

Über die Natur des Entgiftungseffekts der Humussäuren

VLADIMÍR TICHÝ, EVA MANNSBARTOVÁ und JAROSLAV MINÁŘ

Laboratorium für Physiologie und Anatomie der Pflanzen, Naturwissenschaftliche Fakultät
J. E. Purkyně-Universität, Brno*)

Eingegangen am 22. Juni 1964

Abstrakt. In der Arbeit ist der Entgiftungseffekt von Humussäuren und dessen näheres Studium beschrieben. Die Blätter von Wasserpest (*Anacharis canadensis* [MICHX.] PLANCH.) sterben in der aus gemeiner Quecke (*Agropyron repens* [L.] P. BEAUV.) gewonnenen Agropyrenlösung nach einer Zeit ab, welche von der Konzentration dieses Giftes abhängig ist. Durch Zugabe von einigen Humusfraktionen wird diese Zeit je nach der Konzentration dieser Stoffe mehr oder weniger verlängert. Ein Versuch mit Fulvosäuren zeigte, dass die Schutzwirkung dieser Fraktion auch dann zur Geltung kommt, wenn die Wasserpestblätter vorläufig in ihrer Lösung adaptiert und erst dann der nachträglichen Wirkung der Agropyrenlösung unterworfen werden. Man kann also die Schutzwirkung der Fulvosäuren nicht bloss auf die chemische oder physikalisch-chemische ausserhalb der Zelle durchlaufende Herabsetzung der biologischen Aktivität Agropyrens zurückführen. Sie ist ausserdem auch durch eine von Fulvosäuren hervorgerufene Erhöhung der biologischen Resistenz der Zelle zu erklären.

In unserer vorgehenden Mitteilung (MINÁŘ, MANNSBARTOVÁ und TICHÝ 1964) haben wir gezeigt, wie der Einfluss von stimulierenden und sublethalen Mengen Agropyren auf die Alge *Scenedesmus obliquus* (TURP.) KRÜGER in Anwesenheit von Huminsäure, Hymatomelansäure und von Fulvosäuren geändert wird. Um nun die Interaktion von Agropyren und Humussäuren eingehender studieren zu können, haben wir diese Arbeit durchgeführt, in der wir das Verhalten des Blattzellenprotoplasten der Wasserpest (*Anacharis canadensis* [MICHX.] PLANCH.) bei kombinierter Wirkung an grösseren Mengen dieser Substanzen untersuchen. Es ist nämlich gut bekannt, dass Agropyren vor allem die normale Plasmastruktur beschädigt (LAŠTŮVKA und MINÁŘ 1958, LAŠTŮVKA 1960, 1961), während die Humussäuren die Vitalität der Zelle günstig beeinflussen können (RYPÁČEK 1962, VLACHOVÁ 1962). Man kann deshalb voraussetzen, dass Humussäuren auch diese von Agropyren hervorgerufenen pathologischen Veränderungen günstig beeinflussen werden.

*) Adresse: Brno, Kotlářská 2

Material und Methode

Als Versuchsorganismus wurde in dieser Arbeit der Wasserpest (*Anacharis canadensis* [MICHX.] PLANCH.) benutzt, welcher im Glashausbassin des Laboratoriums für Physiologie und Anatomie der Pflanzen gezüchtet wurde. In den Blattzellen dieser Pflanze wurden die durch kombinierte Wirkung des aus der gemeinen Quecke isolierten Agropyrens und der aus Torf gewonnenen Humus-säuren (Huminsäure, Hymatomelansäure und Fulvosäuren) bedingten Veränderungen studiert. Alle diesen Stoffe wurden auf dieselbe Weise und aus demselben Material gewonnen, welche in der vorhergehenden Arbeit (MINÁK, MANNSBARTOVÁ und TICHÝ 1964) beschrieben wurden.

