ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
vol. XXXIX — nr 4
1970

Próba wyjaśnienia mechanizmu działania humianu sodowego na przyrost ilości komórek i suchej masy *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb.

An attempt to determine the mechanism of sodium humate on the multiplication of cells and increase in dry weight in cultures of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb.

St. KYĆ

Prace badające wpływ humianu na glony są raczej nieliczne. Do pionierskich badań odnośnie tego zagadnienia zalicza się dzisiaj prace Uspenskiego (1927) oraz Gumińskiego (1947). Uspenski zauważył, że związki humusowe wpływają pośrednio na rozmieszczenie glonów wód rzecznych i stojących. Gumiński natomiast wykazał, iż określone stężenia kwasów huminowych, różne dla różnych gatunków glonów, stymulowały podziały komórek. Autor ten (Gumiński 1950) stwierdził następnie, że związki próchniczne działały wyraźnie w warunkach gorszej wymiany gazowej. Spośród nowych prac należy wymienić osiągnięcia Lhotský'ego (1955, 1960), który badał wpływ wodnych wyciągów różnych rodzajów węgla brunatnego i związków próchnicznych na wzrost i rozwój glonów i stwierdził że wyciągi te stymulowały hodowlę 19 spośród 21 przebadanych gatunków glonów. Stwierdzono również (Květ 1958), że nawet bardzo niskie stężenia wodnych wyciągów różnych torfów powodowały szybsze rozmnażanie glonów. Prát (1960) zaobserwował, że pod działaniem związków humusowych zwiększała się prawie dwukrotnie masa i zawartość chlorofilu u *Cladophora*, a Stoklasa (1962) wykazał wpływ humianu na intensywność fotosyntezy u *Scenedesmus obliquus*.

Choć przytoczone prace zajmowały się raczej wpływem humianu na glony, a w mniejszym stopniu analizą tego wpływu, to nie mniej autorzy zastanawiali się nad mechanizmem działania tychże związków próchnicznych. Sugestie i hipotezy w tym zakresie wyczerpująco omawiają prace Gumińskiego (1968) i Badury (1965).

Celem pracy były próby zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu działania humianu sodowego na przyrost ilości komórek i suchej masy zielonego glonu planktonowego poprzez sprawdzenie: 1) jak działa humian na szybkość mnożenia się komórek i suchą masę przy różnym na-

tężeniu światła, 2) czy działanie humianu da się sprowadzić do działania zawartych w nim makro- względnie mikroelementów, 3) jak działa humian w różnych zakresach pH odbiegających od optymalnego, 4) jaki jest wpływ humianu przy niedostatku czy szkodliwym nadmiarze niektórych pierwiastków w pożywce.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na hodowli *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Gatunek ten wybrano ze względu na to, że rodzaj *Scenedesmus* obok *Chlorella* rośnie bardzo dobrze w laboratoryjnych hodowlach (Jankowski 1964) i jest przedmiotem wielorakich badań. *Sc. quadricauda* pochodził ze Zbioru Kultur Autotroficznych przy Czeskiej Akademii Nauk (Prát 1948).

Do hodowli stosowano pożywkę Uspenskiego (1927) używaną przez Gumińskiego (1950). Sporządzano ją na wodzie podwójnie destylowanej w aparacie ze szkła Sylvit używając soli oznaczonych jako „czyste do analizy". pH pożywki ustalano na poziomie 6,8 (Uspenski 1927; Gumiński 1950) w ciągu dwóch dni, a w razie potrzeby w ciągu dłuższego czasu. Stwierdzono, że pH pożywki normalnie nie ulegało zmianie po sterylizacji. W pewnych jednak przypadkach zachodziła konieczność dodatkowej stabilizacji pH. Do jego ustalenia stosowano roztwory 0,01 n NaOH względnie H_2SO_4. Pożywkę sterylizowano w autoklawie w ciągu 20 min. przy nadciśnieniu 1 atm.

Hodowlę przeprowadzano w kolbkach Erlenmayera ze szkła Sylvit o pojemności 100 ml, do których wlewano 25 ml pożywki (podobnie jak Péterfi, Pavel, Nagy-Tóth 1966). Przez cały czas prowadzonych doświadczeń utrzymywano „hodowlę podstawową", którą otrzymywano przez przeszczepianie co 15 dni 4 ml zawiesiny glonów do kolbki (300 ml) zawierającej 100 ml pożywki. Kultury doświadczalne szczepiono sterylnie wprowadzając do każdej kolbki hodowlanej po 1 ml dobrze wymieszanej (przez wytrząsanie) 15-to dniowej zawiesiny z kultury podstawowej (Lhotský 1955; Květ 1958). Doświadczenia prowadzono w pięciu równoległych powtórzeniach dla poszczególnych kombinacji. Każde doświadczenie było powtarzane przynajmniej dwukrotnie. W czasie trwania doświadczenia kolbki były ustawione w pokoju fototermostatowym o temp. 21 ± 2°C. Źródłem światła były lampy jarzeniowe umieszczone na ruchomej ramie nad stołem hodowlanym. Intensywność światła była mierzona na powierzchni stołu, na którym stały doświadczalne kolbki. Posługiwano się przy tym luksomierzem standartowym Carl Zeiss — Jena.

Wpływ humianu na rozwój *Scenedesmus* określano ilością komórek i suchą masą. Ilość komórek oznaczano metodą liczenia w komorze Fuchs-Rosenthala. Przed liczeniem zabijano glony dodając do każdej kolbki

4 krople mieszaniny alkoholu etylowego z formaliną (1 część formaliny 40% i 3 części alkoholu). Z każdej, dobrze wymieszanej mieszadełkiem elektrycznym zawartości kolbki pobierano pipetą czterokrotnie zawiesinę glonów do czterech komór liczeniowych. Kolonie dwukomórkowe czy pojedyncze komórki liczono jako 1/2, względnie 1/4 kolonii. Wynik ilości komórek podano jako średnią arytmetyczną z czterech powtórzeń w odniesieniu do 1/32 ml. Następnie, z tak uzyskanych średnich sporządzano z pięciu powtórzeń jednej i tej samej kombinacji jeszcze raz średnią arytmetyczną, która jest ostateczną daną liczbową charakteryzującą ilość komórek w danej kombinacji. Wyniki ilości komórek opracowano statystycznie metodą serii niezależnych 1 lub 2 zmiennych. Wnioskowano na podstawie analizy zmienności przez porównanie z testem „F" Snedecora dla poziomu ufności P = 0,05 (Ulińska 1957; Oktaba 1966). Dla każdego doświadczenia obliczano zmienność obiektów oraz czynników, współdziałanie czynników, przybliżenie średniego błędu różnicy średnich arytmetycznych oraz najmniejsze udowodnione różnice dla obiektów, czynników i współdziałania.

Suchą masę oznaczano w następujący sposób: zawartość kolbki doświadczalnej przesączano przez sączek z bibuły filtracyjnej i przemywano wodą zakwaszoną a następnie wodą lekko alkaliczną w celu rozpuszczenia i wymycia ewentualnie wytrąconych soli czy związków próchnicznych. Masę glonów suszono do stałej wagi w temp. najpierw 80°C, a następnie w 105°C.

Wielkość komórek mierzono przy pomocy okularu mikrometrycznego pod mikroskopem. Równocześnie przeprowadzano też inne obserwacje, jak zabarwienie komórek, wykształcenie ich itp.

