Wpływ różnych frakcji próchnicznych na wzrost niektórych gatunków grzybów

(Doniesienie tymczasowe)

*Effects of various humic fractions on the development
of some fungus species*

J. CHODĄN, J. MIKOŁAJSKA

WSTĘP

Intensywny rozwój badań nad działaniem biologicznym związków próchnicznych rozpoczął się w Polsce w 1950 roku. Badania te podjęli Z. i S. Gumińscy oraz ich współpracownicy (1950, 1953 a, 1953 b, 1955, 1958, 1961). Doszli oni do wniosku, że humian sodu odgrywa rolę akceptora wodoru w procesie oddychania korzeni. Również Tołpa i Czyżewski (1960, 1962) zajęli się biologicznie czynnymi substancjami gleb torfowych. Między innymi badali oni (1962) wpływ otrzymanych wyciągów na rozwój *Saccharomyces* sp., *Penicillium* sp. i *Merulius lacrymans*. Autorzy stwierdzili różny sposób reagowania poszczególnych grzybów pod wpływem stosowanych związków próchnicznych. Szereg innych prac omawia działanie tych substancji na bakterie. Kłosowska (1958) stwierdziła bakteriobójcze działanie borowin szczególnie pochodzących z torfowisk wysokich. Kłosowska i Pawłowska (1960) ustaliły, że wpływ hamujący na bakterie chorobotwórcze wywiera czynnik poza bakteryjny, którego działanie nie ulega zahamowaniu pod wpływem sterylizacji. Tołpa i Czyżewski (1962) wyodrębnili frakcję próchniczną działającą hamująco na rośliny wyższe, ale nie wykazującą żadnego wpływu na szereg bakterii. Bassalik (1957) oraz Bassalik i współpracownicy (1957, 1958, 1960) stwierdzili korzystny wpływ wyciągów torfowych na drobnoustroje pochodzące z tych gleb.

Stosunkowo szczupła ilość publikacji dotyczących wpływu różnych wyciągów próchnicznych na rozwój grzybów wpłynęła na podjęcie tego tematu przez autorów niniejszej pracy. Celem badań było stwierdzenie działania szeregu frakcji próchnicznych, uzyskanych nową metodą rozdziału Kotera i współpracowników (1963), na rozwój kilku gatunków grzybów.

MATERIAŁ I METODYKA

Wyjściowym materiałem do uzyskania frakcji próchnicznych był torf wysoki o stopniu rozkładu ponad 50% oraz torf niski o rozkładzie około 30%. W materiale tym oznaczono azot metodą Kiejdahla, fosfor metodą wanadowo-molibdenową, potas przy użyciu aparatu Schucknecht-Weibla, wapń metodą miareczkową, węgiel metodą Lichterfelda-Altena oraz siarkę według metody Eschki. Wyniki oznaczeń zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1 — Table 1

Zawartość niektórych składników chemicznych w badanych torfach w procentach suchej masy
Contents of some chemical ingredients in examined peats expressed in percentage of dry matter

Lp.	Rodzaj torfu Kind of peat	Substancja mineralna Mineral substance	N	C	S	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	pH w 1n BaCl ₂ pH in 1N BaCl ₂
1	Torf wysoki H ₅ High peat H ₅	4,69	1,06	52,12	0,05	0,05	0,03	0,15	2,25
2	Torf niski H ₃ Low peat H ₃	16,98	2,44	32,62	0,35	0,14	0,05	1,25	5,05