In der ersten Versuchsreihe wurde in drei Experimenten der Einfluss

- a) von Agropyren bei gleichzeitiger Applikation mit Huminsäure,
- b) von Agropyren mit Hymatomelansäure und
- c) von Agropyren mit Fulvosäuren

auf die Wasserpestzellen studiert. Es wurden Agropyrenlösungen in Konzentrationen 0 (Kontrolle), 1, 10, 35 und 70 mg/l und Huminsäurelösungen in Konzentrationen 0 (Kontrolle), 10, 100, 200 und 400 mg/l bereit, sowie Lösungen, welche diese beiden Komponenten in allen Kombinationen dieser Konzentrationen enthielten. So wurden 25 Varianten gewonnen. Die zweite Reihe von 25 Lösungen wurde auf gleiche Weise aus Agropyren und aus Hymatomelansäuren, die dritte Reihe aus Agropyren und aus Fulvosäuren bereit. In diese Lösungen wurden die von den Stengelspitzen abgeschnittenen Wasserpestblätter eingelegt und danach innerhalb eines Zeitraumes von 1 Stunde bis zu 14 Tagen wiederholt bewertet.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die cytophysiologische Reaktion der Wasserpestblattzellen auf die Wirkung des Agropyrens nach vorläufiger, dreitägiger Adaptation an Fulvosäuren untersucht. Die Fulvosäuren wurden in Konzentrationen von 0 (Kontrolle), 10, 100, 200 und 400 mg/l und Agropyren in Konzentrationen von 10, 35 und 70 mg/l benutzt. Die Wirkungsintensität des Agropyrens, bzw. die Veränderungen der Plasmaresistenz gegenüber dieser Substanz wurden nach der Wirkungsdauer des Agropyrens beurteilt, innerhalb welcher die beginnende irreversible Kontraktion des Protoplasten — ein Merkmal des Zellenabsterbens (LAŠTŮVKA 1964) — eintrat. Die Fälle, bei denen die irreversible Kontraktion des Protoplasten in weniger als 10 % der beobachteten Zellen gefunden wurde, reichten wir in die Phase des beginnenden Prozesses ein. Der Beobachtung wurden die distalen Hälften der Blätter unterworfen. Für die Zählung wurde jeweils das dritte, voll entfaltete Blatt von der Stengelspitze an verwendet. In allen Fällen bilden die festgestellten Werte einen Durchschnitt der bei drei Blättern gefundenen Messungsergebnisse.

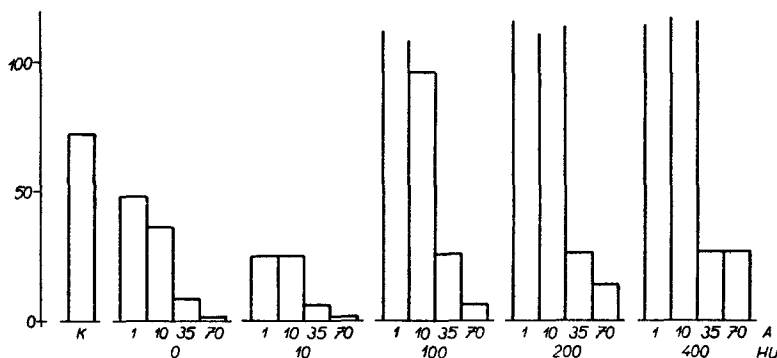


Fig. 1. Veränderungen der Zeitabschnitte, welche für das Herauftreten irreversibler Protoplastenkontraktion unter der Einwirkung von Agropyren bei gleichzeitiger Huminsäureapplikation notwendig sind. Abszisse: A — Konzentration von Agropyren: 1, 10, 35 und 70 mg/l., HU — Konzentration von Huminsäuren: 0, 10, 100, 200 und 400 mg/l. Ordinate: Die fürs Eintreten der beginnenden, irreversiblen Protoplastenkontraktion notwendige Dauer in Stunden. K — dieselbe Dauer für die Variante mit reinem destilliertem Wasser.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe werden in Fig. 1, 2 und 3 veranschaulicht. In Fig. 1 werden die für das Hervortreten der beginnenden irreversi-

