

## WPŁYW CZYNNYCH SUBSTANCJI WYCIĄGÓW TORFOWYCH NA ROZWÓJ MIKROFLORY TORFU STRUKTURALNEGO I ROZPYLONEGO

KAZIMIERZ BASSALIK, LUDMIŁA JANOTA-BASSALIK, CECYLIA OLCZYK,  
HALINA HALWEG

Zakład Fizjologii Roślin U. W.

Z wielkim zadowoleniem skorzystałem z możliwości włączenia się do prac uruchomionych w 1955 r. przez Komisję Melioracyjną i Torfową wydziału V PAN dla wyświetlenia przyczyn tzw. degradacji torfów, gdyż sprawą istoty ciał, dających się ekstrahować z gleb czy to samą wodą, czy wodnymi roztworami, czy też innymi rozpuszczalnikami interesowałem się od dawna, a doświadczenia przeprowadzałem czy to w związku z zagadnieniami wiązania molekularnego azotu przez azotobaktera wzgl. przez *Clostridia*, czy poza tym w związku z tzw. „auksimonami”, które według hipotezy londyńskiego profesora W. B. Bottomleya z 1914 r. miały być niezbędne dla wzrostu i rozwoju wszystkich zielonych roślin; auksymony te, mające powstać w związkach próchnicznych glebowych, do czasu wyświetlenia ich natury chemicznej miały nosić nazwę „ciał wzrostowych”, z grecka więc „auksymonów”. Bottomley nawet wprowadził je do handlu, wzięwszy na wyrób ich patent, nazywając je „bakteryzowanym torfem” który miał zastąpić na razie produkt naturalny. Poza pracami Bottomley'a pierwszą nie z jego pióra publikacją był artykuł w „Biochemical Journal” z r. 1920 (i późniejsze) F. A. Mockeridge, współpracownicy Bottomleya, która w całości potwierdziła wyniki swego mistrza.

Zaczęły się pojawiać wyniki prac doświadczalnych nad auksimonami i innych autorów, przeważnie anglosaskich, którzy negowali konieczność podawania zielonym wyższym roślinom „auksimonów” (n. p. A. Saeger, Journ. Gen. Physiol 1925, podając, że zdołał przez 26 miesięcy zachować na sztucznej całkowicie mineralnej pożywce (1/10 Knopa) *Lemnę maior*, przyznaje jednak, że po dodaniu do tej pożywki wodnego torfowego wyciągu w bardzo małej ilości, uzyskał zwykłą plon 2—3 krot-

ną. Również inny badacz, E. Ashby, w bardzo precyzyjnych doświadczeniach po dodaniu 0,2 do 20 mg na 1 litr substancji spreparowanej z świeżego lub przegniłego nawozu końskiego uzyskał zwiększoną asymilację i plon u *Lemna minor*. Więc interesując się bardzo żywo pasjonującą sprawą związków występujących w próchnicy, w 1926 r. podjąłem swoje badania nad ekstraktami glebowymi, nie zdając sobie sprawy, ile napotkam trudności i rozczarowań, zabierając się do laboratoryjnych badań zdawałoby się tak pospolitych i rozpowszechnionych roślin jak rzęsa itp. od czego to rozpoczął i na czym oparł Bottomley swe obserwacje i hipotezę o auksimonach.

Po 10 pracowitych latach, kiedy to ani razu nie miałem letnich wakacji, ogłosiłem na ten temat krytyczne, obszerne studium pt. „Zur Auximonfrage” (1). Zakończenie zaś tych badań nastąpiło w lecie 1939 r., kiedy to po rozpoczęciu wojny w pierwszych dniach września spodziewałem się, że znalazłem dla rękopisu swej obszernej monografii o tych auksymonach i dla 17 prac dyplomowych, wiążących się przeważnie z tymi samymi zagadnieniami — poza tym różnymi materiałami, notatkami naukowymi, bibliograficznymi, zestawieniami itp. bezpieczny i nie tak łatwo dostępny schówek, w głębokiej piwnicy pod pałacem Kazimierzowskim, gdzie się mieścił sejsmograf uniwersytecki. Były to materiały nic nie mające wspólnego z polityką; miały służyć, jak wszelka prawdziwa nauka całej ludzkości, a poza tym praca porównująca wyniki różnych mych naukowych starań w związku z zagadnieniem wzrostu roślin względnie produkcji roślinnej substancji, była publikowana w języku niemieckim. Spodziewałem się, że ten schówek będzie bezpieczny na wszelki wypadek, gdyby przypadkowe zniszczenie w zmiennych kolejach wojny, nastąpiło z jednej czy z drugiej strony napadających, czy broniących się, nie przypuszczałem ani na chwilę, że będzie wyrzucony na dziedziniec i bezlitośnie spalony jako dowód i świadek rzeczywistości „Totalkrieges”, jak to się faktycznie na początku października 1939 r. stało.

Więc z możliwości powrotu do badań mnie pasjonujących, przy tym w tego rodzaju okolicznościach niezwykłych z pełnym zapalem zorganizowałem zespół pracowników Zakładu dla przystąpienia do pracy dla zorientowania się w nieznanym mi potąd biocenozie mikrobialnej, w torfach niskich (2).

Prace wstępne polegały na oznaczeniu ogólnej ilości mikroorganizmów w próbkach pobranych z różnych głębokości torfów, oraz na przebadaniu szeregu ważnych procesów takich jak rozkład błonnika, rozkład skrobi, amonifikacji, wiązania wolnego azotu, nitryfikacji, denitryfikacji, utleniania siarczków i utleniania siarki, redukcji siarczanów (3).

W latach następnych zespół pracowników Zakładu Fizjologii Roślin zajął się badaniami nad wpływem nieznanymi, czynnymi substancji torfowych na rozwój mikroflory torfu.

Urodzajność torfu tak jak i innych gleb zależy w dużym stopniu od mikroflory. Zespół mikroorganizmów występujących w każdej glebie jest bardzo złożony. Składa się on z najrozmaitszych typów, podlegających wpływom antagonistycznym względnie symbiotycznym, żyjących ponadto w stale zmieniającym się środowisku. Aby poznać przynajmniej częściowo daną glebę pod względem mikrobiologicznym musi się wziąć pod uwagę występujące w niej substancje czynne, zarówno hamujące jak i stymulujące wzrost mikroorganizmów.

Substancjom stymulującym poświęcono dużo mniej pracy niż substancjom antagonistycznym mimo, że obie grupy związków powinny być badane równie intensywnie. Obie grupy wpływają na rozwój dużej ilości mikroorganizmów już w bardzo małych stężeniach i mogą być wytwarzane dzięki syntezie mikrobiologicznej.

W 1920 r. Mockeridge (4) wykazała, że tzw. auksymony wyekstrahowane z kompostu nie tylko stymulują wzrost roślin, lecz również wpływają dodatnio na aktywność organizmów glebowych.

W 1931 r. ogłosiłem (5) wyniki kilkuletnich badań nad wpływem biosu, auksymonów, witamin, koloidów, a najogólniej stymulatorów na proces wiązania azotu molekularnego przez *Azotobacter chroococum* i stwierdziłem, że ekstrakty z gleb, ekstrakty z bakterii symbiotycznych towarzyszących azotobakterowi, z drożdży, z kiełkujących zbóż, oraz preparaty witaminowe działają stymulująco na wiązanie azotu przez azotobaktera. Ponadto ekstrakty te często działają silniej w stanie niegotowanym.

W cytowanej pracy wyraziłem pogląd, że czynność badanych ekstraktów była spowodowana: a) czynnikiem wrażliwym na temp., b) czynnikiem mineralnym i c) czynnikiem lotnym — jeszcze bardzo mało zbadanym.

Pogląd ten o występowaniu specyficznych witamin w glebie potwierdzili po raz pierwszy Lilly i Leonian w 1939 r. (6) dzięki użyciu do doświadczeń gatunków grzybów wymagających do wzrostu określonych witamin. Grzyby te rosły na pożywce bezwitaminowej jedynie po dodaniu do niej ekstraktu glebowego.

Müller (7) wykazał obecność w różnych glebach tiaminy, Carpenter (8) — ryboflawiny.

W roku 1940 West i Lochhead (9) zaobserwowali, że wiele bakterii glebowych rośnie na pożywkach laboratoryjnych jedynie w obecności witamin: tiaminy, biotyny, kwasu nikotynowego i inozytolu. Ponieważ niektóre organizmy nie rosły na pożywkach uzupełnionych witaminami

(z wyjątkiem witaminy B<sub>12</sub>), ani na pożywce z ekstraktem drożdżowym, a rozwijały się na ekstrakcie glebowym, względnie na przesączu z hodowli innych bakterii glebowych, wyprowadzono wniosek, że w glebie muszą występować jeszcze inne czynniki wzrostowe (10). Jednym z takich czynników okazała się witamina B<sub>12</sub> (11, 12) inny tzw. czynnik Terregens (T. F.) (13), którego nazwa pochodzi od *Arthrobacter terregens*, typowego organizmu wymagającego do wzrostu obecności tego czynnika.

