O mechanizmie „stymulującego” wpływu humianu sodu na proces fermentacji alkoholowej i rozmnażanie drożdży*

On the mechanism of the “stimulating” influence of Na-humate upon the process of alcoholic fermentation and multiplication of yeasts

L. BADURA

WSTĘP

Związki huminowe i ich oddziaływanie na procesy fizjologiczne u roślin były punktem zainteresowania wielu badaczy. Autorzy ci w zależności od stężenia, warunków doświadczenia i użytej frakcji, wykazywali wieloraki wpływ tych związków na rośliny i budowali różne hipotezy. Hipotezy te ugrupować można w następującej kolejności:

Próchnica jako dawca podstawowych składników pokarmowych.

Po stwierdzeniu przez Krzemieniowskiego (1907, 1909), że humian sodu wywiera dodatni wpływ na intensywność wiązania azotu przez *Azotobacter chroococcum*, Krzemieniowska (1910) wykazała, że efektu tego nie można wiązać z dostarczaniem podstawowych mineralnych składników odżywczych. Podobne stanowisko zajęli Pringsheim (1935, 1936), badający wpływ próchnicy na rozwój wiciowców, Niklewski i Wojciechowski (1947) oraz Prat et al. (1957) przeprowadzający doświadczenia na roślinach wyższych. Jak wykazały badania v. Reinitzera (1900), Nikityńskiego (1902), Krzemieniowskiej i Badury (1954), Flaiga i Schmidta (1957) oraz innych, związki huminowe nie mogą służyć jako źródło węgla, a tylko w bardzo nieznacznym stopniu jako źródło azotu, pomimo że w hydrolizatach tych związków znajdowano peptydy i aminokwasy (Waksman i Iyer 1943, Pavel et al. 1954, Bremner 1955, 1957, Łoginow 1962).

Dalsze doświadczenia (Kaserer 1910; Bortels 1930, 1939, 1941; Burk et al. 1932; Bassalik i Neugebauer 1931, 1933; Krzemieniowski i Kovats 1936; Kovats 1938; Wojciechowski 1948; Kostecka 1950) wyjaśniły, że humiany jakkolwiek nie dostarczają niezbędnych makroelementów, to mogą być dawcami mikroelementów zwłaszcza Mo, Mn i ultraelementów, gdy te znajdują się w danych warunkach doświadczalnych w deficycie. Równno-

* Praca ta była częściowo finansowana przez Komitet Botaniczny PAN.

częściej z wpływem mikroelementów zawartych w związkach huminowych, wiele poprzednio cytowanych autorów zajmowało się układem próchnica — żelazo przypisując temu układowi dużą rolę w tym stymulującym działaniu.

Związki huminowe jako układy kompleksowe.

Na podstawie owych prac nasunęło się przypuszczenie, że nie tyle odgrywa tu rolę sama obecność w związkach huminowych żelaza i mikroelementów, lecz że pierwiastki te wchodzi w połączenia kompleksowe i jako takie łatwiej są przyswajalne przez organizm roślinny. Problem ten próbował wyjaśnić de Kock (1955) i doszedł do przekonania, iż efekt działania humianów jest podobny do działania typowego chelatu EDTA (kwasu etylenodwuaminoctero-octowego). Obie te substancje przyspieszają pobieranie żelaza przez korzenie. Prace Gumińskich et al. (1962, 1965) wykazały natomiast, że działanie humianu sodowego można zastąpić w kulturach wodnych niewietrzonych nieznacznym dodatkiem (50 mg/l pożywki) EDTA. Bliżej tym problemem zajmował się Czerwiński (1965) i stwierdził, że zarówno EDTA, jak i humian stabilizują w roztworze żelazo i ułatwiają jego przyswajanie przez rośliny.

Związki huminowe nie tylko mogą stymulować pobieranie kationów żelazowych, lecz i innych jonów. W ostatnich latach dużo pisze się o wpływie na rośliny związków fosfohuminowych (Chaminade 1951; Dalton et al. 1952; Wojciechowski et al. 1955; Szymański 1962).

Bodźcowy wpływ związków huminowych na protoplazmę.

Z jednej strony związki huminowe tworzące kompleksowe połączenia z jonami, przypuszczalnie mogą z innymi naturalnymi składnikami komórkowymi o właściwościach chelatowych stanowić układy jonowymienne, z drugiej strony, być może, wpływają bodźcowo na protoplazmę i zwiększają jej przepuszczalność dla jonów (Błagowieszczenskiej i Prosorowska 1934, 1935; Niklewski i Wojciechowski 1938, 1947; Wojciechowski i Kuźdowicz 1939; Duda 1947; Dalton et al. 1952). Eksperymentalnie wykazywali takie zwiększanie się przepuszczalności protoplazmy pod wpływem związków huminowych Błagowieszczenskiej i Prosorowska (1934, 1935), a ostatnio Rypáček (1962). Badacze nie są jednak zgodni, czy ten wpływ jest wynikiem natury koloidowej tych związków, czy też są w nich zawarte jakieś ciała czynne działające na komórkę.

Wpływ koloidów na rośliny.

Już stosunkowo wcześniej Prażmowski (1912) wiązał działanie związków próchnicznych nie tyle z zawartością mikroelementów i żelaza,

lecz z ich naturą koloidową. Stanowisko to w następnych latach poparły liczne prace (Niklewski et al. 1929, 1933, 1939, 1947; Pastewski 1933; Rippel 1936; Duda 1947), z których wynika, że nie tylko koloid organiczny, jakim jest sam humian, lecz i inne koloidy jak agar, skrobia, metawodorotlenek żelaza, hydrozol kwasu krzemowego, a więc związki syntetyczne nie zawierające w naszym rozumieniu ciał czynnych, mogą w pewnych warunkach doświadczalnych działać mniej lub bardziej dodatnio na przyrost suchej masy, rozwój korzeni, pobieranie soli mineralnych etc.

Stymulatory wzrostu (hormony, witaminy, enzymy) w huminach.

Inni tłumaczą ten wpływ związków huminowych obecnością w nich pewnych stymulatorów typu witaminowego lub auksynowego.

W tym duchu interpretował swe wyniki Bottomley (1915, 1917), przyjmując istnienie takich ciał i nadając im nazwę auksymony, a Bassalik i Neugebauer (1931, 1933) nazywali te hipotetyczne związki auksaninami. Również Hilitzer (1932), Pringsheim (1935, 1936), Niklewski et al. (1937), v. Kuthy i Pecznik (1941), Biber i Bogoljubowa (1951), Trojanowski (1954) stwierdzają, że związki huminowe mogą wywierać efekt analogiczny do działania hormonów wzrostu.

Allison i Hoover (1936 wg Flaiga i Schmidta 1957) wysunęli pogląd, iż związki huminowe zawierają enzymy, a Kudrina (1951) przypuszcza, że w próchnicy obecne są witaminy.

Na obecność kwasu β -indolooctowego (IAA) w torfie już wcześniej zwracali uwagę Niklewski i Duda (1936). Jednak dopiero Nig-geman (1955) wyizolował ten kwas z torfu. W hydrolizatach kwasów huminowych znaleźli natomiast pochodne indolu Flaig i Breyhan (1956). Nic więc dziwnego, że Paszewski et al. (1957) mogli stwierdzić, iż niektóre frakcje związków huminowych dają efekty typowe dla kwasu indolooctowego. Ponadto w glebie znajdowane są pewne witaminy z grupy B (Balicka i Trzebiński, 1956). Wodne wyciągi gleb mogą więc wywierać działanie typowo witaminowe.

Wpływ związków huminowych na sorpcję wydzielin korzeniowych.

Na możliwość wylapywania przez związki huminowe szkodliwych reszt kwasowych, względnie zasadowych, powstałych po nierównomiernym pobieraniu jonów, zwracali już uwagę Hiltner i Gertner (1913). Natomiast Hiltner (1926) tłumaczył wpływ związków huminowych wyrównywaniem niekorzystnych stosunków jonowych oraz wychwytywaniem toksycznie działających na roślinę wydzielin korzeniowych. Wanner i Schmucki (1950) wykazywali, że wydzieliny korzeniowe działają hamująco na rośliny, a niwelowanie, w pewnym stopniu, przez humiany takiego trującego działania, wydzielanych przez

korzenie produktów metabolizmu, stwierdził Gumiński et al. (1962, 1965).

Związki huminowe jako układy oksydo-redukcyjne.

Badania nad oksydo-redukcyjnymi właściwościami humianów, zwłaszcza w ostatnich latach, znacznie się rozszerzyły, co wiąże się niewątpliwie z dokładniejszym poznaniem chemicznej ich struktury i wykazaniu chinonowej budowy ich podstawowych elementów (Flaig 1962, Dragunow 1962). Humiany jako układy oksydo-redukcyjne traktowali Gumiński et al. (1953, 1955, 1957), Christiewa (1953), Flaig i Saalbach (1956), Gumińska (1958), Šmidova (1960, 1962) i inni.

Sorpcyjna i strukturotwórcza funkcja związków huminowych.

Liczna grupa badaczy sprowadza działanie związków huminowych do właściwości sorpcyjnych i strukturotwórczych (Terlikowski i Byczkowski 1938; Williams 1950; Górski 1956). W związku z sorpcyjnymi właściwościami koloidów próchnicznych interesującą myśl wypowiedział Uspenski (1927). Mianowicie dodatni wpływ substancji organicznej w zbiornikach wodnych tłumaczył wiązaniem przez te związki nadmiar jonów Fe^{+++} działających toksycznie na glony.

CEL PRACY

Z faktu istnienia tylu możliwych sposobów tłumaczenia tego obserwowanego wpływu związków huminowych na rośliny wynika, że na pytanie, jaki jest istotny mechanizm działania tych związków w konkretnym przypadku można znaleźć odpowiedź tylko przez przeanalizowanie wszystkich istniejących hipotez.

Celem tej pracy było więc znalezienie na drodze doświadczalnej odpowiedzi na pytanie, jaki jest mechanizm stymulującego działania związków huminowych w procesie fermentacji alkoholowej. Doświadczenia Dzierzbickiego (1909) wykazały bowiem, iż związki próchnicze wyraźnie stymulują wydzielanie CO_2 w procesie fermentacji, a Gumińscy (1953) oraz Schönwälder (1958) stwierdzili, że związki te przyspieszają podziały komórkowe drożdży.

OGÓLNA METODYKA

Wpływ humianu sodu w doświadczeniach Dzierzbickiego (1909) na przebieg fermentacji alkoholowej objawiał się czterokrotnie intensywniejszym wydzielaniem CO_2 . W związku z taką wyraźną sty-

mulacją wybrano po wstępnym określeniu błędu doświadczenia mniej precyzyjną, ale wygodniejszą i szybszą metodę grawimetryczną (R o n a 1931).

Doświadczenia prowadzono w 5 powtórzeniach dla każdej kombinacji w 200 ml kolbach erlenmajerowskich zamykanych wentylem typu Bunzena, umożliwiającym jednostronną wymianę gazową. Każda kolbka zawierała 100 ml pożywki. Szybkość fermentacji określano metodą wagową, oznaczając ilość wydzielonego CO_2 z ubytku masy kolbki fermentacyjnej. Ze średnich dobowych ilości wydzielanego CO_2 wykreślano krzywe. Większość doświadczeń była dwukrotnie powtarzana.

Do określenia ilości komórek drożdży posługiwano się metodą liczenia (Lilly i Barnett 1959) w komorze Fuchs-Rosenthala. Z każdej doświadczalnej kolbki, po wytrząśnięciu płynu fermentacyjnego z perełkami szklanymi w celu rozbicia kolonii, sporządzano w 3 powtórzeniach 200-krotne rozcieńczenia i liczono ilość komórek w całej objętości komory. Z wyników pomnożonych przez współczynnik objętości komory i rozcieńczenia obliczano ilość komórek w 1 ml pożywki dla każdej kombinacji.

Alkohol etylowy oznaczano po oddestylowaniu przy pomocy metody piknometrycznej Białozierski i Proskuriakow 1954).

Jako substratu fermentacyjnego używano w zasadzie pożywki Dzierzbickiego o składzie: sacharoza — 100 g, asparagina — 1,5 g, KCl — 1,0 g, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ — 2,0 g, MgSO_4 — 0,2 g, H_2O dest. — 1000 ml, plus 1 ml mikroelementów A—Z Hoaglanda uzupełnionych Mo, plus 2 krople 5% FeCl_3 , oraz w pewnych doświadczeniach pożywki syntetycznej G o składzie: sacharoza — 100 g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 6 g, MgSO_4 — 0,5 g, NaCl — 0,1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0 g, KH_2PO_4 — 1,0 g, CaCl_2 b.w. — 0,1 g, H_2O dest. — 1000 ml, plus FeCl_3 — 0,2 mg, plus mikroelementy, których pełny zestaw podany jest w pracy Galzy i Słominski (1957). Ponadto w niektórych doświadczeniach stosowano pożywkę słodową o stężeniu 9° Blg, pożywkę syntetyczną Dzierzbickiego z dodatkiem witamin w mg/l: tiaminy chlorowodorek — 4, m-inozytol — 4, kwas nikotynowy — 1, kwas pantotenowy — 4, pirydoksyna — 4, biotyna — 0,08 (tzw. grupa B), ryboflawina — 8, kwas askorbinowy — 20, względnie z dodatkiem autolizatu drożdżowego (sporządzonego wg v. H u d s o n a, R o n a 1931), w ilości 0,5 g s.m. na 100 ml pożywki.

pH pożywek stabilizowano, z wyjątkiem specjalnych doświadczeń o różnym pH, na poziomie 6,5 przy pomocy NaOH . Dobór tego stosunkowo jak dla drożdży wysokiego pH (H a e h n 1960) wynikał z konieczności utrzymania w pożywce humianu sodu w stanie nie wytrąconym, co obserwowano się przy niższym pH w doświadczeniach wstępnych.