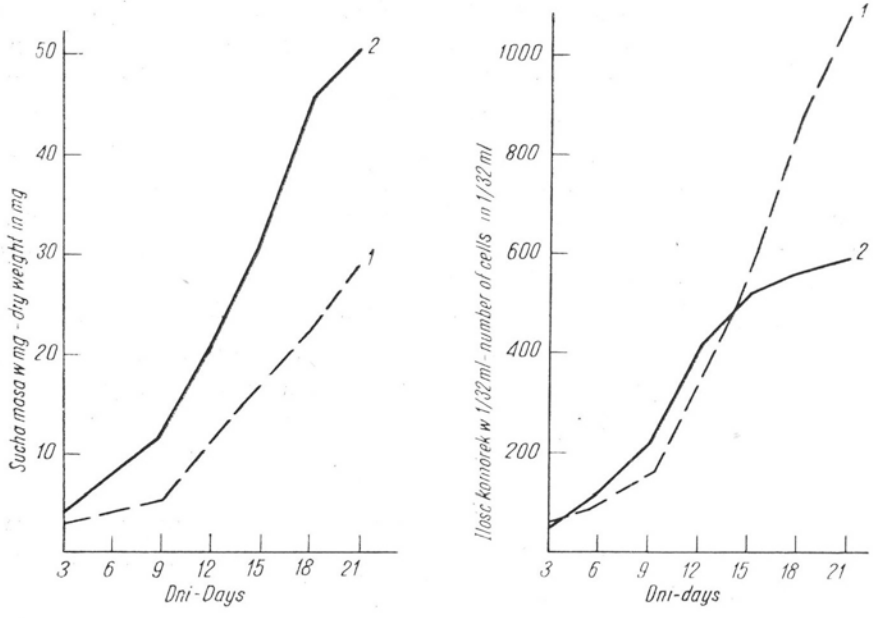
Roztwór Na-humianu naturalnego otrzymywano z kompostu według metody podanej przez Gumińskiego w pracach z r. 1950 i 1965. Na-humian syntetyczny otrzymywano ze skarmelizowanej glukozy (cz. d.a.) według metody podanej przez Hewitta (1952). Stężenie humianu określano na podstawie zawartości suchej masy (ustalonej przy 105°C.) w jednostce objętości. Popiół z humianu naturalnego otrzymywano przez spalanie humianu w piecu muflowym w temp. 550°C. Powstały popiół rozpuszczano w niewielkiej ilości stężonego HCl. Po całkowitym rozpuszczeniu zobojętniano roztwór do pH stosowanego w doświadczeniach.

PRZEBIEG I WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Wpływ światła i różnych stężeń Na-humianu

Doświadczenia, których wyniki podane są na wykresie 1, miały na celu wykazanie ewentualnych różnic w przyroście ilości komórek i masy glonów w poszczególnych dniach hodowli pomiędzy kulturami rosnącymi na samej pożywce a kulturami, które rosły na identycznej pożywce

z dodatkiem Na-humianu w stężeniu 100 mg/l. Doświadczenie trwało 21 dni. W odstępach 3 dni likwidowano część kultur, liczono ilość komórek i oznaczano suchą masę. Przeprowadzono trzy serie doświadczeń spośród których każda seria wykonana była w tych samych warunkach, ale przy różnej intensywności oświetlenia, mianowicie: 3000, 4000 i 5000 lx. Ponieważ różnice pomiędzy tymi trzema doświadczeniami były tylko ilościowe, dla przykładu podano na wykresie jedno doświadczenie wykonane przy natężeniu światła równym 3000 lx.



Wykres 1. Wpływ Na-humianu na mnożenie się i przyrost suchej masy *S. quadricauda*
1 — kontrola; *2* — Na-humian (100 mgl/l)

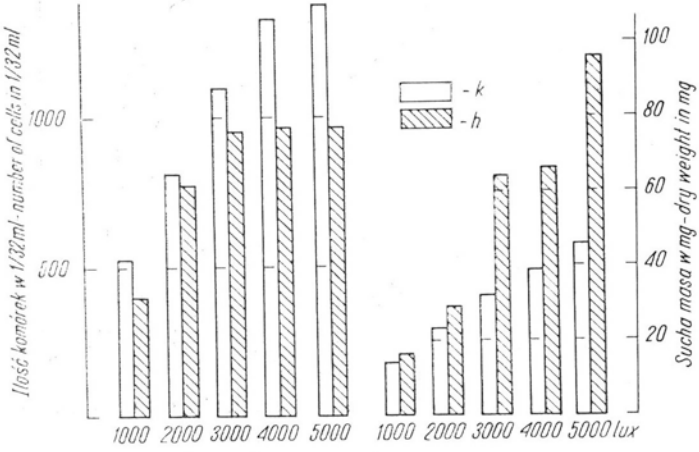
Graph 1. Effect of Na-humate on multiplication of cells and increase in dry weight
1 — control; *2* — Na-humate (100 mg/l)

Z wykresu 1 można odczytać, że intensywność przyrostu komórek w pożywce z dodatkiem Na-humianu do 15 dnia hodowli jest podobna do kontroli, ale ilość komórek w obecności Na-humianu jest nieco większa niż w samej pożywce. Obliczenia statystyczne wykazały istotne różnice w ilości komórek między odpowiednimi kombinacjami z humianem i bez humianu. Po 15 dniach hodowli intensywność przyrostu komórek w samej pożywce jest znacznie wyższa niż w kombinacjach z humianem; pomiary wykazały, że ilość komórek w samej pożywce w porównaniu z kombinacją z dodatkiem humianu gwałtownie wzrasta.

Zupełnie inaczej kształtują się przyrosty suchej masy. Przez cały przebieg doświadczenia sucha masa w kombinacji z humianem była większa niż w kombinacji bez humianu.

Wykres 2 demonstruje wyniki dotyczące wpływu światła o różnym natężeniu na przyrost masy i ilość komórek w 21 dniowej hodowli glonów. Glony hodowano w tych samych warunkach w pożywce z dodatkiem Na-humianu; kontrolę stanowiła pożywka bez humianu. Zastosowano następujące stężenia światła: 1000, 2000, 3000, 4000 i 5000 lx. Po 21 dniach hodowli doświadczenie likwidowano i wykonano pomiary.

Jak było do przewidzenia, ilość komórek zwiększała się ze wzrostem natężenia światła, co jest jednak wyraźniejsze dla kontroli. Zawsze ilość



Wykres 2. Wpływ różnych natężeń światła
k — kontrola; *h* — Na-humain (100 mg/l)

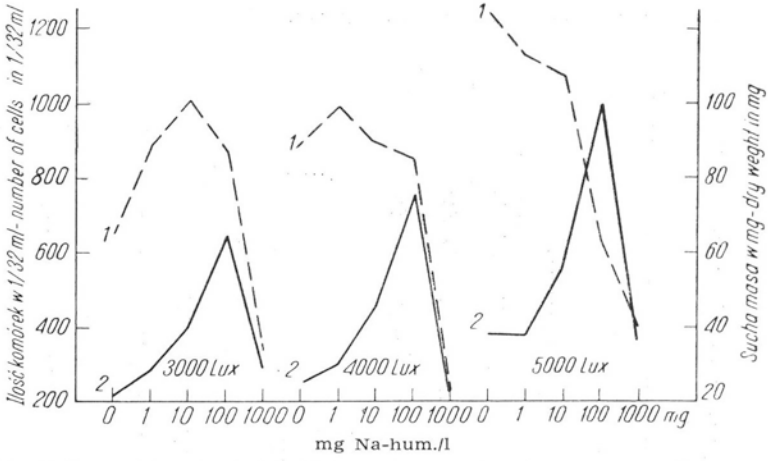
Graph 2. Effect of different intensity of light
k — control; *h* — Na-humate (100 mg/l)

komórek — przy takim samym oświetleniu — jest mniejsza tam, gdzie dodawano humian. Obliczenia statystyczne wykazały istotną różnicę zmienności dla humianu, naświetlenia i współdziałania humianu z naświetleniem. Ilość suchej masy zwiększa się ze wzrostem natężenia światła zarówno w kombinacji z humianem jak i bez humianu, z tym, że w kombinacji z humianem jej wartości są zawsze wyższe w stosunku do odpowiednich kombinacji bez humianu. Dodanie humianu, przy oświetleniu 5000 lx zwiększyło suchą masę o 106% w stosunku do kontroli przy takim samym oświetleniu.

