić rozwarstwienie 2 faz, dodawano uprzednio do roztworu alkoholowego 1/3 objętości wody.

6) Dla wytrącenia substancji humusowych z roztworu, wlewano go zwykle do 2-krotnej objętości wodnego 2% roztworu CaCl_2 i doprowadzano pH do wartości 6,8. Niektóre substancje można było wytrącić już przez rozcieńczenie roztworu alkoholowego 3-krotną objętością wody. Otrzymane tymi sposobami strąty odwirowywano i przemywano rozcieńczonym kwasem solnym i wodą na wirówce.

Odwirowane substancje po rozbełtaniu w wodzie i zakwaszeniu, były umieszczane w elektrodializatorze Brintzingera i dializowane aż do osiągnięcia stałego minimalnego natężenia prądu (od 20 do 40 mA przy napięciu 450 volt). Stosowano membrany celofanowe, anodę platynową, katodę miedzianą. Poniżej umieszczam tabelę, w której wyszczególnione są wszystkie frakcje używane do doświadczeń z roślinami, wraz z krótkim opisem wyodrębnienia tych frakcji.

II. F r a k c j a w o d n a.

Oprócz frakcji alkoholowych humusu użyto również 2 frakcji wodnych próchnicy, które wyodrębniono, wzorując się na metodzie W. A. C. F o r s y t h'a (6).

Wszystkie preparaty suszono pod zmniejszonym ciśn. w temp. 60°.

WYSZCZEGÓLNIENIE FRAKCJI HUMUSU UŻYWANYCH DO DOŚWIADCZENIA Z SAŁATĄ

Torf	Symbol frakcji	Sposób wyodrębnienia
Torf wysoki z Chlebowa	Całość ekstraktu alkoholow.	Patrz przygotowanie roztworu wyjściowego do chromatografii. Izolowanie i oczyszczenie substancji zawartych w tym roztworze — p. punkt 6) powyżej.
„	A ₁	Subst. eluowana z I warstwy chromatogramu alkoholowym roztw. HCl, wytrącona chlorkiem wapnia, oczyszczenie — p. punkt 6).
„	B ₁	jak A ₁ ale wytrącona z roztworu alkoholowego przez trzykrotne rozcieńczenie wodą.
„	C ₁	Subst. eluowana z II warstwy chromatogramu, alkoholowym roztw. HCl, wytrącona przez trzykrotne rozcieńczenie 0,05 normalnym HCl. Strąt wypłynął na powierzchnię w postaci brunatnej żywcowatej mazi, którą dalej oczyszczano zgodnie z punktem 6).
„	D ₁	Subst. eluowana z II warstwy chromatogramu roztworem kwasu olejowego w alkoholu, oczyszczona od reszek substancji z warstwy I przez powtórne chromatografowanie, eluowana następnie roztworem alkoholowym HCl. Oczyszczenie — p. punkt 6).
Torf wysoki z Białowieży	A ₂	Subst. eluowana z I warstwy chromatogramu roztworem alkoholowym HCl. Oczyszczenie — p. punkt 6).
„	B ₂	Subst. eluowana z II warstwy chromatogramu roztworem alkoholowym HCl. Oczyszczenie — p. punkt 6).