Pożywki sterylizowano w autoklawie w ciągu 20 minut przy nad-

ciśnieniu 1 atm., a w wypadku glikozy i brzezki w aparacie Kocha w ciągu 3 dni po 30 minut.

Do doświadczeń używano drożdży gorzelnianych rasy D 43 i w jednym wypadku drożdży małych „petite“ szczepu 59 PRL (15). Pożywki infekowano (1 ml) zawiesiną jednowiekowych drożdży. Hodowle prowadzono w termostacie w temp. 27°C.

Do doświadczeń używano związków huminowych (frakcje kwasów hymetamelanowych i huminowych łącznie) otrzymanych z kompostu wg metody, podanej w pracy Gumińskiego (1950). Syntetyczne humuso-podobne związki (Eller 1920, 1922) uzyskiwano z utlenienia w środowisku alkalicznym p-benzochinonu, wytrąceniu polimerów HCl-em i ponownym rozpuszczeniu w lekko zalkalizowanej wodzie odwirowanego osadu. Początkowo do wytrącania osadu używano HCl, w dalszej pracy okazało się jednak, że powtarzalne wyniki uzyskiwano dopiero po zastosowaniu kwasu siarkowego do wytrącania osadu.

Należy podkreślić, że decydujące znaczenie przy otrzymywaniu aktywnych preparatów ma dokładne przemycie osadu z resztek nie spolimeryzowanych cząsteczek p-benzochinonu i nadmiaru NaCl w wypadku wytrącania osadu kwasem solnym i Na_2SO_4 w wypadku używania do tego celu kwasu siarkowego.

W pewnych doświadczeniach stosowano również „humian“ otrzymany ze skarmelizowanej glikozy (Hewitt 1952).

Stosowane w doświadczeniach związki huminowe preparowano w formie soli sodowej, a sporządzone roztwory zgodnie z zaleceniami Gumińskich (1953) autoklawowano w ciągu 1 godziny przy nadciśnieniu 1 atm. Następnie określano ich stężenie na podstawie zawartości s.m. (sucha masa) w jednostce objętości.

Popiół z humianu sodu do doświadczeń otrzymywano przez spalenie w temperaturze 550°C humianu. Następnie rozpuszczano otrzymany popiół w niewielkiej ilości HCl. Po całkowitym rozpuszczeniu się osadu roztwór zobojętniano i rozcieńczano wodą do stężenia takiego, w jakim znajdowały się te sole w tych związkach przed spopieleniem.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

Dzierzbicki (1909) w swych badaniach nad wpływem związków huminowych na przebieg fermentacji alkoholowej u drożdży używał stosunkowo wysokiego stężenia wynoszącego 100 mg s.m. humianu na 100 ml pożywki. Ponieważ taka wysoka koncentracja jest już dla wielu mikroorganizmów szkodliwa (Gumiński 1947, Christiewa 1962), należało przede wszystkim przeprowadzić doświadczenia porównawcze, aby określić optymalnie działające w danych warunkach doświadczalnych, stężenie humianu sodu.

W tym celu przebadano wpływ następujących stężeń: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 ‰ humianu sodu. Doświadczenie przerwano po 5 dniach, a wyniki przedstawiono na wykresie 1. Z wykresu odczytać można, że optymalnie działające stężenie humianu wynosi 0,1‰. Wysokość tej optymalnej koncentracji jest taka sama, z jaką pracował Dzierzbicki (1909).

Następne doświadczenie miało na celu prześledzenie szybkości przebiegu fermentacji alkoholowej pod wpływem uprzednio określonego stężenia humianu sodu. Kolbki fermentacyjne ważono więc co 24 godziny, a ze średnich ubytków wydzielonego CO_2 wykresowano krzywą (wykres 2). Aby określić różnice w ilości komórek, założono to doświadczenie w takiej

Wykres 1. Wpływ różnych stężeń Na-humianu na ilość wydzielonego CO_2 po 5 dniach fermentacji

Diagram 1. The influence of different concentrations of Na-humate on CO_2 liberated, after 5 days' fermentation.

Wykres 2. Wpływ Na-humianu na szybkość fermentacji. 1 — kontrola; 2 — Na-humian

Diagram 2. The influence of Na-humate on the fermentation. 1 — control; 2 — Na-humate.

ilości powtórzeń, że można było likwidować co 24 godziny po 5 kolbek i w nich obliczać ilość komórek. Wyniki takiego 72-godzinnego doświadczenia zestawiono w tabeli 1. Przy sposobności przeprowadzono pomiary zmian pH zachodzących w trakcie fermentacji i oznaczano ilość zużytego n/10 NaOH potrzebnego do zobojętnienia powstałego zakwaszenia (wykres 3 i 4). Z wykresu 2 i tabeli 1 wynika, że humian sodowy wyraźnie stymuluje rozmnażanie się komórek drożdży, tak jak to wcześniej obser-

wowali Gumiński (1953), i wydzielanie CO_2 , jak wynikało z doświadczeń Dzierzbickiego.

Wykres 3 świadczący o większym spadku pH w pożywce z humianem jest interesujący z tego względu, że, jak wiadomo, w środowisku kwaśnym (pH c. 4,0) następuje rozkład węglanów i całkowite uwolnienie CO_2 . Jest to o tyle ważne, że pożywka z humianem o początkowym pH 6,5 wiązała w doświadczeniach w tym celu przeprowadzanych do 200 mg CO_2 .

Wykres 3. Zmiany pH pożywki w trakcie fermentacji. 1 — kontrola; 2 — Na-humian

Diagram 3. Changes in the medium pH in the course of fermentation. 1 — control; 2 — Na-humate.

Wykres 4. Ilość ml n/10 NaOH zużytych do doprowadzenia pożywki do pH wyjściowego

Diagram 4. Quantity of n/10 NaOH ml used for adjusting the medium to the initial pH.

1 — control; 2 — Na-humate.

Ten fakt wiązania przez związki huminowe przy pewnych wartościach stężenia jonów wodorowych, wydzielanego CO_2 tłumaczy, dlaczego nie stwierdza się w pierwszym dniu doświadczenia (24 godz.) stymulującego działania tych związków, mimo że w liczbie komórek (tabela 1) zaznaczają się duże różnice. W następnych dniach dzięki obniżeniu pH w trakcie fermentacji początkowo związane w pożywce CO_2 jest uwalniane i wyparte z pożywki.

T a b e l a 1 - T a b l e 1

Liczba komórek drożdży w 1 ml pożywki w tysiącach
Number of yeast cells in 1 ml medium in thousands

Po godzinach After hours	Kontrola Control	Na-humian w stężeniu 0,1% Na-humate in 0,1% concentration
24	9 250	19 625
48	12 750	36 875
72	25 562	65 187

W świetle tych obserwacji nasuwa się pytanie, jaka jest istotna przyczyna tej silnej stymulacji? Czy humian sodowy stwarza korzystniejsze warunki siedliskowe, czy też jest czynnikiem przyspieszającym ogólny metabolizm przez zmianę systemu oddechowego?

Wpływ pierwiastków śladowych

To, że humian nie jest źródłem podstawowych składników mineralnych, wiadomo z doświadczeń cytowanych we wstępie autorów. Inne zagadnienie to występowanie w związkach huminowych mikroelementów i żelaza. Dużą również uwagę zwracano na odpowiednie proporcje tych pierwiastków (Bortels 1930, Krzemieniewski i Kovats 1936, Wojciechowski 1948, Kostecka 1950 i inni).

W celu stwierdzenia, jaki w danych warunkach doświadczalnych mogą mieć wpływ mikroelementy na przebieg fermentacji i czy pierwiastki

Wykres 5. Wpływ mikroelementów (A—Z) i Na-humianu na fermentację.

1 — kontrola; 2 — +mikroelementy; 3 — Na-humian; 4 — +mikroelementy

Diagram 5. Influence of microelements (A—Z) and Na-humate on the fermentation.
1 — control; 2 — +microelements; 3 — Na-humate; 4 — +microelements.

Wykres 6. Wpływ Fe i Na-humianu na fermentację.

1 — kontrola; 2 — +FeCl₃ (ślady); 3 — Na-humian; 4 — +FeCl₃

Diagram 6. Influence of Fe and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +FeCl₃ (trace); 3 — Na-humate; 4 — +FeCl₃.

te zniwelują to stymulujące działanie humianu sodu, założono doświadczenie w wersji: pożywka Dzierzbickiego bez humianu, —mikroelementy i +mikroelementy (A—Z Hoaglanda) oraz pożywka z humianem, —mikroelementy i +mikroelementy. Wyniki zestawiono na wykresie 5.

Następne doświadczenie przeprowadzono w układzie: pożywka jw. bez humianu, —Fe i +Fe (ślady FeCl_3) oraz pożywka z humianem, —Fe i +Fe (wykres 6).

Trzecie doświadczenie z tej serii przeprowadzono w następującej kombinacji: pożywka jak poprzednio bez humianu, —mikroelementy, —Fe i +mikroelementy, +Fe (mikroelementy i Fe w tym doświadczeniu jak w pożywce G) oraz pożywka z humianem, —mikroelementy, —Fe i +mikroelementy i +Fe. W tym doświadczeniu użyto nieco innych mikroelementów i innego stężenia Fe, gdyż mogła nasunąć się obawa, czy skład i stężenie poprzednio użytych soli są odpowiednie dla drożdży. Wyniki tego doświadczenia zestawiono na wykresie 7.

Wreszcie czwarte doświadczenie założono w ten sposób, że do pożywki G zawierającej już mikroelementy i żelazo dodawano dodatkowo

Wykres 7. Wpływ mikroelementów (G) i Fe na proces fermentacji

1 — kontrola; 2 — +mikroelementy +Fe; 3 — Na-humian; 4 — +mikroelementy +Fe

Diagram 7. Influence of the microelements (G), and Fe on the fermentation.

1 — control; 2 — +microelem. +Fe; 3 — Na-humate; 4 — +microelem. +Fe.

drugą porcję mikroelementów (A—Z), lub żelaza (ślady FeCl_3), lub też obu składników łącznie. Układ tego doświadczenia był więc następujący:

1. Pożywka G z mikroelementami i Fe
2. Pożywka G z mikroelementami i Fe + Fe (dodatkowo)
3. Pożywka G z mikroelementami i Fe + mikroelementy
4. Pożywka G z mikroelementami i Fe + Fe, + mikroelementy

Druga seria posiadała ten sam układ, lecz dodawany był jeszcze humian sodu. W doświadczeniu tym między innymi chodziło o to, czy sam skład pożywki Dzierzbickiego nie jest nieodpowiedni i czy na innej pożywce uzyska się ten sam efekt. Otrzymane wyniki ilustruje wykres 8.

We wszystkich tych doświadczeniach w serii kontrolnej zarówno z mikroelementami oraz z żelazem, jak i z obu składnikami łącznie wydzielanie CO_2 okazało się znacznie niższe niż w serii z humianem. Co więcej nie można było stwierdzić dodatniego wpływu tych pierwiastków

na proces fermentacji, co świadczy o tym, że sama pożywka już jest dostatecznie nimi zanieczyszczona i zawiera dostateczną dla drożdży ich ilość.

Te cztery doświadczenia dowodzą w sposób jednoznaczny, że w danych warunkach doświadczalnych przebadany komplet i stężenie mikroelementów i Fe nie odgrywa żadnej istotnej roli i obecnością tych pierwiastków nie można wytłumaczyć stymulującego działania związków huminowych.

Nasunęło się więc pytanie, czy używany w doświadczeniach humian sodu nie zawiera w sobie jakichś pierwiastków, lub ich odpowiednich

Wykres 8. Wpływ mikroelementów, Fe oraz mikroelementów łącznie z Fe na fermentację

1 — kontrola; 2 — +Fe; 3 — +mikroelem.; 4 — +mikroelem. + Fe; 5 — Na-humian; 6 — +Fe; 7 — +mikroelem.; 8 — +mikroelem. + Fe.

Diagram 8. Influence of the microelements and Fe on the fermentation.

1 — control; 2 — +Fe; 3 — microelem.; 4 — microelem. + Fe; 5 — Na-humate; 6 — +Fe; 7 — +microelem.; 8 — +microelem. + Fe.

Wykres 9. Wpływ popiołu otrzymanego ze spalania humianu sodu na fermentację

1 — kontrola; 2 — +popiół; 3 — Na-humian; 4 — +popiół

Diagram 9. Influence of the ash obtained from the burnt sodium humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +ash; 3 — Na-humate; 4 — +ash.

proporcji, a które nie zostały uwzględnione w używanej do doświadczeń pożywce. W tym celu spalono humian, a z otrzymanym popiołem przeprowadzono następujące doświadczenie: pożywka Dzierzbickiego z mikroelementami i Fe bez humianu, —popiół i + popiół oraz pożywka ta sama z humianem, —popiół i +popiół. Wyniki tego doświadczenia ujęto na wykresie 9.