Następne doświadczenia przeprowadzono, podobnie jak poprzednie, stosując zmienne warunki oświetlenia 3000, 4000 i 5000 lx z tym, że zastosowano różne stężenia humianu, a mianowicie: 1, 10, 100 i 1000 mg/l. Kontrolą była pożywka bez humianu. Wszystkie doświadczenia trwały 21 dni; nie były one przeprowadzone równocześnie, ale sukcesywnie. Wyniki doświadczenia przedstawia wykres 3.

Krzywe ilości komórek w zależności od stężenia Na-humianu przebiegają nieco odmiennie w poszczególnych doświadczeniach. Zaznacza się

wyraźnie wzrost ilości komórek w kontrolach tych trzech doświadczeń ze wzrostem natężenia światła. We wszystkich trzech przypadkach stężenie 1 g/l humianu bardzo wyraźnie hamuje mnożenie się komórek *Scenedesmus* w stosunku do kontroli. Przy tym stężeniu pożywka jest ciemnobrunatna. Natomiast przy niższych natężeniach światła zaznacza się stymulacja pod wpływem humianu; przy 3000 lx stężenie optymalne wynosi



Wykres 3. Wpływ różnych stężeń Na-humianu naturalnego przy różnym natężeniu światła

1 — ilość komórek; *2* — sucha masa

Graph 3. Effect of different concentrations of natural Na-humate at different intensity of light

1 — number of cells; *2* — dry weight

10 mg/l, przy 4000 lx 1 mg/l. Można by powiedzieć, że optymalne stężenie humianu maleje wraz ze wzrostem natężenia światła; przy 5000 lx stymulacja humianu zanika. Obliczenia statystyczne wykazały istotną różnicę zmienności dla humianu.

Krzywa natomiast przyrostu suchej masy posiada charakterystyczny i podobny przebieg we wszystkich trzech przypadkach. Stężenia Na-humianu 1, 10 i 100 mg/l stymulują przyrost suchej masy, a ostatnie z nich jest optymalnym stężeniem. Największy przyrost suchej masy obserwuje się przy natężeniu światła 5000 lx co potwierdza doświadczenie przedstawione na wykresie 2.

Interesujący jest fakt, że przy stężeniu Na-humianu 1000 mg/l jakkolwiek ilość komórek w stosunku do kontroli bardzo maleje, to ilość suchej masy niewiele się zmienia. Wniosek stąd wyraźny, że masa poszczególnych komórek rosnących w pożywce z dodatkiem humianu musi być większa. Komórki te wyglądały też na dużo większe niż w hodowlach kontrolnych.

Doświadczenie to pozwala również przypuszczać, że zabarwienie pożywki jak i zacienienie powodowane przez humian nie może tłumaczyć

ani jego stymulującego wpływu na namnażanie się komórek (ilość komórek wzrasta bowiem ze wzrostem natężenia światła), ani hamującego (im silniejsze światło tym niższe stężenia humianu działały już hamująco; por. wykres 3). Przemawia za tym dodatkowo wykonane doświadczenie którego wyniki są zebrane w tabeli 1. Światło, padające na kolbki z hodowlą, przechodziło przez filtr sporządzony z roztworu pożywki identycznej w jakiej prowadzono hodowlę, względnie z pożywki z dodatkiem Na-humianu o stężeniu 100 mg/l. Warstwa płynu stanowiącego filtr była takiej samej grubości jaką zajmuje pożywka w kolbce w czasie hodowli. Filtr sporządzono w taki sposób, że szalkę Petriego napełniono pożywką, względnie pożywką z humianem. Na szalce ustawiono krystalizator okrągły z cienkiego szkła owinięty białym (od wewnątrz) i czarnym (na zewnątrz) papierem. W krystalizatorze umieszczono kolbki hodowlane. Hodowla była oświetlona od dołu światłem o natężeniu 4000 lx. Doświadczenie trwało 9 dni.

Tabela 1 — Table 1

Wpływ filtru z roztworem Na-humianu
The effect of Na-humate solution used as a filter

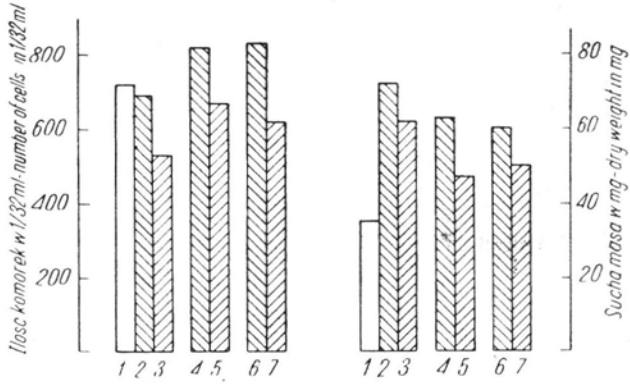
Hodowla: Culture:	Bez humianu Without humate		Z humianem With humate	
Filtr: Filter:	pożywka nutrient solution	pożywka + Na-humian nutrient solution + Na-humian	pożywka nutrient solution	pożywka + Na-humian nutrient solution + Na-humate
Ilość komórek w 1/32 ml Number of cells in 1/32 ml	413	298	347	451
Sucha masa w mg Dry weight in mg	7,5	5,8	13,4	8,5

Ilości komórek w tych układach są trudne do interpretacji. Dane suchej masy natomiast przedstawiają jasny obraz. Filtr sporządzony z pożywki z dodatkiem humianu spowodował w obu przypadkach (hodowla bez humianu i hodowla z humianem) pewne obniżenie suchej masy w stosunku do takich samych hodowli, które posiadały filtr tylko z samej pożywki. Jednakże w hodowli z humianem, nawet w przypadku zastosowania filtru humianowego, przyrost suchej masy był większy, niż w hodowli bez humianu, co jest zgodne ze wszystkimi dotychczasowymi doświadczeniami oraz wyklucza wpływ stymulujący humianu jako swoistego filtru świetlnego.

WPŁYW NIEKTÓRYCH MIKRO- I MAKROELEMENTÓW

Dla stwierdzenia czy Na-humian nie działa poprzez dostarczanie badanemu glonowi odpowiednich mikro- czy makroelementów wykonano dwie serie doświadczeń: 1) z popiołem otrzymanym ze stosowanego w doświadczeniach Na-humianu i 2) z mikroelementami.