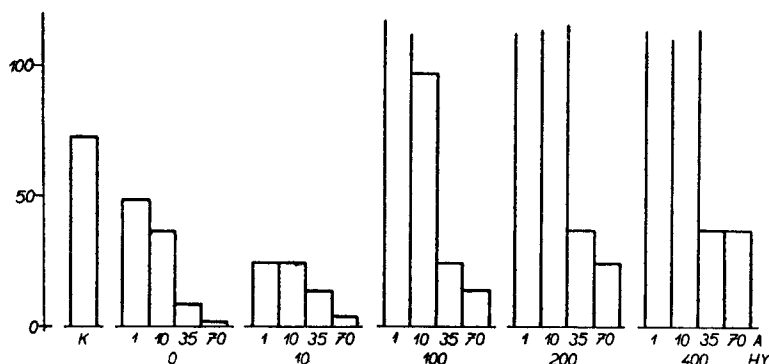


Fig. 2. Veränderungen der Zeitabschnitte, welche für das Auftreten irreversibler Protoplastenkontraktion unter Einwirkung von Agropyren bei gleichzeitiger Hymatomelansäureapplikation notwendig sind. Abscisse: A — Konzentration von Agropyren: 1, 10, 35 und 70 mg/l, HY — Konzentration von Hymatomelansäure: 0, 10, 100, 200 und 400 mg/l. Ordinate: Die für Eintreten der beginnenden, irreversiblen Protoplastenkontraktion notwendige Dauer in Stunden. K — dieselbe Dauer für die Variante mit reinem destilliertem Wasser.

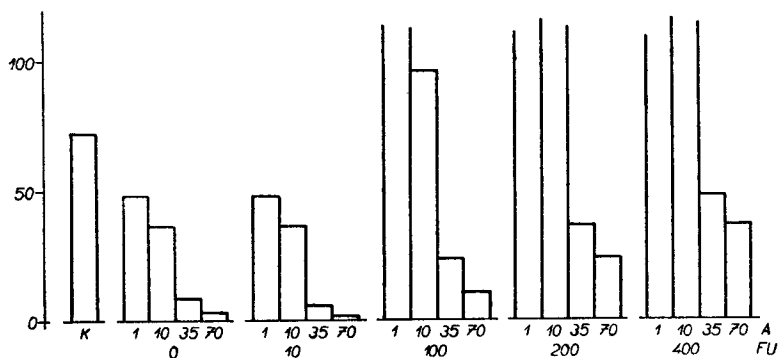


Fig. 3. Veränderungen der Zeitabschnitte, welche fürs Auftreten irreversibler Protoplastenkontraktion unter Einwirkung von Agropyren bei gleichzeitiger Fulvosäurenapplikation notwendig sind. Abscisse: A — Konzentration von Agropyren: 1, 10, 35 und 70 mg/l, FU — Konzentration von Fulvosäuren: 0, 10, 100, 200 und 400 mg/l. Ordinate: Die fürs Eintreten der beginnenden, irreversiblen Protoplastenkontraktion notwendige Dauer in Stunden. K — dieselbe Dauer für die Variante mit reinem destilliertem Wasser.

blen Protoplastenkontraktion in verschiedenen Agropyren- und Huminsäuregemischen notwendigen Zeitabschnitte demonstriert. Fig. 2 zeigt die im Versuch mit Hymatomelansäure mittels derselben Methode erhaltenen Ergebnisse. Fig. 3 bringt endlich die Ergebnisse des Versuches mit Agropyren und mit

Fulvosäuren. Fig. 4 veranschaulicht die Resultate der zweiten Versuchsreihe. Sie zeigt die Veränderungen der Zeit, welche für das Auftreten der Protoplastenkontraktion unter dem Einfluss des Agropyren notwendig ist, wenn das Objekt vorher mit Fulvosäuren behandelt wurde.

