

OLGIERD NOWOSIELSKI, TERESA SEWERYN

## PRZYDATNOŚĆ *ASPERGILLUS NIGER* DO OZNACZANIA MANGANU DOSTĘPNEGO W GLEBIE

Z Zakładu Chemii Rolniczej SGGW Warszawa

Kierownik pracowni prof. dr M. Górski

### WSTĘP

Mangan występuje w glebie w postaci związków o różnej rozpuszczalności [14, 16, 18, 22, 26, 30, 34]. Dla odżywiania się roślin ma znaczenie mangan dwuwartościowy, występujący w kompleksie sorpcyjnym i roztworze glebowym oraz w kompleksowych związkach organicznych<sup>1</sup>.

Ilość manganu dostępnego zależy od wielu czynników, wśród których odczyn gleby odgrywa główną rolę. Decyduje on bowiem o właściwościach redukcyjnych materii organicznej i o kierunku działalności mikroorganizmów; im niższa jest wartość *pH* gleby, tym więcej manganu wielowartościowego przechodzi w związki manganu dwuwartościowego. Dlatego też gleby o wartości *pH* poniżej 5,5 zawierają zwykle znaczną część manganu ogólnego w postaci manganu wymiennego i rozpuszczalnego w wodzie i na ogół nie wymagają nawożenia manganowego [22, 30]. Ze wzrostem wartości *pH* gleby mangan dwuwartościowy utlenia się do manganu wielowartościowego ( $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ) głównie tlenków, których przyswajalność jest tym mniejsza, im mają one bardziej uporządkowaną budowę krystaliczną [9, 18].

Prócz odczynu gleby duży wpływ na zdolności redukujące mikroorganizmów, a w związku z tym i na zawartość manganu dostępnego, mają stoki powietrzne gleb (potencjał red-ox). W miarę jak maleje ilość tlenu, rośnie zawartość manganu dwuwartościowego [18, 20, 27].

Zależnie od kształtowania się wspomnianych czynników ilość manganu dwuwartościowego ulega w jednej i tej samej glebie wahaniom w czasie. Dotyczą one szczególnie manganu rozpuszczalnego w wodzie [14, 18].

Duża zmienność związków manganu w glebie wywołana przechodze-

---

<sup>1</sup> S. G. Heintze: *Studies on Soil Manganese*, J. Soil Sci. 8 (1957) str. 287—300.

niem jednych form w drugie jest m. in. przyczyną trudności opracowania metod ekstrakcji manganu dostępnego.

Poszczególni badacze usiłując oznaczyć zawartość manganu dostępnego próbowali różnych roztworów ekstrakcyjnych [3, 22, 26, 30a, b, 37].

Wetter C. [44] zaproponował, by o ilości manganu dostępnego sądzić z zawartości manganu rozpuszczalnego w wodzie. Zdaniem wielu badaczy wskaźnikiem ilości manganu dostępnego może być mangan wymienny. Steinberg [18] do wypierania manganu wymiennego stosował roztwory  $Mg(NO_3)_2$  i  $Ca(NO_3)_2$ , Heintze<sup>2</sup> — 0,5 molarny roztwór  $Ca(NO_3)_2$ , Leeper i Sherman [14] — obojętny 1 n octan amonu, Schachtschabel roztwór  $MgSO_4$  [30].

Leeper [14] usiłuje określać zapasy manganu dostępnego na podstawie zawartości manganu ulegającego łatwo redukcji, zwanego — łącznie z manganem wymiennym i rozpuszczalnym w wodzie — manganem aktywnym; tę formę manganu ekstrahuje on z gleby za pomocą 0,2% obojętnego ( $pH = 7$ ) roztworu hydrochinonu w 1 n octanie amonu. Schachtschabel stwierdził ściśle zależność między manganem aktywnym a reakcją gleb niemieckich na nawożenie manganowe. W miejsce hydrochinonu do redukcji manganu aktywnego stosował on siarczyn sodu<sup>3</sup>. Uważa on, iż dobre wskazania można również uzyskiwać oznaczając mangan wymienny oraz, jednocześnie z pobraniem próbki do oznaczania, potencjał red-ox [30a]. Schachtschabel omawia obszernie roztwory stosowane do ekstrakcji manganu dostępnego [30b].

We wszystkich wyciągach stosowanych do oznaczania manganu dostępnego stwierdzano różne ilości manganu; mimo to pozostawały one w pewnej zależności od potrzeb nawozowych gleb i niejednokrotnie stawały się wskaźnikami zawartości manganu dostępnego w glebach.

Opierając się na tej zależności opracowano dla poszczególnych form manganu liczby graniczne dzielące gleby na wymagające i nie wymagające nawożenia manganem. Z badań Wettera wynika, że taką liczbą dla manganu rozpuszczalnego w wodzie może być około 0,5 mg Mn/kg s. m. gleby (liczba ta dotyczy gleb niemieckich) oraz że liczba ta może się zmieniać w zależności od  $pH$  gleby.

Roth i Pfaff za liczbę graniczną dla manganu rozpuszczalnego w wodzie na gorąco (ekstrakcja trwa godzinę) uznali 0,9 mg Mn/kg gleby. Słuszność nakreślenia takiej liczby potwierdzili oni w doświadczeniach wegetacyjnych z jęczmieniem na wielu glebach [26]. Steinberg [33e] za liczbę graniczną dla manganu wymiennego (wypieranego za pomocą roz-

<sup>2</sup> S. G. Heintze: Readily Soluble Manganese of Soils and Marsh Spot of Peas J. Agr. Sci. 28 (1938) str. 175—185.

<sup>3</sup> Methodenbuch. Bd 1,3 Auflage, Verlag Neumann.

tworu azotanu magnezu) przyjmuje 2 mg Mn/kg s. m. gleby, zaś L e e p e r [14] — 3 mg Mn/kg s.m. gleby — dla gleb alkalicznych, a 2 mg Mn/kg s.m. gleby dla pozostałych gleb (liczby L e e p e r a odnoszą się do manganu wymiennego wypieranego za pomocą 1n octanu amonu). Jako liczbę graniczną dla manganu ulegającego łatwo redukcji proponuje L e e p e r 100 mg Mn/kg s.m. gleby. S c h a c h t s c h a b e l w zależności od pH gleby podaje szereg liczb granicznych dla manganu aktywnego.

pH gleby	5,7	5,8—5,9	6,0	6,1	6,3	6,5	6,7	6,9
Ilość manganu aktywnego niezbędna dla normalnego wzrostu roślin w mg/kg gleby	—	15	25	30	40	50	60	70

Podaje on, że w glebach niemieckich o pH poniżej 5,7 na ogół nie spotyka się gleb wymagających nawożenia manganowego. Podobnie jak inni badacze, S c h a c h t s c h a b e l zaleca ostrożność w posługiwaniu się liczbami granicznymi dla celów praktycznych; w zależności od rośliny, stanu nawożenia gleby, stopnia jej zwapnowania oraz od antagonizmu jonowego Ca : Mn liczby graniczne nawet w przypadku tej samej gleby mogą ulegać, jego zdaniem, dość dużym zmianom.