Jak już wspomniano, znacznie więcej uwagi niż substancjom stymulującym, występującym w glebach, poświęcono substancjom hamującym rozwój jednych mikroorganizmów, a produkowanych przez inne mikroorganizmy, tzw. antybiotyków. Dane odnośnie tego typu czynników przedstawił między innymi w opracowaniu referatowym Stallings w 1954 (14).

Jak szeroko rozpowszechnione są własności antybiotyczne u promieniowców widać z pracy Vaňek'a i wsp. (15). wydrukowanej w 1958 r. Na 739 zbadanych szczepów promieniowców wyizolowanych ze 115 próbek gleb chińskich, 69,7% posiadało własności antybiotyczne.

Praca wykonana w 1956 r. przez zespół mych współpracowników (16) miała na celu przede wszystkim określenie wpływu wyciągu z torfu gotowanego i wyciągu z torfu niegotowanego na rozwój mikroflory torfu. Zasadnicze badania przeprowadzono na torfie rozpylonym z Biebrzy, którego próbki pobrano z poziomu 2—10 cm.

Już w roku 1956 stwierdzono stymulujące własności wyciągu torfowego na mikroorganizmy torfowe. Własności te były silniejsze w wyciągu niegotowanym niż w wyciągu gotowanym.

W 1957 r. (17) uwzględniono w badaniach próbki pobrane z trzech poziomów torfu strukturalnego jak i rozpylonego. Doświadczenia nad wpływem wyciągu torfowego niegotowanego, sterylizowanego tlenkiem etylenu (metodę sterylizacji opracowano w roku poprzednim), gotowanego, oraz niegotowanego, ale sterylizowanego przez sączenie, powtórzono w czerwcu, sierpniu i październiku. Potwierdzono wyniki z 1956 r. odnośnie silniejszego stymulującego działania wyciągu niegotowanego niż gotowanego, oraz stwierdzono najniższy wzrost mikroorganizmów na wyciągu sączonym przez świecę, w którym założono hipotetycznie największą ilość substancji hamujących.

W pracy niniejszej postanowiono:

- 1) uzyskać do doświadczeń wyciągi bogatsze w substancje czynne, scharakteryzować je pod względem zawartości azotu, popiołu, suchej masy organicznej,

2) potwierdzić występowanie w wyciągach prócz substancji stymulujących rozwój mikroflory, substancji hamujących, określić wpływ temperatury i sączenia na te substancje,

3) wyizolować organizmy testowe wrażliwe na substancje stymulujące względnie hamujące wyciągów torfowych, starać się znaleźć szczepki różnie reagujące na wyciągi pochodzące z torfu strukturalnego wzgl. rozpylonego,

4) znaleźć i określić mikrobiologiczne różnice pomiędzy torfem strukturalnym i rozpylonym, na podstawie których można by prowadzić dalsze badania nad urodzajnością torfowisk meliorowanych.

Do badań otrzymano torf strukturalny i rozpylony z Biebrzy pobrany dnia 12 lipca, 25 lipca, 5 listopada i 30 listopada z poziomu 2—10 cm. Do szczepienia użyto torf pobrany 25 lipca i 5 listopada.

### CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Zawartość suchej masy oznaczono w próbkach torfu strukturalnego i rozpylonego, pobranego z głębokości 2—10 cm w dn. 12. VII i 5. XI 1958 r. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Zawartość suchej masy w torfie strukturalnym i rozpylonym w lipcu i listopadzie 1958 r.

Torf poziom	Sucha masa w procentach				Temp. przechowywania
	data pobr. 12. VII	5. XI			
	oznacz. 13. VII	6. XI	13. XI	27. XI	
Strukturalny 2—10 cm	23,69	22,25	23,11	23,01	22°C
			22,35	22,15	7°C
Rozpylony 2—10 cm	26,88	23,84	26,66	24,43	22°C
			25,74	24,52	7°C

Stwierdzono, że: 1) oba torfy miały większą suchą masę w lipcu, 2) w lipcu i listopadzie 1958 r. torf rozpylony zawierał większą ilość suchej masy.

Pojemność wodna oznaczona w lipcu w przeliczeniu na 1 g s. m. wynosiła dla torfu strukturalnego 1,73 g, dla torfu rozpylonego 1,25 g. W celu przekonania się w jakim stopniu oba różne torfy tracą wodę w czasie przechowywania, w próbkach torfu pobranych 5. XI oznaczono suchą masę jeszcze dwukrotnie, dnia 13. XI i 27. XI.

Torfy przechowywano w szklanych słojach w temp. 22° i temp. 7°C. Okazało się, że ubytki wody w torfie strukturalnym przechowywanym w temp. 7° były minimalne. W tym samym torfie przechowywanym w temp. 22° ubytek wody był większy, ale też nie dochodził do 1%. W torfie rozpylonym ubytek wody był znacznie większy, po tygodniu od pierwszego pomiaru zawartość suchej substancji wzrosła w temp. 7° o niecałe 2%, w temp. 22° o niecałe 3%. Charakterystyczne dla wszystkich próbek było ponowne zwiększenie zawartości wody w ciągu następnych dwóch tygodni — znacznie większe w torfie rozpylonym.

Z oznaczeń powyższych wynika, że torf rozpylony posiadający mniejszą pojemność wodną niż strukturalny podlega większym wahaniom w zawartości wody, dzięki którym w roku specjalnie wilgotnym może zawierać w pewnych okresach nawet większe ilości wody niż torf strukturalny (tak się zdarzyło w 1957 r.).

#### O t r z y m y w a n i e i w s t ę p n e a n a l i z y w y c i ą g ó w t o r f o w y c h

Wyciągi torfowe otrzymywano z torfu strukturalnego i rozpylonego bez podsiąkania wodą. Porcje torfu o ciężarze 100 g nakładano do worków z lnianego płótna, a następnie wyciskano ręczną śrubową prasą stale do tego samego skreću. Aby izolować wyciągi od wpływu metalu prasę wyłożono folią plastikową. Po odstaniu w lodówce wyciągi dekantowano i zobojętniano wodorotlenkiem sodu do pH 7. Ze 100 g torfu strukturalnego otrzymywano średnio 38,3 ml wyciągu: ze 100 g torfu rozpylonego otrzymywano średnio 36,6 ml wyciągu. pH wyciągów przed zobojętnieniem wynosiło dla torfu rozpylonego 6,8: dla strukturalnego 6,5. Stwierdzono również dość znaczną różnicę w barwie wyciągów pochodzących z różnych torfów.

Barwa wyciągu z torfu strukturalnego była ciemniejsza, odpowiadała ona barwie wypadkowej ze zmieszania dwóch farb w jednakowym stosunku: sieni palonej i ugieru jasnego. Barwa wyciągu z torfu rozpylonego odpowiadała barwie ugieru jasnego.

W celu bliższego scharakteryzowania otrzymanych wyciągów oznaczano w nich zawartość azotu metodą Kjeldahla (dla porównania oznaczano również zawartość azotu w torfach), suchą masę i popiół. Wyniki oznaczania azotu przedstawiono w tabeli 2.

Zawartości azotu w obu różnych torfach i wyciągach są zbliżone, z tym, że torf i wyciąg strukturalny są w azot bogatsze. Porównując przedstawione tu dane z wynikami dotyczącymi zawartości azotu w wyciągach otrzymanymi w 1957 r. można zauważyć zwiększenie ilości azotu w 1958 r. Spowodowane to jest niewątpliwie inną metodą otrzymywania wyciągów.

Tabela 2  
Zawartość azotu wg. Kjeldahla w torfie i wyciągu torfowym

Torf poziom	Lipiec 1958 r.				
	Torf mg/1g s. m.	Wyciąg mg/100 ml.	Otrzymany z ilu g s. m. torfu	% $\frac{N \text{ wyc.}}{N \text{ torf.}}$	Wyciąg sączony mg/100 ml
Strukturalny 2—10 cm	31,61	3,50	59,93	0,18	0,77
Rozpylony 2—10 cm	30,36	3,08	72,58	0,14	1,54

Bezpośrednie wyciskanie bez podsiąkania daje wyciąg bogatszy i lepiej odzwierciedlający stosunki w danym torfie. W tabeli podano również wyniki przeliczenia w jakiej ilości azot z torfu przechodzi do wyciągu. Okazało się, że są to ilości minimalne wynoszące 0,18% dla strukturalnego; 0,14% dla rozpylonego.

Sączenie przez azbestowy sączek Seitza EKS 1797 zatrzymuje część substancji azotowych. Mniejszą ilość azotu w wyciągu sączonym, pochodzącym z torfu strukturalnego, tłumaczymy zaobserwowanym silniejszym zaklejeniem sączka przez cząstki organiczne, których ilość jest większa niż w wyciągu z torfu rozpylonego (tab. 3). Ten ostatni wyciąg jest również uboższy w składniki popiołowe.

Tabela 3  
Zawartość suchej masy i popiołu w wyciągu torfowym

Torf poziom	Lipiec 1958 r.		
	Sucha masa mg/100 ml	Popiół mg/100 ml	Sucha masa organ. mg/100 ml
Strukturalny 2—10 cm	83,2	38,1	45,1
Rozpylony 2—10 cm	67,3	32,4	34,9

Przygotowanie pożywek do izolowania mikroorganizmów występujących w torfach, oraz do badań nad wpływem czynnych substancji torfowych na mikroflorę torfu

Do izolowania mikroorganizmów występujących w torfach, oraz do obserwacji kolonii na szalkach stosowano pożywki agarowe z wyciągiem z torfu.