Torf	Symbol frakcji	Sposób wyodrębnienia
Torf niski z Białowieży	A ₃	Subst. eluowana z I warstwy chromatogramu roztw. alkoholowym HCl. Oczyszczenie — p. punkt 6).
„	B ₃	Substancja eluowana z II warstwy chromatogramu, roztw. alkoholowym HCl. Oczyszczenie — p. punkt 6).
Torf niski z Zemborzyc	A ₄	Substancja eluowana z I warstwy chromatogramu roztworem alkoholowym HCl, oczyszczenie — p. 6).
„	B ₄	Subst. eluowana z II warstwy chromatogramu roztw. alkoholowym HCl. Wytrącona przez czterokrotne rozcieńczenie wodą. Oczyszczenie — p. 6).
„	C ₄	Frakcja otrzymana bez pomocy metody chromatograficznej. Otrzymano z torfu preparat humusowy metodą ekstrakcji szczawianem sodu według Simon'a (18). Preparat ten wyekstrahowano alkoholem etylowym, otrzymany roztwór tzw. dawniej „kwasu hymatomelanowego“ zadano chlorkiem wapnia w roztworze wodnym. Osad uwolniono od wapnia i oczyszczano jak podałem w punkcie 6).
Torf niski z Zemborzyc — wyciąg wodny		Torf wypłukano rozc. HCl w celu usunięcia soli wapnia i żelaza. Ekstrahowano go następnie wodą destylowaną, zużywając 50 razy większą masę wody w stosunku do masy substancji organicznych zawartych w torfie. Przeprowadzono rozdzielanie substancji rozpuszczonych w wodzie przy pomocy metody adsorpcyjnej W. A. C. Forsyth' (6). Używany był w charakterze adsorbenta węgiel aktywny, marki Hopkins et Williams, London, „Charcoal purified for decolourising, activated“. Przed użyciem adsorbent przemyto 0,1 normalnym HCl, acetonem i wodą. Otrzymano niżej wymienione 2 frakcje, których symbole są zgodne z symbolami użytymi przez Forsyth'a w jego pracy (6). Frakcji A i C, tak nazwanych przez w/w badacza, nie udało się z badanego torfu wyodrębnić.
„	frakcja B w/g Forsyth'a)	Adsorbent był eluowany acetonem, acetonowy roztwór odparowywano do małej objętości, substancje humusowe wytrącano eterem, suszono w suszarce próżniowej w temp. 60°.
„	frakcja D (w/g Forsyth'a)	Adsorbent po wypłukaniu frakcji B eluowano 0,5% roztworem NaOH. Substancje zabarwiające eluat na brązowo strącono roztworem chlorku magnezu. Odsączony osad rozpuszczono 0,05 n kwasem solnym i wytrącono ponownie, dodając równą objętość alkoholu etylowego. Suszono w suszarce próżniowej w temp. 60°.

Jak wynika z tabeli, wyodrębniono łącznie 14 różnych frakcji humusu, pochodzących z 4 różnych torfów. Z tego 10 frakcji udało się wydzielić przy pomocy metody chromatograficznej (21); dwie frakcje uzyskano według metody adsorpcyjnej (6); jedną frakcję otrzymano przez ekstrahowanie alkoholem preparatu humusowego, przygotowanego metodą Simon'a (18). Przygotowano poza tym preparat, zawierający mieszaninę substancji, które rozpuściły się w alkoholu podczas ekstrakcji torfu w opisanych warunkach. Ten ostatni preparat nazwano: „całość ekstraktu alkoholowego“.

Z otrzymanych substancji uważać można z pewnym prawdopodobieństwem za chemicznie jednorodne preparaty otrzymane na drodze chromatograficznej.

KULTURY WODNE

Przygotowanie pożywki.

W doświadczeniu stosowano 3 kombinacje pożywek:

- 1) pełna pożywka (Pfeffera-Knopa),
- 2) pełna pożywka + preparat humusowy,
- 3) pożywka z wyłączeniem soli żelaza + preparat humusowy.

Skład użytej pożywki Pfeffera-Knopa, jest w/g F. H o n c a m p a (10), następujący:

	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	—	1,30 g
	KNO_3	—	0,33 g
	KCl	—	0,16 g
w 1 litrze	KH_2PO_4	—	0,33 g
pożywki	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0,33 g

Do kombinacji z żelazem dodawano 2 krople 2% roztworu chlorku żelazowego na każdy litr pożywki.

Pożywki sporządzone były na wodzie destylowanej z naczyń cynowanych. Wartość pH pożywki przed doświadczeniem ustalono na 5,5 we wszystkich kombinacjach.

Preparaty humusowe dodawane były w stosunku 4 mg suchej substancji preparatu na 1 litr pożywki. Stosowane substancje humusowe były dodawane do pożywki w postaci roztworu. Roztwory preparatów sporządzano przez rozpuszczenie odważonej ilości substancji w określonej objętości 0,05 normalnego NaOH i niezwłoczne zobojętnienie roztworu mianowanym kwasem solnym. Dzięki temu wiadome było stężenie NaCl w roztworach poszczególnych preparatów. Do kombinacji bez humusu, dodawano tyle chlorku sodu, aby stężenie tej soli było jednakowe we wszystkich naczyniach.

Przebieg hodowli roślin.