Metody oparte na stosowaniu różnego rodzaju wyciągów mogą budzić zastrzeżenia; prawdopodobnie wykrywane przez nie ilości manganu nie zawsze dobrze charakteryzują zawartość manganu dostępnego.

Sporządzania wyciągów można uniknąć w przypadku metod makrobiologicznych. Rolę roztworu ekstrakcyjnego spełnia w nich żywy organizm — roślina wyższa.

R o t h i P f a f f (1955) idąc za wskazaniem Mc H a r g u e (1922), H i l t n e r a (1924) i R a d e m a c h e r a (1940) zastosowali do oznaczania manganu dostępnego w glebie — owies. Zdaniem ich roślina ta może wskazywać nie tylko na już istniejący niedobór manganu dostępnego w glebie, ale również na zawartości bliskie niedoboru. W opracowanej przez R o t h a i P f a f f a metodzie owies wyrasta na badanej glebie (w doświadczeniach wazonowych lub neubauerowskich), przy czym oznacza się w nim chemicznie mangan. W wyniku przeprowadzenia doświadczeń nawozowych z manganem na wielu glebach R o t h i P f a f f doszli do przekonania, że jeśli wegetatywna część rośliny zawiera poniżej 12—17 mg Mn/kg suchej masy lub ziarno poniżej 15—20 mg na kg suchej masy, wówczas badana gleba wymaga nawożenia manganowego. Ta liczba graniczna pokrywa się dość dobrze z liczbami znalezionymi przez L e e p e r a (1934/35), R a d e m a c h e r a (1948), C o i c, C o p p e n e t a i V o i x (1950) oraz przez J o n e s a i L e e p e r a (1951). Wskazania uzyskane za pomocą tej metody pozostają

w zgodzie z zawartością w glebie manganu rozpuszczalnego w wodzie na gorąco oraz z zawartością manganu aktywnego.

Nowotny-Mieczyska i Ruszkowska (1956) do oznaczeń manganu dostępnego zastosowały sałatę. Proponowana przez nie metoda polega również na chemicznym oznaczaniu manganu w roślinach wyhodowanych na badanej glebie.

Donald, Passey i Swaby (1952) do oznaczeń manganu dostępnego stosują *Trifolium subterraneum*; Löhnis (1951) przy pomocy fasoli określa szkodliwy nadmiar manganu.

Wartość proponowanych metod makrobiologicznych jest raczej niewątpliwa, należy jednak zwrócić uwagę na ich pracochłonność; prócz oznaczania biologicznego wymagają one również wykonywania oznaczeń chemicznych.

Pośrednie stanowisko między metodami chemicznymi i makrobiologicznymi zajmują metody mikrobiologiczne. W przypadku tych metod można wprawdzie uniknąć sporządzania wyciągów (oznaczając mangan wprost w próbce glebowej), jednak funkcję ich spełnia do pewnego stopnia pożywka; dodawane do gleby sole wraz z pożywką oraz kwasy produkowane przez testowe organizmy z cukrów w czasie wzrostu mają duży wpływ na wyniki oznaczeń. Mimo to istnieje prawdopodobnie dość zasadnicza różnica między metodami chemicznymi i mikrobiologicznymi; metodami chemicznymi wykrywa się cały mangan, który przechodzi do roztworu ekstrakcyjnego, zaś metodami mikrobiologicznymi wykrywa się tylko związki manganu dostępne dla testowego organizmu.

Z mikroorganizmów do oznaczania manganu bądź bezpośrednio w próbkach glebowych, bądź w wyciągach glebowych czy nawet roślinnych, został zastosowany *Aspergillus niger* [5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15b, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 35, 37].

Oprócz *A. niger* istnieje wiele innych organizmów, z pomocą których można oznaczać mangan. Metody, do których wykorzystano te organizmy, służą przeważnie do oznaczania manganu nie wprost w glebie, lecz w różnego rodzaju wyciągach glebowych lub roślinnych.

Interesującą tego rodzaju metodę opracowali Bentley, Snell i Phillips (1947), wykorzystując zależność między ilością wytworzonego kwasu mlekowego przez *Lactobacillus arabinosus* a ilością manganu w środowisku. Pożywkę oczyszczają oni od śladów manganu przez uprzednie hodowanie na niej *L. arabinosus*. Dodatek 0,38  $\gamma$  manganu powoduje w ciągu 73 godzin wzrost produkcji kwasu mlekowego o 6 ml (w przeliczeniu na 0,1 n kwas). Mangan oznacza się w tej metodzie z błędem około 10%. Przydatność tej metody do oznaczania manganu dostępnego w glebie nie została dotąd ustalona.

J o g e s w a r i (1948) zwrócił uwagę na możliwość oznaczania manganu i innych mikroelementów za pomocą grzybów z rodziny *Fusarium*.

Charney (1950) oraz Charney i Fisher (1951) stwierdzili możliwość oznaczania manganu za pomocą *Bacillus subtilis*; zastosowali oni tę bakterię do oznaczeń manganu nie tylko w glebie, ale także w materiale roślinnym.

Saffert (1951) do oznaczeń manganu w glebie stosuje *Aspergillus oryzae*.

Nicholas (1952) prócz *Aspergillus niger* do oznaczeń manganu w glebie i materiale roślinnym stosuje *Penicilium glaucum*.

Wang (1951) oznacza mangan w glebie za pomocą *Azotobacter chroococcum* z dokładnością 1,0  $\gamma$ , wykorzystując w tym celu zależność między pigmentacją *A. chroococcum* a stężeniem manganu w pożywce. Metoda ta zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ oznacza się nią mangan wprost w glebie i to w środowisku nie zakwaszającym się.

Borton i Wright do oznaczeń manganu zastosowali *Streptococcus faecalis*.

Niektóre z przytoczonych metod, a m. in. także i metoda *A. niger* zasługują na szczególną uwagę, wykrywają bowiem w wyciągach śladowych ilości manganu (0,01  $\gamma$ /50 ml pożywki). Pod tym względem czulsze od nich są chyba tylko metody izotopowe.

#### METODA *A. NIGER*

Ze wspomnianych organizmów stosowanych do oznaczania manganu w glebie *Aspergillus niger* był przedmiotem największego zainteresowania.