Pożywką kontrolną była pożywka bez wyciągu. Zarówno pożywka kontrolna jak i pożywki z wyciągami miały następujący skład:

1,5	%	agaru	
1,0	„	glukozy	
0,12	„	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	
0,1	„	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
0,05	„	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	pH = 7

Na 1 litr wyżej wymienionej pożywki dodawano 1 ml roztworu A-Z Hoaglanda w modyfikacji prof. K. Bassalika.

Wyciągi torfowe otrzymywane w sposób opisany powyżej sterylizowano: 1) na gorąco — trzykrotnym gotowaniem przez 30 min. w aparacie Kocha, 2) przez dodanie 1% tlenku etylenu, 3) przez sączenie przez sączonek Seitza azbestowy EKS 1797.

Jałowe wyciągi łączono z równą objętością podwójnie stężonej pożywki agarowej w temperaturze nie przekraczającej 50°C, przed rozlanem na szalki.

W doświadczeniu przeprowadzonym w lipcu zastosowano dodatkowo następujące kombinacje wyciągów:

- 1) wyciąg zagęszczony przez odsączenie połowy roztworu przez sączonek azbestowy Seitza EKS 1797, sterylizowany tlenkiem etylenu
- 2) wyciąg zagęszczony, sterylizowany w aparacie Kocha
- 3) wyciąg sączonek, sterylizowany w aparacie Kocha
- 4) wyciąg składający się w połowie z wyciągu sączonek, w połowie z wyciągu sterylizowanego tlenkiem etylenu.

Do pasażowania wyizolowanych mikroorganizmów na skosach agarowych stosowano pożywki z wyciągiem z torfu, oraz pożywkę kontrolną bez wyciągu. Zarówno pożywka kontrolna jak i pożywki z wyciągiem miały następujący skład:

1,5%	agaru	
0,05%	glukozy	
0,012%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	
0,01%	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
0,005%	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	pH = 7
	H <sub>2</sub> O	redestylowana.

Jałowe wyciągi (sterylizowane na gorąco, tlenkiem etylenu względnie przez sączenie), łączono z równą objętością podwójnie stężonej pożywki agarowej w temperaturze nie przekraczającej 50°, w probówkach przed zrobieniem skosów.



Hodowane szczepy pasażowano również na agarze z glukozą i peptonem. Skład tej pożywki był następujący:

1,5% agaru  
1,0% glukozy  
0,5% peptonu  
0,1%  $K_2HPO_4$   
0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$       pH = 7

### Wpływ czynnych substancji wyciągów torfowych na rozwój mikroflory torfu

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w 1957 r. postawiono hipotezę, że w wyciągach torfowych znajdują się substancje czynne, jedne stymulujące, inne hamujące rozwój mikroorganizmów.

W 1958 r. postanowiono przede wszystkim hipotezę tę sprawdzić powtarzając i uzupełniając doświadczenie z roku poprzedniego, jednakże pracując z wyciągami bogatszymi w substancje czynne. Stosowano w dalszym ciągu metodę liczenia kolonii na szalkach skracając jednakże do minimum (jak się później okazało całkiem słusznie), czas pomiędzy pobraniem próbki torfu a szczepieniem. Wprowadzono szczepienie na pożywkę kontrolnej, identycznej z innymi, ale bez wyciągu. Oprócz trzech podstawowych kombinacji zawierających wyciąg gotowany, wyciąg nieogrzewany powyżej 50° sterylizowany tlenkiem etylenu i wyciąg sączony zastosowano:

- 1) w celu przekonania się czy substancje stymulujące ulegną zagęszczeniu, wyciąg zagęszczony,
- 2) w celu poznania stosunku substancji stymulujących do temperatury, wyciąg zagęszczony, gotowany,
- 3) w celu poznania stosunku substancji hamujących do temperatury, wyciąg sączony, gotowany,
- 4) jako sprawdzian liczenia kolonii, kombinację zawierającą połowę wyciągu niegotowanego i połowę sączonego.

Rozszerzenie doświadczenia, które powinno być przeprowadzone jednorazowo spowodowało, że musiano zrezygnować na razie z badania wyciągów z niższych poziomów torfów, uwzględnionych w 1957 r. Pierwsze szczepienie na szalki przeprowadzono dn. 28. VII z próbek torfów strukturalnego i rozpylonego, pobranych w Biebrzy dn. 25. VII z tych samych miejsc i głębokości, w których pobrano dn. 12. VII torf do przygotowania wyciągów. Pocztowy transport próbek trwał aż trzy

dni, jednakże ewentualne zmiany w nich mogły być niewielkie (dzięki temu, że próbki zostały wysłane w dużych workach zawierających około 20 kg torfu).

Mimo starannego uprzednio przygotowania pożywek i wyciągów, z dotychczas niewyjaśnionego powodu wyciągi gotowane okazały się niejako (sprawdzono na jałowość wszystkie oprócz gotowanych). Z tego powodu doświadczenie musiano częściowo powtórzyć dn. 4. VIII uwzględniając kombinacje zniszczone, kontrolę, oraz pożywkę z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu. Wyniki otrzymane z powtórnego szczepienia na podstawie kontroli sprowadzono do wyników z pierwszego szczepienia i jako niezupełnie pewne zaznaczono gwiazdką.

Próbkami z torfu strukturalnego szczepiono (w 3 powtórzeniach i 3 rozcieńczeniach) pożywki z wyciągiem z torfu strukturalnego, próbkami z torfu rozpylonego szczepiono pożywki z wyciągiem z torfu rozpylonego. Szalki wstawiono do termostatu o temp.  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}$ . Kolonie liczono po dwóch i czterech dniach. W tabeli 4 uwzględniono wyniki z drugiego liczenia.

Wbrew oczekiwaniom, oraz wynikom 1957 r. torf rozpylony okazał się bogatszy w mikroorganizmy (twierdzenie to jest słuszne w stosunku do tej mikroflory, która mogła się rozwinąć na przygotowanych podłożach i w danych warunkach hodowli). Różnice na korzyść mikroorganizmów z torfu rozpylonego wystąpiły we wszystkich kombinacjach z wyjątkiem Nr 7.

Ponadto, gdy w wyniku liczenia kolonii na pożywce kontrolnej różnica ta wynosiła 5 milionów (około  $\frac{1}{4}$  ilości z torfu strukturalnego), liczenia kolonii na pożywkach z wyciągami dawały ilość mikroorganizmów w torfie rozpylonym większą od kilkudziesięciu do ponad stu milionów. Dyskusję odnośnie powyższych wyników umieścimy na końcu referatu.

Występowanie substancji stymulujących zostało potwierdzone w wyciągach obydwu torfów. Występowały one w największej ilości w wyciągu niegotowanym i niesączonym (cztero- względnie dziewięciokrotne zwiększenie ilości przeliczonych mikroorganizmów w stosunku do kontroli), ulegały zagęszczeniu (kombinacja 5) były obecne, chociaż w mniejszej ilości w wyciągach gotowanych i sączonych (kombinacje Nr 3, 4, 6, 7, 8, w porównaniu z kontrolą w procentach).

Na podstawie omawianego doświadczenia nie można było stwierdzić, czy na substancje stymulujące działa bardziej ujemnie gotowanie czy sączenie (różnice kilkuprocentowe o różnych kierunkach w obu torfach, przy czym część liczb niezupełnie pewna). Stwierdzono jednakże, że część substancji stymulujących, która przeszła do wyciągu sączonego przez pory sączka w przypadku torfu rozpylonego, ulega zniszczeniu

(100% kombinacja 4; 54% — Nr 7). Nie potwierdziło się to w torfie strukturalnym (100% i 118%).

W tym doświadczeniu nie zdołano wykazać występowania w wyciągach substancji hamujących. Szczepienie kombinacji 8 dało następujący wynik sprawdzania metody: w torfie strukturalnym powinno być po przeliczeniu na 1 g s. m. 61,5 milionów mikroorganizmów  $(78 : 2) + (45 : 2) = 61,5$ , stwierdzono 62 miliony; w torfie rozpylnym powinno być 151,5 miliona  $(219 : 2) + (84 : 2) = 151,5$ , stwierdzono 123 miliony. Błąd 18% w przypadku torfu rozpylnego wskazuje na to, że interpretacja otrzymanych wyników przy stosowaniu metody szalkowej musi być bardzo ostrożna, a wyniki sprawdzane wielokrotnie.

Obserwacje jakościowe kolonii na szalkach (rozć. 1 : 1 milj.) wykonano 9. VIII. Stwierdzono, że zarówno w torfie strukturalnym jak i rozpylnym najmniejsze i najsłabsze były kolonie na pożywce kontrolnej, największe i najdorodniejsze były kolonie na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu.

Różnorodność typów kolonii okazała się podobna w obu torfach. Ilość promieniowców wynosiła tylko kilka procent, jednakże była ona dwu, względnie trzykrotnie większa w torfie rozpylnym. Kolonie pleśni spotykano wyjątkowo.

Następne szczepienia na szalki przeprowadzono dn. 6. XI o godz. 7 rano z próbek torfów strukturalnego i rozpylnego, pobranych w Biebrzy dn. 5. XI. o godz. 17-tej z tych samych miejsc i głębokości co w lipcu.