Celem sporządzenia wyciągów próchnicznych powietrznie suchy torf ekstrahowano mieszaniną alkoholu z benzenem dla usunięcia bitumin. Następnie za pomocą 0,1 n NaOH otrzymano wyciąg substancji próchnicznych, który za pomocą kwasu solnego rozdzielono na kwas fulwowy i huminowy. Z kolei kwasy te oczyszczono na jonitach „Sephadex“, po czym kwasy huminowe rozdzielono na pięć frakcji na specjalnych kolumnach wypełnionych preparatem „Sephadex“. Dokonywany dotychczas rozdział kwasów próchnicznych za pomocą chromatografii bibułowej nie wydawał nam się celowy z uwagi na zbyt małe ilości otrzymywanych roztworów oraz zbyt duże ilości odczynników, którymi traktuje się otrzymane wyciągi. Zastosowane kolumny natomiast pozwalały na otrzymanie znacznej ilości wyciągów, a jako środka wymywającego rozdzielone kwasy próchnicowe używano jedynie wody destylowanej. W wyniku tego postępowania otrzymano następujące frakcje:

frakcja 1 — wyciąg 0,1 n NaOH z torfu wysokiego

frakcja 2 — kwas fulwowy torfu wysokiego

frakcja 3 — kwas huminowy torfu wysokiego

frakcja 4 — kwas fulwowy torfu wysokiego oczyszczony na jonitach DEAE Sephadex A-50 i CM Sephadex C-50.

frakcje 5 — 9 — kwas huminowy torfu wysokiego przepuszczony przez jonity, a następnie rozdzielony na kolumnach z preparatem „Sephadex G-75“. Uzyskano pięć kolejnych frakcji od nr 5 do 9.

- frakcja 10 — wyciąg 0,1 n NaOH z torfu niskiego
frakcja 11 — kwas fulwowy torfu niskiego
frakcja 12 — kwas huminowy torfu niskiego
frakcja 13 — kwas huminowy torfu niskiego oczyszczony na jonitach „Sephadex“ (jak przy torfie wysokim).
frakcje 14 — 18 — kwas huminowy torfu niskiego oczyszczony na jonitach i rozdzielony na kolumnach (jak przy torfie wysokim). Uzyskano pięć kolejnych frakcji (nr nr 14 — 18).

W wyciągach powyższych oznaczono zawartość azotu, węgla i siarki. Wyniki podaje tabela 2.

Wyżej wymienione wyciągi sterylizowano przez filtrację przy użyciu sączków „Seitz EK“.

Do badań wzięto trzy następujące gatunki grzybów: *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. var. *herbarum* (Cda.) Sacc., *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. i *Botrytis cinerea* Pers. Wymienione grzyby hodowano na pożywce Czapek-Doxa z dodatkiem badanych wyciągów w ilości 1 i 5 ml na 100 ml pożywki. Zwracano szczególną uwagę, aby odczyn pożywki utrzymywał się w granicach pH 6,5—6,7. Grzyby hodowano na płytkach Petriego (w pięciu powtórzeniach) w temperaturze 20°C. Pomiary przyrostu grzybnego przeprowadzano aż do momentu pokrycia całej powierzchni płytek w tym wariantcie doświadczenia, w którym dany gatunek grzyba rozwijał się najszybciej. Stopień rozwoju kultur na poszczególnych pożywkach wyrażono w procentach przyjmując za 100 wartość otrzymaną dla pożywki kontrolnej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W sumie przebadano osiemnaście wyciągów i frakcji próchnicznych, które wykazały znaczne zróżnicowanie w działaniu na wzrost grzybnego. Pożywka z dodatkiem 1 ml (1%) wyciągów próchnicznych działała na ogół słabiej na wzrost badanych grzybów niż pożywka 5%. W przypadku *Fusarium avenaceum* var. *herbarum* (ryc. 1, A) silniejszy rozwój grzybnego, w porównaniu z pożywką kontrolną, obserwowano na 1% pożywce w trzech przypadkach, na 5% zaś w dziewięciu. Przy pozostałych wyciągach działanie roztworów było hamujące, przy czym w 1% pożywce uwidoczniło się silniej niż w 5%. Najsilniej na rozwój tego grzyba na pożywce 5% wpływał wyciąg nr 1, 5 i 13. W tych wypadkach działanie wyciągów było silnie stymulujące. Zastanawiający jest fakt, że wyciąg nr 3 stanowiący roztwór podstawowy, z którego uzyskano w wyniku rozdziału frakcję nr 5, nie wykazywał silnego działania stymulującego, natomiast na 5% pożywce z wyciągiem nr 5 uwidocznił się bardzo silny rozwój grzybnego. Pozostałe frakcje uzyskane przez rozdział wyciągu nr 3 działały bądź hamująco (nr 8 i 9), bądź bardzo słabo stymulująco (nr 6 i 7 — pożywka 5%). Natomiast kwas huminowy z torfu