O dodatnim wpływie manganu na wzrost tego grzyba pierwsi zakomunikowali Bertrand i Javillier (1911). Jednak dopiero Steinberg R. A. (1935) udowodnił, że mangan jest konieczny do wzrostu *A. niger*. Wykazał on, że optymalne stężenie manganu i innych ciężkich metali dla *A. niger* zależy od odczynu pożywki i jest w przybliżeniu 20-krotnie większe w pożywce o  $pH = 8,01$  niż w pożywce o  $pH = 7,31$ .

Löhnis (1944—45) w dokładnych badaniach stwierdził, że *A. niger* wymaga manganu nie tylko do wzrostu, ale również do wykształcenia zarodników [17]. Stwierdził on, że organizm ten jest bardzo czuły na ślady manganu w kwaśnym środowisku; nie uważał jednak, aby można go było wykorzystać do oznaczania manganu dostępnego bezpośrednio w glebie, ze względu na zbyt silne zakwaszenie się środowiska podczas wzrostu i związane z tym uruchamianie się niedostępnych związków manganu.

Gerretsen (1948) zastosował *A. niger* do oznaczania manganu i innych składników w glebie [12]. Nadmiernego zakwaszania się środowiska

w czasie wzrostu *A. niger* udało mu się tylko częściowo uniknąć, dzięki zastąpieniu w pożywce soli amonowych mocznikiem. Próby utrzymania odczynu pożywki na odpowiednim poziomie za pomocą buforu fosforanowego nie powiodły się. Mulder (1948) zastosował *A. niger* do oznaczania manganu nie tylko w glebie, ale także i w materiale roślinnym [17, 19]. Nichols (1952) oznacza za pomocą *A. niger* w materiale roślinnym prócz manganu także i inne mikroelementy. Mulder i Gerretsen oznaczając za pomocą *A. niger* mangan i inne mikroelementy w glebach holenderskich, doszli do przekonania, że *A. niger* całkiem trafnie, o wiele lepiej, niż metody chemiczne czy spektrograficzne oparte na wyciągach, ocenia zawartość dostępnego cynku, miedzi i molibdenu, natomiast często zawodzi w ocenie zawartości dostępnego manganu i żelaza. Nie zalecają więc oni stosować *A. niger* do oznaczeń manganu wprost w próbkach glebowych [18].

Tomlison i Campbell (1950) opracowali metodę oznaczania manganu i innych mikroelementów za pomocą *A. niger* przypominającą metodę *L. arabinosus* Bentleya i współautorów; opiera się ona na zależności produkcji kwasu cytrynowego przez *A. niger* od stężenia w pożywce badanych mikroelementów. Metoda ta nie została ostatecznie zastosowana do oznaczeń manganu w glebach.

Nicholas (1950) oraz Nicholas i Fielding (1951) stosują w Anglii *A. niger* do oznaczania manganu bezpośrednio w próbkach glebowych. Nadmiernego zakwaszania się środowiska w czasie rozwoju grzyba unikają oni doprowadzając odczyn pożywki do  $pH = 7,5$  za pomocą rozcieńczonego amoniaku przed wprowadzeniem do niej odważki gleby. W wypadku stosowanej przez Nicholasa pożywki wzrost plonu grzybni *A. niger* następował pod wpływem dodatku manganu w granicach od 0,01 — 10  $\mu$ /50 ml pożywki.

Donald, Passey i Swaby (1952) zbadali wiele mikroorganizmów pod względem reakcji na zawartość manganu w środowisku i doszli do przekonania, że *A. niger* najlepiej nadaje się do oznaczania manganu. Oznaczają oni za jego pomocą mangan dostępny i inne mikroelementy wprost w minerałach, skałach oraz glebach [9, 10a i b]. Oznaczeń dokonują oni w warunkach sterylnych, dzięki czemu mogą stosować pożywkę o odczynie obojętnym oraz przedłużać czas wzrostu grzyba do 7 dni. Miarą zawartości manganu jest ciężar grzybni lub intensywność zarodnikowania. Zakres czułości metody waha się od śladów do 0,1 mg Mn/500 mg badanego materiału. *A. niger* dawał dobre wskazania o uruchamianiu się manganu dostępnego i innych mikroelementów z minerałów i skał, natomiast w przypadku gleb obojętnych i zasadowych, na których często w Australii występują objawy głodu manganowego, przeważnie przeceniał zawartość manganu dostępnego. Autorzy przypisują to działaniu kwasów produkowanych przez *A. niger* oraz redukowaniu utlenionych form manganu [10].

Wetter (1954) w celu uniknięcia skutków zakwaszania się środowiska w czasie trwania oznaczania, zamiast bezpośredniej próbki gleby wprowadza do pożywki 1 ml wodnego wyciągu gleby [37]. O zawartości manganu rozpuszczalnego w wodzie wnioskuje on z wielkości plonu grzybni *A. niger* rozwijającej się w kwaśnej pożywce o  $pH = 3$ . Z badań Wettera wynika, że gleby zawierające poniżej 0,35 mg manganu rozpuszczalnego w wodzie w 1 kg gleby wykazują silne objawy niedostatku manganu.

Wetter wspomina w swojej pracy również o możliwości oznaczania manganu w glebach na podstawie koloru zarodników *A. niger*.

Lavolla wykazał, że *A. niger* rośnie zgodnie z prawem Mitscherlicha oraz że plon jego zależy od stężenia badanego składnika w pożywce, a nie od jego absolutnej ilości [13]. Löhnis (1952), Donald, Passey i Swaby (1952) oraz Seraswathi (1954) potwierdzili przydatność *A. niger* do oznaczania manganu i innych mikroelementów. Według nich *A. niger* w odróżnieniu od roślin wyższych nie jest wrażliwy nawet na stokrotne zmiany stężeń mikroelementów w pożywce w zakresie stężeń większych od optymalnych. Jedynie miedź w stężeniu 4-krotnym w stosunku do optymalnego obniża plon, a w stężeniu 64 razy większym od optymalnego zabija *A. niger* [15].

Dodatek humianów i niektórych gleb do pożywki o optymalnej zawartości składników zwiększa plon z nie znanych dotąd przyczyn [15].

Passey (1953) oraz Starkey (1955) przytaczają dość obszerną literaturę na temat oznaczania manganu za pomocą *A. niger* i innych mikroorganizmów.