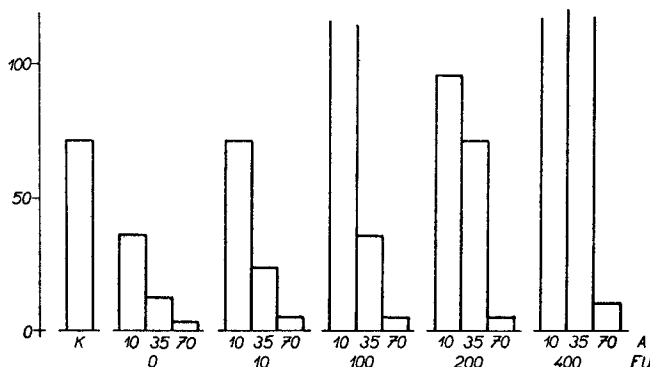


Fig. 4. Veränderungen der Zeitabschnitte, welche fürs Auftreten irreversibler Protoplastenkontraktion unter Einwirkung von Agropyren nach vorgehender Fulvosäurenapplikation notwendig sind. Abscisse: A — Konzentration von Agropyren: 10, 35 und 70mg/l, FU — Konzentration von Fulvosäuren: 0, 10, 100, 200 und 400 mg/l. Ordinate: Die für das Eintreten der beginnenden, irreversiblen Protoplastenkontraktion notwendige Dauer in Stunden. K — dieselbe Dauer für die Variante mit reinem destillierten Wasser.

Diskussion

In unseren früheren Experimenten (MINÁŘ, MANNSBARTOVÁ und TICHÝ 1964) erwies sich die Alge *Scenedesmus obliquus* als ein für die Testprüfungen der biologischen Aktivität der Agropyren- und Humussäurengemischen geeignetes Objekt. Die geringe Zellengrösse dieser Alge ist jedoch ein wesentlicher Nachteil bei der direkten cytophysiologischen Untersuchung. LAŠTŮVKA (1964) zeigte, dass zu derartigem Studium die Blätter des Wasserpest besser geeignet sind. Ihre Zellen starben unter dem Einfluss des Agropyren ab und wiesen dabei je nach der Konzentration dieser Substanz verschiedene Veränderungen ihres Inhalts auf. Es war auch in unseren Experimenten möglich, solche pathologischen Veränderungen zu beobachten und photographisch zu erfassen (Fig. 5). Sie beginnen mit einer Verlangsamung und nachfolgender Abbrechung der Plasmabewegung. Bald darauf tritt eine mit der Ektoplastbeschädigung verknüpfte Kontraktion des Protoplasten in Erscheinung (Fig. 5b), welche unter einer weiteren Agglutination von Chloroplasten vor sich geht (Fig. 5c). Die letzten verlieren endlich ihre scharfe Abgrenzung und die Zellen sterben infolge einer irreversiblen Kontraktion des Protoplasten und einer Plasmakoagulation vollkommen ab (Fig. 5d). Diese Kontraktion des Protoplasten erinnert an die hinsichtlich der Wirkung gewisser Kohlenwasserstoffe charakteristische Cytolyse (CURRIER 1956), obwohl es sich in diesem Falle nicht um ihre charakteristische Form handelt.