Wpływ popiołu. Trzy różne humiany naturalne (oznaczone jako I, II i III), otrzymane w różnym czasie, w taki sam sposób, z takiego samego, ale nie indentycznego materiału (kompostu), spalono oddzielnie. Otrzymane popioły, po rozpuszczeniu, dodawano w takiej ilości jaką by wprowadzono wraz z humianem do hodowli. Wobec tego w kombinacjach



Wykres 4. Wpływ popiołu otrzymanego ze spalenia Na-humianu

1 — kontrola; *2* — Na-humian I; *3* — popiół z Na-humianu I; *4* — Na-humian II, *5* — popiół z Na-humianu II; *6* — Na-humian III, *7* — popiół z Na-humianu III

Graph 4. Effect of asches obtained from the burnt out Na-humate

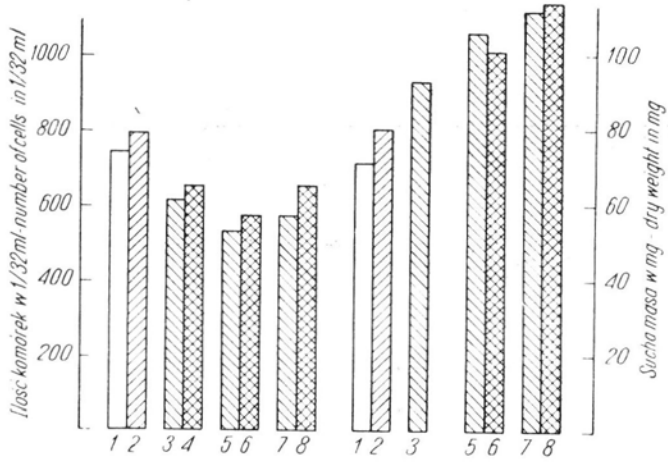
1 — control; *2* — Na-humate I; *3* — ashes from Na-humate I; *4* — Na-humate II; *5* — ashes from Na-humate II; *6* — Na-humate III; *7* — ashes from Na-humate III

z humianem i z popiołem (otrzymanym z danego humianu) znajdowała się taka sama ilość tych samych związków mineralnych. Doświadczenie trwało 18 dni, oświetlenie wynosiło 4000 lx. Miało ono ponadto na celu porównanie działania różnych humianów i upewnienie się, czy stosowany stale ten sam humian nie powoduje efektu pochodzącego z przypadkowego składu materiału wyjściowego, czy też z zabiegów pośrednich przy procesie otrzymywania Na-humianu. Wyniki doświadczenia przedstawia wykres 4.

Dodatek humianu II i III nieznacznie stymulował ilość komórek w stosunku do kontroli. Ilość komórek w kombinacjach z dodatkiem popiołu była we wszystkich przypadkach nieco mniejsza od kontroli i odpowiadających sobie kombinacji z humianem. Obliczenia statystyczne wykazały, że różnice spowodowane dodaniem popiołu, humianu jak i współdziałaniem popiołu z humianem są istotne. Kombinacje z dodanymi humianami posiadały zawsze większą suchą masę w stosunku do kontroli

(choć różną między sobą). Kombinacje z popiołem dały niższe wartości suchej masy w stosunku do odpowiednich kombinacji z humianem, ale wyższe w stosunku do kontroli. Szczególnie wyraźnie zaznaczyło się to w przypadku popiołu otrzymanego z Na-humianu I. Możliwe, że wchodziło tu w grę żelazo, ponieważ popiół ten miał zabarwienie wyraźnie pomarańczowe.

Ostateczny wynik doświadczenia wskazuje na to, że działania Na-humianu nie da się sprowadzić wyłącznie do działania zawartych w nim związków mineralnych; jednakże obecność ich w humianie niewątpliwie odgrywa pewną rolę.



Wykres 5. Wpływ Na-humianu naturalnego i mikroelementów

1 — control; *2* — microelements; *3* — Na-humate IV; *4* — Na-humate IV + microelements; *5* — Na-humian I; *6* — Na-humian I + mikroelementy; *7* — Na-humian II; *8* — Na-humian II + mikroelementy

Graph 5. Effect of natural Na-humate and of microelements

1 — control; *2* — microelements; *3* — Na-humate IV; *4* — Na-humate IV + microelements; *5* — Na-humate I; *6* — Na-humate I + microelements; *7* — Na-humate II; *8* — Na-humate II + microelements

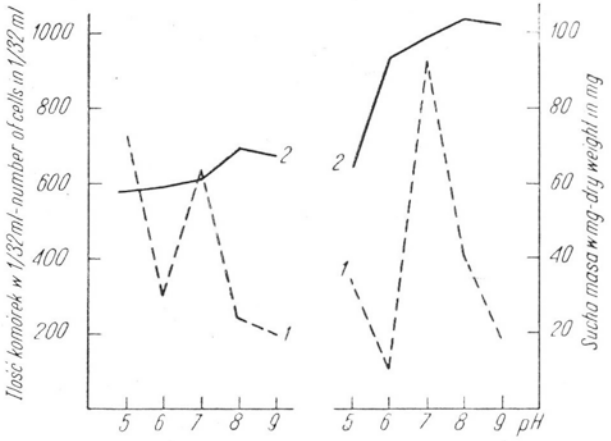
W p ł y w m i k r o e l e m e n t ó w. Ponieważ do doświadczeń używano odczynników cz. d.a., wodę podwójnie destylowaną ze szkła itp. i nie dodawano mikroelementów do pożywki, należało sprawdzić, jaki efekt wywoła ich dodanie, zwłaszcza w porównaniu z Na-humianem. Takie doświadczenie dałoby również odpowiedź, o ile można przypisać działanie humianu zawartym w nim mikroelementom. W związku z tym przeprowadzono doświadczenie z dodaniem mikroelementów w układzie A—Z Hoaglanda w ilości 1 ml/l (L h o t s k ý 1955; P é t e r f i, P a v e l, N a g y - T ó t h 1966). Analogicznie jak w poprzednim doświadczeniu zastosowano trzy humiany (oznaczone jako I, II i IV). Doświadczenie trwało 21 dni przy oświetleniu 4000 lx i pH 6,9. Wyniki przedstawione są na wykresie 5.

Przy dodawaniu mikroelementów do pożywki dało się zauważyć niewielkie podwyższenie ilości komórek w stosunku do kontroli. Dodawanie mikroelementów wraz z Na-humianem do hodowli spowodowało pewne podwyższenie ilości komórek w stosunku do hodowli z pożywką i humianem, ale było ono we wszystkich przypadkach niższe niż w kontroli (bez humianu). Obliczenia statystyczne wskazują na istotną różnicę zmienności różnych kombinacji mikroelementów. W stosowanych kombinacjach z Na-humianem sucha masa była we wszystkich przypadkach wyższa niż w kontroli. Dodanie mikroelementów do serii z humianem nie miało większego znaczenia dla przyrostu masy.

Wpływ pH środowiska

Z wielu obserwacji (Uspenski 1927) i prac eksperymentalnych (Uspenski i Uspenskaja 1925; Uspenski 1927, Pringsheim 1954) wiadomo, że różne gatunki glonów mają różne wymagania pod względem środowiska pH, a granica ta jest rozpięta od pH 5 do 9. Z drugiej strony badania Lhotský'ego (1955) wskazywały, że związki humusowe mają nieco odmienny wpływ na rozwój glonów w zależności od pH środowiska hodowli. Zależność działania humianu od pH środowiska nastręczała też odmienną interpretację mechanizmu tego wpływu (np. Mainx 1927; Badura 1965). Dane te wskazywałyby na konieczność przeprowadzenia doświadczenia z hodowlą *Scenedesmus* w różnych warunkach pH.

Równoległe kombinacje z humianem naturalnym i bez humianu posiadały wartości pH: 5, 6, 7, 8 i 9. pH stabilizowano przez szereg dni (przy pH 8 i 9 wytrącały się nieco sole z pożywki w obu kombinacjach). Doś-



Wykres 6. Wpływ Na-humianu naturalnego przy różnym pH pożywki
1 — kontrola; *2* — Na-humian (100 mg/l)

Graph 6. Effect of natural Na-humate with respect to pH nutrient solution
1 — control; *2* — Na-humate (100 mg/l)

wiadczenie trwało 21 dni przy oświetleniu 4000 lx. Stężenie dodawanego Na-humianu wynosiło 100 mg/l. Wyniki doświadczenia przedstawia wykres 6.