#### BADANIA WŁASNE

Z cytowanej literatury wynika, że *A. niger* może być w rozmaity sposób wykorzystywany do oznaczeń manganu w glebie. Pozwala on sądzić o ilości manganu na podstawie ciężaru grzybni lub ilości wytworzonego kwasu cytrynowego; te sposoby można uznać jako ilościowe. Istnieje również możliwość oznaczania nim manganu na podstawie zależności zarodnikowania od ilości manganu w środowisku; ze wzrostem stężenia manganu *A. niger* wytwarza więcej zarodników, a w związku z tym kolor powierzchni grzybni zmienia się od białego poprzez kremowy, brązowy do czarnego. Zależność ta pozwala na przybliżone jakościowe oznaczanie manganu.

Dotychczas *A. niger* był stosowany do ilościowego oznaczania manganu (na podstawie ciężaru grzybni) wprost w próbkach glebowych po uprzednim zalkalizowaniu pożywki lub wysterylizowaniu jej wraz z glebą, lub do ilościowego oznaczania manganu w wodach w wyciągach gleb. W tej pracy zajęto się przydatnością jego do:

- 1) jakościowego oznaczania manganu w glebie w oparciu o sposób zarodnikowania,
- 2) ilościowego oznaczania manganu,
  - w innych wyciągach niż wodne,
  - wprost w próbkach glebowych, ale w warunkach naturalnego zakwaszenia pożywki podczas wzrostu bez uprzedniego alkalizowania jej czy sterylizacji.

#### 1. PRZYDATNOŚĆ *A. NIGER* DO OZNACZANIA MANGANU W GLEBACH NA PODSTAWIE ZARODNIKOWANIA

Z pracy W e t t e r a wynika, że wpływ manganu na zarodnikowanie *A. niger* zależy od źródła azotu w pożywce. Zależność tę postanowiliśmy wykorzystać do opracowania metody jakościowego oznaczania manganu w glebie.

Związane z tym badania zaczęto od sprawdzenia zależności między zarodnikowaniem *A. niger* a źródłem azotu. Porównywano więc wzrost i zarodnikowanie *A. niger* na pożywce zawierającej azot w formie azotanu sodu ze wzrostem i zarodnikowaniem na pożywce zawierającej azot w postaci chlorku amonu, przy wzrastających dawkach manganu.

Pożywkę sporządzono według S t e i n b e r g a [30] i W e t t e r a [37], oczyszczając ją od manganu metodą Sakamury [29]. Aby jak najbardziej uwolnić się od zanieczyszczeń manganem używano wody podwójnie destylowanej w szkle jenajskim, erlenmajerek do hodowli grzyba ze szkła jenajskiego oraz soli p.a. przeważnie marki Merck. Sporządzoną w tych warunkach czystości pożywkę wlewano do erlenmajerek (po 50 ml) i szczepiono zarodnikami pobranymi z grzybni wyhodowanej na sterylizowanym chlebie. Uzyskane plony grzybni i opis zarodnikowania podano w tablicy 1. Potwierdzają one spostrzeżenia W e t t e r a. Mianowicie *A. niger* hodowany na pożywce zawierającej azot amonowy reagował na wzrastające dawki manganu silniejszym rozwojem masy grzybni, nie wytwarzając równocześnie zarodników. Natomiast hodowany na azocie azotanowym na wzrastające stężenie manganu w pożywce reagował wcześniejszym i silniejszym zarodnikowaniem. Jednak po 90 godzinach trwania wzrostu różnice w zarodnikowaniu między poszczególnymi kombinacjami zaczęły zanikać, a w końcu wegetacji przy wszystkich poziomach manganu czarne zarodniki pokryły całą powierzchnię grzybni. Ze względu na taki zanik różnic w zarodnikowaniu wskazaną przez W e t t e r a zależność uznaliśmy za niezupełnie wystarczającą dla opracowania jakościowej metody oznaczania manganu w glebie.

Zupełnie przypadkowo udało się nam jednak zwiększyć różnicę w zarodnikowaniu *A. niger* na innej drodze. Chcąc przyspieszyć wzrost grzybni

T a b l i c a 1

Wpływ wzrastających ilości manganu w  $\gamma$  na rozwój i zarodnikowanie *A. niger* na pożywce zawierającej azot w postaci  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Mn/50 ml pożywki	Pożywka z $\text{NaNO}_3$			Pożywka z $\text{NH}_4\text{Cl}$		
	sucha masa grzybni w mg*	zarodnikowanie		sucha masa w mg*	zarodnikowanie	
		po 2 dobach	po 3 dobach		po 2 dobach	po 3 dobach
0,0	862	ślabe	obfite, cała powierzchnia grzybni czarna**	545	brak zarodników	brak zarodników
1	870	„	„	742	„	„
2	863	„	„	778	„	„
5	857	„	„	1028	„	„
10	899	„	„	1033	„	„

\* Średnia z 3 powtórzeń.

\*\* Zarodniki pojawiły się o dobę później niż na kombinacjach z azotem azotanowym.

*A. niger* i zwiększyć różnicę w plonie w zależności od stężenia manganu, wprowadziliśmy do pożywki podobnie jak S e k e r a<sup>4</sup> — kwas taninowy. Wynik był dość nieoczekiwany. Różnice w plonie grzybni zmalały, natomiast wystąpiły bardzo znacznie różnice w zarodnikowaniu. W kombinacji zerowej i w pożywce o małym stężeniu manganu *A. niger* nie wytwarzał

T a b l i c a 2

Plon i zarodnikowanie *A. niger* przy wzrastającym stężeniu manganu w  $\gamma$  w pożywce z dodatkiem kwasu taninowego

Mn/50 ml pożywki	Sucha masa grzybni w mg				Zarodnikowanie
	I	II	III	średnio	
0,0	975	940	950	955	brak
1	970	945	986	966	ślady
2	987	948	952	962	zarodniki pokrywają $\frac{1}{3}$ powierzchni grzybni
3	983	945	983	970	zarodniki pokrywają $\frac{1}{2}$ powierzchni grzybni
5	980	953	940	957	zarodniki pokrywają całą powierzchnię grzybni
10	989	953	940	960	zarodniki pokrywają całą powierzchnię grzybni

<sup>4</sup> F. S e k e r a: *Der Quantitative Micro-Dungungsversuch zur Prüfung der Düngewirkung von Kali und Phosphorsäure*. Die Phosphorsäure 5 (1953) str. 527—537.

zarodników, zaś w miarę wzrostu zawartości manganu w pożywce pojawiały się coraz liczniejsze kolonie czarnych zarodników. Wyniki obrazuje tablica 2 oraz rys. 1, 2, 3, 4. Prócz tego wpływ kwasu taninowego zaznaczył się w przyspieszeniu wzrostu grzybni w pierwszych dwóch dniach wegetacji.