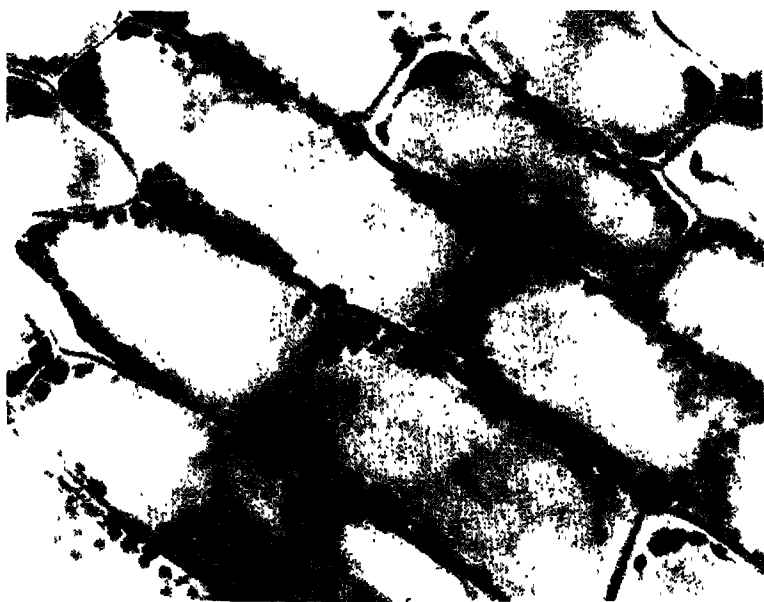
*a**b*

Fig. 5. Cytologische Untersuchung der Agr pyreneinwirkung auf die Wasserpestblatzellen
a — Kontrolle, b — beginnende Kontraktion des Protoplasten.



c



d

Fig. 5.c — Protoplastenkontraktion mit Agglutination von Chloroplasten, d — Absterben der Zellen unter der Plasmakoagulation.

Die Wirkung der Humussäuren hat dagegen einen ganz anderen Charakter. Wie schon früher RYPÁČEK (1962) in den Experimenten mit *Nitella gracilis* und *Mnium affine* gezeigt hat, wird der Verlauf der Plasmolyse durch Humin- und Hymatomelansäure verlangsamt, die Fulvosäuren beeinflussen ihn, was den Zeitverlauf betrifft, dagegen nicht. Aus unserer Arbeit folgt, dass auch der Beginn der irreversiblen Protoplastenkontraktion durch Humussäuren verzögert wird, wie es Fig. 1—3 zeigen und tritt in einigen Fällen sogar noch nach 14 Tagen nicht ein, während sie in destilliertem Wasser schon nach 75 Stunden in 10% der Zellen beginnt.

Wenn jetzt die Wasserpestzellen in Anwesenheit der Humussäuren der Agropyrenwirkung ausgesetzt werden, kommt es allgemein zur Verlängerung der zum Hervortreten der Protoplastenkontraktion notwendigen Zeit. Nur in der niedrigsten Konzentration von Humin- und Hymatomelansäure (10 mg/l) ist diese Zeit verkürzt, die Fulvosäuren beeinflussen sie bei dieser Konzentration nicht. Dies stimmt mit unserer vorigen Arbeit überein, in welcher an Experimenten mit *Scenedesmus obliquus* gezeigt wurde, dass Humin- und Hymatomelansäure als ein eigenartiges Vehiculum zur Geltung kommen können, welches das Eindringen des Agropyrens in die Zellen unterstützt und so die den höheren Konzentrationen des Agropyrens entsprechenden Veränderungen herbeiführt. In höheren Konzentrationen des Agropyrens wird dieser Effekt natürlich verwischt. Die Fulvosäuren, welche in den Experimenten mit der Alge *Scenedesmus obliquus* gegenüber Agropyren vielmehr einer gewissen Kompensationseffekt gezeigt hatten, bewirkten übereinstimmend damit auch in dieser Arbeit keine Beschleunigung des Beginns der irreversiblen Protoplastenkontraktion.