Nasiona sałaty wykiełkowane w wodzie destylowanej na szalkach Petriego przeniesiono po upływie tygodnia na pożywkę. Rośliny umieszczone zostały po 4 w jednej erlenmajerce poj. 350 ml. Naczynia przed doświadczeniem wymoczono przez tydzień w 10% kwasie siarkowym oraz dokładnie wypłukano. Rośliny tkwiły dosyć swobodnie w wacie, którą zatkana była szyjka erlenmajerki. Zatyeczka z waty zakładana była luźno, bez nacisku, jednak w sposób uniemożliwiający przedostanie się kurzu do wnętrza naczynia. Korzenie były zanurzone w pożywce, jednak część szyjki korzeniowej pozostawiono na powietrzu. Naczynia osłonięto czarnym papierem aby zabezpieczyć pożywkę przed rozwojem glonów. Pożywki w ogóle nie wietrzono.

Ilość powtórzeń dla poszczególnych kombinacji wynosiła 4, ilość powtórzeń kontrolnych — 10.

Naczynia ustawione były losowo w szklarni dobrze wietrzonej. W dni słoneczne szyby zasłanianio pergaminem. W tych warunkach doświadczenie trwało od 18.VI.52 do 14.VIII.52.

Przez pierwszy tydzień wzrost roślin przebiegał dość równomiernie. Następnie zaczęły się zarysowywać coraz wyraźniej różnice we wzroście roślin na pożywkach z żelazem i bez żelaza. W s z ę d z i e t a m, gdzie nie dodano do pożywki żelaza, wystąpiły w różnym nasileniu objawy chlorozy oraz zahamowanie wzrostu pędów i korzeni. Objawy te potęgowały się z upływem czasu. Rozpoczęło się schnięcie niektórych chlorotycznych roślin. Szczególnie silne zahamowania wzrostu obserwowano w naczyniach zawierających frakcje B i D w/g Forsyth'a. Natomiast wszystkie rośliny hodowane na pożywkach z żelazem, zarówno z próchnicą jak i bez niej, robiły wrażenie zdrowych, posiadały liście zielone i jędrne. Dowodziłoby to, że warunki hodowli były odpowiednie dla sałaty.

Pożywkę zmieniono dwukrotnie podczas doświadczenia, zachowując ściśle jej skład.

OBJAŚNIENIA DO TABLICY I.

- * I — pH pożywki przed doświadczeniem.
pH of the nutrient solution before the experiment.
- II — pH pożywki po 20 dniach doświadczenia.
pH of the nutrient solution after 20 days.
- III — Potencjał redukcyjno-oksydacyjny pożywki przed doświadczeniem. (mV).
The redox potential of nutrient solution before the experiment. (mV).
- IV — Potencjał redukcyjno-oksydacyjny pożywki po 20 dniach. (mV).
The redox potential of the nutrient solution after 20 days. (mV).

TABLICA I
Pomiary pH i potencjału redukcyjno-oksydacyjnego
Determinations of pH and redox potential

Torf Peart	Frakcja Fraction	I	II	III	IV
Torf wysoki z Chlebowa Sphagnum peat from Chlebowo	Pełny wyciąg alkohol. bez Fe Full alkohol extr. without Fe	5,5	5,7 — 5,9	530	539 ± 7
"	Pełny wyciąg alkohol. + Fe Full alkohol extr. + Fe	"	5,9	520	538 ± 5
"	A ₁ — Fe	"	4,8	540	571 ± 6
"	A ₁ + Fe	"	5,9	537	533 ± 5
"	B ₁ — Fe	"	5,3	521	535 ± 10
"	B ₁ + Fe	"	5,7	511	543 ± 5
"	C ₁ — Fe	"	5,3	513	566 ± 6
"	C ₁ + Fe	"	5,7	520	533 ± 3
"	D ₁ — Fe	"	5,3 — 5,5	523	551 ± 7
"	D ₁ + Fe	"	6,2	528	508 ± 2
Torf wysoki z Białowieży	A ₂ — Fe	"	5,7	522	545 ± 7
"	A ₂ + Fe	"	5,9	521	543 ± 4
Sphagnum peat from Białowieża	B ₂ — Fe	"	5,3 — 5,5	545	555 ± 7
"	B ₂ + Fe	"	6,1	538	513 ± 4
Torf niski z Białowieży	A ₃ — Fe	"	5,2 — 5,3	531	541 ± 10
"	A ₃ + Fe	"	5,8	503	535 ± 7
Caricetum peat from Białowieża	B ₃ — Fe	"	5,6 — 5,7	488	560 ± 5
"	B ₃ + Fe	"	5,9	480	548 ± 2
Torf niski z Zemborzyc	A ₄ — Fe	"	5,0 — 5,2	523	568 ± 9
"	A ₄ + Fe	"	5,9	520	543 ± 6
Caricetum peat from Zemborzyc	B ₄ — Fe	"	5,7	528	532 ± 10
"	B ₄ + Fe	"	5,8	523	508 ± 9
"	C ₄ — Fe	"	4,8 — 5,1	511	573 ± 8
"	C ₄ + Fe	"	5,8	510	548 ± 5
Wyciąg wodny wg Forsyth'a	B — Fe	"	7,0 — 7,3	441	488 ± 8
"	B + Fe	"	7,1 — 7,2	443	484 ± 10
Fractions prepared after Forsyth	D — Fe	"	7,0	460	487 ± 10
"	D + Fe	"	7,0	453	497 ± 2
Kontrolne bez humusu The control without humus		"	5,0 — 5,7	488	546 ± 10
Pożywka bez Fe, bez humusu		"		491	
Nutrient sol. without Fe and humus					