Doświadczenie przeprowadzono analogicznie do poprzedniego, pomijając jedynie szczepienie kombinacji dodatkowych (5; 6; 7; oraz 8). Wyniki przeliczeń podano w tabeli 5. Ogólna ilość mikroorganizmów w obu torfach na podstawie liczenia kolonii na pożywce kontrolnej zmalała od lipca, bardziej w torfie rozpylnym (porównanie danych z tabeli 4 i 5).

Wpływ substancji stymulujących, wrażliwych na temperaturę i nieprzesączalnych przez stosowany sączonek zaznaczył się jeszcze wyraźniej, poza tym ponownie silniej w torfie rozpylnym. Gotowanie i sączenie wyciągów działało prawie jednakowo ujemnie na czynne substancje. Ponieważ w każdej kombinacji z wyciągiem była większa ilość kolonii niż na kontroli, w dalszym ciągu nie można było nic stwierdzić o substancjach hamujących.

Obserwacje jakościowe kolonii na szalkach (rozć. 1 : 1 milj.) wykonano 14. XI. Wyniki tych obserwacji były podobne do wyników uzyskanych z obserwacji szalek szczepionych w lipcu, z tą różnicą, że w torfie rozpylnym liczba kolonii promieniowców spadła do ilości mniejszej niż w torfie strukturalnym.

Tabela 4

Wpływ czynnych substancji wyciągów torfowych na rozwój mikroflory torfu  
Ilość mikroorganizmów w milionach w przeliczeniu na 1 g s. m. torfu (szalki szczepione 28. VII. 1958 r.)

Torf poziom	Pożywki z dodatkiem wyciągu							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrola		Wyciąg steryliz. tlenkiem etylenu	Wyciąg steryliz. w aparacie Kocha	Wyciąg steryliz. przez sączenie	Wyciąg zagęszczon. steryliz. tlenkiem etylenu	Wyciąg zagęszczon. steryliz. w aparacie Kocha	Wyciąg sączony steryliz. w aparacie Kocha	Wyciąg łączony 1/2 sączon. 1/2 z tlenk. etylenu
Strukturalny 2—10 cm	19	78	42*	45	98	33*	53	62
Dane w procentach	100%	410,5%	221%	237%	516%	174%	279%	326%
		100%	54%	58%	100%	34%	118%	
Rozpylony 2—10 cm	24	219	89*	84	225	85*	45	123
Dane w procentach	100%	913%	371%	350%	938%	354%	187,5%	512,5%
		100%	41%	38%	100%	38%	54%	
			100%	100%				

\* Wyniki otrzymane z powtórnego szczepienia na szalkach dn. 4. VIII., sprowadzone na podstawie kontroli do wyników z dnia 28. VII., ale niezupełnie pewne.

Tabela 5

Wpływ czynnych substancji wyciągów torfowych na rozwój mikroflory torfu  
Ilość mikroorganizmów w milionach w przeliczeniu na 1 g s. m. (szalki szczepione  
6. XI. 1958 r.)

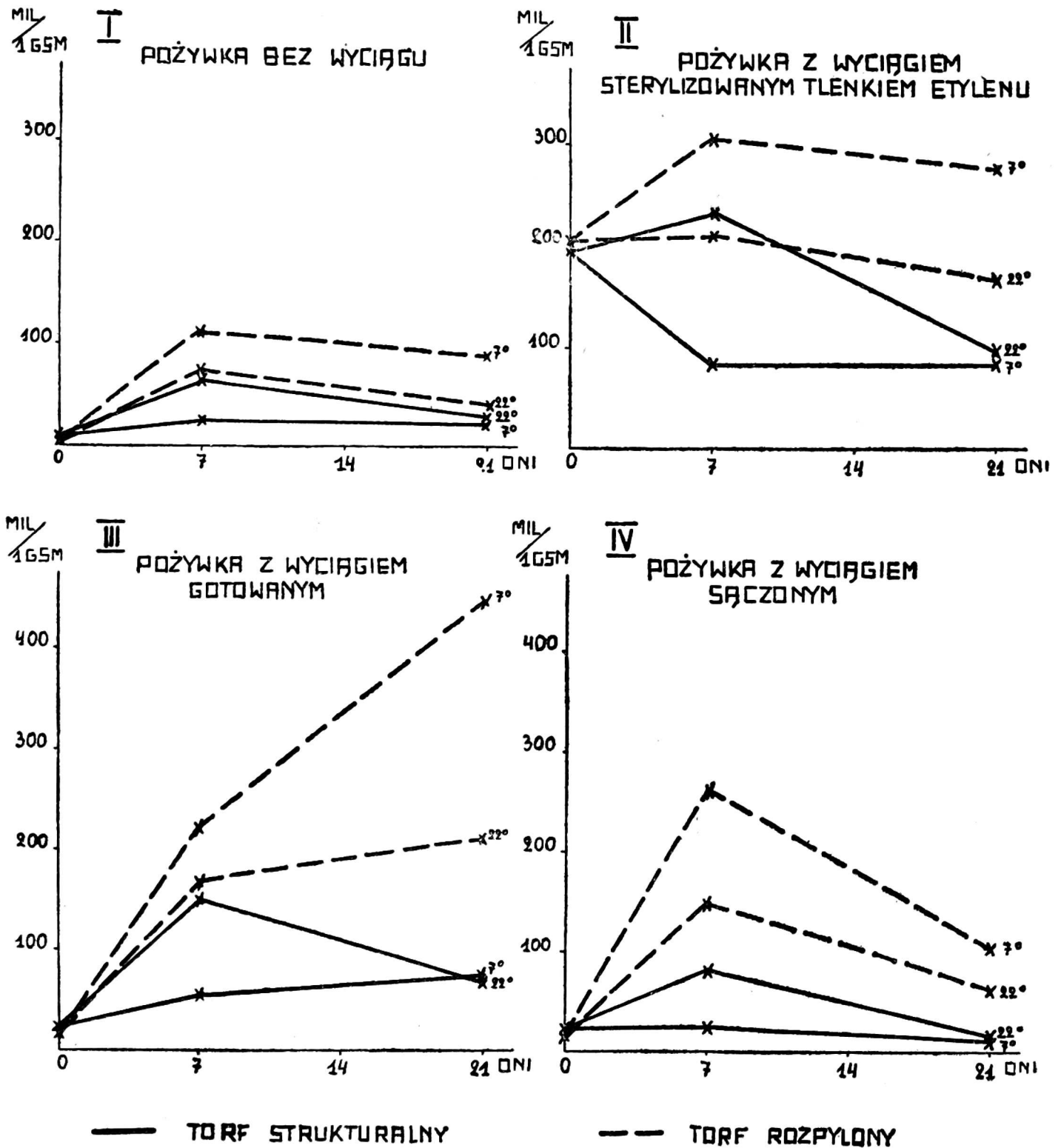
Torf poziom	Pożywki z dodatkiem wyciągu			
	1	2	3	4
	Kontrola	Wyciąg sterylizow. tlenkiem etylenu	Wyciąg sterylizow. w aparacie Kocha	Wyciąg sterylizow. przez sączenie
Strukturalny 2—10 cm	9	193	22	23
Dane w procentach	100%	2144%	244%	255%
		100%	11%	12%
Rozpylony 2—10 cm	4,2	205	16,4	16,4
Dane	100%	4881%	390%	390%
w procentach		100%	8%	8%

Zmiany zachodzące w mikroflorze torfu  
strukturalnego i rozpylonego podczas  
przechowywania próbek w pracowni

Następnym zagadnieniem do rozwiązania było przesledzenie zmian ilościowych i jakościowych w mikroflorze obu badanych torfów podczas przechowywania pobranych próbek w pracowni. Do tego celu posłużono się próbkami pobranymi w Biebrzy 5. XI, szczepionymi po raz pierwszy na szalki 6. XI.

Próbki obu torfów w ilości około 1 kg każda przechowywano w szklanych słojach w temp. 22° oraz 7°C. Powtórne szczepienie na szalki wykonano po tygodniu 13. XI oraz po trzech tygodniach, 27. XI.

Zmiany zawartości wody w tych próbkach opisano w pierwszej części pracy doświadczalnej. Do szczepienia pobierano materiał ze środka próbek. Wyniki przedstawiono na wykresach. Stwierdzono, że podczas tygodniowego przechowywania próbek torfu w pracowni, niezależnie od temperatury przechowywania, ilość mikroorganizmów w obu torfach zwiększyła się znacznie (wykres 1). W torfie strukturalnym słabiej rozmnożyły się mikroorganizmy w temp. 7° niż w temp. 22°, w torfie rozpylonym natomiast odwrotnie, słabiej rozmnożyły się mikroorganizmy w temp. 22°. Ponadto w torfie rozpylonym w obu stosowanych temperaturach ogólna ilość mikroorganizmów przewyższyła ilość znaną w torfie strukturalnym. Procentowy wzrost ilości kolonii na różnych



Rys. 1. Zmiany w ilości mikroorganizmów w torfie strukturalnym i rozpylonym podczas przechowywania próbek w pracowni

kombinacjach był różny, największy na kontroli, mniejszy na pożywce z wyciągiem gotowanym, na ogół najmniejszy na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu. Ponieważ ilość szczepionych komórek z danego torfu na wszystkie kombinacje była taka sama wyprowadzono wniosek, że rozmnożone mikroorganizmy były mniej wrażliwe na substancje stymulujące zawarte w wyciągach, względnie więcej wrażliwe na substancje hamujące, których największą stosunkowo ilość zakłada-

liśmy hipotetycznie w wyciągu sączonym. Jednakże nie możemy odrzucić przypuszczenia, że ilość substancji stymulujących zmniejsza się w czasie przechowywania wyciągów. Nie umiemy również na razie skomentować dlaczego procentowy wzrost ilości mikroorganizmów na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem jest słabszy niż np. na pożywce sączonej.