To doświadczenie również wykazało, że humian sodowy i w tym wypadku nie działa poprzez dostarczanie niezbędnych składników śladowych.

wych. Ze wszystkich tych doświadczeń wynika, że działanie związków huminowych nie wiąże się z dostarczaniem badanym mikroorganizmom koniecznych do rozwoju pierwiastków mineralnych. Można więc było przypuszczać, że wpływ, jaki wywierają humiany, jest związany z ich organiczną budową.

Wpływ EDTA na proces fermentacji

Jeżeli nie można było wytłumaczyć wpływu humianu sodu na proces fermentacji obecnością w nim pierwiastków nieorganicznych, to należało przede wszystkim przekonać się, czy nie odgrywają tu roli chelatyzujące właściwości tych związków. Z doświadczeń de Kocka (1955), Gumińskiego et al. (1965) oraz Czerwińskiego (1965) wynikało, że niewielkim dodatkiem EDTA można zastąpić humian sodu oraz, że związki te przyspieszają pobieranie przynajmniej niektórych kationów i ułatwiają ich transport wewnątrz rośliny. Z drugiej strony doświadczenia Heatha i Clarka (1956, 1960) wykazały, że EDTA w pewnych warunkach doświadczalnych w nieznacznym stopniu zwiększa wzrost pochwy liściowej pszenicy, analogiczne do wpływu, jaki wywierają niewielkie dawki humianu sodu na wzrost koleoptile, obserwowanego przez Paszewskiego et al. (1957), oraz na wzrost korzenia, obserwowanego przez Niklewskiego i Wolnicką (1937).

Ponieważ optymalnie działające stężenia EDTA zawarte są w szerokich granicach od 10^{-10} M u Heatha i Clarka (1956) do 50 mg/l pożywki u Gumińskiego (1965), zatem należało przeprowadzić doświadczenia w tym przedziale stężeń i wybrać do dalszych badań optymalnie stymulującą koncentrację.

Tabela 2 - Table 2

Wpływ różnych koncentracji EDTA na ilość wydzielonego CO_2

The influence of different concentrations of EDTA upon the quantity of liberated CO_2

Stężenie EDTA w g/l EDTA concentrations in g/l	0,0	1,0	10,0	100,0	1000,0	10000,0
CO_2 w mg	468	432	438	447	482	478

Pierwsze doświadczenie przeprowadzono ze stężeniami od 1 do 10000 g EDTA na litr pożywki. Jako podłoża fermentacyjnego użyto pożywkę Dzierzbickiego uzupełnioną mikroelementami i śladami Fe. Wyniki dotyczące ilości wydzielonego CO_2 po 72 godz. trwania doświadczenia przedstawiono w tabeli 2.

Z doświadczenia tego wynika, że EDTA w danych warunkach doświadczalnych w badanych stężeniach nie wywarło żadnego wpływu na przebieg fermentacji. Należało więc przeprowadzić doświadczenie drugie, przy wprowadzeniu wyższych koncentracji tego związku. Wykres 10 ilustruje wyniki takiego doświadczenia, w którym badano wpływ 50 (50000 γ), 100, 1000 mg EDTA na litr pożywki.

Również i w tym doświadczeniu, poza wyraźnym obniżeniem się szybkości przebiegu fermentacji przy najwyższym stężeniu EDTA, nie

Wykres 10. Wpływ różnych koncentracji EDTA na fermentację

1 — kontrola; 2 — + 50 mg/l;
3 — +100 mg/l; 4 — +1000 mg/l.

Diagram 10. Influence of various EDTA concentrations on the fermentation.
1 — control; 2 — + 50 mg/l; 3 — +100 mg/l; 4 — +1000 mg/l.

stwierdzono dodatniego wpływu tego związku na wydzielanie CO_2 . Nie stwierdzono także przy niższych koncentracjach EDTA tak charakterystycznego dla humianów intensywnego rozmnażania się komórek drożdży, a w wyższych stężeniach od 50 mg/l, liczba komórek wyraźnie zmniejszała się i to zmniejszanie się przybierało na sile wraz z dalszym wzrostem koncentracji EDTA (tabela 3). Wobec takich wyników trudno mówić o działaniu EDTA analogicznym do humianu sodu.

T a b e l a 3 - T a b l e 3

Wpływ różnych stężeń EDTA na liczbę komórek drożdży

The influence of different concentrations of EDTA upon the number of yeast cell

Stężenie EDTA w mg/l EDTA concentrations in mg/l	0,0	50,0	100,0	1000,0
Liczba komórek w 1 ml pożywki w tysiącach	21 815	16 450	10 656	6 262
Number of cells in 1 ml medium in thousands				

Wpływ koloidów

Wobec faktu, że nie udało się znaleźć analogii pomiędzy działaniem EDTA a humianem sodu, należało przeprowadzić doświadczenie w celu wyjaśnienia, czy nie można sprowadzić roli humianu do bodźcowej względnie sorpcyjnej funkcji koloidu, zwłaszcza, że używane w doświadczeniach stężenie humianu sodu jest bardzo wysokie. Wielu poprzednio cytowanych autorów z powodzeniem zastępowali w pewnych doświadczeniach humiany czy wyciągi z ziemi kompostowej koloidami różnego typu.

Najczęściej używanym koloidem w takich badaniach był agar. Dobrze przemity w bieżącej, a następnie destylowanej wodzie agar pozbawiony jest zanieczyszczeń ciałami czynnymi (Robbins 1939), a nadto wy-

Wykres 11. Wpływ agaru w różnych stężeniach na fermentację

1 — kontrola; 2 — 0,1%; 3 — 0,5%; 4 — Na-humian

Diagram 11. Influence of various agar-agar concentrations on the fermentation.

1 — control; 2 — 0,1%; 3 — 0,5%; 4 — Na-humate.

plukany z soli mineralnych. Wprowadzając taki agar do pożywki ma się tę pewność, że nie zawiera on ciał czynnych ani soli mineralnych, które mogłyby wywierać swój wpływ niezależnie od wpływu czystego koloidu. Pod tym względem układ ten ma przewagę nad koloidami nieorganicznymi, zwłaszcza metawodorotlenkiem żelazowym zawierającym spore ilości pierwiastków fizjologicznie czynnych np. jonów Fe^{+++} , które, jak się okazało, w trakcie badań nad związkami huminowymi (Czerwiński 1965) stanowią kluczową pozycję. Odporność na enzymy hydrolytyczne wyróżnia agar w stosunku do koloidu skrobiowego.

Z tych względów jako koloidu użyto do doświadczeń dobrze wymytego agaru, stosując jego dwa stężenia: 0,1 i 0,5%. Wyniki tego doświadczenia przedstawione są na wykresie 11.

Z wykresu tego wyraźnie widać, że użyty jako koloid agar nie miał żadnego wpływu na proces fermentacji i nie może zastępować działania związków huminowych. Doświadczenie to wykazało więc, że nie chodzi i w tym wypadku o działanie samego koloidu.

Związki huminowe jako czynnik witaminowo-hormonalny

Ponieważ poprzednie doświadczenia nie dały oczekiwanej odpowiedzi na postawione pytania, nasunęła się konieczność stwierdzenia, czy wpływu badanych związków huminowych nie można odnieść do ciał czyn-

nych, być może obecnych w tych związkach. Obecności witamin w humianach dotychczas nie stwierdzono, lecz ich występowanie, zwłaszcza witamin z grupy B, w glebach kompostowych (Balicka i Trzebiński 1956) nasuwa podejrzenie, że pewna ich ilość, pomimo nie sprzyjających warunków preparacji, pozostaje w związkach huminowych.

Aby wyeliminować ewentualny wpływ minimalnych resztek witamin zawartych w humianie, do pożywek wprowadzono podwójną ich dawkę,

wychodząc z założenia, że przy takim nadmiarze ciał czynnych w pożywce ta drobna ilość wprowadzona z humianem nie powinna mieć żadnego wpływu. Jeżeli więc wpływ humianu jest uwarunkowany obecnością witamin, to w tym doświadczeniu humian sodu nie powinien stymulować fermentacji.

Doświadczenie takie założono w następującej wersji: pożywka Dzierzbickiego bez humianu, —witaminy i +witaminy oraz z humianem, —witaminy i +witaminy. Ponieważ drożdże wrażliwe są na niedobór witamin z grupy B, dodawano je do pożywek w składzie i ilości podanej w rozdziale dotyczącym ogólnych metod pracy. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono na wykresie 12.

Z wykresu odczytać można, że ilość wydzielonego CO_2 wzrastała wprawdzie w serii z witaminami, niemniej jednak przebieg tego procesu był szybszy, gdy w pożywce obecne były jeszcze związki huminowe.

Wykres 13. Wpływ m-inozytolu i Na-humianu na fermentację

1 — kontrola; 2 — +inozytol;
3 — Na-humian; 4 — +inozytol

Diagram 13. Influence of m-inositol and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +inositol;
3 — Na-humate; 4 — +inositol.

Świadczy to więc o tym, że działanie humianów jest niezależne od czynnika witaminowego i w danych warunkach doświadczalnych te dwa czynniki nałożyły się na siebie. Na podstawie tego doświadczenia nie można więc przypuszczać, aby stymulujące działanie związków huminowych związane było z obecnością w nich witamin.

Następne doświadczenie przeprowadzono z m-inozytolem, gdyż wg danych literatury (H a e h n 1960) witamina ta nie jest czynna, gdy nie występuje w obecności innych witamin, zwłaszcza biotyny i kwasu pantotenowego. Jeżeli więc działanie inozytolu uwidacznia się dopiero w obecności innych witamin, to w wypadku istnienia takowych w humianie należałoby się spodziewać wzrostu intensywności fermentacji w układzie inozytol + humian sodu. Założono to doświadczenie w następującym układzie: pożywka Dzierzbickiego bez humianu, — inozytol i +inozytol oraz pożywka z humianem, — inozytol i +inozytol, a wyniki

przedstawiono na wykresie 13. Eksperyment ten wykazał, że inozytol, mimo że był dodawany do pożywki w dość wysokim stężeniu, nie wywarł żadnego wpływu na przebieg fermentacji, ani w serii kontrolnej, ani w serii z humianem.

Wydaje się na podstawie i tego doświadczenia, iż działania stymulującego badanych związków humianowych nie można sprowadzić do efektu witaminowego. Oba czynniki działają niezależnie od siebie.

Następne doświadczenia przeprowadzono z kwasem β -indolooctowym (IAA). Teoretyczne podstawy do tego doświadczenia dały wyniki z jednej strony Niklewskiego et al. (1937) oraz Paszewskiego et al. (1957) wykazujące wpływ związków huminowych analogiczny do wpływu substancji wzrostowych, z drugiej strony obserwacje Grace (1937) i Turfitta (1941), którzy stwierdzili pewną stymulację fermentacji wywołanej przez drożdże pod wpływem niewielkich dawek (1–5 mg/l

Wykres 14. Wpływ różnych stężeń kwasu indolooctowego na fermentację

1 — kontrola; 2 — +IAA (5×10^{-6} M); 3 — +IAA (3×10^{-5} M); 4 — Na-humian; 5 — +IAA (5×10^{-6} M); 6 — +IAA (5×10^{-5} M).
Diagram 14. Influence of various concentrations of indoleacetic acid on the fermentation.

1 — control; 2 — +IAA (5×10^{-6} M); 3 — +IAA (3×10^{-5} M); 4 — Na-humate; 5 — +IAA (5×10^{-6} M); 6 — +IAA (5×10^{-5} M).

pożywki) IAA oraz NAA. A ponieważ Flaig i Breyhan (1956) znaleźli w humianach pochodne indolu, można było spodziewać się, że związki próchniczne będą pobudzały fermentację również i w tych doświadczeniach.

W tym celu przeprowadzono doświadczenia stosując stężenia 5×10^{-6} i 3×10^{-5} M, co mniej więcej odpowiada 1 i 5 mg/l IAA, a więc tak, jak to obserwowali autorzy poprzednio cytowani. Ponadto doświadczenie przeprowadzono w serii bez humianu i w serii z humianem. Wyniki doświadczenia zilustrowane na wykresie 14 świadczą o tym, że IAA w badanym stężeniu nie miał prawie żadnego wpływu na fermentację ani w serii kontrolnej, ani w serii z humianem.

W celu całkowitego wykluczenia ewentualnego wpływu zawartych w humianie soli mineralnych, wpływu koloidu, ciał czynnych typu hormonalnego oraz ewentualnych zanieczyszczeń aminokwasami przepro-

wadzano dwa doświadczenia: jedno z pożywką naturalną, jaką jest brzeczka słodowa, drugie z pożywką Dzierzbickiego wzbogaconą autolizatem. Wyniki doświadczenia pierwszego z humianem i bez humianu zestawiono w tabeli 4. Doświadczenie to również wykazuje, że w obecności humianu wydzielanie CO_2 jest intensywniejsze niż w kontroli.

Wykres 15. Wpływ autolizatu drożdżowego i Na-humianu na fermentację

1 — kontrola; 2 — +autolizat; 3 — Na-humian; 4 — +autolizat

Diagram 15. Influence of yeast autolyzate and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +autolyzate; 3 — Na-humate; 4 — +autolyzate.

Można więc i na tej podstawie przypisywać związkom huminowych swoiste i nie związane z obecnością w nich mikroelementów działanie witamin czy aminokwasów.