POMIARY I ANALIZY

Mierzono elektrometrycznie pH i potencjał redoks. Oznaczono suchą masę płonów z poszczególnych naczyń oraz zawartość żelaza w płonie i w pożywce. Pomiaru potencjału redoks były wykonywane przy dostępie powietrza, ale czas i sposób wykonania był jednakowy dla wszystkich pomiarów, które mają wobec tego wartość porównawczą. Wartości pH były zmierzone przy użyciu elektrody szklanej, pehametrem lampowym marki „Polythronics“. Potencjał redoks mierzono między elektrodą platynową a nasyconą elektrodą kalomelową, a następnie przeliczono na odpowiedni potencjał elektrody wodorowej w danej temperaturze. Wszystkich pomiarów nie można było przeliczyć na określony poziom wartości pH, ponieważ nieznana jest zależność między zmianami pH a zmianami potencjału redoks dla roztworu badanych substancji, humusowych (5). Po każdym pomiarze elektroda platynowa była wyżarzona w celu usunięcia zaadsorbowanych substancji, mogących zmienić jej potencjał, zgodnie z uwagami B. Dirksa (5), dotyczącymi pomiarów potencjału redoks próchnicy. Wyniki pomiarów pH i potencjału redoks podane są w tabeli I.

Jak wynika z tej tabeli, dodatek związków żelaza do pożywki zawierającej daną frakcję humusu, powodował w toku doświadczenia spadek wartości pH (w kierunku do 7), w porównaniu do odpowiedniej kombinacji bez żelaza. Zależności tej nie stwierdza się dla frakcji wodnych humusu. Natomiast widać, że frakcje wodne sprzyjały bardziej niż inne procesowi alkalizacji pożywki.

Potencjał redoks pożywek z próchnicą przed doświadczeniem leżał (z wyjątkiem wyciągu wodnego torfu i frakcji $B_3 + Fe$) zawsze powyżej potencjału samej pożywki bez humusu. Nasuwa się tu analogia do wyników B. Dirksa (5), który w badanych przez siebie glebach wykazał obecność słabych utleniaczy.

Po 20 dniach doświadczenia większość kombinacji wykazała wzrost potencjału w granicach od 5 do 67 mV. Ten przyrost nie może być wszędzie wyjaśniony zmianami pH pożywki, które przeważnie były niewspółmiernie małe. Z tabeli I widać jednak, że niektóre kombinacje z próchnicą i żelazem w czasie trwania doświadczenia obniżyły nieco swój potencjał. Towarzyszące tym obniżkom zmiany pH nie pozwalają niestety wnioskować, czy przejawiały się tu własności oksydacyjno-redukcyjne roztworu.

Należy podkreślić, że badane frakcje wodne humusu wybitnie obniżyły potencjał oksydacyjny roztworów przed doświadczeniem i po doświadczeniu. Ta obniżka nie może być wyjaśniona zmianami pH, gdyż pH wszystkich roztworów przed doświadczeniem było równe.

Oznaczenie suchej masy plonu. Plon z poszczególnych naczyn był oddzielnie suszony w temp. 105° do stałej wagi. Obliczano średnią arytmetyczną dla każdej kombinacji. Wyniki z uwzględnieniem rozrzutu podane są w tabeli II. Z tej tabeli widać, że w kombinacjach z różnymi frakcjami próchnicy bez żelaza następowało bądź całkowite uschnięcie wszystkich roślin, bądź bardzo niskie plonowanie w stosunku do kombinacji z żelazem. Wyjątkiem od tego wyniku jest frakcja A_1 , gdzie sucha masa plonu jest tego rzędu wielkości, jaką uzyskano w kombinacjach zawierających żelazo. Wyjaśnienie tego podane jest niżej.