Die bisher diskutierten Ergebnisse ermöglichten keine Erklärung der Frage, ob der Detoxifikationseffekt der Humussäuren nur durch die gegenseitige chemische und physikalisch-chemische Desaktivierung der Humussäuren und des Agropyrens bedingt ist oder ob dabei auch die allgemein fördernde Wirkung der Humusstoffe auf den Pflanzenorganismus eindrucksvoll erscheint. Mit Hinsicht darauf, dass die im Protoplasma von Humussäuren verursachten Veränderungen einen mehr oder minder dauernden Charakter besitzen (NIKLEWSKI 1933, NIKLEWSKI und WOJCIECHOWSKI 1938, BLAGOWESTSCHENSKI und PROSOWSKAJA 1935), wurde diese Frage mit Hilfe eines anderen Experimentes gelöst. Es wurde der Einfluss des Agropyrens auf Blattzellen von *Anacharis canadensis* ermittelt, welche vorher drei Tage mit Fulvosäuren behandelt worden waren. Diese Humusfraktion wurde deswegen für den Versuch gewählt, weil ihr Kompensationseffekt gegen die Agropyrenwirkung am grössten war, weil sie in die Zellen am besten eindringt (PRÁT 1960) und weil sie selbst an sich keine Veränderungen des Plasmolyseverlaufs bewirkt hatte (RYPÁČEK 1962). Die in Fig. 4 veranschaulichten Resultate haben dann in vollem Masse unsere Voraussetzung bestätigt, dass Humusstoffe oder zumindest die Fulvosäuren in der Interaktion mit Agropyren nicht nur durch ihre chemische oder physikalisch-chemische Desaktivierung, sondern auch durch die biologische Plasmaadaptation und die Erhöhung natürlicher Plasmaresistenz zur Geltung kommen.

Der Einfluss des Agropyrens auf den Protoplasten kann ähnlich wie die Wirkung anderer Kohlenwasserstoffe (van OVERBEEK und BLONDEAU 1954) in

der Zerstörung der Bindungen von Lipiden des Ektoplasten gesehen werden und in der Beschädigung der Struktur, der Reaktivität und der Funktion desselben. Die Humusstoffe erweisen sich dann als Substanzen, welche im Einklang mit Prát'scher Interpretation (1955) ihrer Wirkung mittels Theorie der freien Radikale, erforderliche Aktivität und anabolische Beschaffenheit des Protoplasmas aufrechterhalten, bzw. erhöhen.

Literatur

- BLAGOWESTSCHENSKI, A. W., PROSOROWSKAJA, A. A.: Zur Frage des Einflusses der Huminsäure auf die Assimilation der Pflanzen. — Biochem. Zeitschr. **282** : 99—103, 1935.
- CURRIER, H. B.: Effects of toxic compounds: stimulation, inhibition, injury, and death. — In: RUHLAND, W. (ed.): Handb. d. Pflanzenphysiol. II : 792—825, 1956.
- LAŠTŮVKA, Z.: Vliv účinných látek z píry plazivého na anatomii klíčnic rostlin pšenice. [Der Einfluss von spezifischen Stoffen aus der gemeinen Quecke auf die Anatomie der Keimpflanzen des Weizens.] — Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyně, Brno (426) : 373—392, 1961.
- LAŠTŮVKA, Z.: Vliv účinných látek z píry plazivého na buňky a tkáně některých rostlin. [Der Einfluss von spezifischen Stoffen aus der gemeinen Quecke auf die Zellen und Gewebe einiger Pflanzen.] — Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyně, Brno (453) : 237—250, 1964.
- LAŠTŮVKA, Z., MINÁŘ, J.: Vliv silice z oddenků píry plazivého na některé nižší živočichy. [Über den Einfluss des atherischen Öles aus dem Rhizom der Quecke auf einige niedere Lebewesen.] — Čs. Biol. **7** : 462—465, 1958.
- MINÁŘ, J., MANNSBARTOVÁ, E., TICHÝ, V.: Changes in the Biological Activity of Agropyrene on Combined Application with Humus Substances in the Cultivation of *Scenedesmus obliquus* (TURP.) KRUGER. — Biol. Plant. **6** : 265—272, 1964.
- NIKLEWSKI, B.: Über den Einfluss von Kolloidstoffen auf die Entwicklung einiger Kulturpflanzen. — Jahrb. wiss. Bot. **78** : 431—482, 1933.
- NIKLEWSKI, B., WOJCIECHOWSKI, J.: Wpływ związków próchnicznych na pobieranie fosforanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i siarczanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przez rośliny. [The Influence of Humic Compounds on the Absorption of Ammonium Phosphate and Sulphate by Plants.] — Acta Soc. Botan. Poloniae **15** : 111—151, 1938.
- OVERBEEK, J. VAN, BLONDEAU, R.: Mode of Action of Phytotoxic Oils. — Weeds **3** : 55—65, 1954.
- PRÁT, S.: Vliv humusových látek (kapucínů) na řasy. — Čs. Biol. **4** : 535—541, 1955. — Der Einfluss der Humusstoffe (Kapuziner) auf die Algen. — Folia Biol. **1** : 321—326, 1955.
- PRÁT, S.: Distribution of the Humus Substance Fractions in Plants. — Biol. Plant. **2** : 308—312, 1960.
- RYPÁČEK, V.: Der Einfluss isolierter Humusstoffe auf einige physiologische Äusserungen der Pflanzenzelle. — Studies about Humus. ČSAV, Praha 1962, 235—243.
- VLACHOVÁ, B.: Vliv humusových kyselin na průběh plasmolysy. [Der Einfluss der Humussauren auf den Plasmolyseverlauf.] Diplomarbeit der naturwiss. Fak., Brno, 1962.
- ЛАШТУВКА, З.: Влияние пирея ползучего на анатомию пшеницы — Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyně, Brno (411) : 81—94, 1960. [LAŠTŮVKA, Z.: Einfluss der Ackerquecke auf die Anatomie von Weizen.]