### Jakościowe oznaczanie manganu bezpośrednio w próbkach glebowych

Reakcję *A. niger* na różne stężenia manganu w obecności kwasu taninowego postanowiliśmy wykorzystać do oznaczania manganu bezpośrednio w glebie, by w ten sposób oznaczać ilość manganu dostępnego bez sporządzania wyciągów.

Zarodnikowanie *A. niger* przy wzrastającym stężeniu manganu w pożywce z dodatkiem kwasu taninowego



Rys. 1. 0  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki



Rys. 2. 1  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki



Rys. 3. 3  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki



Rys. 4. 5  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki

T a b l i c a 3

Różnice w zarodnikowaniu *A. niger* na pożywce ze wzrastającymi ilościami gleb i wyciągu wodnego z gleb

Gleba	Odczyn gleby (pH w H <sub>2</sub> O)	Wzrastające ilości gleby w mg/50 ml pożywki	Ocena zarodnikowania	Wzrastające ilości wyciągu wodnego gleby w mg/50 ml pożywki	Ocena zarodnikowania
		0 pożywka bez dodatku gleby	brak zarodników	0 pożywka bez dodatku wyciągu	brak zarodników
Gleba bielico- wa wytworzona z piasku słabo gliniastego	5,8	10	$\frac{1}{2}$ powierzchni pokryta zarodni- kami	0,5	ślady
		25	cała powierzchnia pokryta zarodni- kami	1	„ „
		50	„ „	2	„
		100	„ „	3	„
Gleba bielico- wa wytworzona z piasku słabo gliniastego	6,5	10	$\frac{1}{3}$ powierzchni grzybni pokryta zarodnikami	0,5	ślady
		25	cała powierzchnia grzybni pokryta zarodnikami	1	„
		50	„ „	2	„
		100	„ „	3	„
Gleba bielico- wa ciężka wytwor- zona z gliny zwałowej	6,5	10	prawie cała po- wierzchnia po- kryta zarodnikami	0,5	ślady
		25	cała powierzchnia grzybni pokryta zarodnikami	1	„
		50	„ „	2	$\frac{1}{5}$ powierzchni pokryta zaro- dnikami
		100	„ „	3	$\frac{1}{4}$ powierzchni pokryta zaro- dnikami

Ciąg dalszy tablicy 3

Gleba	Odczyn gleby (pH w H <sub>2</sub> O)	Wzrastające ilości gleby w mg/50 ml pożywki	Ocena zarodnikowania	Wzrastające ilości wyciągu wodnego gleby w mg/50 ml pożywki	Ocena zarodnikowania
Gleba brunatna lekka wytworzona z gliny żwałowej	7,2	10	$\frac{1}{3}$ powierzchni grzybni pokryta zarodnikami	0,5	ślady
		25	cała powierzchnia grzybni pokryta zarodnikami	1	„
		50	„	2	„
		100	„	3	„
Gleba brunatna ciężka wytworzona z gliny żwałowej	7,8	10	prawie cała powierzchnia grzybni pokryta zarodnikami	0,5	„
		25	cała powierzchnia grzybni pokryta zarodnikami	1	„
		50	„	2	$\frac{1}{5}$ powierzchni pokryta zarodnikami
		100	„	3	$\frac{1}{4}$ powierzchni pokryta zarodnikami

W celu ustalenia ilości gleby, jaką należy brać do oznaczania, do 50 ml pożywki wprowadziliśmy wzrastające odważki gleb o różnej zawartości manganu (według wyceny *A. niger*), po czym obserwowaliśmy zarodnikowanie w czasie wzrostu *A. niger*. Wyniki zamieszczono w tablicy 3. Widać z nich, że na kombinacjach bez gleby *A. niger* w ogóle nie zarodnikuje (powierzchnia grzybni jest kremowa). Na kombinacjach z 10 mg gleby/50 ml pożywki w przypadku części badanych gleb zarodnikowanie było słabe; powierzchnię częściowo pokrywały czarne zarodniki. W przypadku pozostałych gleb zarodniki pokrywały całą powierzchnię grzybni. Przy dawkach gleby większych od 10 mg/50 ml pożywki w przypadku wszystkich badanych gleb zarodnikowanie było obfite, tj. cała powierzchnia grzybni miała kolor czarny.

Na podstawie przytoczonych wyników można wnioskować, że ze względu na zakres czułości tej metody naważka gleby około 10 mg/50 ml pożywki jest największą naważką, jaką można stosować. Tak bardzo mała naważka budzi zrozumiałe zastrzeżenia ze względu na reprezentatywność oznaczeń i dokładność metody. Słuszność tych zastrzeżeń potwierdziły do pewnego stopnia badania nad zgodnością równoległych oznaczeń. Przy starannym pobraniu średnich próbek i przy bardzo dokładnym naważaniu gleby różnice w zarodnikowaniu między równoległymi oznaczeniami były dość znaczne. Oznaczenia tą metodą mogą mieć orientacyjną wartość i to tylko przy stosowaniu większej ilości powtórzeń (5 — 6).

### Jakościowe oznaczanie manganu w wyciągach wodnych gleb

Aby uniknąć stosowania małych naważek gleby, które budzą słuszne zastrzeżenia, próbowaliśmy oznaczać mangan jakościowo nie wprost w glebie, lecz w wyciągach wodnych.

Wyciągi wodne gleb sporządzaliśmy według W e t t e r a wytrząsając przez 15 minut 2 g powietrznie suchej gleby przesianej przez sito o średnicy 1 mm z 10 ml wody podwójnie destylowanej. Przed sączeniem zawiesinę pozostawialiśmy na okres doby.

Przystosowanie *A. niger* do jakościowych oznaczeń manganu w wyciągach wodnych gleb sprowadziło się do ustalenia objętości wyciągu, jaką należy brać do oznaczeń. Do 50 ml pożywki dodawaliśmy więc wzrastające ilości wyciągów wodnych z różnych gleb (0,5; 1; 2; 3 ml wyciągu/50 ml pożywki), po czym obserwowaliśmy zarodnikowanie *A. niger*. Opis obserwacji zamieszczony w tablicy 3. Dodatek nawet 3 ml wodnego wyciągu z badanych gleb prawie że nie spowodował zarodnikowania. Między poszczególnymi glebami, podobnie jak między wzrastającymi dawkami wyciągów, nie wystąpiły znaczniejsze różnice (z wyjątkiem gleb bardzo zasobnych w mangan).

Można więc przypuszczać, że w stosowanych przez nas ilościach wyciągów wodnych jest zbyt mało manganu, aby wywołać pełne zarodnikowanie. Jak widać z tablicy 3, te same gleby, z których sporządzano wyciągi, dodane w ilości 10 lub 20 mg/50 ml pożywki, powodowały pełne zarodnikowanie.