Korzystny wpływ próchnicy w porównaniu z plonem kontrolnym zaznaczył się tylko w kombinacji $B_4 + Fe$. Natomiast na podstawie obserwacji rozwoju systemu korzeniowego można było stwierdzić korzystny wpływ niektórych frakcji próchnicy z dodatkiem żelaza na ten rozwój (patrz rysunek 1), oraz ujemny wpływ innych frakcji.

Wybitnie korzystny wpływ na rozwój systemu korzeniowego miała frakcja $A_1 + Fe$ (Nr 1 na rysunku 1) oraz frakcja $B_4 + Fe$.

Rys. 1.

Wybitnie ujemny wpływ w tym kierunku wykazały frakcje wyciągu wodnego torfu (na rysunku ozn. Nr D); korzenie w tych kombinacjach miały wygląd długiej nitki o krótkich i nielicznych odgałęzieniach.

Oprócz wyżej wspomnianej frakcji A_1 , wszystkie inne kombinacje bez żelaza wykazały słaby rozwój systemu korzeniowego (p. Nr 17 na rys. 1). Porównanie plonu i odpowiedniego potencjału redoks przedstawia diagram.

Rys. 2.

Oznaczenie zawartości żelaza w plonie.

Żelazo oznaczono kolorymetrycznie w suchej masie plonu i w roztworach z poszczególnych naczyń, po uprzednim zagęszczeniu. Stosowano metodę opisaną przez C. S. Pipera (16). Polega ona na spaleniu na mokro suchego materiału roślinnego przy pomocy mieszaniny kwasu azotowego, siarkowego i nadchlorowego. Otrzymany roztwór, odpowiednio przygotowany, zadaje się rodankiem, ekstrahuje alkoholem amylowym, a ekstrakt służy do kolorymetrii. Używano do tego celu fotokolorymetru uniwersalnego Langego, posługując się przy odczycie krzywą kalibracyjną, wykreśloną na podstawie skali wzorcowej.

OBJAŚNIENIA DO TABLICY II.

- * I — Średnia sucha masa w gramach z jednego naczynia — kombinacje bez żelaza.
Average dry matter in grams of one vessel — combinations without iron.
- II — Średnia sucha masa w gramach z jednego naczynia — kombinacje z żelazem.
Average dry matter in grams of one vessel — combinations + iron.
- III — Sucha masa plonu z jednego naczynia kombinacji bez żelaza w % do plonu kontrolnego = 100.
Dry matter of one vessel (combinations without iron) in relation to the control = 100.
- IV — Sucha masa plonu z jednego naczynia kombinacji z żelazem w % do plonu kontrolnego = 100.
Dry matter of one vessel (combinations + iron) in relation to the control = 100.

TABLICA II

Sucha masa plonu. Dry matter.

Torf — Peat	Frakcja Fraction	I	II	III	IV
Torf wysoki z Chlebowa	Pełny wyciąg alkoh. z torfu	$0,024 \pm 0,009$	$0,511 \pm 0,155$	4,2	89,8
Sphagnum peat from Chlebowo	Full alkohol extract				
„	A ₁	$0,170 \pm 0,090$	$0,292 \pm 0,110$	29,8	51,2
„	B ₁	$0,046 \pm 0,011$	$0,320 \pm 0,107$	8,1	56,1
„	C ₁	—	$0,463 \pm 0,124$	—	81,2
„	D ₁	$0,072 \pm 0,027$	$0,285 \pm 0,105$	12,6	50,0
Torf wysoki z Białowieży	A ₂	—	$0,352 \pm 0,150$	—	61,7
Sphagnum peat from Białowieża	B ₂	—	—	—	—
Torf niski z Białowieży	A ₃	$0,056 \pm 0,020$	$0,597 \pm 0,172$	9,8	104,7
Caricetum peat from Białowieża	B ₃	—	$0,309 \pm 0,105$	—	54,2
Torf niski z Zemborzyc	A ₄	—	$0,199 \pm 0,090$	—	34,9
Caricetum peat from Zemborzyce	B ₄	$0,025 \pm 0,011$	$0,729 \pm 0,210$	4,4	127,9
	C ₄	—	$0,312 \pm 0,147$	—	54,7
Wyciąg wodny w/g Forsyth'a	B	$0,021 \pm 0,010$	$0,216 \pm 0,090$	3,7	37,9
Fractions prepared after Forsyth	D	$0,051 \pm 0,012$	$0,204 \pm 0,085$	8,9	35,8
Kontrolne bez humusu			$0,570 \pm 0,132$		100,0
The control without humus					