V. TICHÝ, E. MANNSBARTOVÁ, J. MINÁŘ, Laboratoř fyziologie a anatomie rostlin přírodovědecké fakulty University J. E. Purkyně, Brno: O povaze detoxifikačního účinku humusových kyselin. Biol. Plant. **6** : 306—314, 1964.

V práci je popsán detoxifikační účinek humusových kyselin a blíže studována jeho povaha. Listy vodního moru (*Anacharis canadensis* [MICHX.] PLANCH, vložený do roztoku agropyrenu izolovaného z oddenků píry plazivého (*Agropyron repens* [L.] P. BEAUV.), odumírají po čase, jehož délka je závislá na koncentraci jedu. Přídavek některých humusových frakcí tuto dobu více nebo méně prodlužuje. Pokus s fulvokyselinami ukázal, že toto ochranné působení se projevuje i tehdy, jsou-li listy vodního moru v roztoku této frakce předem adaptovány a působí-li agro-

pyren dodatečně. Ochranná schopnost fulvokyselin nespočívá tedy pouze v mimobuněčném chemickém nebo fyzikálně chemickém otupení biologické účinnosti agropyrenu, nýbrž i ve zvýšení biologické odolnosti buňky účinkem této humusové frakce.

В. Тихи, Е. Маннсбартова, Я. Минарж, Лаборатория физиологии и анатомии растений естественного факультета Университета им. Я. Э. Пуркyně, Брно: Природа детоксификационного действия гумусовых кислот. — Biol. Plant. 6 : 306—314, 1964.

В работе описывается детоксификационное действие гумусовых кислот и ближе изучается его природа. Листья водяной чумы (*Anacharis canadensis* [Michx.] Planch.) при помещении в раствор агропирена, изолированного из корневищ пырея ползучего (*Agropyron repens* (L.) P. Beauv.), отмирают спустя отрезок времени, длина которого зависит от концентрации яда. Прибавка некоторых гумусовых фракций этот срок более или менее удлиняет. Опыт с фульвокислотами показал, что это защитное действие проявляется и тогда, если листья водяной чумы предварительно адаптировались в растворе этой фракции и действует ли агропирен добавочно. Защитная способность фульвокислот основывается тогда не только во внеклеточном химическом или физико-химическом отуплении биологического действия агропирена, но и в повышении биологической устойчивости клетки под влиянием этой гумусовой фракции.