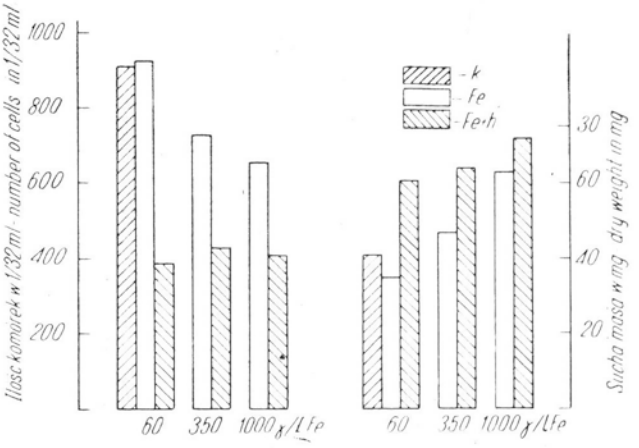
Wystąpiły wyraźnie dwa optima przy pH 5 i pH 7 w serii bez humianu. Natomiast krzywa ilości komórek z humianem nie wykazuje tych wahań i lekko wzrasta ze wzrostem pH; przebiega w pobliżu wartości optymalnej pH 7 w serii kontrolnej. Obliczenia statystyczne wykazały istotną różnicę zmienności dla Na-humianu, pH i współdziałania Na-humianu i pH. Krzywa ilości suchej masy w serii kontrolnej wykazuje również duże wahania i charakter jej jest zbliżony do krzywej ilości komórek w analogicznej serii. Natomiast krzywa suchej masy hodowli z humianem ma przebieg odmienny, nie wykazuje wielkich wychyleń, posiada tendencję wzrastającą ze wzrostem pH, jej wartości są zawsze wyższe od odpowiednich wartości kontrolnych. Najniższą stymulację natomiast obserwuje się w warunkach optymalnych dla kontroli.

Powyższe dane pozwalają sądzić, że Na-humian działał tym bardziej korzystnie im bardziej niewłaściwe było pH środowiska.

Wpływ żelaza

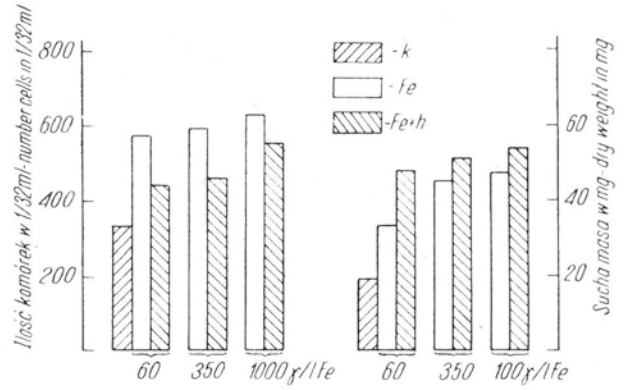
Zagadnienie żelaza przy działaniu humianu na glony ma szczególne znaczenie. Wskazują na to prace Uspenskiego (1927), który wykazał, że rozmieszczenie glonów w zbiornikach wodnych zależy od zawartego w nich w dostępnej formie żelaza. Twierdził on, że żelazo związane przez związki organiczne (m. in. humian) działa mniej szkodliwie na glony. Badania Gumińskiego i współaut. (1965) oraz Czerwińskiego (1967) dowiodły, że Fe dzięki tworzącemu się kompleksowi „humian-żelazo" nie wytrąca się tak łatwo z fosforanami i dłużej utrzymuje się w pożywce, przez co jest łatwiej dostępne dla rośliny. Ponieważ rozpuszczalność używanego $Fe_2(SO_4)_3$ jest zależna bardzo wyraźnie od pH, należało zatem przebadać wpływ różnych dawek Fe w obecności i nieobecności humianu w różnych wartościach pH. Zastosowano trzy przedziały pH, mianowicie pH 5, 6 i 7. trzy dawki żelaza 60, 350 i 1000 γ/l, a humianu dodawano w stężeniu 100 mg/l. Doświadczenia trwały 18 dni. Ponieważ nie były one przeprowadzane równocześnie, dlatego otrzymane wartości bezwzględne nie mogą być bezpośrednio porównywalne. Wyniki doświadczeń przedstawione są na wykresach 7, 8 i 9.

Przy wszystkich trzech układach pH, ilości komórek w kombinacjach z pożywką i samym żelazem są nieco większe niż w takiej samej pożywce z żelazem, ale z dodatkiem Na-humianu. Obliczenia statystyczne wykazują istotną różnicę zmienności dla Na-humianu, ilości żelaza i współdziałania humianu z żelazem przy pH 5. Przy pH 6 różnice te były istotne dla humianu, a nie udowodnione dla ilości żelaza i współdziałania humianu z żelazem. W przypadku pH 7 różnice zmienności dla humianu



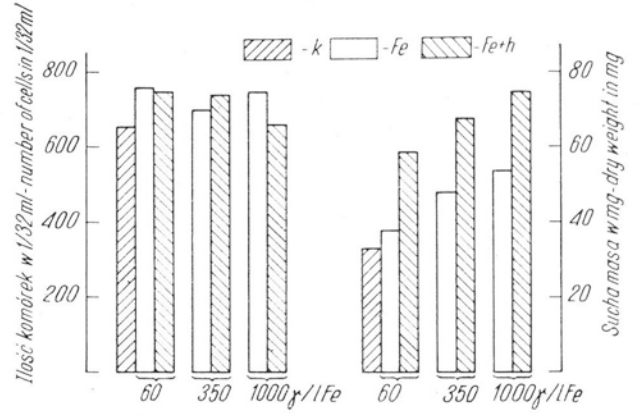
Wykres 7. Wpływ Fe i Na-humianu naturalnego przy pH 5
k — kontrola; *Fe* — żelazo; *Fe+h* — żelazo + humian (100 mgl/l)

Graph 7. Effect of Fe and natural Na-humate at pH 5
k — control; *Fe* — iron; *Fe+h* — iron + humate (100 mg/l)



Wykres 8. Wpływ Fe i Na-humianu naturalnego przy pH 6 (Objaśnienia jak na wykresie 7)

Graph 8. Effect of Fe and natural Na-humate at pH 6 (for legend see Graph 7)

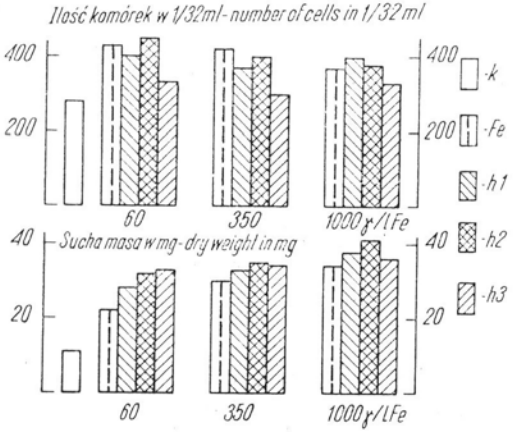


Wykres 9. Wpływ Fe i Na-humianu naturalnego przy pH 7 (legenda jak przy wykresie 7)

Graph 9. Effect of Fe and natural Na-humate at pH 7 (for legend see Graph 7)

były nie udowodnione, a dla żelaza istotne. We wszystkich trzech układach pH sucha masa glonów była zawsze większa przy dodawaniu Na-humianu w porównaniu do pożywek o takiej samej ilości Fe. Ze wzrostem zawartości Fe wzrasta ilość suchej masy w każdym z trzech przypadków zarówno w kombinacji z humianem, jak i bez humianu. Różnice w ilości suchej masy hodowli bez humianu i z humianem (przy takiej samej dawce Fe) są większe, gdy dawka żelaza jest mniejsza, a mniejsze gdy dawka żelaza jest większa, co można odczytać na wykresach 7, 8 i 9.