Kwasy stężone, potrzebne do spalania, redestylowano z aparatury ze szkła Pyrex. Czas i sposób wykonania wszystkich analiz był ściśle jednakowy, co jest warunkiem dokładności wyników w tej metodzie. Spalanie na mokro, chociaż uciążliwe, jest konieczne, gdyż według C. S. Pipera przy spalaniu i prażeniu materiału roślinnego, część związków żelaza może się ulotnić (16).

Analizując całkowity plon z każdego naczynia z roślinami chlorotycznymi (kombinacje „bez żelaza“) znaleziono w nim ilości żelaza wahające się w granicach od 0,02 do 0,048 mg. Znaleziona po likwidacji doświadczenia zawartość żelaza w roztworach odnośnych kombinacji wahała się od 0,0013 do 0,0022 mg w objętości 300 ml. Takie ilości żelaza były znalezione w kombinacjach, do których związków żelaza nie dodawano. Pochodzą one oczywiście z kumulujących się zanieczyszczeń odczynników, użytych do doświadczenia. Ilości te nie zapobiegały jednak wystąpieniu ostrej chlorozy odnośnych roślin. Kombinacja z frakcją A₁ („bez żelaza“), która dała najwyższy plon spośród kombinacji „bez żelaza“ i umożliwiła rozwój bez chlorozy, zawierała 0,08 mg żelaza w plonie jednego naczynia. Była to więc najbardziej zanieczyszczona żelazem kombinacja „bez żelaza“.

W plonie roślin hodowanych z dodatkiem żelaza i frakcji humusowych, zawartość żelaza w stosunku na 1 naczynie, wynosiła od 0,17 do 0,66 mg. W odnośnych pożywkach stwierdzono jakościowo duży nadmiar niezużytego przez rośliny żelaza. Rośliny te we wszystkich kombinacjach miały normalnie zielone liście.

Reasumując wyniki analizy na zawartość żelaza, należy stwierdzić, że kombinacje z frakcjami humusu „bez żelaza“, cierpiały z wyjątkiem jednej, na ostrą chlorozę przy ogólnie im dostępnej ilości żelaza, wahającej się od 0,0213 do 0,0502 mg w jednym naczyniu.

Kombinacje z tymi samymi frakcjami humusu w pożywce, ale dysponujące normalną ilością żelaza, przewidzianą dla pożywki Pfeffer-Knopa, nie miały ani jednego wypadku chlorozy.

WNIOSKI

- 1) Użyte w doświadczeniu frakcje humusu nie mogą zastąpić niezbędnej dla normalnego wzrostu sałaty w kulturze wodnej ilości żelaza.
- 2) Użyte frakcje alkoholowe humusu nie stymulują wzrostu sałaty w kulturze wodnej w podanych warunkach (za wyjątkiem dwóch). Frakcja A₁ + Fe i frakcja B₄ + Fe wydatnie stymulowały rozgałęzienie systemu korzeniowego sałaty.
- 3) Użyte frakcje wodnego wyciągu z torfu hamowały wybitnie wzrost pędów i korzeni sałaty w podanych warunkach, co wyraziło się w niskim plonie tych kombinacji.

Wymienione frakcje wyciągu wodnego obniżały znacznie potencjał redukcyjno-oksydacyjny odnośnych roztworów w porównaniu z roztworem kontrolnym. Nasuwa się przypuszczenie, że niski potencjał pożywki w tych kombinacjach może być jednym z czynników obniżających plon.

4) Opisane frakcje alkoholowego wyciągu próchnicy mają zdolność zmieniania potencjału redukcyjno-oksydacyjnego pożywki w różnym stopniu. Korelacji między suchą masą plonu z danej kombinacji a potencjałem redukcyjno-oksydacyjnym badanej pożywki nie stwierdzono.

UZUPEŁNIENIE

W związku z dyskusją o działaniu próchnicy w warunkach beztlenowych, przeprowadzoną z Prof. Dr Gumińskim na Zjeździe PTB w Białymstoku w r. 1953, przytaczam poniżej wyniki tymczasowe nieukończonych jeszcze doświadczeń odnośnie tego problemu.