Tabela 2 — Table 2

Zawartość azotu, węgla i siarki w badanych wyciągach próchnicznych w mg/100 ml
 Contents of nitrogen, carbon and sulphur in examined humic extracts expressed in mg/100 ml

Nr frakcji Fractions No.	Rodzaj frakcji Kind of fraction	N	C	S	N:S	C:S
Torf wysoki — High peat						
1	Wyciąg 0,1 n NaOH — Extract in 0,1 N NaOH	2,94	97,5	0,15	19,6	650,0
2	Kwas fulwowy — Fulvic acid	1,94	49,2	ślady	—	—
3	Kwas huminowy — Humic acid	2,85	92,4	0,10	28,5	924,0
4	Kwas fulwowy przepuszczony przez jonity	1,87	43,5	ślady	—	—
	Fulvic acid passed through ionites					
5	Kwas huminowy przepuszczony przez jonity i rozdzielony na „Sephadex’ie”					
	Humic acid passed through ionites and divided on “Sephadex”:					
	frakcja 1 — fraction 1	1,82	40,1	0,04	45,5	1002,5
6	frakcja 2 — fraction 2	1,05	67,5	0,07	15,0	964,3
7	frakcja 3 — fraction 3	1,94	81,2	0,09	21,5	902,2
8	frakcja 4 — fraction 4	2,90	73,8	0,05	58,0	1476,0
9	frakcja 5 — fraction 5	1,25	35,1	ślady	—	—
Torf niski — Low peat						
10	Wyciąg 0,1 n NaOH — extract in 0,1 N NaOH	11,05	102,7	0,31	35,6	331,2
11	Kwas fulwowy — Fulvic acid	4,75	57,0	0,23	20,6	248,0
12	Kwas huminowy — Humic acid	8,90	95,0	0,28	31,8	339,2
13	Kwas huminowy przepuszczony przez jonity	8,03	92,1	0,28	28,6	328,9
	Humic acid passed through ionites					
14	Kwas huminowy przepuszczony przez jonity i rozdzielony na “Sephadex’ie”:					
	Humic acid passed through ionites and divided on “Sephadex”:					
	frakcja 1 — fraction 1	4,27	38,5	0,11	38,8	350,0
15	frakcja 2 — fraction 2	5,29	71,0	0,17	31,1	417,1
16	frakcja 3 — fraction 3	7,43	91,3	0,21	35,3	434,7
17	frakcja 4 — fraction 4	6,02	49,0	0,16	37,6	306,2
18	frakcja 5 — fraction 5	4,15	35,2	0,12	34,5	293,3

Ryc. 1. Wpływ różnych frakcji próchnicznych na wzrost grzybów

Effects of various humic fractions on the growth of fungi.

A — *Fusarium avenaceum* var. *herbarum*, B — *Fusarium culmorum*, C — *Botrytis cinerea*

1 — kontrola; 2 — pożywka z dodatkiem frakcji próchnicznych w ilości 1%; 3 — pożywka z dodatkiem frakcji próchnicznych w ilości 5%.