Tabela 4 - Table 4

Wpływ Na-humianu w pożywce słodowej na wydzielanie CO_2 w procesie fermentacji alkoholowej

The influence of Na-humate in malt medium upon the liberation of CO_2 in the process of alcoholic fermentation

Czas trwania doświadczenia w godzinach Duration of experiment in hours	Ilość wydzielonego CO_2 w mg The quantity of liberated CO_2 in mgs	
	Kontrola Control	Na-humian Na-humate
24	152	183
48	2036 $\pm$ 58	2578 $\pm$ 82

Pogląd ten ugruntowuje jeszcze doświadczenie drugie z autolizatem, przeprowadzane w następującym układzie: pożywka, —autolizat i +auto-

lizat oraz z humianem, —autolizat i +autolizat, którego wyniki przedstawiono na wykresie 15.

Doświadczenia z brzeczką słodową jak i z autolizatem drożdżowym dowodzą w sposób jednoznaczny, że wpływu humianu sodu na fermentację nie można wytłumaczyć żadną z dotychczas analizowanych doświadczalnie hipotez.

Wpływ syntetycznych humuso-podobnych związków

Należało w następnej kolejności przeprowadzić doświadczenia, w celu stwierdzenia, czy wpływ, jaki wywierają te związki na proces fermentacji i rozmnażanie się komórek, jest właściwy tylko humianom naturalnego pochodzenia, czy też podobne efekty stymulacyjne będą wywierały syntetycznie otrzymane humuso-podobne związki. W doświadczeniach z roślinami wyższymi ten syntetyczny „humian“ działał identycznie z naturalnym humianem otrzymanym z kompostu (Ba d u r a 1964). Można się więc było spodziewać, że podobne wyniki uzyska się w doświadczeniach z drożdżami.

W tym celu przeprowadzono doświadczenia z polifenolem otrzymanym z utlenienia i polimeryzacji p-benzochinonu, stosując jego trzy stężenia: 0,01, 0,05, 0,1% w przeliczeniu na s.m. Wyniki optymalnie działającego stężenia (0,05%) na wydzielanie CO_2 ujęto na wykresie 16, a ilość komórek drożdży przedstawiono w tabeli 5.

T a b e l a 5 - T a b l e 5

Wpływ Na-humianu otrzymanego z p-benzochinonu na
rozmnażanie się komórek drożdży

The influence of synthetic humus-like compounds upon the
multiplication of yeast cells

Czas trwania doświadczenia w godzinach Duration of the experiment in hours	Liczba komórek drożdży w 1 ml pożywki w tysiącach Number of yeast cells in 1 ml medium in thousands	
	Kontrola Control	Syntetyczny Na-„humian“ (0,05%) Synthetic sodium humate
24	10 875	13 000
48	15 990	23 437
72	20 375	30 625

Zarówno ilość wydzielonego CO_2 i liczba komórek drożdży w 1 ml płynu fermentacyjnego w serii z „humianem“ była wyższa niż w serii kontrolnej, choć zwyżka ta nie była taka duża, jak to miało miejsce z naturalnymi związkami huminowymi w poprzednich doświadczeniach.

Następne doświadczenie przeprowadzono również ze sztucznym humianem, lecz otrzymanym ze skarmelizowanej glikozy. Zachęcające podstawy do tego doświadczenia uzyskano już wcześniej, gdy badano wpływ naturalnych związków huminowych na fermentację, przy stosowaniu różnych źródeł węgla. Okazało się wtedy, że w eksperymentach z glikozą sterylizowaną w autoklawie przy nadciśnieniu 1 atm., humian sodu

Wykres 16. Wpływ syntetycznego humianu otrzymanego z p-benzochinonu na fermentację

1 — kontrola; 2 — Na-„humian”

Diagram 16. Influence of synthetic humate, obtained from p-benzoquinone, on the fermentation.

1 — control; 2 — Na₂humate”.

znacznie słabiej działa w stosunku do kontroli, niż w doświadczeniach z sacharozą. Bliższe zajęcie się tym zjawiskiem pozwoliło na wyjaśnienie tego zagadnienia, i można było wykazać, że glikoza ulegając łatwej karmelizacji pod wpływem autoklawowania, daje produkty humuso-podobne. Możliwości powstawania tego typu związków z cukrowców dyskutowane są w pracach Endersa (1942) oraz Flaiga et al. (1952).

Wyniki doświadczenia nad wpływem humianu syntetycznego, otrzymanego z karmelu, przedstawiono na wykresie 17. W doświadczeniu tym

Wykres 17. Wpływ syntetycznego humianu otrzymanego z glikozy na fermentację

1 — kontrola; 2 — Na-„humian”

Diagram 17. Influence of synthetic humate, obtained from glucose, on the fermentation.

1 — control; 2 — Na₂humate”.

użyto 0,05% stężenia „humianu”. Doświadczenie to również wykazało, że humian otrzymany ze skarmelizowanej glikozy, jakkolwiek wywiera mniejszy wpływ niż naturalne związki huminowe, to jednak sposób jego działania jest analogiczny do wpływu, jaki wywierają naturalne związki huminowe.

Doświadczenia powyższe jeszcze raz potwierdzają poprzednie wnioski, że działania humianu sodu nie można sprowadzić do wpływu mikroelementów, żelaza, witamin, aminokwasów, czy ciał czynnych w dzisiejszym rozumieniu. Wpływ humianu na fermentację alkoholową jest wynikiem swoistego działania i działanie to jest związane z budową chemiczną makrocząsteczki polimeru, bez względu na to, czy otrzymano go na drodze syntetycznej *in vitro*, czy z gleby.

Humian sodu jako układ oksydo-redukcyjny

Jeżeli nie można było wykazać pośredniego wpływu humianu sodu na proces fermentacji, to należało przeanalizować drugą ewentualność, wpływu bezpośredniego i przekonać się, czy związki te w danych warunkach doświadczalnych nie włączają się w metabolizm oddychowy komórek drożdży.

Podstawy do rozważania takiej możliwości dały wyniki wspomnianych we wstępie prac i one skłaniają do przyjęcia tezy, że humian, dzięki swej chinonowej budowie może brać udział w procesie oddychania jako odwracalny układ oksydo-redukcyjny. A w wypadku drożdży, ze względu na możliwość wymiany oksydo-redukcyjnej na powierzchni komórki, odpadałaby nawet trudność pogodzenia wspomnianej hipotezy z faktem niewnikania tych dużych koloidalnych cząsteczek do wnętrza komórki (Prat et al. 1958, 1959, 1961).

W myśl tej hipotezy jednak humian sodu jako biorca wodoru z pośrednich produktów przemiany materii musiałby wpływać na przesunięcie końcowego produktu fermentacji z alkoholu na kwasy organiczne lub doprowadzać do całkowitego utlenienia substratu. Za przyjęciem tej koncepcji musiałoby zatem przemawiać doświadczenia, z których wynikałoby między innymi, iż stosunek alkoholu do CO_2 ulegał w obecności humianu dużemu przesunięciu.

Ponieważ z ogólnego równania fermentacji alkoholowej Gay-Lussaka: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightleftharpoons 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$ wynika, że teoretycznie obliczony stosunek alkoholu do CO_2 powinien wynosić 1,045, to zmniejszanie się tego stosunku w procesie fermentacji świadczyć będzie o zmianie metabolizmu na niekorzyść wytwarzanego alkoholu. Zmniejszanie się ilości alkoholu w obecności humianu powinno iść w parze w nagromadzeniem się kwasów organicznych.

Przeprowadzono oznaczenia ilości wydzielonego CO_2 oraz alkoholu, a wyniki obliczonego stosunku alkohol: CO_2 ujęto w tabeli 6.

W doświadczeniach tych wprowadzie obserwuje się spadek wartości obliczonego stosunku, lecz procent spadku jest mały, a wydaje się, iż przy tej dużej stymulacji powinny być te wyniki bardziej zróżnicowane. Drugi warunek doświadczenia wprowadzie był spełniony (wykres 3 i 4), lecz tę zmianę stężenia jonów wodorowych można tłumaczyć nie tylko

hipotezą oksydo-redukcyjną. W normalnym procesie fermentacji obserwuje się również zakwaszanie się płynu fermentacyjnego, które jest między innymi wynikiem nierównomiernego pobierania kationów i anionów oraz wytwarzania drobnych ilości kwasów organicznych. Dlatego też bez dokładnej analizy powstającego zakwaszania i identyfikacji kwasów, nie można nic wiążącego powiedzieć na dany temat.

T a b e l a 6 - T a b l e 6
Stosunek alkoholu do CO_2 w doświadczeniach kontrolnych
i w doświadczeniach z humianem (po 5 dniach)
Ratio alcohol: CO_2 in experiments without and with humate
(after 5 days)

Doświadczenie Experiments	Kontrola Control	Na-humian Na-humate	% spadku % drop
1	1,070	0,968	9,53
2	1,073	1,001	6,72

Aby sprawę oksydo-redukcji dokładniej przeanalizować, przeprowadzono doświadczenie z drożdżami „petite“, których metabolizmem szczególnie zajmował się Słoniński (1953). Drożdże te charakteryzują się tym, że bez względu na warunki tlenowe oddychają tylko beztlenowo. Są to mutanty o zablokowanym układzie cytochromowym. Można więc było przypuszczać, że humian sodu, o ile działa jako akceptor wodoru lub dawca tlenu, w doświadczeniach z taką kulturą nie będzie wpływał stymulująco, choćby z tego względu, że komórkom takim wystarczy zupełnie do podziałów energia uzyskiwana z fermentacji. Z drugiej strony z doświadczeń Šmidovej (1962) wynikałoby, że humian sodu wpływa pobudzająco na aktywność oksydazy cytochromowej, której to brak tym mutantom.

T a b e l a 7 - T a b l e 7
Wpływ Na-humianu na wydzielanie CO_2 przez drożdże „petite“
The influence of Na-humate upon the liberation of CO_2 by
the cells of yeast „petite“

Doświadczenie Experiment	Ogólna ilość wydzielonego CO_2 w mg po 10 dniach Total amount of liberated CO_2 in mgs after 10 days of the experiment	
	Kontrola Control	Na-humian Na-humate
1	395	1284
2	316	1094

Przeprowadzono doświadczenie z drożdżami „petite“, a wyniki przedstawiono w tabeli 7. Doświadczenie to ze względu na bardzo powolny wzrost fermentacji trwało 10 dni. Wyniki tych eksperymentów są jednoznaczne, gdyż obserwuje się stymulujący wpływ związków huminowych na te komórki; doświadczenia te wykazują, iż w tym wypadku nie chodzi ani o dostarczanie tlenu, ani o pobieranie wodoru przez humian, a przynajmniej wspomniany proces nie odbywa się poprzez system cytochromowy.

Jeżeli więc badany humian sodu miałby działać jako akceptor wodoru, a nie byłoby to związane z systemem cytochromowym, to nasuwa się pytanie, jaki system przenośników wodoru może być tutaj czynny: czy układ flawinowy, czy też układ polifenolowy? Aby odpowiedzieć na

Wykres 18. Wpływ ryboflawiny i Na-humianu na fermentację

1 — kontrola; 2 — +vit. B₂; 3 — Na-humian; 4 — +vit. B₂

Diagram 18. Influence of riboflavin and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +Vit. B₂; 3 — Na-humate; 4 — +Vit. B₂.

to pytanie, należało sprawdzić doświadczalnie, czy ryboflawina wchodząca w komórce w skład flawinowych fermentów oddechowych w obecności humianu będzie działała stymulująco na proces fermentacji i czy będzie ona mogła pełnić funkcję przenośnika wodoru pomiędzy komórką a środowiskiem w myśl schematu:

przy czym humian sodu miałby pełnić analogiczną funkcję do błękitu metylowego, dla którego to równanie podał Slater (1951 wg Słomimskiego 1953).

Wyniki takiego doświadczenia przedstawione są na wykresie 18. Z tą samą myślą przeprowadzono następne doświadczenie z aneuryną (wykres 19). Doświadczenia te świadczą, że żadna z tych witamin nie pełni

w danych warunkach doświadczalnych funkcji przenośnika wodoru z układu NAD na humian sodu.

Pozostaje jeszcze inny system, prowadzący przez polifenolazę. Wprawdzie o tym systemie w komórkach drożdży niewiele wiadomo, jednak istnieją przesłanki teoretyczne wskazujące na możliwość przeniesienia wodoru poprzez oksydazę polifenolową na fenole stanowiące budulec związków huminowych (Christiewa 1962). Pewne doświadczalne podstawy pod te założenia dają prace Gumińskiej (1958) oraz Skrabki (1964), obie nad kiełkowaniem nasion. Pierwsza z tych prac sugeruje, że w niedostatku tlenu kiełkujące nasiona mogą przekazywać wodory poprzez układ polifenolowy na humian, druga dyskutuje

Wykres 19. Wpływ aneuryny i Na-humianu na fermentację
1 — kontrola; 2 — +wit. B₁; 3 — Na-humian; 4 — +wit. B₁

Diagram 19. Influence of aneurine and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +Vit. B₁; 3 — Na-humate; 4 — +Vit. B₁.

mechanizm oddychania, poprzez układ polifenolowy, kiełkujących nasion. Ponieważ w tych układach funkcje przenośnika wodoru pełni kwas askorbinowy (witamina C), a w skład oksydazy polifenolowej wchodzi miedź, należało się przeto spodziewać, że związki te wywrą jakiś wpływ na proces fermentacji w obecności humianu.