Roślina doświadczalna — sałata w kulturze wodnej.

Zródło próchnicy — preparaty kwasów humusowych i kwasów hymatomelanowych z torfu niskiego, w dawkach 40 mg na 1 litr. Czas doświadczenia 32 dni. Ilość powtórzeń 6.

Wyniki:

I Kombinacja — Pożywka z próchnicą w warunkach beztlenowych (wygotowanie wody, odcięcie od powietrza przez warstwę parafiny płynnej, nalanej na powierzchnię pożywki po zanurzeniu korzeni)

Sucha masa pędów 0,221 g
Objętość korzeni 2,0 ml

II Kombinacja — Pożywka bez próchnicy w warunkach beztlenowych, utrzymanych jak w kombinacji I.

Sucha masa pędów 0,255 g
Objętość korzeni 0,8 ml

III Kombinacja — Pożywka bez próchnicy — wietrzona.

Sucha masa pędów 5,852 g.
Objętość korzeni 15,3 ml

IV Kombinacja. — Pożywka bez próchnicy, niewietrzona, posiadająca dostęp tlenu do powierzchni.

Sucha masa pędów 1,674 g.
Objętość -korzeni 8,4 ml.

V Kombinacja. — Pożywka z próchnicą, niewietrzona, posiadająca dostęp tlenu do powierzchni.

Sucha masa pędów 1,284 g.
Objętość korzeni 7,0 ml.

Wyniki prób z kilku innymi preparatami humusowymi były bardzo podobne.

Wydaje mi się zatem, że stosowane preparaty humusowe w opisanych warunkach nie mogą zastąpić wietrzenia wodnych kultur sałaty, względnie swobodnego dostępu powietrza do powierzchni pożywki.

Pełną publikację odnośnych danych przewiduje się po zakończeniu doświadczeń w przyszłym sezonie.

SUMMARY

On the basis of the literature quoted one can observe that various directions of researches have been adopted for elucidating the biological activity of the humus in relation to plant life.

Numerous investigators (4, 14, 17, 11, 8, 1) detect in the humus the presence of agents able of stimulating growth. Another group (5, 24, 9, 7, 20, 23) attributes this influence to some physico-chemical properties, characteristic of the humus (e. g. the redox potential) and consider those as the chief agents of plant development.

Some authors (12, 3, 13, 15) explain the positive influence exerted upon the crops by the capacity of the humus of facilitating the uptake of mineral salts by plants. The last assumption allows supposing that the biologic activity in the humus is related to a number of substances present in it. The content of these substances, as used by particular investigators proved to be casual, because the actual methods do not permit to obtain them in a state unaltered and chemically pure.

Preliminary attempts to elaborate a suitable method were carried out in the following studies:

by W. A. C. Forsyth (6) and by J. Trojanowski (21).

The method of Forsyth makes it possible to separate the hydrous extract of the humus into several fractions by means of adsorption on active coal. Trojanowski's method allows to isolate the substances present in an alcoholic humus extraction by means of chromatographic column filled with magnesium oxide.

The purpose of experiments described in the present paper was to study the biologic activity of some fractions isolated by means of both methods.

For experimental plant was used a salad grown in water and the Pfeffer-Knop nutritive solution. Following humus fractions were used:

- 1) from an aqueous extraction of a low (Caricetum) peat from Zemborzyce — fractions B and C (Forsyth's denominations),
- 2) from four different peats treated with alcoholic solutions — fractions separated by Trojanowski's method and determined as follows:

1) Peat I — high (Sphagnum-moss) peat from Chlebów

Fraction A₁ eluated from the first chromatogramm layer (first from the Fraction B₁ top)

Fraction C₁ eluated from the second chromatogramm layer

Fraction D₁

Entire alcoholic extraction of Peat I.

2) Peat II — high (Sphagnum-moss) peat from Białowieża

Fraction A₂ eluated from the first chromatogrammm layer

Fraction B₂ eluated from the second chromatogrammm layer

3) Peat III — low (Caricetum) peat from Białowieża

Fraction A₃ eluated from the first chromatogrammm layer

Fraction B₃ eluated from the second chromatogrammm layer

4) Peat IV — low (Caricetum) peat from Zemborzyce

Fraction A₄ eluated from the first chromatogrammm layer

Fraction B₄ eluated from the second chromatogrammm layer

Fraction C₄ alcoholic extraction of a humus preparation obtained according to K. Simon (18).

A detailed description of the chromatographic isolation of the fractions quoted above has been published formerly (21).