Ponieważ sztuczny Na-humian nie zawiera żelaza i mikroelementów, a z badań Erdtmana (1955) oraz Badury (1965) wiadomo było o podobnym efekcie fizjologicznym działania humianu sztucznego i naturalnego na rośliny, wskazane było sprawdzić wpływ Fe na hodowlę przy użyciu tego humianu. W tym celu przeprowadzono doświadczenia, w których zastosowano dwie dawki humianu syntetycznego, mianowicie 10 i 100 mg/l i dla porównania humian naturalny w stężeniu 100 mg/l. Czas trwania doświadczenia wynosił 9 dni. pH ustalono na poziomie 7. Oświetlenie hodowli było równe 4000 lx. Wyniki doświadczenia są przedstawione na wykresie 10.



Wykres 10. Wpływ Fe w obecności Na-humianu naturalnego i sztucznego
k — kontrola; *Fe* — żelazo; *h1* — humian syntetyczny (10 mg/l) + Fe; *h2* — humian syntetyczny (100 mg/l) + żelazo; *h3* — humian naturalny (100 mg/l) + żelazo

Graph 10. Effect of Fe in presence of natural and synthetic Na-humates
k — control; *Fe* — iron; *h1* — synthetic humate (10 mg/l) + Fe; *h2* — synthetic humate (100 mg/l) + Fe; *h3* — naturale humate (100 mg/l) + Fe

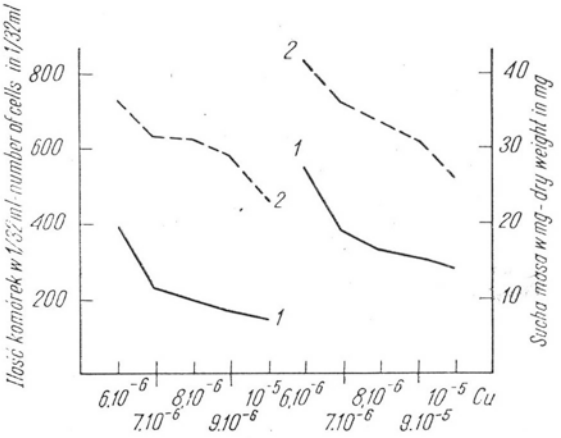
Dane zawarte na wykresie 10 nie pozwalają na zwięzłe scharakteryzowanie wpływu humianu syntetycznego na ilość komórek w stosunku do kontroli bez humianu. Odnośne wyniki suchej masy są natomiast bardziej czytelne. We wszystkich kombinacjach z humianem sucha masa była większa niż w kontroli bez humianu przy trzech badanych dawkach żelaza. Przyrost suchej masy dla humianu syntetycznego jest nieco większy przy jego wyższym stężeniu (100 mg/l). Humian naturalny spowodo-

wał mniej więcej taki sam efekt w przyroście suchej masy co i humian syntetyczny stosowany w takiej samej dawce.

Ze wzrostem stężenia żelaza wzrastała ilość suchej masy zarówno w kombinacjach z Na-humianem naturalnym i sztucznym, jak i bez tych związków. Natomiast wzrost ten w kombinacjach z humianem tak sztucznym jak i naturalnym w stosunku do pożywki z Fe ale bez humianów maleje zawsze ze wzrostem dawki żelaza. Innymi słowy: efekt dodania humianu jest tym mniejszy im większa (w badanych granicach) jest dawka żelaza.

Wpływ miedzi

Ponieważ w poprzednim doświadczeniu z żelazem nie udało się ze względów praktycznych przebadać wpływu humianu przy ponadoptymalnych dawkach żelaza (przy dużych dawkach żelaza wytrącały się tak sole, jak i humian), interesujące stało się przeprowadzenie doświadczenia z takim pierwiastkiem, którego niewielkie stężenia nie wpływałyby na samą pożywkę, a wykazywałyby trujące działanie na hodowlę glonów. Rolę taką spełniają jony Cu^{++}, których toksyczne działanie przy stężeniu 10^{-7}M stwierdził Greenfield (1942) na glonach *Chlorella vulgaris*.



Wykres 11. Wpływ Cu w obecności Na-humianu syntetycznego
1 — kontrola; *2* — Na-humian (100 mg/l)

Graph 11. Effect of Cu in presence of synthetic Na-humate
1 — control; *2* — Na-humate (100 mg/l)

Dla zbadania tego zagadnienia przeprowadzono doświadczenie, w którym użyto następujących stężeń Cu: $6 \cdot 10^{-6}$, $7 \cdot 10^{-6}$, $8 \cdot 10^{-6}$, $9 \cdot 10^{-6}$ i 10^{-5}M. Trwało ono 21 dni przy oświetleniu 4000 lx i pH równym 6,8. Posiadało dwie kombinacje: z Na-humianem syntetycznym i bez humianu. Wyniki doświadczenia przedstawia wykres 11. Krzywa ilości komórek tak dla kontroli, jak i dla humianu wykazuje tendencję spadkową ze

wzrostem stężenia Cu, ale wartości dla kombinacji z Na-humianem są wyższe niż wartości kontroli. Obliczenia statystyczne wykazały istotną różnicę zmienności dla Na-humianu i stężenia Cu. Krzywe ilości suchej masy przedstawiają się podobnie, a więc ze wzrostem stężenia Cu spadają, ale wartości w kombinacji z humianem są znacznie wyższe niż w kontroli o takim samym stężeniu Cu.

Jeśli obliczy się w % przyrost ilości komórek i suchej masy dla kombinacji z humianem w stosunku do kontroli i porówna się wyniki między sobą, to zauważy się, że działanie Na-humianu widoczniejsze jest w bardziej niekorzystnych stężeniach Cu dla hodowli — oczywiście — tylko do pewnych granic.

Tabela 2 — Table 2

Wpływ Na-humianu syntetycznego na wielkość cenobii (średnia z 5 powtórzeń)
The effect of synthetic Na-humate on the size of cenobies (mean values obtained from 5 replications)

Stężenie Cu Concentration Cu	Szerokość cenobii w μ width of cenobies in μ		Długość cenobii w μ length of cenobies in μ	
	pożywka nutrient solution	pożywka + Na-humian nutrient solution + Na-humate	pożywka nutrient solution	pożywka + Na-humian nutrient solution + Na-humate
0	23,9	25,2	31,9	32,9
5×10^{-6} M	26,5	26,8	33,4	35,4
10^{-5} M	25,7	28,1	33,0	37,9
5×10^{-5} M	26,0	27,8	31,1	39,5
Średnia Mean	25,5	26,9	32,2	36,4

Obserwacje optyczne czynione w czasie wszystkich doświadczeń wskazywały na to, że zawsze w kombinacjach z humianem komórki Scenedesmus były większe. Dla przekonania się, czy istotnie tak jest, w omawianym doświadczeniu w którym różnice wielkości komórek wydawały się stosunkowo niewielkie, przeprowadzono pomiary cenobii czterokomórkowych; mierzono ich długość (suma szerokości czterech komórek) i szerokość. (Z każdego powtórzenia było mierzonych sto kolonii na przypadkowo wybranych polach (Komárek, Simmer 1965). Dalsze postępowanie i opracowanie statystyczne wyników było podobne jak przy liczeniu ilości komórek. Wyniki są podane w tabeli 2. Obliczenia statystyczne wykazały, że różnice w długości i szerokości cenobii spowodowane dodaniem humianu lub miedzi, jak i współdziałania miedzi i humianu są istotne. Wyniki te są zgodne z osiągnięciami innych autorów (Prát 1960; Sladký i Tichý 1959, Opatrná-Fischerowá 1964; Sladký 1965).