Przeprowadzono takie doświadczenie z witaminą C, miedzią oraz obu składnikami łącznie z dodatkiem i bez dodatku humianu. Jednak doświadczenia te nie dały spodziewanego rezultatu (tabela 8). Również nie udało się uchwycić większych różnic w rHI pożywki pomiędzy doświadczeniem z humianem i bez humianu.

Wydaje się na podstawie wszystkich tych doświadczeń, że tłumaczenie tego dużego wpływu na rozmnażanie się komórek i wydzielanie CO₂ właściwościami oksydo-redukcyjnymi humianu nie wytrzymuje krytyki

Tabela 8 - Table 8

Wpływ kwasu askorbinowego i CuSO_4 na proces fermentacjiThe influence of ascorbic acid, CuSO_4 upon the process of alcoholic fermentation without and with humate

Kombinacja Combination	Ogólna ilość wydzielonego CO_2 w mg po 72 godz. Total amount of liberated CO_2 in mgs after 72 hours			
		+Vit.C +Vit.C	+ CuSO_4 50 g/l	+Vit.C + CuSO_4
Kontrola Control	544	605	489	534
Na-humian Na-humate	1437	1486	1392	1462

i należy szukać innej jeszcze możliwości, wyjaśnienia tego działania. Pewne wskazówki w tym kierunku dały doświadczenia z większymi dawkami miedzi.

Sorpcyjna funkcja związków huminowych

Doświadczenia z większymi dawkami miedzi przeprowadzano na pożywce Dzierzbickiego, lecz bez mikroelementów i Fe, gdyż te sole, jak wynikało z poprzednich eksperymentów (wykres 5, 6, 7, 8), nie wywierały żadnego wpływu. Układ tego doświadczenia był następujący:

1. Pożywka bez humianu
2. Pożywka bez humianu + Cu^{++} 500 g/l (w soli CuSO_4)
3. Pożywka bez humianu + Cu^{++} 2500 g/l (w soli CuSO_4)

oraz ten sam układ tylko z humianem. Wyniki 72-godzinnego doświadczenia przedstawiono na wykresie 20. Doświadczenie to wykazało, że o ile przy najwyższym stężeniu siarczan miedzi w serii bez humianu działał już toksycznie, to w serii z humianem nie dało się zaobserwować tego trującego wpływu. Wydaje się więc, że związki huminowe usunęły nadmiar szkodliwych jonów Cu^{++} . Doświadczenia te potwierdziły wyniki Schlichtinga (1955) dotyczące wiązania miedzi przez kwasy huminowe.

Nasunęło się więc pytanie, czy humian sodu może neutralizować szkodliwie działające stężenia innych kationów. W tym celu przeprowadzono doświadczenia z wpływem większych stężeń Fe (1—5 mg Fe^{+++} jako soli Mohra na litr pożywki) na proces fermentacji. Wyniki takich dwóch doświadczeń zilustrowano na wykresie 21 i 22; wyniki pierwszego doświadczenia wykreślono jako dobowe straty CO_2 , wyniki drugiego doświadczenia wykreślono na podstawie całkowitej ilości wydzielonego CO_2 . Wyniki tych doświadczeń w pełni potwierdzają przypuszczenie, że hu-

miany mogą działać antytoksycznie w wypadku trującego wpływu nadmiernych ilości kationów. Wyniki Maksimowa i Pawlaka (1951) nad sorpcją manganu przez torfy, i to w tym silniejszym stopniu im dany materiał był bardziej zhumifikowany, sugerowałyby, że to antytoksyczne działanie humianu sodu w danych warunkach doświadczalnych, polegałoby również na właściwościach sorpcyjnych tych związków. Na to, że kwasy huminowe dzięki swej złożonej budowie mogą pełnić taką funkcję, zwracało już uwagę wielu badaczy Kadner (1962).

Nasunęło się w związku z tymi doświadczeniami przypuszczenie, że sama pożywka zawiera już jakieś pierwiastki w dużym nadmiarze i one

Wykres 20. Wpływ różnych stężeń Cu oraz Na-humianu na fermentację

1 — kontrola; 2 — +500 γ/l; 3 — +2500 γ/l; 4 — Na-humian; 5 — +500 γ/l; 6 — +2500 γ/l.

Diagram 20. Influence of various Cu concentrations and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +500 γ/l; 3 — +2500 γ/l; 4 — Na-humate; 5 — +500 γ/l; 6 — +2500 γ/l.

w serii kontrolnej działają hamująco na proces fermentacji, natomiast w serii z humianem dzięki jego sorpcyjnym właściwościom to trujące działanie jest niwelowane.

Przeprowadzono takie doświadczenie porównawcze pomiędzy pożywką Dzierżbickiego i pożywką G, a wyniki ujęto w tabeli 9. Doświadczenie to i poprzednie (wykres 8) nie potwierdziły tej obawy, gdyż obie pożywki są równocenne i w obu pożywkach obserwowano ten sam wpływ humianów.

Należało więc jeszcze przebadać, jaki wpływ będzie wywierał NaOH wprowadzany do każdej pożywki celem stabilizowania na żądanej wysokości stężenia jonów wodorowych, zwłaszcza że we wstępnych doświadczeniach nad otrzymaniem aktywnego preparatu z p-benzochinonu większe dawki (0,5, 1,0 i 1,5 g/l pożywki) NaCl obniżały intensywność fermentacji w serii bez humianu.

W doświadczeniach poprzednio prowadzonych przy pH 6,5 zdawano sobie sprawę z nieco niekorzystnych warunków do fermentacji i rozmnażania się drożdży, lecz sądzono, iż ten niekorzystny wpływ odbija się w jednakowym stopniu w serii kontrolnej i w serii z humianem. Główny nacisk natomiast położono, aby dobrać środowisko takie, przy

którym humiany znajdowałyby się w pożywce w stanie rozpuszczonym a niewytrąconym, gdyż to mogło mieć duże znaczenie przy interpretacji wyników. Wytrącone bowiem kwasy huminowe wg Christiewy (1962) mają być nie aktywne, a Jarczyk (1962) stwierdza, że rozpuszczalność kwasów huminowych w zależności od źródła ich otrzymywania zależy od pH roztworu. Tak np. optimum rozpuszczalności kwasów huminowych otrzymanych z torfu waha się w granicach 6,9—7,3 pH.

W celu więc stwierdzenia wpływu NaOH, co związane jest ze zmianą stężenia jonów wodorowych, na proces fermentacji oraz w celu określenia wpływu humianu w tych warunkach, założono doświadczenie z po-

Wykres 21. Wpływ różnych stężeń Fe oraz Na-humianu na fermentację

1 — kontrola; 2 — +1 mg/l; 3 — +5 mg/l; 4 — Na-humian; 5 — +1 mg/l; 6 — +5 mg/l

Diagram 21. Influence of various Fe concentrations and Na-humate on the fermentation.

1 — control; 2 — +1 mg/l; 3 — +5 mg/l; 4 — Na-humate; 5 — +1 mg/l; 6 — +5 mg/l.

Wykres 22. Wpływ różnych stężeń Fe i Na-humianu na fermentację po 72 godzinach

1 — kontrola; 2 — Na-humian

Diagram 22. Influence of various Fe concentrations and Na-humate on the fermentation, after 72 hrs.

1 — control; 2 — Na-humate.

żywką Dzierzbickiego bez humianu i z humianem, o następujących wartościach pH: 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0. Wyniki wydzielonego CO₂ po 48 i 72 godzinach przedstawione są łącznie na wykresie 23. Doświadczenie to jest niezwykle interesujące ze względu na przebieg fermentacji w serii z humianem.

O ile bowiem było do przewidzenia, że w warunkach kontrolnych

wraz ze wzrostem pH krzywa fermentacji będzie wzrastała aż do pewnej wartości maksymalnej, a następnie będzie gwałtownie spadała, to minimalne wahania w przebiegu krzywej fermentacji z humianem są zaskakujące. Świadczą bowiem o tym, że Na-humian działał neutralizująco przy nadmiarze z jednej strony jonów H^+ , z drugiej strony jonów Na^+ lub OH^- .

T a b e l a 9 - T a b l e 9

Ilość wydzielonego CO_2 w mg po 72 godz. fermentacji
na pożywce Dzierzbickiego i G

The amount of liberated CO_2 in mgs after 72 hours' fermentation
on Dzierzbicki's and G medium

Pożywka Medium	Kontrola Control	Na-humian Na-humate
Dzierzbicki	621	1643
G	532	1428

Należało więc przeanalizować, czy to neutralizujące działanie humianu odnosi się tylko do jonów Na^+ , czy również do jonów OH^- . Na podstawie poprzednich doświadczeń można było przypuszczać, że działanie humianu sprowadza się do wyłapywania głównie kationów, które to procesy sorpcyjne są nota bene najlepiej poznane. Jednakże przebieg krzywej fermentacji w serii kontrolnej (wykres 23) świadczyłby o tym, że związki huminowe są tak samo czynne w stosunku do jonów OH^- . Należało to jednak eksperymentalnie wykazać, metodą bądź bezpośrednią, bądź przez wykazanie braku wpływu jonów Na^+ na badany proces. Zastosowano metodę pośrednią, opartą na następującym rozumowaniu. Jeżeli początkowo stymulujące, a następnie hamujące działanie na proces fermentacji miałyby wywierać wzrastające stężenia kationu, a humian miałby to szkodliwe działanie, przy większych stężeniach Na^+ , znosić, to w wypadku dodawania ekwiwalentnych ilości NaCl zamiast NaOH do pożywki, można by się spodziewać analogicznego przebiegu krzywej fermentacji.

Doświadczenie takie założono, lecz bez wprowadzania NaOH, celem zmiany początkowego pH, które w tym wypadku wynosiło 4. NaCl dodawano w ilościach: 0,5, 1,0, 1,0 g/l pożywki, co mniej więcej odpowiadało połowie, całej i półtorej dawki w przeliczeniu na Na^+ w wypadku dodawania NaOH. Ponadto doświadczenie to było przeprowadzone w serii bez humianu i z humianem. Średnie wyniki przedstawiono w tabeli 10.

Doświadczenie to nie wykazało wpływu NaCl ani w serii kontrolnej, ani w serii z humianem, co daje podstawy do przyjęcia tezy, iż nie chodzi tu o ujemny wpływ nadmiaru jonów Na^+ i niwelowanie tego wpływu

przez humiany, lecz że ujemnie wpływającym czynnikiem na proces fermentacji są jony OH^- , gdyż one obniżają silnie badane procesy.

Doświadczenie to nie przeczy poprzedniemu stwierdzeniu, że większe dawki NaCl wywierają ujemny wpływ na fermentację. Pierwsze doświadczenie było bowiem prowadzone przy pH 6,5, a więc już z pewną zawartością jonów Na^+ i te sumujące się stężenia musiały wywrzeć

Wykres 23. Wpływ pH na fermentację w pożywce bez humianu i z humianem, po 48 i 72 godzinach
1 — kontrola; 2 — Na-humian (po 48 godz.); 3 — kontrola, 4 — Na-humian (po 72 godz.)

Diagram 23. Influence of pH on the fermentation in medium with and without humate, after 48 and 72 hrs.

1 — control; 2 — Na-humate (after 48 hrs.); 3 — control; 4 — Na-humate (after 72 hrs.).

swój ujemny wpływ, drugie doświadczenie prowadzono przy pH 4, a więc bez neutralizacji pożywki NaOH . W doświadczeniu tym więc stężenie jonów Na^+ było mniejsze w sumie niż w poprzednim.

W rezultacie otrzymujemy obraz hamowania procesu fermentacji — zarówno w środowisku kwańniejszym, jak i w środowisku o większym stężeniu jonów wodorotlenowych od optymalnego — oraz niwelowanie hamującego działania tych nie optymalnych stężeń jonowych przez hu-

mian sodu. Do podobnych wniosków doszedł L h o t s k y (1960) badając wpływ oksyhumolitów na glony. Nic więc dziwnego, że przy takiej roli humianu doświadczenia prowadzone przy pH 6,5 dawały obraz stymulacji, oraz że również w doświadczeniach prowadzonych przy jakimkolwiek innym pH niż optymalne, względnie przy jakimkolwiek innym stężeniu soli mineralnych niż optymalne uzyskiwałoby się analogiczne efekty.

T a b e l a 10 - T a b l e 10

Wpływ warstających stężeń NaCl na proces fermentacji
The influence of increasing concentrations NaCl upon the
fermentation process

Stężenie NaCl w g/l NaCl concentrations in g/l	Ogólna ilość wydzielonego CO ₂ w mg po 72 godz. Total amount of liberated CO ₂ in mgs after 72 hours			
	0,0	0,5	1,5	1,5
Kontrola Control	482	476	462	472
Na-humian Na-humate	1962	1973	1986	1992

Natomiast lekkie wznoszenie się krzywej w doświadczeniach z humianem (wykres 23) wraz ze wzrostem pH zgodne jest z innymi badaniami, z których wynika, że pojemność sorpcyjna kwasów huminowych wzrasta wraz z alkalizacją środowiska (M u s i e r o w i c z 1956).