Po trzech tygodniach przechowywania próbek ilość mikroorganizmów zmalała, była ona jednak wyższa niż przy pierwszym szczepieniu. Torf rozpylony tak jak przy drugim szczepieniu zawierał więcej mikroorganizmów niż strukturalny (wykres 1).

Zmalala również ilość mikroorganizmów, które wyrosły na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu i z wyciągiem sączonym (wykres 2 i 4) z wyjątkiem nieznacznego wzrostu w przypadku torfu strukturalnego przechowywanego w temp. 7° (wykres 2). Liczenie kolonii na pożywce z wyciągiem gotowanym wykazało dalszy znaczny wzrost ilości mikroorganizmów w torfie rozpylonym, spadek w torfie strukturalnym przechowywanym w 22°, nieznaczny wzrost w strukturalnym przechowywanym w 7° (wykres 3). Powyższe dane można by wytłumaczyć następująco: w torfie rozpylonym mimo wymarcia części mikroflory w ostatnich dwóch tygodniach przechowywania próbki, w dalszym ciągu rozwijały się te mikroorganizmy, które były wrażliwe na substancje stymulujące znajdujące się w wyciągu gotowanym. Dotyczy to zmian, które zaszły w obu stosowanych temperaturach. W torfie strukturalnym najsilniejszy spadek ilości kolonii na pożywce z wyciągiem sączonym wykazał po raz pierwszy w sposób bezpośredni w naszych badaniach występowanie w wyciągu sączonym substancji hamujących (55% kolonii w temp. 22° i 61% w temp. 7° w stosunku do odpowiednich kontroli). A więc w torfie strukturalnym rozmnożyły się i ujawniły mikroorganizmy wrażliwe na substancje hamujące, zginęła część wrażliwych na substancje stymulujące.

Obserwacje jakościowe kolonii na szalkach wykazały w torfie strukturalnym przechowywanym w temp. 7° w okresie trzech tygodni nieznaczny spadek ilości promieniowców; w temp. 22° dość słaby wzrost ilości promieniowców (przy pierwszym szczepieniu średnio 2 kolonie na szalce, przy trzecim szczepieniu średnio 3 kolonie na szalce, rozć. 1 : 1 milj.).

W torfie rozpylonym niezależnie od temperatury przechowywania ilość promieniowców wyraźnie się zwiększyła (przy pierwszym szczepieniu średnio 1 kolonia na szalce, przy drugim i trzecim szczepieniu średnio 8 kolonii na szalce rozć. 1 : 1 milj.). Z powyższego wynika, że większa ilość mikroorganizmów w torfie rozpylonym niż w torfie strukturalnym po tygodniu względnie trzech tygodniach przechowywania próbek

została spowodowana przynajmniej w pewnej mierze rozmnożeniem się promieniowców w torfie rozpylonym. Stwierdzono ponadto, że o ile w wyniku pierwszego szczepienia największe i najdorodniejsze kolonie wyrosły na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu, w wyniku następnych szczepień kolonie na pożywce z wyciągiem gotowanym co najmniej im dorównywały. Obserwacja ta zgodna jest z wynikami otrzymanymi z liczenia kolonii, wskazującymi na stopniowy wzrost ilości mikroorganizmów (szybszy w torfie rozpylonym) wrażliwych na substancje stymulujące, znajdujące się w wyciągu gotowanym.

### Izolacja mikroorganizmów torfowych i obserwacje na skosach agarowych z wyciągami torfowymi

Mikroorganizmy torfowe izolowano z szalek szczepionych: 28. VII, 6. XI, 13. XI oraz 27. XI. Do wyszczepiania starano się wybierać kolonie typowe dla danego torfu, unikając jednocześnie powtórnego izolowania szczepów już hodowanych na skosach agarowych. Szczepom izolowanym z torfu strukturalnego nadano numery kolejne poczynając od „1”, szczepom izolowanym z torfu rozpylonego nadano numery kolejne poczynając od „51”. Z obu torfów wyizolowano łącznie 96 szczepów. Część szczepów odrzucono, gdyż stanowiły one powtórzenia szczepów posiadanych, część szczepów zginęła.

Badania szczegółowe przeprowadzono na 53 szczepach torfowych (37 szczepów pałek, 3 szczepy sarcin, 1 szczep koków, 3 szczepy drożdży, 8 szczepów promieniowców w tym 7 *Nocardii* i 1 szczep *Penicillium*) oraz na kilku szczepach wyizolowanych z innych źródeł, odnośnie których wyników na razie nie podajemy. Wszystkie szczepy badane hodowane są na agarze z glukozą i peptonem, przeszczepiane zaś były dotychczas 1 raz na miesiąc.

Ponieważ zauważono, że niektóre szczepy rosną coraz słabiej postanowiono skrócić czas pomiędzy kolejnymi przeszczepieniami. Właściwe badania mające na celu stwierdzenie w jaki sposób wyizolowane szczepy reagują na wyciągi torfowe przeprowadzono następująco: ze skosu agarowego z glukozą i solami o składzie procentowym takim jaki miała pożywka wylewana na szalki oraz z dodatkiem wyciągu gotowanego każdy szczep przeszczepiano na 7 równoległych skosów. Skos Nr 1 zawierał pożywkę kontrolną bez wyciągu, skos Nr 2, 3 i 4 pożywki z wyciągiem z torfu strukturalnego sterylizowanym tlenkiem etylenu, przez gotowanie i sączenie; skos Nr 5, 6 i 7 analogiczne pożywki do 2, 3 i 4, ale z wyciągiem z torfu rozpylonego. Jak już podano w części metodycznej ilość



glukozy w pożywce używanej do obserwacji na skosach zmniejszono dwudziestokrotnie, ilość soli dziesięciokrotnie. Zubożenie pożywki było spowodowane brakiem wyników w pierwszych obserwacjach na skosach prowadzonych na pożywkach „bogaty” o składzie analogicznym do składu używanego do obserwacji na szalkach. Zagadnienie to omówimy szerzej w dyskusji.

Po upływie dwóch tygodni od pierwszego szczepienia na skosy, każdy szczep przeszczepiono znowu na siedem analogicznych skosów (ze skosu Nr 1 na skos Nr 1, ze skosu Nr 2 na skos Nr 2 itd.) po następnych dwóch tygodniach przeszczepienie powtórzono jeszcze raz. Całe doświadczenie obserwacyjne trwało 6 tygodni i obejmowało 3 pasażę, oraz 9 względnie w niektórych przypadkach 8 obserwacji. Obserwacje prowadzono po 3, 8 i 13 dniach od zaszczepienia. Hodowlę prowadzono w termostacie w temp. 27—28°, przy czym uważano, aby w probówkach utrzymywała się cały czas woda kondensacyjna.

Wyniki obserwacji odnośnie wzrostu wszystkich szczepów z wyjątkiem promieniowców i pleśni ujęto w dane cyfrowe i przedstawiono na tabelach Nr 6; 7; 8; 9; 10; i 11. Umownie przyjęto następujące określenia cyfrowe: brak wzrostu = 0, ślad wzrostu = 1; wzrost bardzo słaby = 2; wzrost dostateczny = 3; wzrost dostateczny + = 4; wzrost dobry — = 5; wzrost dobry = 6; wzrost dobry + = 7; wzrost bardzo dobry — = 8; wzrost bardzo dobry = 9. Po skończeniu obserwacji podsumowano wyniki i podzielono przez ilość obserwacji. Otrzymane liczby wstawiono do tabeli.

Dla porównania umieszczono również w tabelach cyfry charakteryzujące wzrost na agarze z glukozą i peptonem (1% glukozy; 0,5% peptonu).

Wśród 44 obserwowanych szczepów 12 szczepów reagowało najbardziej dodatnio na wyciąg sterylizowany tlenkiem etylenu zarówno z torfu strukturalnego jak i rozpylonego. Zostały one zestawione w tabeli 6. Znajdują się tutaj szczepy wyizolowane z obu torfów. Kolejność wpisywania do tabeli uzależniono od stopnia stymulującego działania wyciągu. Największe różnice we wzroście na pożywce kontrolnej i na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem wykazują szczepy Nr 29 i 42, przy czym szczep Nr 29 reaguje bardziej dodatnio na wyciąg z torfu rozpylonego. Na wyciąg z torfu rozpylonego reagują również bardziej dodatnio szczepy Nr 30, 96 i 12, na wyciąg z torfu strukturalnego, szczepy nr 70 i 62. Szczep Nr 22 różni się tym od pozostałych, że wyciąg gotowany działa na jego wzrost hamująco.