1 — control; 2 — medium containing 1% of humic fractions; 3 — medium containing 5% of humic fractions.

niskiego (wyciąg nr 13) działał, zwłaszcza w wyższym stężeniu, silnie stymulująco, podczas gdy wyodrębnione z niego frakcje wykazywały zasadniczo działanie hamujące (wyciągi nr 14—18). Kwas fulwowy zarówno torfu wysokiego (nr 2), jak i niskiego (nr 11) na ogół nieznacznie stymulował rozwój grzybni. Porównując działanie 1% pożywki z 5% można stwierdzić jedynie w dwóch przypadkach (nr 1 i 2) zgodne działanie stymulujące, które zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia wyciągów w pożywce. Odmienne natomiast zachowują się wyciągi nr 3, 5, 6, 7, 11 i 13, które w wypadku 1% działają hamująco na wzrost grzybni, przy 5% zaś stymulująco w granicach od 7,9% (nr 3) do 203% (nr 5 i 13) w porównaniu z pożywką kontrolną. Trzy wyciągi (nr 4, 15 i 18), przy 5% pożywce, hamowały rozwój grzybni nieznacznie silniej niż przy 1%. Wyciąg nr 10 działał odwrotnie w porównaniu z pozostałymi frakcjami, bowiem na 1% pożywce stymulacja była nieco silniejsza niż na 5%. Pozostałe wyciągi (nr 8, 9, 12, 14, 16 i 17) hamowały rozwój grzybni, przy czym stopień zahamowania zmniejszał się w miarę wzrostu stężenia wyciągów w pożywce.

Odmienne natomiast działają badane wyciągi na rozwój grzyba *Fusarium culmorum* (ryc. 1, B). Pożywka 1% w 16 wypadkach stymulowała rozwój grzybni, zaś pożywka 5% w czternastu. Najbardziej interesujące było działanie wyciągów nr 6, 14 i 16, które przy słabszym stężeniu nieznacznie stymulowały, natomiast przy silniejszym hamowały wzrost *F. culmorum*. Można by przypuszczać, że wymienione wyciągi w słabym stężeniu mogą być wykorzystywane przez grzybnie, jeśli zaś występują w większych ilościach, działają na nią szkodliwie. Wyciąg nr 15 w słabym stężeniu nieznacznie hamował rozwój grzybni, natomiast w silniejszym (5%) działał stymulująco. W trzynastu wypadkach wyciągi działały stymulująco, przy czym w pożywkach z wyciągami nr 3, 4 i 9 działanie to malało wraz ze wzrostem stężenia, w pozostałych zaś (nr 1, 2, 5, 7, 8, 10—13 i 17) rosło. Spośród badanych frakcji próchnicznych jedynie wyciągi nr 1, 2 i 18 wykazywały analogiczne działanie zarówno na *Fusarium avenaceum* var. *herbarum*, jak i na *F. culmorum*.

Najsłabsze działanie wywierały wyciągi na *Botrytis cinerea* (ryc. 1, C), bowiem na 12 badanych frakcji w siedmiu przypadkach (nr 5, 8, 12, 14, 15, 17 i 18) wzrost grzybni był taki sam jak serii kontrolnej. Wyciąg nr 13 hamował rozwój grzyba, zaś wyciąg nr 16 stymulował go bez względu na stężenie. Wyciąg nr 6 działał stymulująco w słabych stężeniach, a w silniejszych nie wywierał wpływu na wzrost grzybni. Działanie natomiast wyciągu nr 9 było odwrotne. Jedynie wyciąg nr 7 w wyższym stężeniu działał stymulująco na wzrost wszystkich trzech badanych grzybów, w niższym zaś działanie to uwidoczniło się jedynie w przypadku *F. culmorum* i *B. cinerea*.

Porównując zawartość węgla, azotu i siarki (tabela 2) z biologicznym

działaniem uzyskanych frakcji próchnicznych nie można dopatrzeć się jakiegokolwiek wzajemnej zależności tych czynników.

Reasumując należy stwierdzić, że podstawowe wyciągi 0,1 n NaOH sporządzone zarówno z torfu wysokiego, jak i niskiego odznaczały się największą zawartością azotu, węgla i siarki. Wykazywały one również działanie stymulujące (ryc. 1, A, B) z tym, że wyciąg z torfu wysokiego działał na ogół silniej niż z torfu niskiego, mimo że ten ostatni był niewątpliwie bogatszy zarówno w azot, węgiel jak i siarkę.