DYSKUSJA WYNIKÓW

W określonych warunkach stężenia humianu i pH wpływ Na-humianu w początkowej fazie rozwoju hodowli *Scenedesmus quadricauda* (do 15 dni) objawiał się lekką stymulacją mnożenia się komórek, a potem hamowaniem ich przyrostu (wykres 1 i 2). W każdym natomiast przypadku dodawanie humianu zwiększało suchą masę przez cały czas przebiegu doświadczenia. Pod koniec doświadczenia przyrost ten przewyższał niekiedy ponad 100% suchą masę w kontroli. Przeprowadzone doświadczenia (wykres 3, tabela 1) wykazały, że tego stymulującego działania humianu nie można wytłumaczyć ograniczaniem ilości światła przechodzącego przez warstwę pożywki, w której się znajduje, ani też jego działaniem o charakterze specyficznego filtru (por. Lhotský 1955; Pringsheim 1935, 1936). Nie można też tłumaczyć działania humianu przypadkowym składem materiału wyjściowego, z którego został otrzymany, czy też własnościami nabytymi w czasie zabiegów pośrednich przy procesie otrzymywania. Taką ewentualność wykluczają doświadczenia (wykres 4 i 5), w których zastosowano różne humiany, przygotowane oddzielnie, z takiego samego, ale nie identycznego materiału. Wszystkie z nich wykazywały stymulujące, aczkolwiek nie jednakowo silne działanie.

Należy również wykluczyć możliwość działania humianu jedynie poprzez zawarte w nim pierwiastki. Popiół bowiem otrzymany z różnych humianów (wykres 4), a także mikroelementy (wykres 5) dodane do pożywki powodowały nieznaczną stymulację. Dodany natomiast w obu przypadkach humian syntetyczny, a więc taki który nie zawiera żadnych dodatkowych pierwiastków (wykres 10 i 11), zwiększał stymulację bardzo wyraźnie, nie mniej niż naturalny.

Wpływ Na-humianu objawiał się szczególnie wtedy, kiedy pH pożywki było najbardziej niekorzystne dla rozwoju *Scenedesmus* (wykres 6). Fakt ten można wytłumaczyć uwzględniając sorpcyjne własności związków huminowych stwierdzone przez Górskiego (1956), Kadnera (1962), Michajluka (1962) i innych. Błona protoplazmatyczna komórki glonu mianowicie, przy niższych wartościach pH może wysycać się jonami H^+ co utrudnia sorpcję kationów ze środowiska na jej powierzchni. Jeśli jednak w takim środowisku znajdzie się humian, który jest układem jonowymiennym, to może on adsorbować z powierzchni błony jony H^+, a oddawać z własnego kompleksu komórce jony makro- czy mikroelementów. Następuje zatem wymiana jonów między błoną a kompleksem sorpcyjnym kwasów huminowych. Tego rodzaju wymianę jonów między powierzchnią korzeni roślin a cząsteczkami gliny stwierdzili w pracach eksperymentalnych Jenny i Overstreet (1939). Badura (1966) w badaniach nad wpływem pewnych kationitów i anionitów na proces fermentacji alkoholowej drożdży stwierdził, że niektóre z nich miały stymulujące działanie. Działanie to było silniejsze, jeśli uprzednio

były one nasycone solami mineralnymi i gdy pH pożywki odbiegało znacznie od optymalnego. Wpływ tych układów jonowymiennych był bardzo podobny do wpływu Na-humianu na drożdże hodowane w takich samych warunkach (Badura 1965).

Powyższe wyniki sugerują, że humian na skutek własności sorpcyjnych i jonowymiennych ułatwia pobieranie kationów utrudnione przez nieodpowiednie pH pożywki. Wyniki te zgodne są z badaniami Ellenberga (1958). W rozważanym przypadku nie można przyjąć sugestii Mainxa (1927) jakoby związki próchniczne działały korzystnie poprzez swoje własności buforujące w stosunku do środowiska, ponieważ pH było ustalone po dodaniu humianu.

Doświadczenia z wpływem żelaza na rozwój hodowli *Scenedesmus* (wykres 7, 8 i 9) wykazały, że stymulujący efekt humianu stwierdzany w obecności żelaza jest tym wyraźniejszy im dawki żelaza odbiegają bardziej od wartości optymalnych dla rozwoju *Scenedesmus*. Podobne wyniki otrzymano w pracach nad glonami (Lhotský 1955), jak i roślinami wyższymi (Gumiński i współaut. 1965; Czerwiński 1967; Aso i Sakai 1963; Badura 1965; Tatkowska 1970). Korzystne działanie humianu dla rozwoju *Scenedesmus* polega prawdopodobnie w tym przypadku na udostępnianiu badanemu glonowi żelaza. Oczywiście, miałoby to związek z sorpcyjnymi i jonowymiennymi własnościami humianu. Przypuszczenie takie wydaje się uzasadnione w świetle badań które wykazały, że pewne frakcje humianu posiadają różną zawartość żelaza (Unger 1965, oraz Gumiński i Sulej 1967), a także wiążą dodawane do nich kationy żelazowe z różną siłą. Otóż, najkorzystniej działały na wzrost pomidorów i drożdży (Gumiński i Sulej 1967) te frakcje, które wiązały dużo żelaza, a równocześnie łatwo oddawały je kupferonowi będącemu chelatyzatorem wiążącym żelazo. Badania te zatem potwierdzają przypuszczenie, że korzystne działanie humianu polega m. in. na udostępnianiu roślinie żelaza.

W związku z powyższymi rozważaniami prawdopodobne jest, że humian adsorbował nadmiar miedzi z pożywki. Kompleks próchniczno-miedziowy określany jest jako szczególnie trwały (Broadbent 1957). Dawki miedzi, które hamowały mnożenie się komórek i suchą masę, okazywały się mniej szkodliwe w obecności humianu (wykres 11). Ponadto większy wpływ humianu zaznaczył się przy większym stężeniu miedzi.

Zarówno te ostatnie doświadczenia, jak i poprzednie nad wpływem humianu w różnych pH pożywki, potwierdzają możliwość pośredniego wpływu humianu na metabolizm wyrównując ilościowe stosunki pobieranych jonów. Dowodem tego mogą być jeszcze zaobserwowane, następujące fakty. W każdym układzie, gdzie był dodawany humian, komórki posiadały barwę intensywnie zieloną (co wskazuje na większy poziom chlorofilu), podczas gdy w kontroli zabarwienie ich było słabo jasnozielone (por. Prát 1960; Sladký 1959a, 1959b, 1965; Sladký i Tichý 1959).

Z literatury (Badurowa, Gumiński, Suder-Moraw 1967; Sienko i Szczypek 1969) wiadomo, że humian wpływał na poziom chlorofilu poprawiając stosunek P/Fe w roślinie. Kolonie w hodowli z dodatkiem humianu posiadały zawsze po cztery komórki, natomiast kolonie w kontroli, zwłaszcza w poza optymalnym pH, braku żelaza czy nadmiarze miedzi, występowały bardzo często w postaci dwóch komórek. Może to także wskazywać, iż związki humusowe wpływają na jakiejś drodze na ogólny metabolizm komórek. Co więcej, jeśli w pewnych układach kontrolnych komórki były zniekształcone, to dodatek Na-humianu wpływał na ich normalne wykształcenie.