DYSKUSJA WYNIKÓW

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że Na-humian w danych warunkach doświadczalnych nie działa stymulująco na proces fermentacji, poprzez dostarczanie komórkom niezbędnych składników pokarmowych, mikroelementów i Fe (wykres 5, 6, 7, 8, 9). Wyniki te stoją więc w pewnej sprzeczności z doświadczeniami Bortelsa (1938, 1939), Krzemieniewskiego i Kovatsa (1936), Kovatsa (1938) i innych. Jednak bliższa analiza doświadczeń wykazuje, że sprzeczność ta jest pozorna. Doświadczenia prowadzone przez poprzednio cytowanych autorów wykazały bowiem, że dodatek mikroelementów, a zwłaszcza Mo i Fe do kontroli, podwyższał bardzo silnie wiązanie azotu przez *Azotobacteria*. Również z doświadczeń tych autorów wynika, że popiół otrzymany ze spalonych związków próchnicznych działa podobnie jak sama próchnica. Jednakże badacze ci stwierdzali również, że humiany wywierają jeszcze dodatkowe działanie, nie związane z obecnością mikroelementów, i ten dodatkowy wpływ różnie interpretowali. Jedni sprowadzali ten wpływ do działania samego koloidu (P r a ż m o w s k i 1912), inni wiązali go z obecnością ciał czynnych (B a s s a l i k i N e u g e

bauer 1931). Natomiast doświadczenia z drożdżami wykazały, że dodatek mikroelementów czy Fe do serii kontrolnej nie powoduje wcale podwyższenia intensywności fermentacji, co świadczy o tym, że w pożywce znajduje się dostateczna ilość tych pierwiastków. Uwypukliło się jednak to inne działanie związane z jej organiczną budową.

Nie uzyskano również analogicznych wyników działania związków huminowych (tabela 2, 3, wykres 10) i EDTA. Z doświadczeń de Kocka (1955), Gumińskich et al. (1965) i innych wynika bowiem, że typowy chelat EDTA, działający w doświadczeniach z roślinami wyższymi, analogicznie do humianu sodu ułatwia przyswajanie Fe, pierwiastka niezbędnego w procesie oddychania, asymilacji CO_2 , syntezie pewnych składników komórkowych etc. U drożdży natomiast poza tą mikroilością Fe, potrzebną tylko do syntezy niektórych składników jak ryboflawiny (v. Lanen i Tanner 1948) lub (DNA) kwasów nukleinowych (Passingham i Brown 1958) Fe nie odgrywa większej roli. To z kolei wiąże się ze znacznie mniejszym zapotrzebowaniem przez komórkę na ten pierwiastek. Również u drożdży nie ma problemu transportu jonów, sprawy tak ważnej u roślin wyższych, nad którymi to były prowadzone doświadczenia z EDTA. Inne też wymogi biologiczne mają mikroorganizmy, inne rośliny wyższe. Jasnym więc staje się, że EDTA może pełnić inną funkcję w doświadczeniach z roślinami wyższymi, inną w doświadczeniach z drożdżami.

Nie udało się także w doświadczeniach z koloidem (wykres 11) stwierdzić jego stymulującego wpływu na wydzielanie CO_2 . Doświadczenia te nie potwierdzają wprawdzie wyników, jakie uzyskiwali Niklewski et al. (1933, 1937, 1939) oraz Duda (1947), lecz także im nie przeczą. Sami ci autorzy bowiem stwierdzają, że badane przez nich związki koloidowe mogą w pewnych tylko wypadkach wywierać podobne działanie do związków huminowych, lecz i to działanie jest znacznie niższe od działania naturalnych związków huminowych. Wyszło to szczególnie wyraźnie w doświadczeniach Gumińskich et al. (1962) nad pomidorami w kulturach wodnych wietrzonych i nie wietrzonych. Dlatego też, aby te ilościowe różnice wytłumaczyć, przyjmowali, iż związki huminowe wpływają bodźcowo na protoplazmę zwiększając jej przepuszczalność (Niklewski i Wojciechowski 1938, 1947), lub zakładali, że w związkach tych obecne są ciała wzrostowe (v. Kuthy i Pecznik 1941). Za tą ostatnią możliwością przemawiałyby również doświadczenia Paszewskiego et al. (1957).

W zasadzie istnieje teoretyczna możliwość, aby takie ciała czynne występowały w humianach, lecz po wzięciu pod uwagę metody otrzymywania związków huminowych i ich oczyszczenia, wydaje się to przypuszczenie nie bardzo uzasadnione, zwłaszcza, że żaden z cytowanych autorów nie wykrył metodami chemicznymi ani witamin, ani kwasu indolooctowego w tych związkach. Wprawdzie Flaig i Breyhan

(1956) znalazł w związkach huminowych pochodne indolu, lecz jest to produkt raczej rozkładu IAA niż jego prekursor. Nie mogli natomiast znaleźć tryptofanu, który jest związkiem wyjściowym do syntezy tego kwasu. Trudno w tej chwili dyskutować, czy nieznanie w humianach szukanego aminokwasu jest wynikiem jego nieobecności, czy też ulegał on szybkiemu rozkładowi w trakcie hydrolizy kompleksów huminowych.

Uzyskane wyniki w tej pracy (wykres 12, 13, 15, tabela 4) nie potwierdzają też tezy, że związki huminowe miałyby być czynne dzięki obecności w nich witamin czy auksyn. Wyniki te są także zgodne z poglądami Gumińskich (1953), którzy również nie mogli stwierdzić witaminowego charakteru badanych przez nich humianów.

Wprawdzie Grace (1937) i Turfitt (1941) otrzymywali zwyżkę fermentacji o około 13% pod wpływem IAA, jednak wyniki te zakwestionował Anker (1951, wg Aududa 1960) na podstawie swoich doświadczeń i uważa, że to stymulujące działanie IAA może pochodzić od innego składnika używanego do otrzymywania roztworu np. alkoholu. Z drugiej strony zwyżka fermentacji pod wpływem IAA, gdyby nawet miała miejsce, to jest ona stosunkowo niska i przy stosowanej w tej pracy metodzie badań nie udałooby się jej ponad wszelką wątpliwość potwierdzić. Nic więc dziwnego, że doświadczenia z IAA (wykres 14) nie pozwoliło stwierdzić tej stymulacji. W związku z dotychczasowymi doświadczeniami nasuwa się uwaga, że gdyby efekt fizjologiczny związków huminowych był związany wyłącznie z obecnością ciał wzrostowych lub witamin, jak uważają niektórzy badacze, a nie z ich strukturą chemiczną, to należałoby spodziewać się bardziej różnorodnej gamy oddziaływań tych związków w zależności od ich pochodzenia, sposobu otrzymywania i oczyszczania. Takiej zależności nie obserwowano się.

Reasumując można powiedzieć, że działanie związków huminowych jest innej natury niż działanie ciał wzrostowych i witamin.

Należy jeszcze przedyskutować zagadnienie, czy humian sodu w doświadczeniach z drożdżami może pełnić funkcję ochronną przed szkodliwymi produktami przemiany materii. Na ujemny wpływ nawet nieznacznych stężeń alkoholu na proces fermentacji zwracało uwagę wielu autorów. Jednak zgodnie stwierdzali, że problem ten nabiera wagi, gdy dojrzałe drożdże opadają na dno kolby fermentacyjnej. W początkowym stadium fermentacji nie obserwuje się jednak tego szkodliwego wpływu, ze względu na szybką wędrówkę komórek drożdżowych w górę i w dół naczynia, dzięki czemu z jednej strony uwalniają się one od tych szkodliwych produktów fermentacji, z drugiej strony stykają się z bogatym w składniki odżywcze środowiskiem (H a e h n 1960). Wyniki omawianych prac obejmują okres 72 godzin, to jest do momentu ich sedymentacji, a więc czasu, gdy stężenie alkoholu i CO_2 w otoczeniu komórki

jest jeszcze bez znaczenia. Wpływ humianu uwidacznia się natomiast już w pierwszym dniu doświadczenia (tabela 1). W tym układzie humian sodu nie mógłby jeszcze (o ile w ogóle może pełnić taką ochronną funkcję) wykazywać swoich właściwości. Przypisywanie w tych doświadczeniach związkom huminowym pewnej ochronnej roli przed szkodliwymi produktami rozkładu białek wydaje się też trochę ryzykowne, ze względu na wynik doświadczenia nad wpływem autolizatu i humianu na proces fermentacji (wykres 15). W doświadczeniu tym użyto bowiem stosunkowo dużego stężenia autolizatu, a więc produktów rozkładu białek i nie obserwowano w serii kontrolnej ich ujemnego działania.

Doświadczenia z humuso-podobnymi polimerami otrzymanymi zarówno z prostych fenoli, czy skarmelizowanej glikozy potwierdzały w całej rozciągłości, dotychczasowe wyniki większości badaczy zajmujących się tym problemem. Wykazały (wykres 16, 17, tabela 5), że działanie związków huminowych jest związane z ich strukturą chemiczną, a nie sposobem powstawania. Większość autorów pracujących nad naturalnymi i syntetycznymi humianami stwierdza zgodnie, że istnieje pomiędzy tymi związkami nie tylko duża analogia chemiczna, lecz i również efekt fizjologiczny, jaki wywierają te związki, jest podobny (Gumiński 1953, Erdtman 1955, Flaig et al. 1955, Badura 1964).

W danych warunkach doświadczalnych w zasadzie fizjologiczny sposób działania badanych humusowo-podobnych związków był analogiczny do wpływu, jaki wywierają związki huminowe pochodzenia naturalnego, lecz efekt tego działania był niższy. Na podstawie poprzednio cytowanych prac oraz doświadczeń Michajluka (1962) można by sądzić, iż syntetyczne „humiany“ powinny wykazywać taką samą, względnie większą fizjologiczną aktywność niż naturalne związki huminowe. Jednakże w doświadczeniach z syntetycznym „humianem“ otrzymanym z p-benzochinonu należy wziąć pod uwagę fakt, że użyty do syntezy polimeru benzochinon wywiera jeszcze uboczne trujące działanie na drożdże (Flaig i de Jong 1960). Ponadto syntetyczne związki huminowe, będąc bardziej jednorodnymi ciałami, mogą nie zawierać wszystkich elementów decydujących o ich fizjologicznej aktywności w stosunku do badanych mikroorganizmów.

Nie udało się także wykazać (tabela 6, 7, 8, wykres 18), że związki huminowe pełnią funkcję akceptora wodoru, pochodzącego z utlenienia substratu. A ściślej mówiąc nie można na podstawie uzyskanych wyników tłumaczyć stymulującego wpływu humianu jego oksydo-redukcyjnymi właściwościami. Jeżeli więc taka możliwość funkcjonowania humianu istnieje, na co wskazywałyby doświadczenia Gumińskiego et al. (1955, 1957), Christiewy (1953, 1962), Flaiga i Saalbacha (1956), Gumińskiej (1958), Šmidovej (1960) oraz innych, to w danych warunkach doświadczalnych oksydo-redukcyjna funkcja hu-

mianu byłaby nieznaczna. Za całkowitym odrzuceniem tej koncepcji musiałyby przemawiać jednak dokładne pomiary współczynników oddechowych i analizy płynu pofermentacyjnego, zwłaszcza powstających kwasów.

Ostatnią serią doświadczeń (wykresy 20—23, tabela 9, 10) wykazała, że wpływ humianu w badanym procesie fizjologicznym sprowadzić można w gruncie rzeczy do jego sorpcyjnych właściwości. Szczególnie na uwagę zasługuje w tych przypadkach sorpcja jonowymienna i chemisorpcja. Pod pojęciem sorpcji jonowymiennej należy rozumieć adsorpcję polarną polegającą na wymianie jonowej pomiędzy sorpcyjnym kompleksem kwasów huminowych a jonami roztworu, a pod pojęciem chemisorpcji należy rozumieć wiązanie się jonów z kompleksem przy pomocy wiązań chemicznych.

Jakkolwiek istotne dla tej pracy zjawiska w głównej mierze badane były na glebach i torfach, to jednak wydaje się, że można te zjawiska uogólnić, zwłaszcza iż przyjmuje się, że sorpcyjne właściwości tych kompleksów związane są w zasadzie z kwasami huminowymi (Kadner 1962).

Według Kadnera (1962) taka wymiana może zachodzić przy pomocy sił natury chemicznej prowadzącej do wytworzenia wiązań jonowych, kowalentnych i koordynacyjnych, a pochodzących od aktywnych grup karboksylowych, hydroksylowych (fenolowych i alkoholowych), karbonylowych, chinonowych, aminowych, iminowych etc. Także wg niektórych autorów heterocykliczne grupy $=HN$ łącznie z sąsiadującymi grupami kwasowymi współdziałają przy tej wymianie jonowej. Powiązanie pomiędzy pojemnością sorpcyjną kwasów huminowych a ilością niektórych grup czynnych stwierdzał między innymi Michajluk (1962). Ponadto kwasy huminowe pochodzenia naturalnego zawierają jeszcze jony Fe^{+++} i Al^{+++} , które mogą brać udział w chemisorpcyjnym wiązaniu między innymi grup wodorotlenowych.

Następnie kwasy huminowe naturalnego pochodzenia, poza węglem tlenem i wodorem, zawierają jeszcze szereg pierwiastków metalicznych w istocie bez większego znaczenia pokarmowego, lecz na zasadzie wymiany jonowej mogących odgrywać dużą rolę w balansowaniu pożywki. To z kolei wiąże się z procesem pobierania jonów przez organizmy grzybowe (Gortner 1949, wg Lilly i Barnett 1959).