Kwas fulwowy (ryc. 1, A, B, nr 2 i 11) uzyskany z obydwu wyżej wymienionych wyciągów, również wykazywał stymulację, z wyjątkiem kwasu fulwowego z torfu niskiego w stężeniu 1% (ryc. 1, A, nr 11), jednak nieco słabszą.

Podstawowe roztwory kwasów huminowych działały w różny sposób bądź stymulująco, bądź też hamująco, przy czym w niektórych wypadkach pożywka o mniejszej zawartości wyciągu działała silniej w jednym lub drugim kierunku (ryc. 1, nr 3 i 12). Świadczy to o złożonym charakterze tych związków, co potwierdzają wyniki uzyskane z rozbicia kwasów huminowych na preparacie „Sephadex“. Frakcje otrzymane z rozbicia podstawowych roztworów kwasów huminowych wykazują dużą rozbieżność w działaniu omówioną poprzednio (ryc. 1, nr 5—9 i 14—18). Faktem jest jednak zasługującym na podkreślenie, że uzyskane frakcje kwasów huminowych wykazują nie tylko różne działanie na poszczególne gatunki grzybów, ale i odmienny kierunek tego oddziaływania (stymulujący bądź hamujący), jak też zróżnicowany wpływ w zależności od stężenia.

Przepuszczenie kwasu fulwowego torfu wysokiego przez jonity powodowało w wypadku *Fusarium avenaceum* var. *herbarum* (ryc. 1 A, nr 4) silniejsze działanie hamujące (w porównaniu z kwasem fulwowym nieoczyszczonym na jonitach), natomiast u *F. culmorum* (ryc. 1 B, nr 4) osłabiało działanie stymulujące.

Przepuszczenie kwasu huminowego torfu niskiego przez jonity wpływało dodatnio na rozwój *F. avenaceum* var. *herbarum* i *F. culmorum* (ryc. 1 A, B, nr 13), natomiast nieznacznie osłabiało wzrost *B. cinerea* (ryc. 1 C, nr 13).

O bardzo zróżnicowanym wpływie poszczególnych wyciągów na badane gatunki grzybów świadczy fakt, że stymulację wzrostu grzybni u *F. avenaceum* var. *herbarum* stwierdzono w 33% przypadków, u *F. culmorum* aż w 80%, natomiast u *B. cinerea* stymulacja występowała w 25% przypadków, zaś w 67% w ogóle nie było żadnego działania badanych wyciągów.

Na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że otrzymane wyciągi są nadzwyczaj złożonymi związkami, które po rozdzieleniu mają odmienną strukturę chemiczną i właściwości w działaniu biologicznym. Być może, że zbyt szczupła analiza chemiczna tych zwią-

ków oraz nie dość precyzyjne jeszcze sposoby rozdziału nie pozwalają na wyodrębnienie w chwili obecnej zasadniczych frakcji silnie działających statycznie bądź stymulująco na badane grzyby. Być też może, że dobór innych gatunków grzybów mógłby dać jaśniejszy obraz mechanizmu działania poszczególnych frakcji. Stąd też badania nad tym zagadnieniem powinny być prowadzone nadal, gdyż dotychczasowe wyniki zachęcają do tego.

WNIOSKI

Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Wyodrębnione frakcje próchniczne działają na ogół inaczej na każdy z badanych gatunków grzybów. Najsilniejsze działanie stymulujące tych wyciągów stwierdzono dla *Fusarium culmorum* (80% przypadków), znacznie słabsze dla *F. avenaceum* var. *herbarum* (33%) i najslabsze dla *Botrytis cinerea* (25%).

2. Zarówno wyciągi 0,1 n NaOH, jak też i podstawowe roztwory kwasów huminowych wykazują często odmienne działanie aniżeli frakcje uzyskane z nich przy zastosowaniu podanego postępowania analitycznego.

3. Na ogół frakcje uzyskane z rozbitcia kwasu huminowego torfu wysokiego, a zwłaszcza niskiego działają hamująco na rozwój grzybów.