Zastosowanie humianu syntetycznego wykazało, że w działaniu jego nie chodzi o zawarte w nim jakieś witaminy czy ciała wzrostowe. Ponieważ wpływ humianu był badany na kulturach sterylnych *Scenedesmus*, dlatego zostało w tym przypadku wykluczone także jego pośrednie działanie poprzez mikroorganizmy.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania nad wpływem Na-humianu na namnażanie się komórek i suchą masę hodowli *Scenedesmus quadricauda* pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków.

1. Wpływu Na-humianu nie można wytłumaczyć jedynie wprowadzeniem do hodowli wraz ze związkami humusowymi makro- czy mikroelementów.

2. Nie da się wytłumaczyć jego działania ograniczaniem światła przez rozpuszczone w pożywce barwne związki próchniczne, ani działaniem tych związków w pożywce jako specyficznego filtru.

3. Istotnym czynnikiem działającym w humianie nie są witaminy czy ciała wzrostowe.

4. Humian w niekorzystnych warunkach hodowli (poza optymalne pH, brak Fe, nadmiar Cu) umożliwia przyrost suchej masy właściwy dla warunków optymalnych.

5. Stymulacja przyrostu ilości komórek wywołana przez humian zachodzi przy niższych stężeniach tej substancji i trwa krócej aniżeli stymulacja suchej masy.

Panu Profesorowi dr S. Gumińskiemu, Kierownikowi Zakładu Fizjologii Roślin Instytutu Botaniki i Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, serdecznie dziękuję za propozycję problemu powyższej pracy oraz cenne rady i wskazówki przy jej wykonywaniu. Wielką wdzięczność wyrażam doc. dr L. Badurze oraz pracownikom Zakładu Fizjologii za liczne dyskusje. Szczególnie dziękuję także prof. dr S. Prátowi z Pragi za udostępnienie mi czystej kultury *Scenedesmus*.

Zakład Fizjologii Roślin Instytutu Botaniki i Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, ul. Kanonia 6/8

(Wpłynęło dn. 16.2.1970 r.)

SUMMARY

The effects of natural and synthetic humates exerted on cultures of *Scenedesmus quadricauda* conducted at constant light and temperature have been determined in terms number of cells and dry weight. Under the described conditions multiplication of cells was stimulated by humate at the initial phase of development of culture, later this process was inhibited, whereas dry weight increased throughout the whole experiment. Experiments with different concentrations of humate as well as with humate used as "a filter" have shown that the stimulating effect of Na-humate exerted on dry weight can be explained neither by its action as a specific filter, nor by the intensity of light passing through the layer of nutrient solution. Stimulating effects resulting from addition of microelements or ashes (obtained from different humates) appeared to be considerably smaller than that of humates alone. The stimulating effect exerted by humates on cell number and dry weight appeared to by particularly distinct at pH not favourable for the development of *Scenedesmus*.

In nutrient solutions supplemented with different amounts of Fe the effect of humates increased with the decreasing doses of Fe. The same doses of Cu that had inhibited multiplication of cells and increase in dry weight appeared to be less harmful in the presence of humates. In this case, however, the effect of humate was greater at higher concentrations of Cu. Thus under unfavourable conditions (non-optimal pH, absense of Fe, excess of Cu) humate performed a compensatory part.

Indentical results obtained from experiments with synthetic and natural humates have, moreover, proved that the stimulating effect of humates is not associated with vitamins or auxins.

LITERATURA

Aso Sueo, Sakai Isao, 1963, Soil Sci. and Plant Nutr. 9: 85—91.

Badura L., 1965, Acta Soc. Bot. Pol. 34: 287—328.

Badura L., 1966, Acta Microbiol. 15: 335—342.

Badurowa M., Gumiński S., Suder-Moraw A., 1967, Biol. Plant., 9: 92—101.

Broadbent F. E., 1957, Soil Sci. 84: 127—131.

Czerwiński W., 1967, Acta Soc. Bot. Pol. 36: 549—554.

Ellenberg H., 1958, Hb. Pflanzenphysiol., Berlin, 4: 638—708.

Erdtman H., 1955, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 69: 38—43.

Górski M., 1956, Próchnica a żyzność gleby. Nawozy i nawożenie. t. III, PWRiL, Warszawa.

Greenfield S. S., 1942, Am. J. Botany 29: 121—131.

Gumiński S., 1947, Acta Soc. Bot. Pol. 18: 91—115.

Gumiński S., 1950, Acta Soc. Bot. Pol. 20: 589—620.

Gumiński S., Gumińska Z., Sulej J., 1965, J. Exptl. Bot. 16: 151—162.

Gumiński S., Sulej J., 1967, Acta Soc. Bot. Pol. 36: 109—122.

Gumiński S., 1968, Poczwowiedenje 9: 62—69.

Hewitt E. J., 1952, Sand and Water culture methode used in the study of plant nutrition, Farnham, Roy Bucks, England.

Jankowski A., 1964, Badania nad selekcją glonów dla potrzeb kultur masowych, Instytut Zootechniki, Kraków.

Jenny H., Overstreet R., 1939, Soil Science 47: 257—272.

Kadner R., 1962, Materiały z Konferencji Naukowej „Nawozy Organiczne" w Szczecinie 6—11.X.1959: 255—264.

Komárek J., Simmer J., 1965, Biol. Plant. (Praha) 7: 409—424.
Květ J., 1958, Preslia 30: 126—137.
Lhotský S., 1955, Biologica 1: 155—213.
Lhotský S., 1960, Acta Agrobotanica 9: 113—116.
Mainx F., 1927, Archiv f. Protistenkunde 60: 305, 355.
Michajluk L., 1962, Zeszyty Prob. Post. Nauk Roln. 34: 139—146.
Oktaba W., 1966. Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa, Łódź, PWN.
Opatrná-Fišherová J., 1964, Biol. Plant. (Praha) 6: 122—131.
Péterfi S., Pavel T., Nagy-Tóth F., 1966, Rev. Roum. Biol-Botanique 11: 327—331.
Prát S., 1948, Preslia 22/23: 1—12.
Prát S., 1960, Acta Agrobotanica 9: 117—121.
Pringsheim E. G., 1935, Naturwiss. 23: 197—198.
Pringsheim E. G., 1936, Beih. z. Bot. Centralbl. 55(A): 100—121.
Pringsheim E. G., 1954, Algenreinkulturen, Jena.
Sienko A., Szczypek A., 1969, Acta Agrobotanica 22: 57—70.
Sladký Z., 1959a, Biol. Plant. (Praha) 1: 199—204.
Sladký Z., 1959b, Biol. Plant. (Praha) 1: 142—159.
Sladký Z., Tichý V., 1959, Biol. Plant. (Praha) 1: 9—15.
Sladký Z., 1965, Biol. Plant. (Praha) 7: 251—260.
Stoklasa J., 1962, Biol. Plant. (Praha) 4: 98—100.
Tatkowska E., 1970, Acta Agrobot. (w druku).
Ulińska M., 1957, Technika obliczeń przy opracowywaniu wyników doświadczeń rolniczych, PWRiL, Warszawa.
Unger E., 1965, Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Roln. we Wrocławiu, Rolnictwo XIX 60: 83—96.
Uspenski E. E., Uspenskaja W. J., 1925, Zeitsch. f. Bot. 17: 273—308.
Uspenski E. E., 1927, Eisen als Faktor für die Verbreitung niederer Wasserpflanzen, Jena.