W wypadku dobrze zbalansowanej pożywki wzrasta również tolerancja grzybów na większe stężenia jonów H^+ i OH^- i rozwój mikroorganizmów przebiega normalnie w znacznie szerszych granicach pH (Lilly 1959).

Z przesunięciem wartości pH w prawo albo w lewo od punktu optymalnego związane jest jeszcze inne zagadnienie. Przy niższych wartościach pH błona protoplazmatyczna może się wysycić jonami H^+ , przy wyższych jonami OH^- , tak że podstawowe kationy lub aniony niezdolne

są do wnikięcia do wnętrza komórki. Gdy w takiej pożywce znajdują się odpowiednie układy jonowymienne, to mogą one w tych warunkach powodować wymianę owych zaadsorbowanych na powierzchni komórki jonów na jony konieczne do odżywiania (McCalla 1940; Miksimow i Goralewski 1959).

W świetle powyższej dyskusji nad możliwymi sposobami regulowania składu pożywki przez humian sodu zrozumiały staje się przebieg krzywych fermentacji w zależności od pH (wykres 23). Pomimo, że w obu seriach bez humianu i z humianem stężenie jonów wodorowych były takie same, krzywa fermentacji bez humianu wznosi się i opada, utrzymując swe maksimum w bardzo wąskim przedziale pH, a z serii z humianem utrzymuje się prawie na stałym poziomie.

W związku z takim działaniem humianu sodu trudno mówić w danych doświadczeniach o stymulującym wpływie tych związków na rozmnażanie się komórek drożdży, a co zatem idzie na wydzielanie CO_2 . Mamy w tych doświadczeniach raczej do czynienia z hamowaniem owych procesów w serii kontrolnej, ze względu na niekorzystne warunki środowiska. Humian sodu dzięki swym sorpcyjnym właściwościom może regulować skład pożywki, zapewniając zawsze optymalnie zrównoważone stężenia jonowe. W świetle tych uogólnień zrozumiały staje się fakt, że efekt działania humianów, objawia się wyraźnie dopiero przy jego wysokiej koncentracji. Niskie dawki nie mogły być czynne z powodu zbyt małej ich zdolności sorpcyjnej.

Na podstawie tej koncepcji zrozumiałe staje się, że humiany dzięki ich właściwościom sorpcyjnym, w pewnych doświadczeniach przy deficycie niektórych pierwiastków, na zasadzie równowagi sorpcyjno-desorpcyjnej, oddają te składniki do środowiska, zaś w wypadku dużej ich ilości w podłożu przyjmują do siebie. Taki pogląd łączy więc wyniki autorów wykazujących dodatni wpływ humianów przy braku mikroelementów (Bortels 1930) i ich stymulujący wpływ przy nadmiarze tych składników w środowisku (Uspenski 1927).

W świetle rozważań nad funkcją, jaką pełnią grupy czynne kwasów huminowych, wydaje się, że związki te działać mogą zarówno jako układy sorpcyjne, jak widzą ten problem jedni badacze (Musierowicz 1956, Kadner 1962, Michajluk 1962) jak i jako chelaty, jak widzą to zagadnienie inni (de Kock 1955, Gumiński 1965). Różnice pomiędzy działaniem humianu sodu a EDTA polegały wtedy na tym, że humiany tworzą kompleksy ze znacznie większą ilością pierwiastków, natomiast EDTA ma te możliwości ograniczone. Druga różnica polegałaby na tym, że humiany jako ciała wielkocząstkowe nie wnioskują do komórki (Prat et al. 1958, 1959, 1961), a EDTA jako ciało niskocząstkowe może wnikać do komórek roślinnych, jak i może brać czynny udział w transporcie niektórych pierwiastków wewnątrz rośliny. Należy się przeto spodziewać, że EDTA będzie działało analogicznie do

humianu tylko wtedy, gdy będzie związane z wpływem takich pierwiastków, które tworzyć mogą z EDTA chelaty. Ponieważ w doświadczeniach z drożdżami nie chodziło o czynnik żelaza, który to w doświadczeniach z kulturami roślin wyższych odgrywa zasadniczą rolę (Wojciechowski 1948, Czerwiński 1965), nie można było stwierdzić korzystnego wpływu tego związku na proces fermentacji. Hamujące jego działanie w wyższych stężeniach było wynikiem ubocznego wpływu na samą komórkę. W związku z takim uogólnieniem działanie EDTA można by sprowadzić do szczególnego przypadku działania humianu sodu.

Opierając się na wynikającej z badań tezie, sprowadzającej działanie humianu do jego sorpcyjnych właściwości, można także tłumaczyć ten niejednakowy wpływ, jaki otrzymywali autorzy w swych doświadczeniach nad różnymi typami koloidów (Duda 1947). Im bowiem badany koloid więcej będzie miał grup czynnych, tym jest bardziej sorpcyjnie czynny. Taka zależność może wyjaśnić te rozbieżne wyniki otrzymywane przez różnych autorów w badaniach nad różnymi koloidami.

Podobnie w ramach tej koncepcji może się mieścić wyjaśnienie szybszego pobierania niektórych jonów pod wpływem niewielkich dawek humianu sodu. Jonowymiennymi układami huminowe z podobnymi układami komórkowymi stanowiłyby pomost, po którym mogłyby jony pobierane przez rośliny aktywnie, zgodnie z rządzącymi prawami fizykochemicznymi, wędrować ze środowiska do komórki (Maksimow i Goralowski 1959). Taki pogląd ugruntowują także badania nad wymianą jonową zachodzącą pomiędzy ścianą komórkową bakterii a układami jonowymiennymi (McCalla 1940).

O ile hipoteza sprowadzająca działanie związków huminowych do układów sorpcyjnych może wiele zjawisk tłumaczyć, to pewnych obserwacji, np. efektów wzrostowych (Niklewski 1937, Paszewski et al. 1957), bez dalszych badań nie można jednoznacznie wyjaśnić.

WNIOSEK

Na podstawie przeprowadzonych badań nad stymulującym wpływem humianu sodu na rozmnażanie się komórek i na wydzielanie CO_2 nie można było wykazać, że wpływ ten jest wynikiem wprowadzenia do kultur drożdży wraz ze związkami huminowymi mikroelementów, Fe ani żadnych odżywczych składników. Nie można było także powiązać działania związków huminowych z jego właściwościami chelatowymi typu EDTA, ani z działaniem ochronnym koloidu. Dalsze wyniki nie potwierdzają mniemania, że czynnikiem działającym w humianach są auksyny i witaminy.

Badania nad oksydo-redukcyjną funkcją związków huminowych wykazały, że wpływ humianu na fermentację nie można przy pomocy tej

hipotezy tłumaczyć, jakkolwiek nie wykluczyły one całkowicie, iż w minimalnym stopniu ten układ może działać.

Natomiast można było wykazać, że badany humian sodu pełni w procesie fermentacji funkcję ochronną, wychwytyjąc dzięki swym właściwościom sorpcyjnym jony, które w badanych warunkach działały toksycznie. Humian nie stymulował więc fermentacji ani rozmnażania się komórek, lecz jedynie niwelował trujące stężenia jonów, które hamowały badane procesy w serii kontrolnej.

Profesorowi dr S. Gumińskiemu, kierownikowi Katedry Fizjologii Roślin przy Uniwersytecie Wrocławskim, pragnę złożyć moje najserdeczniejsze podziękowanie za zasugerowanie mi tego problemu i cenną dyskusję nad wynikającymi w trakcie pracy trudnościami natury teoretycznej i praktycznej.

Pragnę również podziękować kol. dr J. Kiersnowskiemu z Katedry Technologii WSR i kol. dr T. Lachowiczowi z Katedry Mikrobiologii Uniw. Wrocławskiego za udostępnienie mi czystych kultur drożdżowych.

Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytetu Wrocławskiego
Wrocław, ul. Kanonia 6/8

(Wpłynęło dn. 17.7.1964 r.)

SUMMARY

The work aimed at elucidating the mechanism of the stimulating effect of humic compounds (fractions of hymetamelanic and humic acids together) on the process of alcoholic fermentation.

As it results from Dzierzbicki's experiments (1909), humic compounds visibly stimulated CO₂ liberation during the fermentation process. Gumiński (1953) and Schönwälder (1958) found that these compounds accelerate the division of yeast cells. In order to establish the true mechanism of action of these compounds all the hypotheses were examined by which various authors tried to explain the observed influence of humic compounds upon plants (Bortels 1930; Krzemieniewski and Kovats 1936; de Kock 1955; Gumiński et al. 1964; Blagoveshchenski and Prosvorskaya 1934, 1935; Niklewski and Wojciechowski 1938, 1947; Prażmowski 1912; Rippe 1936; Duda 1947; Bottomley 1915, 1917; Bassalik and Neugebauer 1931; Christieva 1953; Gumiński et al. 1955, 1957; Flaig and Saalbach 1956; Šmidova 1960; Uspenski 1927; Terlikowski and Byczkowski 1956).

Measurement of the fermentation rate was carried out by the gravimetric method (Rona 1931), by determination of the weight of liberated CO₂, and by counting the number of yeast cells. For the experiments Dzierzbicki's medium was used with addition of Fe and microelements (A—Z Hoagland's with Mo added) and in some cases medium G. (Galzy and Słominski 1957). pH was stabilized by means of NaOH at 6.5. Sodium-humate was obtained from compost earth by the classical method (Gumiński 1950). Synthetic humates were prepared from p-benzoquinone, using H₂SO₄ instead of HCl for precipitating the sediment and washing carefully the preparation to remove the remainders of non-polymerized phenol toxic to yeast (Flaig and de Jong 1960), and from caramelized glucose (Hewitt 1952).

As optimum concentration 0.1% sodium-humate (Diagram 1) was used in the experiments. Diagram 2 shows the fermentation rate at optimum concentration, Table 1 — the increment of the cell number, and Diagrams 3 and 4 — the changes of pH occurring during fermentation.

In order to find what the effect of eventual contamination of Fe and trace elements may be, the influence of microelements (A—Z Hoagland's), microelements included in medium G, Fe and ash obtained from burnt Na-humate were examined in various arrangements. The results of the experiment are shown in Diagrams 5—9. As it results from these experiments, the influence of humic compounds is not dependent on the supply of mineral elements necessary for nutrition.

Further, the influence of various concentrations of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) upon the fermentation was studied. These investigations were based on the experiments carried out by de Kock (1955) and Gumiński et al. (1962, 1965), which proved that the action of EDTA is analogical to that of sodium humate. Our experiments showed (Tables 2, 3 and Diagram 10) that in this case the action of humic compounds cannot be compared to the action of chelate compounds of EDTA type.

Attempts at demonstrating (Diagram 11) an analogy between the action of sodium humate and that of colloid, as found by Niklewski (1933, 1939) Rippe (1936) and Duda (1947) on other vegetable material, failed.

Then, some experiments with vitamins of group B were carried out. They were added in concentration twice as high as normal because, at such an excess of vitamins in the medium, those small quantities (if any) introduced, by any chance, with humates should have no influence at all. Diagram 12 shows that the action of humic compounds is independent of the vitamin factor, and that the influence of factors is superposed. The non-vitaminic character of the action of humus compounds has been confirmed by an experiment with m-inositol. As it results from literature data (Hae hn 1960), this vitamin exerts its action only in the presence of other vitamins.

As may be seen in Diagram 13, m-inositol did not influence the fermentation process either in the control series or in that with humate. Further experiments with β -indoleacetic acid did not confirm the suggestion (Bottomley 1915, 1917; Paszewski 1957) that growth substances are active in humates (Diagram 14). For the complete exclusion of mineral salts, active substances, aminoacids etc. contained in humates, an experiment was carried out with malt mash and a mineral medium with yeast autolysate added (0.5g d.s./100 ml medium). Table 4 and Diagram 15 give the results of these experiments, which also confirm the former conclusions on the specific action of the compounds examined.

The results of experiments with humus-like compounds (Diagrams 16, 17 and Table 5) testify that the effect of humic compounds is the result of a specific action which is connected with the chemical structure of the polymer macroparticle, notwithstanding whether it is prepared synthetically *in vitro* or obtained from soil.

Further experiments were aimed at proving that in the processes studied the humic compound plays the function of hydrogen acceptor or oxygen donor. However, experiments with yeast of the "petite" strain showed (Table 7) that liberation of CO₂ was also more intensive in the presence of sodium humate. These results indicate that the increased cell proliferation and liberation of CO₂ in the presence of humate cannot be explained by its redox function. Neither could any significant changes in the alcohol:CO₂ ratio (Table 6) be discovered. Besides, experiments with different hydrogen carriers (Diagram 18 and 19), such as ribo-

flavin, vitamin C, aneurine, as well as rH measurements did not reveal a redox character of the action of sodium humate.

Experiments with Cu in high concentration proved, however, that sodium humate acts antitoxically (Diagram 20). Its behaviour was similar also in the case of other metal ions (Diagrams 21, 22). These experiments suggest that the medium itself may contain some ions at non-optimum concentrations which in the control series reveal their toxic influence, this being attenuated in the presence of sodium humate. This suggestion was not confirmed by the experiment in which the fermentation rate of Dzierżbiński's medium with that of medium G was compared (Table 8).

Further experiments showed (Diagram 23) that non-optimum concentration of hydrogen ions is the factor inhibiting the fermentation course under control conditions. In experiments with humate the inhibitory effect of these concentrations of hydrogen ions is abolished.