Wszystkie szczepy z wyjątkiem Nr 70 na agarze z glukozą i peptonem rosły co najmniej dobrze, na agarze ubogim z glukozą i solami (kontrola bez wyciągu) rosły bardzo słabo pałki niesporujące (Nr 70; 75; 26). Pięć

Tabela 6

## Szczepy rosnące najlepiej na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość pasaż.	Ilość obserwacji	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwagi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	29	pałki G+ spor. nieruchl.	3	9	2,4	4,8	2,5	3,5	5,8	3,9	3,8	9	+
2	42	pałki G+ spor. nieruchl.	3	8	4,2	7,4	6,6	6,0	7,2	6,7	5,5	9	-
3	70	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	1,9	4,7	2,9	3,5	3,9	3,3	3,1	5	-
4	75	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	1,5	3,9	1,7	1,4	4,2	3,0	2,8	9	-
5	30	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	3,7	5,1	3,8	4,7	5,8	3,8	3,8	8	+
6	99	sarcyny G+	3	8	2,5	4,1	3,5	3,4	4,2	3,5	3,5	8	+
7	96	pałki G— niespor. ruchl.	3	8	5,2	6,2	5,1	6,0	7,0	6,5	5,9	9	-
8	12	pałki G+ niespor. ruchl.	3	9	2,3	2,9	2,8	2,4	4,1	3,0	2,8	6	+
9	5	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	3,1	3,9	3,4	3,2	3,9	3,4	3,1	9	+
10	26	pałki G— niespor. ruchl.	?	9	1,9	2,6	2,3	2,1	2,7	2,2	2,1	7	+
11	62	koki G+ w kr. łańc.	3	9	3,1	3,7	3,5	3,0	3,3	3,1	3,1	9	-
12	22	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	5,1	5,8	4,2	5,3	5,7	4,1	5,5	9	+

+ różnice utrzymują się na tym samym poziomie

— różnice słabną.

Tabela 7

## Szczepy rosnące najlepiej na pożywce z wyciągiem z torfu rozpylonego sterylizowanym tlenkiem etylenu

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość pasaż.	Ilość obserwacji	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwagi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	3	pałki G— niespor. ruchl.	3	7	5,5	5,7	5,1	5,7	7,4	6,5	5,7	9	—
2	10	pałki G— spor. nieruchl.	3	9	5,1	5,1	6,1	6,1	7,1	5,8	6,9	9	—
3	45	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,7	2,8	3,9	3,3	4,2	2,5	2,8	9	+
4	59	pałki G+ spor. nieruchl.	3	9	3,1	3,3	3,3	3,3	4,5	3,3	3,7	9	+
5	47	pałki G+ niespor. ruchl.	3	8	2,4	3,0	3,0	2,9	3,4	3,0	3,0	9	—
6	72	pałki G— niespor. nieruchl.	3	9	2,2	0,9	0,5	2,4	3,0	1,7	1,3	3	+
7	38	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	3,4	3,4	3,8	3,0	4,2	3,4	2,8	8	+

\* objaśnienia w tab. 6

szczepów (oznaczonych minusami) w czasie kolejnych przeszczepień wykazywało coraz mniejsze różnice we wzroście na różnych kombinacjach.

W tabeli 7 zestawiono szczepy na wzrost, których działa stymulująco wyciąg z torfu rozpylonego, sterylizowany tlenkiem etylenu. Taki sam wyciąg z torfu strukturalnego albo działa hamująco jak w przypadku szczepu Nr 72, albo działa słabo stymulująco, lecz nie silniej niż inne wyciągi z tego samego torfu (szczep Nr 47), względnie nie działa wcale.

Interesującym w tym zestawieniu jest fakt, że na 7 szczepów reagujących dodatnio na wyciąg z torfu rozpylonego, 5 wyizolowano z torfu strukturalnego. Wspomniany już szczep Nr 72 charakteryzuje się ogólnie bardzo słabym wzrostem nawet na agarze „bogatym” z glukozą i peptonem. 3 szczepy wykazywały coraz mniejsze różnice we wzroście w czasie kolejnych przeszczepień. 5 szczepów (tabela 8) rosło najlepiej na pożywce z wyciągiem gotowanym. Wśród nich znalazły się 2 szczepy sarcin i 1 szczep drożdży, który zresztą reagował na ten wyciąg coraz słabiej.

Szczepy pałek Nr 56 i 94 są ciekawe ze względu na to, że wyciągi niegotowane działają na nie hamująco. Zaobserwowano również, że niektóre szczepy reagują dodatnio na wyciąg gotowany, ale tylko z torfu strukturalnego względnie tylko z torfu rozpylonego (tabela 9). W tabeli 10 zestawiono szczepy, które reagowały dodatnio na wyciąg, ale poza szczepem Nr 16 i 80, obojętne dla ich wzrostu było pochodzenie i sposób przygotowania wyciągu.

Dwa pierwsze szczepy rosły najlepiej na wyciągu sączonym z torfu rozpylonego, lecz ta własność malała przy kolejnych przeszczepianiach. 8 szczepów nie reagowało na wyciąg, względnie reagowało tylko ujemnie (tabela 11).

Ogólnie można stwierdzić, że nawet przy tak mało czułej metodzie jaką jest obserwacja wzrostu na skosie agarowym oraz przy małej ilości obserwowanych szczepów potwierdzono wnioski wyprowadzone z liczenia kolonii na szalkach.

Największa ilość szczepów rosła najlepiej na pożywce z wyciągiem sterylizowanym tlenkiem etylenu, mniejsza na pożywce z wyciągiem gotowanym, najmniejsza na pożywce z wyciągiem sączonym. Ponieważ w każdej przedstawionej grupie znajdowały się szczepy wyizolowane z obu torfów, oraz reakcja na wyciąg z określonego torfu nie zależała od pochodzenia szczepu, nie zdołano wykazać różnic w zachowaniu się szczepów pochodzących z torfu strukturalnego i rozpylonego. Wykazano natomiast, że w wyciągach znajdują się substancje hamujące wzrost niektórych szczepów, albo tylko w wyciągu gotowanym, albo tylko w wy-

ciągu niegotowanym, względnie i w gotowanym i w niegotowanym. Te wyizolowane szczepy, które nie tracą własności reagowania na określony wyciąg po ulepszeniu metody określania wzrostu przez zastosowanie np. nefelometru, będą mogły być wykorzystane jako szczepy testowe w dalszych badaniach nad substancjami czynnymi torfów.

Obserwacje odnośnie promieniowców i pleśni ograniczono do obserwacji konidiowania ze względu na trudności porównywalnego szczepienia wszystkich próbek. Brak konidiowania oznaczono jako 0; ślad konidiowania = 1; konidiowanie częściowe = 2; konidiowanie całkowite = 3. W tabeli 12 umieszczono cyfry dotyczące ostatnich obserwacji. W przypadku gdy zdolności konidiowania na danej pożywce wzrastały, zaznaczono to strzałką skierowaną do góry, gdy malały, strzałką skierowaną do dołu. Stwierdzono, że na osiem zbadanych szczepów, trzy zupełnie nie reagowały na dodanie wyciągu. *Nocardia* Nr 43 i *Nocardia* Nr 93 miały konidiowanie całkowite na wszystkich pożywkach „ubogich”, niezależnie od dodania wyciągu, *Nocardia* Nr 95 wogóle na stosowanych przez nas podłożach nie miała zdolności konidiowania. Dwa szczepy reagowały dodatnio na uzupełnianie pożywki wyciągiem: *Nocardia* Nr 15 i *Streptomyces* Nr 86. Pozostałe trzy szczepy reagowały różnie na różne wyciągi. Z powodu zbyt małej ilości obserwowanych promieniowców nie można na razie wyciągnąć ogólniejszych wniosków. Znalezienie szczepów, których zdolności konidiowania uzależnione są częściowo od dodania wyciągu, wskazuje na celowość badań w tym kierunku.

## DYSKUSJA

Zagadnienia, które miały być wyjaśnione w niniejszej pracy, sprecyzowane we wstępie, były dość obszerne. Na popracie powyższego twierdzenia możnaby przytoczyć szereg prac wykonanych w doskonale wyposażonych ośrodkach badawczych, które zajmując się czynnymi substancjami glebowymi rozpatrywały je tylko z jednego punktu widzenia, stymulującego, względnie hamującego wzrost mikroorganizmów. Takie zażewienie pozwala na zastosowanie precyzyjniejszej metodyki badania, oraz umożliwia uzyskanie dokładniejszych wyników, traci na tym jednak obraz całości. W naszym przypadku, gdy chodziło przede wszystkim o uzyskanie danych mikrobiologicznych charakteryzujących dwa różne pod względem struktury i urodzajności torfy należało brać pod uwagę możliwie najwięcej aspektów.

Zanim przejdziemy do omówienia wyników zatrzymamy się pokrótce na metodyce badań.

Najszerzej rozpowszechnioną metodą liczenia ilości mikroorganizmów jest metoda liczenia kolonii na szalkach. Jest ona obciążona rozlicznymi

błędami, z których może najpoważniejszym jest stosowanie selektywnego podłoża i selektywnych warunków parcjalnego ciśnienia tlenu, oraz temperatury. Uniknięcie tego błędu jest prawie niemożliwe, gdyż wymagałoby mnożenia ilości kombinacji prawie w nieskończoność.