4. Frakcja nr 7 wyodrębniona z kwasu huminowego torfu wysokiego oraz kwas fulwowy obu rodzajów torfu stymulowały wzrost badanych grzybów.

5. Wzrost stężenia najczęściej podnosi aktywność biologiczną roztworu.

Katedra Chemii Rolnej WSR w Olsztynie
i Zakład Fitopatologii WSR w Olsztynie

(Wpłynęło: dn. 14.4.1965 r.)

SUMMARY

Eighteen humic fractions were isolated from high and low peat. Their effects on the development of *Fusarium avenaceum* var. *herbarum*, *F. culmorum* and *Botrytis cinerea* have been studied. It has been found that, on the whole, the isolated fractions influence each of the studied fungus species in a different way. The basic solutions of humic acids have frequently different effects than the fractions of the latter. On the whole, the extracts obtained from humic acid of high peat and particularly those of low peat retard the development of the fungi under study. Fulvic acid of both peat varieties stimulated the development of the fungi under study.

LITERATURA

Bassalik K., 1957, Zmiany w torfowisku wywołane odwodnieniem w świetle procesów mikrobiologicznych, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rol. 10:75—81.

- Bassalik K., Janota-Bassalik L., Niewiarowska I., Olczyk C., 1957, Badania nad wpływem nieznanых związków organicznych na urodzajność torfowisk zmeliorowanych, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rol.* 10:121—126.
- Bassalik K., Janota-Bassalik L., Niewiarowska I., Olczyk C., 1958, Badania nad wpływem nieznanых związków organicznych na urodzajność torfowisk zmeliorowanych. Cz. II, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rol.* 13:153—160.
- Bassalik K., Janota-Bassalik L., Olczyk C., Halweg H., 1960, Méthodes des recherches microbiologiques sur les substances actives des extracts de turbes, *Acta Microbiol. Pol.* 9:303—313.
- Gumińska Z., 1958, Utlenione związki próchniczne jako stymulatory kiełkowania nasion, *Acta Soc. Bot. Pol.* 26:501—522.
- Gumińska Z., Gumiński S., 1961, Der direkte und indirekte Einfluss mancher Fraktionen der Humusverbindungen auf den pflanzlichen Organismus, *Materiały z sympozjum „Humus a rostlina“*, Praga.
- Gumiński S., 1950, Badania nad warunkami i mechanizmem działania związków próchnicznych na organizm rośliny, *Acta Soc. Bot. Pol.* 20: 589—620.
- Gumiński S., Gumińska Z., 1953a, Dalsze badania nad mechanizmem działania próchnicy na organizm rośliny, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22:45—63.
- Gumiński S., Gumińska Z., 1953b, Chemiczne podstawy podobnego działania fizjologicznego próchnicy i wyciągów wodnych z liści niektórych gatunków roślin, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22:771—785.
- Gumiński S., Czerwiński W., Unger E., Bacowa A., 1955, Badania nad oddychaniem korzeni. Cz. I, *Acta Soc. Bot. Pol.* 24:723—731.
- Kłowska T., 1958, Badania nad bakteriobójczym działaniem borowin, *Acta Microbiol. Pol.* 7:45—50.
- Kłowska T., Pawłowska K., 1960, Próby wyjaśnienia bakteriobójczego działania borowin typu wysokiego, *Acta Microbiol. Pol.* 9:191—197.
- Koter M., Chodań B., Chodań J., Panak H., 1963, Próba zastosowania „Sephadex'u” do rozdziału substancji próchnicznych, *Zeszyty Naukowe WSR w Olsztynie* 15(265):343—353.
- Tołpa S., Czyżewski W., 1960, Działanie biologiczne wyciągów torfowych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rol.* 25:241—253.
- Tołpa S., Czyżewski W., 1962, Aktywność biologiczna frakcji torfowej wyróżnionej metodą chromatografii bibułowej, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rol.* 34:301—318.