Separate fractions were purified by electrodialysis and next dried under low pressure in the nitrogen atmosphere. During the treatment the value of pH was maintained in the limits from 6,7 to 2,0.

To the nutritive solutions were given an addition of humic preparations which amounted to 4 mg per 1 litre. The original pH value was estimated as 5,5.

Following three combinations were used in trials:

- 1) full rate of nutrient
- 2) full rate of nutrient + humic preparation
- 3) nutrient without Fe + humic preparation.

The plants had their root system buried in the solution. No aeration of the nutrient solution was given during the treatment. The nutrients were changed twice. The trials lasted from the 18th June till the 15th, August 1952.

Results of the pH and redox potential measurements, determinations of the dry matter are shown in Tables I and II.

In separate vessels and in residue solutions left after the trial the contents of iron were determined.

Combinations of humic fractions which were devoid of iron resulted in a severe chlorosis of the plants. This occurred under conditions of a total quantity of Fe from 0,0213 to 0,0502 per 1 vessel of 300 ml of content, which quantities were due to unsufficiently pure reagents.

In experiments with the same humic fractions when their content of iron was such as usually in Pfeffer-Knop nutrients — no chlorosis has been observed.

Individual humic fractions influenced highly the development of roots; this is presented on fig 1.

Conclusions

1) The humic fraction as used in the described trials cannot compensate for the lack of required Fe, at least as far a salad grown under the above mentioned conditions is concerned.

2) All but two alcoholic humic fractions used during the experiments did not stimulate the growth of plants under the conditions described. Fraction $A_1 + Fe$ and fraction $B_4 + Fe$ stimulated obviously the root development of the plant.

3) The fractions extracted from peat by treatments with water checked visibly the growth of stems and roots under the conditions described consequently in these combinations and the salad crop was low.

The said fraction produced by a hydrous peat extraction reduced highly the redox potential in respective solutions when compared with the control solution. One can suppose that in these combinations the low potential in nutrients may be one of the yield reducing agents.

4) The described fractions extracted by treating humus with alcohol show the capacity of changing the redox potential in nutrients in various degrees. No correlation between the redox potential in nutrients and the dry matter yield in a given combination has been stated.

LITERATURA

1. Biber W. A., Bogoliubow N. S., Doklady Akad. Nauk ZSRR. 1951, 76, 2.
2. Biber W. A., Doklady Akad. Nauk ZSRR, 1952, 83, 1.
3. Błagowieszczenski A. W., Proserowskaja A. A., Bioch. Zeitschr. 1934.
4. Bottomley W. B., Ann. of Botany, 1920, 34.
5. Dirks B., Zeitschr. Bodenkunde u. Pfl.-ern., 1940, 21/22.
6. Forsyth W. A. C., Bioch. Journal, 1947, 47.
7. Geller J. A., Poczwowiedienije, 1952, 10, 921.
8. Gumiński S., Acta Soc. Bot. Pol., 1947, 18.
9. Gumiński S., Acta Soc. Bot. Pol., 1950, 20.
10. Honcamp F., „Handbuch d. Pfl.-ern. u. Düngelehre“, Berlin, 1931.
11. Kuthy A., Pecznik J., Bodenk. u. Pfl.-ern., 1941, 23.
12. Lieske R., Zeitschr. f. angew. Chemie, 1932.
13. Niklewski B., Bioch. Zeitschr., 1934, 271.
14. Niklewski B., Duda J., Bioch. Zeitschr., 1936, 286.
15. Niklewski B., Wojciechowski J., Acta Soc. Bot. Pol., 1938, XV.
16. Piper C. S., „Soil a. Plant Analysis“. 1950, s. 340.
17. Pringsheim E. G., Beih. z. Bot. Centralbl., 1936, 55.
18. Simon K., Zeitschr. f. Pfl.-ern., 1929, 14.
19. Terlikowski F., Byczkowski, Roczniki Nauk Roln. i Leśn., 1938, 45.
20. Tjulín A. F., Małomachowa T. A., Poczwowiedienije, 1952, 6.
21. Trojanowski J., Annales Univ. M. C. Skłodowska, 1952, VI, 9, sec. C.
22. Uspenski E. E., Pfl.-forsch., 1927, 9.
23. Williams W., „Gleboznawstwo“, wyd. polskie z r. 1950.
24. Wojciechowski J., Rozprawy Pol. Akad. Umiej. 1948, 73, dz. B.