Lochhead i Burton (16) w pracy swej nad glebowymi substancjami stymulującymi, do izolacji wrażliwych na te substancje organizmów używał agaru z wyłącznym dodatkiem ekstraktu glebowego. Dodatnią stroną takiej pożywki jest jej selektywność skierowana prawidłowo, ujemną — bardzo zwolniony wzrost kolonii, niemożność wprowadzenia kontroli, z czym związana jest niemożność porównywania ilości organizmów wrażliwych i niewrażliwych na niedobór substancji czynnych, oraz praktycznie wykluczenie badań nad substancjami hamującymi.

W naszej pracy zastosowano do izolacji i badania wpływu substancji czynnych na wzrost mikroorganizmów (przy użyciu metody szalkowej) pożywkę, która prócz wyciągu zawierała 1% glukozy oraz sole. Wielokrotny wzrost ilości kolonii na szlakach z wyciągiem w stosunku do kontroli wykazał, że pomimo wzbogacenia pożywki nadaje się ona do wykazania obecności w torfach substancji stymulujących. Na tej samej pożywce stwierdzono ponadto istnienie substancji hamujących.

Pierwsze doświadczenia, w których do obserwacji wzrostu wyizolowanych mikroorganizmów na skosach zastosowano również pożywkę wzbogaconą, spotykały się z niepowodzeniem. Przyczyną tego niepowodzenia była zbyt mało czuła metoda bezpośredniej obserwacji. Należało więc albo zmienić metodę, albo stworzyć warunki w których okazałoby się ona dostateczna. Ddwudziestokrotne obniżenie zawartości glukozy, oraz dziesięciokrotne obniżenie zawartości soli mimo, że wpłynęło na ogólne osłabienie wzrostu, pozwoliło jednocześnie uchwycić różnice poprzednio nieostrzegalne.

W następnej części pracy zmienimy również metodę bezpośredniej obserwacji na metodę nefelometryczną tam, gdzie będzie ona mogła być zastosowana.

Najmniejszym zagadnieniem do rozwiązania było znalezienie i określenie mikrobiologicznych różnic pomiędzy torfem strukturalnym i rozpylonym na podstawie których możnaby prowadzić dalsze badania nad urodzajnością torfowisk meliorowanych.

Zagadnienie to rozwiązano częściowo, uzyskano jednak konkretne podstawy co do kierunku dalszych badań. Obliczenia ilości mikroorganizmów w obu badanych torfach wykazały w jednych doświadczeniach większą ilość w torfie rozpylonym, w innych w torfie strukturalnym. Stwierdzono jednakże, że zwiększenie się ilości mikroorganizmów w torfie rozpylonym związane jest zawsze z procentowym wzrostem ilości promieniowców. Zbyt mała ilość wyizolowanych promieniowców nie pozwoliła na ujęcie

statystyczne wpływu wyciągów torfowych na ich konidiowanie. Uzyskano jednak pewne dane pozwalające przypuszczać, że wyciąg z torfu rozpylonego wpływa silniej stymulująco na rozmnażanie promieniowców niż wyciąg z torfu strukturalnego. Uważamy, że tym zagadnieniem należałoby się zająć w następnym roku uwzględniając ponadto działanie bezkomórkowych przesądów z wyizolowanych promieniowców na wzrost innych mikroorganizmów torfowych.

Badanie zmian zachodzących w mikroflorze obu torfów w próbkach przechowywanych w pracowni ujawniło silniejszy wzrost ilości mikroorganizmów torfu rozpylonego, w temperaturze 7° niż w temp. 22°. Wynik ten, który zresztą musi być sprawdzony, wskazuje na większą ilość w torfie rozpylonym psychrofilii niż mezofili (odwrotnie niż w torfie strukturalnym).

Następne doświadczenia powinny uwzględnić typy psychrofilne torfu rozpylonego i ich stosunek do pozostałej mikroflory. Badania nad 53 wyizolowanym szczepami potwierdziły ogólny pogląd o złożoności mikroflory glebowej. Stwierdzono, że substancje zawarte w jednym i tym samym wyciągu mogą wpływać zależnie od mikroorganizmu stymulująco względnie hamująco. Posługując się odpowiednio dobranymi szczepami testowymi i czułą metodą oznaczania ich wzrostu można będzie starać się określić czynne substancje pod względem chemicznym, oraz stwierdzić jakie ich ilości występują w obu różnych, badanych torfach.

Tabela 8

## Szczepy rosnące najlepiej na pożywce z wyciągiem gotowanym

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość pasaż.	Ilość obserwacji	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwagi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	20	sarcyny G+	3	9	1,5	2,7	3,2	2,3	3,7	3,9	2,8	6	+
2	64	sarcyny G+	3	9	2,4	3,0	3,2	2,8	3,0	3,3	2,8	9	+
3	19	drożdże	3	9	5,2	5,9	6,0	5,4	5,8	5,9	5,1	9	—
4	56	pałki G+ niespor. nieruchl.	3	9	3,4	2,4	4,0	2,3	3,3	3,9	2,4	8	+
5	94	pałki G+ niespor. nieruchl.	3	8	3,4	3,1	3,7	2,5	3,4	3,9	2,9	8	+

\* objaśnienia w tab. 6



Tabela 9  
Szczepy rosnące najlepiej na pożywce z wyciągiem gotowanym z torfu strukturalnego, względnie z torfu rozpylonego

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość pasaż.	Ilość obserwacji	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwagi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	46	pałki G+ spor. nieruchl.	3	9	3,2	2,9	4,0	3,2	2,8	3,3	2,7	9	+
2	41	pałki G— niespor. ruchl.	3	8	3,6	4,1	4,4	3,4	4,1	4,1	3,1	8	+
3	73	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,8	3,4	3,1	3,1	3,9	4,2	2,8	8	—
4	90	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	4,9	5,1	5,1	5,2	5,1	6,3	5,0	9	—
5	32	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	3,3	3,0	2,8	2,7	3,5	4,4	3,3	8	+

\* objaśnienia w tab. 6

Tabela 10  
 Szczepy rosnące najlepiej na pożywce z wyciągiem sączonym, względnie rosnące lepiej na pożywkach z wyciągiem niż na kontroli, ale słabo zróżnicowane

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość obser- wacji	Ilość pasaż.	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwa- gi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	16	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	2,2	5,9	5,1	5,9	6,0	2,9	6,3	7,0	—
2	80	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	1,5	3,1	2,7	2,4	3,1	2,4	3,2	8,0	—
3	8	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,2	3,2	3,3	2,9	3,3	3,2	3,2	6,0	+
4	76	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,3	3,0	3,1	3,1	3,3	3,7	3,7	8,0	+
5	97	pałki G— niespor. ruchl.	3	8	1,8	2,9	3,0	3,2	3,2	2,9	3,0	6,0	+
6	68	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,3	2,9	2,7	2,8	2,9	3,0	3,0	8,0	+
7	66	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,7	3,1	3,2	2,9	3,1	3,1	3,0	9,0	+

\* Objaśnienia w tab. 6

Tabela 11

Szczepy nie reagujące na wyciąg, względnie reagujące ujemnie

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość pasaż.	Ilość obserwacji	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwagi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	9	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	5,0	3,1	4,9	3,7	4,8	4,4	3,7	9	
2	27	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	3,2	2,7	3,1	3,1	3,0	3,2	2,7	9	
3	21	pałki G+ spor. ruchl.	3	9	2,7	2,5	2,8	2,8	2,4	2,9	2,4	3	
4	58	pałki G— niespor. ruchl.	3	9	2,0	2,2	2,1	2,2	2,2	2,1	2,0	9	
5	40	pałki G— niespor. ruchl.	3	8	6,0	6,0	6,3	6,0	6,3	6,2	6,0	9	
6	89	drożdże	3	9	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	9	
7	91	drożdże	3	8	4,1	4,1	4,1	4,0	4,1	4,1	4,0	9	
8	92	pałki G— niespor. ruchl.	3	8	3,0	3,4	2,7	3,2	3,1	3,0	3,0	6	

Tabela 12

## Wpływ czynnych substancji wyciągów torfowych na konidowanie promieniowców i pleśni

Nr kol.	Nr szczepu	Charakterystyka szczepu	Ilość pasaż.	Ilość obser-wacji	Poż. bez wyciągu	Pożywka z wyc. z torfu strukturalnego			Pożywka z wyc. z torfu rozpylonego			Agar bogaty z gluk. i pept.	Uwagi*
						Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony	Wyciąg steryl. tl. et.	Wyciąg gotow.	Wyciąg sączony		
1	43	Nocardia	3	8	3	3	3	3	3	3	3	1	+
2	93	Nocardia	3	8	3	3	3	3	3	3	3	2	+
3	95	Nocardia	3	8	0	0	0	0	0	0	0	0	-
4	15	Nocardia	3	9	2	3	↗ 3	3	3	↗ 3	↗ 3	2	+
5	86	Streptomyces	3	9	2	3	3	2	2	3	3	1	+
6	17	Nocardia	3	9	3	1	↘ 1	3	3	↗ 3	3	2	+
7	69	Nocardia	3	9	2	0	2	3	↘ 1	↗ 2	↗ 2	0	+
8	98	Nocardia	3	9	2	1	0	0	1	↘ 2	↘ 1	2	+
9	79	Penicillium	3	9	3	3	3	3	3	3	3	3	+