The latter experiments have shown (Diagrams 20—23) that the influence of sodium humate on the processes investigated may be reduced to its function as sorbent, and, strictly speaking, to its ion-exchange properties. On the principle of sorption—desorption equilibrium, some cations and anions may be captured from the environment, whereas others may be released into it. For this reason, a medium that contains sodium humate seems to be better balanced, this being of great importance in the process of mineral salts uptake (Gortner 1949, after Lilly and Barnett 1959) and securing a normal development of fungi within a much wider range of pH (Lilly 1959). Moreover, the ion-exchange system can facilitate the ion exchange between the protoplasmic membrane and the environment (McCalla 1940); this may be of great significance in unfavourable conditions of pH. In the light of the foregoing considerations, it becomes comprehensible that in the presence of humate the fermentation curve (Diagram 23) is flattened and almost horizontal and that in the humate-free medium its maximum falls within a very narrow pH interval, in spite of hydrogen ion concentration being the same in both the series.

In view of such an action of sodium humate, one hardly can speak of a stimulating influence of this compound on yeast cell proliferation and liberation of CO₂ under the given experimental conditions, as an inhibition of these processes is rather observed in the control series because of the unfavourable environmental conditions.

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

LITERATURA

- Audus L. A., 1960, Hb. d. Pflanzenphysiol. 12/1: 360—387.
Badura L., 1964, Acta Agrobot. 16: 67—75.
Balicka N., Trzebiński M., 1955, Acta Microbiol. Polon. 5:377—384.
Bassalik K., Neugebauer J., 1931, Acta Soc. Bot. Polon. 8:213—251.
Bassalik K., Neugebauer J., 1933, Acta Soc. Bot. Polon. 10:481—493.
Białoziński A., Proskuriakow N., 1954, Cwiczenia z Biochemii Roślin, PWRiL, Warszawa.
Biber V. A., Bogoljubowa N. L., 1951, Dokl. Akad. Nauk ZSSR 76: 313—316.

- Błagoweszczenskij A. W., Prosorowskaja A. A., 1934, *Biochem. Z.* 273:341—345.
- Błagoweszczenskij A. W., Prosorowskaja A. A., 1935, *Biochem. Z.* 282:99—103.
- Bortels H., 1930, *Arch. Mikrobiol.* 1:333—342.
- Bortels H., 1939, *Zentralbl. Bakt. Abt. II*, 100:373—393.
- Bortels H., 1941, *Landw. Jb.* 90:270.
- Bottomley W. B., 1915, *Proc. Roy. Soc. Lond.* 89:102—108.
- Bottomley W. B., 1917, *Proc. Roy. Soc. Lond.* 89:481—508.
- Bremner J. M., 1955, *J. Agric. Sci.* 46:147—256.
- Bremner J. M., 1957, *J. Agric. Sci.* 48:352—361.
- Burk D., Lineweaver H., Horner C. K., 1932, *Soil Sci.* 33:413—454; 455—487.
- Chaminade R., 1951, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk. (Ref.)* 60:197, 1953.
- Christiewa Ł. A., 1953, *Poczwowiedenisje* 10:46—56.
- Christiewa Ł. A., 1962, *Materiały z Konferencji Nauk. „Nawozy Organiczne“ w Szczecinie* 6—11. X 1959:141—147.
- Czerwiński W., 1965, *Acta Soc. Bot. Polon.* (w druku).
- Dalton J. D., Russel G. C., Sieling D. H., 1952, *Soil Sci.* 73:173—182.
- De Kock P. C., 1955, *Science* 121:473—474.
- Dragunow S. S., 1962, *Gumienowyje udobrenia* II:11—22.
- Duda J., 1947, *Acta Soc. Bot. Polon.* 18:179—208.
- Dzierzbicki A., 1909, *Bull. intrnatl. Acad. Sci. Cracovia Cl. Sci. et Nat.* 651—660.
- Eller W., Koch K., 1920, *Ber. chem. Ges.* 53:1469—76.
- Eller W., 1922, *Brennstoff Chem.* 3:55—56.
- Enders C., 1942, *Biochem. Z.* 312:339—353.
- Erdtman H., 1955, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk.* 69:38—43.
- Flaig W., 1955, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk.* 69:43—50.
- Flaig W., 1962, *Materiały z Konferencji Nauk. „Nawozy Organiczne“ w Szczecinie* 6—11. X 1959:208—230.
- Flaig W., Breyhan Th., 1956, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk.* 75:132—135.
- Flaig W., de Jong W., 1960, *Arch. Mikrobiol.* 37:355—368.
- Flaig W., Reinemund K., 1955, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk.* 63:255—269.
- Flaig W., Saalbach E., 1956, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk.* 72:1—7.
- Flaig W., Schmidt H. L., 1957, *Arch. Mikrobiol.* 27:1—32.
- Flaig W., Schulze H., 1952, *Z. Pflanzenernährg Düng. Bodenk.* 58:59—67.
- Galzy P., Słoniński P. P., 1957, *Compt. Rend.* 245:2423—26.
- Grace N. H., 1937, *Canad. J. Res. Sec. C* 15:538—546.
- Górski M., 1956, *Nawozy Organiczne*, PWRiL, Warszawa.
- Gumińska Z., 1958, *Acta Soc. Bot. Polon.* 27:501—522.
- Gumińska Z., Gumiński S., Badura L., 1962, *Acta Soc. Bot. Polon.* 31:265—268.
- Gumiński S., 1947, *Acta Soc. Bot. Polon.* 16:91—115.
- Gumiński S., 1950, *Acta Soc. Bot. Polon.* 20:589—620.
- Gumiński S., Czerwiński W., Unger E., Bacowa A., 1955, *Acta Soc. Bot. Polon.* 24:723—731.
- Gumiński S., Czerwiński W., Unger E., Skrabka H., 1957, *Acta Soc. Bot. Polon.* 26:631—645.
- Gumiński S., Gumińska Z., 1953, *Acta Soc. Bot. Polon.* 22:45—63; 771—785.
- Gumiński S., Gumińska Z., Sulej J., 1965, *J. Exptl. Bot.* 16:151—162.

- Haehn H., 1960, Hb. d. Pflanzenphysiol. 12/1:747—803.
- Heath O. V. S., Clark J. E., 1956, Nature 177:1118—1121.
- Heath O. V. S., Clark J. E., 1960, J. Exptl. Bot. 2:168—187.
- Hewitt E. J., 1952, Roy Bucks, Farnham.
- Hiltner A., 1932, Beihef. Bot. Zentrabl. 49:467—495.
- Hiltner E., 1926, Fortschritte Landw. 1:328—337.
- Hiltner L., Gertner G., 1913, Landw. Jb. Bayern 511—523.
- Jarczyk I. I., 1962, Guminowye Udobrenia II:65—72.
- Kadner R., 1962, Materiały z Konferencji Nauk. „Nawozy Organiczne” w Szczecinie 6—11. X 1959:255—264.
- Keserer H., 1910, Ber. d. Bot. Ges. 28:208—212.
- Kostecka O., 1950, Acta Soc. Bot. Polon. 20:169—200.
- Kovats J., 1938, Bull. internat. Acad. Polon. Cl. Sci. Math. et Nat. s. B. 6/10:91—112.
- Krzemieniewska H., 1910, Bull. internatl. Acad. Sci. Cracovia Cl. Sci. Math. et Nat.: 376—413.
- Krzemieniewska H., Badura L., 1954, Acta Soc. Bot. Polon. 23:545—587.
- Krzemieniewski S., 1907, Bull. internatl. Acad. Cracovia Cl. Sci. Math. et Nat.: 646—749.
- Krzemieniewski S., 1909, Zentrabl. Bakt. Abt. II, 23:161—173.
- Krzemieniewski S., Kovats J., 1936, Bull. internatl. Acad. Polon. Cl. Sci. Math. et Nat. s. B. 8/10:169—195.
- Kudriena E. S., 1951, Trudy Poczwiennogo Inst. Akad. Nauk SSSR 38:185—253.
- Kuthy A. v., Pecznik J., 1941, Boden. Pflanzenernährg 23:83—90.
- Lanen J. M. v., Tanner F. W., 1948, Vitamins and Hormons 6:164—224.
- Lhotsky S., 1960, Acta Agrobot. 9:113—116.
- Lilly V. G., 1959, Hb. Pflanzenphysiol. 11:327—382.
- Lilly V. G., Barnett H. L., 1959, Fizjologia grzybów, PWRiL, Warszawa.
- Łoginow W., 1962, Symposion Humus and Plant (28. IX — 6. X 1961), Praha: 135—141.
- Maksimow A., Goralewski J., 1959, Własności sorpcyjne i odczyn gleb, PWRiL, Warszawa.
- Maksimow A., Pawlak T., 1951, Roczn. Nauk. Roln. 59:163—179.
- McCalla T. M., 1940, J. Bact. 40:23—32; 33—43.
- Michajluk L., 1962, Zeszyty Prob. Post. N. Roln. 34:139—146.
- Musierowicz A., 1956, Gleboznastwo ogólne. PWRiL, Warszawa.
- Niggemann J., 1955, Naturwiss. 42:98.
- Nikitinsky J., 1902, Jb. wiss. Bot. 37:365—420.
- Niklewski B., 1933, Jb. wiss. Bot. 78:431—482.
- Niklewski B., 1934, Biochem. Z. 271:1—3; 111—122.
- Niklewski B., Duda J., 1936, Biochem. Z. 286:110—119.
- Niklewski B., Krause A., 1929, Jb. wiss. Bot. 70:158—162.
- Niklewski B., Wojciechowski J., 1937, Boden. Pflanzenernährg 4:294—327.
- Niklewski B., Wojciechowski J., 1938, Acta Soc. Bot. Polon. 15:61—109; 111—151.
- Niklewski B., Wojciechowski J., 1947, Acta Soc. Bot. Polon. 18:65—90.
- Niklewski B., Wolnicka J., 1937, Bull. internatl. Acad. Polon. Cl. Sci. Math. et Nat. s. B. 6/7:147—157.
- Niklewski B., Wójcikówna Z., Pestka M., 1939, Acta Soc. Bot. Polon. 16:97—125.
- Passingham J. V., Brown R., 1958, J. Exptl. Bot. 9:277—284.
- Pastewski J., 1933, Acta Soc. Bot. Polon. 10:389—415.

- Paszewski A., Trojanowski J., Łobarzewska A., 1957, Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska s. C 12:1—13.
- Pavel L., Kolušek J., Šmatka V. V., 1954, Sbornik ČSAZV 27 A: 207—212.
- Prat S., Čatský J., Melichar O., 1957, Acta Soc. Bot. Polon. 26:325—347.
- Prat S., Pospišil F., 1958, IV Internatl. Cong. of Biochem. Wien 1—6, IX 1958:144.
- Prat S., Pospišil F., 1959, Biol. Plant. (Praha) 1:71—80.
- Prat S., Šmidová M., Činčeroва A., 1961, V Internatl. Cong. of Biochem. Moskwa 10—16, VIII 1961: 329.
- Prażmowski A., 1912, Bull. internatl. Acad. Cracovia Cl. Sci. Math. et Nat. 87—174; 855—950.
- Pringsheim E. G., 1935, Naturwiss. 22:197—198.
- Pringsheim E. G., 1936, Beihefte Bot. Zentralbl. 55:100—121.
- v. Reinitzer F., 1900, Bot. Z. 56:59—73.
- Rippel A., 1936, Arch. Mikrobiol. 7:210—234.
- Robbins W. J., 1939, Am. J. Bot. 26:772—778.
- Rypeček V., 1962, Symposium Humus and Plant (28. IX — 6. X 1961) (Praha: 235—243.
- Schlichting E., 1955, Acta Agric. Skand. 4:313—357.
- Schönwälder H., 1958, Arch. Mikrobiol. 30:162—180.
- Skrabka H., 1964, Acta Soc. Bot. Polon. (w druku).
- Słoniński P. P., 1953, Actualités Biochem. 17:1—203.
- Šmidová M., 1960, Biol. Plant. (Praha) 2:152—164.
- Šmidová M., 1960, Acta Agrobot. 9:129—143.
- Šmidová M., 1962, Symposium Humus and Plant (28. IX — 6. X 1961) Praha: 291—304.
- Szymański S., 1962, Symposium Humus and Plant (28. IX — 6. X 1961) Praha: 289—290.
- Terlikowski F., Byczkowski A., 1938, Roczn. Nauk Roln. i Leś. 45:271—302.
- Trojanowski J., 1954, Acta Soc. Bot. Polon. 23:143—160.
- Turfitt G. E., 1941, Biochem. J. 35:237—244.
- Uspenski E. E., 1927, Pflanzenforschung 9:1—194.
- Waksman S. A., Iyer K., 1943, Soil Sci. 34:43—79.
- Wanner H., Schmucki S., 1950, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 60:413—425.
- Williams W. R., 1950, Gleboznawstwo, PWRiL, Warszawa.
- Wojciechowski J., 1948, PAU Rozp. Wyd. Mat. Przyr. 77/B/1:1—26.
- Wojciechowski J., Krzywański Z., Szymański S., 1955, Po- znańskie Tow. Przyj. Nauk. Wyd. Mat. Przyr. Prace Kom. Nauk Roln. i Leś. 2:3—30.
- Wojciechowski J., Kuźdowicz A., 1939, Acta Soc. Bot. Polon. 16:81—95.