W dalszych badaniach zastosowaliśmy więc bardziej skoncentrowane wyciągi wodne (10 g gleby/20 ml wody), a rozproszczenie ich spowodowało mocniejsze zarodnikowanie *A. niger*, pozwalające na rozróżnienie gleb ubogich od zasobnych w mangan.

Metoda jakościowa oznaczania manganu w glebach ma tę dużą zaletę, że jest stosunkowo prosta w wykonaniu; nie wymaga suszenia i ważenia

grzybni, lecz na drodze prostej obserwacji wzrokowej pozwala odróżnić gleby zasobne od ubogich. Chociaż jest ona mało dokładna, to jednak przy masowych oznaczeniach może przypuszczalnie mieć zastosowanie jako metoda odróżniania gleb bardzo ubogich od zasobnych w mangan.

### Sposób wykonywania jakościowej metody *A. niger*

Stosując w pracy wskazane już warunki czystości (str. 70) sporządza się pożywkę o następującym składzie (w 1000 ml wody podwójnie destylowanej):

A. 1. glukoza	50 g	B. 1. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3 mg
2. kwas taninowy	20 g	2. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg
3. $\text{NH}_4\text{Cl}$	2,75 g	3. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,6 mg
4. $\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,5 g	4. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 mg
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g	( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,3 mg)	
6. $\text{Na}_2\text{SO}_4$	1,0 g		

Zawsze najpierw przygotowuje się pożywkę makroelementów (A), oczyszcza się ją od śladów metali ciężkich, a dopiero potem dodaje się roztwór mikroelementów bez manganu.

Do oczyszczania pożywki od zanieczyszczeń manganem można stosować, zgodnie z zaleceniami S a k a m u r y [29], fosforan wapnia. W naszych próbkach okazał się on skuteczniejszy od innych środków, z których, niestety, nie wszystkie [1, 2] mogliśmy sprawdzić. Chemicznie czysty fosforan wapnia przed bezpośrednim użyciem do oczyszczania pożywek należy przemyć podwójnie destylowaną wodą. W tym celu 50 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wytrząsa się w 1 litrze wody w ciągu 1 godziny. Przesączony przez bezpopielne sączki i wysuszony fosforan wapnia dodaje się do pożywki (10 g/litr), doprowadzając jednocześnie jej odczyn do  $\text{pH} = 5,5$  za pomocą  $\text{NaOH}$ , a następnie wytrząsa się 2 godziny. Pożywkę sączy się przez podwójne sączki bezpopielne, uzyskując w ten sposób czystą, pozbawioną manganu, pożywkę, nadającą się do oznaczeń.

Odczyn oczyszczonej pożywki doprowadza się do  $\text{pH} = 3$  za pomocą kwasu solnego. Następnie wlewa się ją do czystych (wymoczonych w 30% kwasie solnym) erlenmajerek w ilości 50 ml i dodaje się glebę w ilości 10 mg/50 ml pożywki lub jej wyciągi (np. 2 ml wyciągu z 1,0 n octanem amonu — patrz str. 81).

Równocześnie przygotowuje się próby standardowe zawierające 0,0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki. Szczepienia dokonuje się zarodnikami *A. niger* za pomocą opalonego drucika platynowego. Należy starać się pobrać jak najmniejszą ilość zarodników, by wraz z nimi nie wprowadzać manganu. Szczepienia można również dokonywać kropłą zawiesiny za-

rodników przemytych wodą dwa razy destylowaną w aparacie szklanym. Wprowadzamy wówczas do wszystkich kultur jednakową ilość zarodników.

Zarodniki *A. niger* otrzymuje się przez zaszczepienie ich w szalkach Petriego na sterylizowanym chlebie nasyconym wodą destylowaną. Po kilku dniach inkubacji w temperaturze 30—33 °C zarodniki nadają się już do szczepienia. Warto zaznaczyć, że na wysterylizowanym chlebie *A. niger* rozwija się i zarodkuje bardzo obficie oraz że ten sposób otrzymania zarodników jest mniej kłopotliwy od hodowli kropidlaka na podłożach agarowych czy innych. Zarodniki zachowują żywotność przez bardzo długi okres czasu; przechowywane w suchych pomieszczeniach w temperaturze pokojowej nawet po roku rozwijały się jak kilkudniowe.

Zaszczepione kultury płynne umieszcza się w termostacie na przeciąg 90 godzin w temperaturze 30 °C. W okresie tym *A. niger* w zależności od ilości manganu w podłożu wytworzy więcej lub mniej zarodników na powierzchni grzybni. Wygląd zewnętrzny tych grzybni porównujemy z *A. niger* wyrosłym na pożywce standardowej ze wzrastającymi ilościami manganu.

Czasem bez stosowania oczyszczania udaje się uzyskać pożywkę zawierającą tak mało manganu, że dodatek jego powoduje silniejsze zarodnikowanie. Z reguły jednak należy pożywkę oczyszczać. Dowodem tego jest doświadczenie, w którym porównywaliśmy zarodnikowanie *A. niger* na pożywce oczyszczonej i nie oczyszczonej. Wyniki znajdują się w tabelicy 4.

T a b l i c a 4  
Zarodnikowanie *A. niger* na oczyszczonej i nie oczyszczonej  
pożywce bez dodatku manganu i z dodatkiem manganu

Pożywka	Bez dodatku manganu	Z dodatkiem 10 γ Mn/50 ml
oczyszczana	brak zarodników	zarodniki na całej powierzchni grzybni
nie oczyszczana	ślady zarodników	„

Okazało się, że na pożywce nie oczyszczonej w kombinacji zerowej pojawiły się ślady zarodników. Natomiast nie było ich w tej samej kombinacji, ale na pożywce oczyszczonej.

## 2. PRZYDATNOŚĆ *A. NIGER* DO ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA MANGANU W WYCIĄGACH WODNYCH

Jedną znaną dla nas metodą ilościową, posiadającą liczby graniczne (dla gleb niemieckich), była metoda *A. niger* w wykonaniu C. W e t t e r a.

Postanowiliśmy więc nawiązać do tej metody i powtórzyć ją w naszych warunkach.

Sprawdzając jej przydatność stosowaliśmy pożywkę taką jak w metodzie jakościowej, ale bez kwasu taninowego. Źródłem azotu był chlorek amonu. Również w sposób analogiczny oczyszczaliśmy pożywkę, stosując do tego celu fosforan wapnia w ilości 10 g/1000 ml płynu. Po 90 godzinach trwania wzrostu *A. niger* w temperaturze 30 °C grzybnie jego suszyliśmy i ważyliśmy na wadze analitycznej.