↗ — konidowanie coraz lepsze

↘ — konidowanie słabnie

\* Objaśnienia w tab. 6

## LITERATURA

1. Bassalik K. — Zur „Auximenfrage” Acta Societatis Bot. Pol. Vol. XI. 4, 1934.
2. Bassalik K. — Zmiany w torfowisku wywołane odwodnieniem w świetle procesów mikrobiologicznych. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 10, 74—81. 1957.
3. Bassalik K., Janota L., Niewiarowska J., Fiuczek M., Halweg H. — Badania procesów mikrobiologicznych w torfie strukturalnym i rozpylonym. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 2, 122, 1956.
4. Mockeridge F. A. The occurrence and nature of the plant growth-promoting substances in various organic manurial composts. Biochem. J. 14 432—450, 1920.
5. Bassalik K., Neugebauer J. — Bios, auksymony, witaminy i koloidy w świetle badań nad wiązaniem azotu przez *Azotobacter chroococcum* Beij. Acta Soc. Bot. Pol. VIII 3/4, 212—251, 1931.
6. Lilly V. G., Leonian L. H. — Vitamin B<sub>1</sub> in soil. Science 89, 292, 1939.
7. Müller W. F. — Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes *Mucor ramannianus*. Ber. schweiz. botan. Ges. 51, 165, 1941.
8. Carpenter C. C. — Riboflavin — vitamin B<sub>2</sub> in soil. Science 98, 109—110, 1943.
9. West P. M. Lochhead A. G. — Qualitative studies of soil microorganisms IV. The rhizosphere in relation to the nutritive requirements of soil bacteria. Can. J. Research C. 18, 129—135, 1940.
10. Lochhead A. G., Chase F. E. — Bacterial growth factors in soil. Science 96, 387, 1942.
11. Lochhead A. G., Thexton R. H. — Vitamin B<sub>12</sub> as a growth factor for soil bacteria. Nature 167, 1034, 1951.
12. Lochhead A. G. Thexton R. H. — Qualitative studies of soil microorganisms. x. Bacteria requiring vitamin B<sub>12</sub> as a growth factor. J. Bacteriol. 63, 219—226, 1952.
13. Lochhead A. G., Burton M. O. — An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis. Can J. Botany 31, 7—22, 1953.
14. Stallings J. H. — Soil produced antibiotics — plant disease and insect control. Bact. Rev. 18, (2), 131—146 (1954).
15. Vaňek Z., Doležilová L., Řekáček Z. — (Biologický ústav ČSAV Prague) Antibiotické vlastnosti čerstvé izolovaných půdních aktinomycet. Československá Mikrobiol. 3 (2) 117—123, 1958.
16. Bassalik K., Janota-Bassalik L., Niewiarowska J., Olczyk C. — Badania nad wpływem nieznanych związków organicznych na urodzajność torfowisk meliorowanych. Cz. I. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 10, 121—126. 1957.
17. Bassalik K., Janota-Bassalik L., Niewiarowska J., Olczyk C. — Badania nad wpływem nieznanych związków organicznych na urodzajność torfowisk meliorowanych Cz. II. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 13, 153—159 (1958).
18. Lochhead A. G., Burton M. O. — Importance of soil extract in the enumeration and study of soil bacteria. Trans. Intern. Congr. Soil. Sci., 6-th Congr. Paris. C. 157—161. 1956.

К. Бассалик, Л. Янота-Бассалик, Ц. Ольчик, Г. Гальвер

## ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ТОРФЯНЫХ ВЫТЯЖЕК НА РАЗВИТИЕ МИКРОФЛОРЫ В СТРУКТУРНОМ И РАСПЫЛЕННОМ ТОРФЕ

### Резюме

Из образцов структурного и распыленного торфов, отобранных в опытной станции Бебжа из горизонта 2—10 см были сделаны вытяжки, в которых определялось содержание азота методом Къельдаля, содержание сухой массы и зольных элементов. Вытяжки далее подвергались стерилизации путем прибавки окиси этилена, кипячения или пропускания через асбестовый фильтр Зайтца ЕКС 1797, после чего вносились в питательную среду, на которой изолировались торфяные микроорганизмы. Исследовалось влияние стерилизованных различным образом вытяжек на количество колоний, получаемых на чашках. Были установлены сильно стимулирующие свойства вытяжек (в самой сильной степени в некипяченой и нефильтрованной вытяжке), а в одном опыте было констатировано также тормозящие свойства вытяжек. Сравнение количества микроорганизмов, находящихся в структурном и распыленном торфе показало, что их преобладание в распыленном торфе вяжется с увеличением процентного содержания актиномицетов. Исследовалось влияние хранения торфа в лабораторных условиях в температуре 22° и 7° Ц на количество микроорганизмов в обоих видах торфа и на их отношение к активным веществам торфяных вытяжек. Было установлено, что после недельного хранения в образцах торфа увеличилось общее количество микроорганизмов, тогда как после трех недель оно уменьшилось. В структурном торфе в температуре 7° Ц наблюдались меньшие колебания количества микроорганизмов, чем в температуре 22° Ц, тогда как в распыленном торфе микроорганизмы размножались в гораздо большей степени в температуре 7° Ц. Сверх того, наблюдалось значительное процентное снижение количества микроорганизмов чувствительных на стимулирующие вещества, находящиеся в вытяжке стерилизованной окисью этилена, а повышение количества микроорганизмов чувствительных на стимулирующие вещества, находящиеся в кипяченой вытяжке (особенно из распыленного торфа).

Исследовалось влияние активных веществ на развитие 44 штаммов, изолированных из обоих исследуемых видов торфа. Было установлено, что большинство штаммов обнаруживает положительную реакцию на вытяжку, стерилизованную окисью этилена, меньшее количество —

на кипяченую вытяжку, а самое малое количество — на фильтрованную вытяжку. Шесть штаммов палочек и дрожжей не реагировало на вытяжку, два штамма палочек реагировало отрицательно на обе исследуемые вытяжки, независимо от способа их стерилизации.

Вещества, тормозящие рост некоторых штаммов, выступали либо только в кипяченой вытяжке, либо в некипяченой. Определенная реакция на вытяжку не обнаруживала зависимости от происхождения штамма.

Исследовалось влияние активных веществ на образование конидий у восьми актиномицетов и одной плесени. Три штамма актиномицетов не обнаруживали положительной реакции на вносы вытяжки, два реагировали положительно, а три реагировали на разные вытяжки различным образом. Влияние вытяжек на плесень не наблюдалось.

## THE INFLUENCE OF ACTIVE SUBSTANCES IN PEAT EXTRACTS ON THE DEVELOPMENT OF MICROFLORA IN STRUCTURAL AND DUSTY PEATS

### S u m m a r y

From structural and dusty peats taken at Biebrza from a depth of 2—10 cm., extracts have been obtained in which the content of dry substance and ash were determined. The content of nitrogen was established by Kjeldahl's method.

Extracts were sterilized by adding ethylene oxide, by boiling or respectively by passing through an asbestos strainer of the Seitz type EKS 1797, and were then added to a medium on which peat microorganisms had been isolated.

The influence of the variously sterilized extracts on the quantity of colonies obtained on was tested. The extracts proved to have strong stimulating properties (the strongest were noted in non-boiled and non-filtered extracts). In one of the tests it was stated that the extracts possess also inhibiting properties.

When comparing the quantity of microorganisms found in structural and dusty peats it was observed that the quantitative superiority of microorganisms in dusty peats was due to the percent increase of actinomycetes.

Having stored both kinds of peat in temperatures of 2°C and 7°C one had tested the influence of such treatment: a) on the quantity of



microorganisms contained, and b) on their relation towards the active substances of peat extracts.

It was stated, that after a week's storage of samples, the general quantity of microorganisms increased and that it decreased after three-weeks storage. In structural peat smaller differences in the quantity of microorganisms were stated at a temperature of 7°C than at 22°C; in dusty peat the microorganisms developed more rapidly at 7°C. An important percent decrease was moreover stated in the quantity of microorganisms, susceptible to stimulating substances, which are to be found in extracts sterilized with ethylene oxide; an increase of microorganisms susceptible to stimulating substances contained in the boiled extracts (particularly in dusty peats).

The influence of active substances on the growth of 44 strains obtained from both kinds of peat was examined. It was stated that the majority of the strains reacts positively to extracts sterilized with ethylene oxide, a smaller quantity to boiled extracts, and the smallest quantity to filtered extracts.

Six strains of bacteria and yeast did not react to the extract, two strains of bacteria reacted negatively to both tested extracts, regardless of the method by which the extract was sterilized.

Substances inhibiting the growth of some of the strains appeared either only in boiled extracts or only in nonboiled extracts. A determined reaction to the extract was independent of the origin of the strain.

The influence of active substances on the bearing of conidia by 8 (eight) actinomycetes and 1 mold was examined. Three strains of actinomycetes did not react to the addition of extract, two reacted positively, three reacted in different ways to various extracts. There was no observable reaction of mold to extracts.