Zgodnie ze wskazaniem C. Wettera mangan oznaczaliśmy w wyciągach wodnych gleb, których sposób przyrządzenia opisaliśmy przy metodzie jakościowej. Aby określić absolutną ilość manganu rozpuszczalnego w wodzie, porównywaliśmy ciężar grzybni rozwijającej się na pożywce

T a b l i c a 5

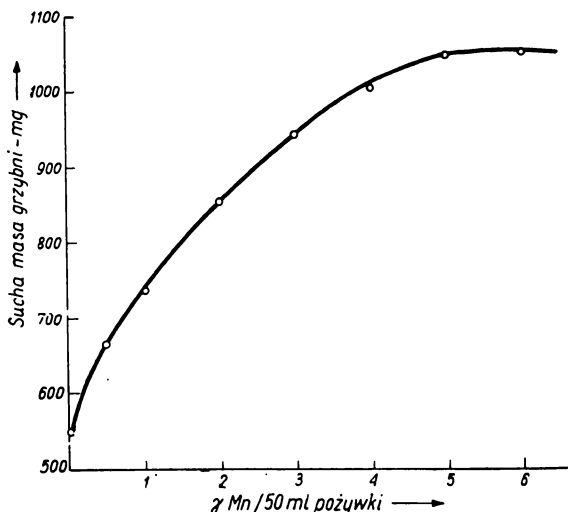
Plon grzybni *A. niger* na pożywce z wyciągami wodnymi różnych gleb  
(1 ml wyciągu wodnego gleby/50 ml pożywki)

Gleba, z której sporządzono wyciąg	pH (H <sub>2</sub> O)	Ciężar* s. m. grzybni w mg				średnio	Mn rozpuszczalny w wodzie w przeliczeniu na kg gleby w mg (wg wyceny <i>A. niger</i> )
		powtórzenia			średnio		
		I	II	III			
Gleba bielnicowa wytworzona z piasków luźnych	6,0	730	755	820	768	5,0	
Gleba brunatna wytworzona z gliny zwałowej średniej	5,8	870	830	855	852	10,0	
Gleba bielnicowa wytworzona z utworu pyłowego średniego	4,8	1050	1035	1020	1035	25,0	
Gleba bielnicowa wytworzona z utworu pyłowego średniego	6,5	600	590	550	580	0,2	
Gleba brunatna wytworzona z gliny zwałowej ciężkiej	5,9	820	805	840	821	8,5	

\* Ciężar suchej masy grzybni na pożywce bez dodatku wyciągu wyniósł 536 mg, na pożywce z dodatkiem 1 γ Mg/50 ml pożywki wyniósł 713 mg, na pożywce z dodatkiem 5 γ Mn/50 ml pożywki wyniósł 1041 mg.

z wyciągami wodnymi badanych gleb (1 ml wyciągu wodnego gleby/50 ml pożywki) z ciężarem grzybni wyrosłej na pożywce ze wzrastającymi ilościami manganu.

Plony grzybni z kombinacji bez manganu oraz z kombinacji ze wzrastającymi dawkami manganu, jak również plony grzybni z kombinacji z wyciągami glebowymi, zamieszczono w tablicy 5. Z tablicy tej widać, że przebieg krzywej plonów przy wzrastających dawkach manganu jest niemal taki sam jak u C. W e t t e r a, co dowodzi, że pracowaliśmy przy



Rys. 5. Krzywa standardowa plonu grzybni (dla Mn dostępnego i rozpuszczalnego w wodzie)

podobnej czystości pożywki i takiej samej reakcji *A. niger* na mangan co i W e t t e r. W obu wypadkach plon grzybni *A. niger* z kombinacji zerowych wynosił około 500 mg (tabl. 6).

Tablica 6  
Plon *A. niger* na pożywce oczyszczanej i nie oczyszczanej

Pożywka	Ciężar s.m. grzybni w mg								
	0,0 $\gamma$ Mn/50 ml pożywki				śred- nio	10 $\gamma$ Mn/50 ml pożywki			śred- nio
	powtórzenia			powtórzenia					
	I	II	III	I	II	III			
Oczyszczana	450	425	430	435	1030	1045	1005	1026	
Nie oczyszczana	700	712	745	722	1038	1043	1050	1043	

Również ilość wyciągu wodnego gleb (1 ml/50 ml pożywki) zalecana przez W e t t e r a okazała się odpowiednia dla naszych gleb. Przy tej ilości wyciągu gleby zasobniejsze dawały optymalny plon grzybni, a ubogi plon zbliżony do plonu z kombinacji zerowej. Ilościowa metoda *A. niger* ozna-

czania manganu w wyciągach wodnych okazała się powtarzalna i nadająca się do badania naszych gleb. Dla uzyskania pełniejszego obrazu wartości tej metody zajęliśmy się oceną jej czułości i dokładności. Okazało się, że czułość jej podobnie jak i innych metod biologicznych jest największa przy małych zawartościach manganu w środowisku (0,1 — 3  $\lambda$  Mn/50 ml pożywki) i maleje w miarę zbliżania się do optimum stężenia manganu. Obrazuje to do pewnego stopnia wykres krzywej standardowej na rys. 5. Widać z niego, że już pod wpływem 0,5  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki przyrost s.m. grzybni w pierwszej części krzywej wynosi około 100 mg, dalej — maleje.

T a b l i c a 7

Wahania równoległych plonów *A. niger* na pożywce z wyciągami wodnymi różnych gleb  
(1 ml wyciągu/50 ml pożywki)

Gleba	Ciężar s. m. grzybni w mg				średnio
	powtórzenia				
	I	II	III	IV	
Bielicowa wytworzona z utworów pyłowych; lekka	625	627	710	670	658
Bielicowa wytworzona z utworów pyłowych; lekka	660	574	666	633	634
Bielicowa wytworzona z utworów pyłowych; lekka	930	935	890	915	917,5
Bagienna, mułowo-bagienna; lekka	1090	980	880	1030	995
Brunatna wytworzona z glin zwałowych; lekka	670	600	765	710	686
Mada ciężka	950	1070	990	1025	1008,7

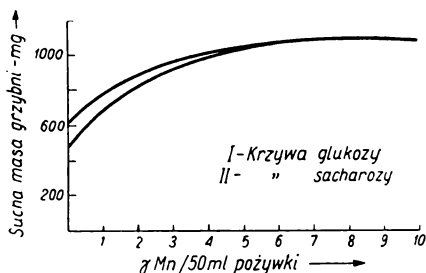
Przedział ufności przy  $P = 5\%$  wynosi 57,8 (średni błąd oznaczenia wynosi 7,0%). Błąd pojedynczego oznaczenia ( $c$ ) obliczono ze wzoru  $c = \sqrt{\frac{\sum M - x}{n}}$ .

Dokładność metody oceniliśmy na podstawie zgodności między równoległymi oznaczeniami manganu w glebach o różnej jego zawartości (według wyceny *A. niger*). Wyniki tych oznaczeń, zamieszczone w tablicy 7, wskazują na to, że dokładność oznaczeń jest stosunkowo, jak dla metod biologicznych, dość dobra, gdyż błąd oznaczeń wynosi około 7%. Przyczyną tego dość wysokiego błędu w porównaniu z metodami chemicznymi są prawdopodobnie wahania w zawartości manganu w wyciągach glebo-

wych, jak również zanieczyszczenia manganem pożywki, pochodzące z zarodników używanych do szczepienia, kurzu czy niestarannego umycia szkła. Dokładność tej metody należy rozpatrywać w związku z czułością, tzn. z przyrostami plonu grzybni *A. niger* pod wpływem wzrastających dawek manganu; dokładność ta jest więc największa w zakresie największego wzrostu krzywej plonów.

Ze szczegółów metodycznych zajęliśmy się wpływem oczyszczania pożywki. Podobnie jak w metodzie jakościowej okazało się, że jest on duży i w celu zwiększenia czułości metody pożywkę należy oczyszczać. Ilustruje to tablica 7. Wyniki jej pochodzą z doświadczenia, w którym *A. niger* rozwijał się na pożywce nie oczyszczonej i oczyszczonej fosforanem wapnia, bez manganu i przy optymalnym stężeniu manganu. Plon grzybni na kombinacji bez manganu jest o około 300 mg niższy w przypadku pożywki oczyszczonej od plonu z pożywki nie oczyszczonej.

Ze względu na wysoką cenę glukozy porównywaliśmy wzrost *A. niger* na pożywce z glukozą i na pożywce z sacharozą. Okazało się, że w wypadku pożywki z glukozą ciężar grzybni w kombinacji zerowej był zawsze niższy od ciężaru grzybni na pożywce z sacharozą mimo stosowanego oczyszczania. Ilustrują to krzywe na rys. 6. Dlatego uznaliśmy, że należy pozostać przy glukozie.



Rys. 6. Różnica w ciężarze suchej masy grzybni wyrosłej na pożywce z glukozy i sacharozy

### 3. PRZYDATNOŚĆ *A. NIGER* DO OZNACZANIA MANGANU W WYCIĄGU SPORZĄDZANYM DLA OZNACZANIA MANGANU WYMIENNEGO

Dla poznania gleby pod względem zawartości manganu dostępnego oprócz oznaczenia manganu rozpuszczalnego w wodzie, duże znaczenie ma oznaczanie manganu wymiennego. Postanowiliśmy więc sprawdzić przydatność ilościowej metody *A. niger* do tego celu.

Mangan wypieraliśmy z gleby [2] za pomocą obojętnego ( $pH = 7$ ) 1 n octanu amonu. Postępowaliśmy w następujący sposób: 2 g gleby zalewaliśmy taką ilością roztworu octanu amonu, aby całą objętość płynu znajdował osadu zmieścić na sączku. Po 20 godzinach przesączaliśmy wyciąg, a pozostałą glebę kilkakrotnie przemywaliśmy przez dekantację, aż do zaniku reakcji na wapń. Potem nowymi porcjami płynu zalewaliśmy glebę na sączku tak, aby w sumie do wypierania manganu użyć 50 ml roztworu na 2 g gleby.

Po uzyskaniu przesączu z manganem wymiennym musieliśmy ustalić

ilość, jaką należy dodawać do 50 ml pożywki. W tym celu założyliśmy doświadczenie, w którym *A. niger* rozwijał się na pożywce ze wzrastającymi ilościami wyciągu octanu amonu z różnych gleb. Plon grzybni *A. niger* wyrosłej na pożywce z wyciągami różnych gleb przedstawia tablica 8. Wiadź z niej, że 1 ml wyciągu octanu amonu daje w przypadku wielu gleb prawie optymalny plan grzybni. Przy większej ilości wyciągu plon grzybni nawet maleje. Natomiast 0,5 ml wyciągu/50 ml pożywki jest dawką, przy której uwidoczniają się różnice między glebami, jeśli chodzi o zawartość manganu wymiennego. Tak więc dawkę 0,5 ml wyciągu gleby w octanie amonu/50 ml pożywki uznaliśmy za najlepszą i stosowaliśmy w dalszych oznaczeniach manganu wymiennego.

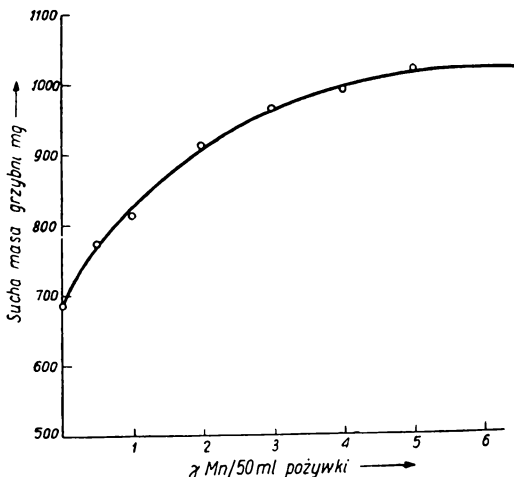
Tablica 8

Rozwój *A. niger* na pożywce ze wzrastającymi ilościami wyciągu octanu amonu różnych gleb

Gleba, z której sporządzono wyciąg w 1,0 n octanie amonu	Plon s. m. grzybni w mg				Mn wymienny w mg/kg gleby przy 0,5 ml wyciągu (50 ml pożywki)
	ilość wyciągu w ml/50 ml pożywki				
	0,5	1	2	5	
Bielicowa wytworzona z utworów pyłowych; lekka	810	980	1010	910	41
Bielicowa wytworzona z piasków; luźna	760	980	—	—	37
Bielicowa wytworzona z piasków; luźna	860	1170	830	—	75
Bielicowa wytworzona z piasków; luźna	700	900	1005	1020	6
Bielicowa wytworzona z gliny żwawej; średnia	710	920	710	790	9
Czarna ziemia wytworzona z gliny żwawej; ciężka	756	810	700	920	35
Mada ciężka	1052	1040	940	1070	240
Brunatna wytworzona z gliny żwawej; ciężka	1000	1070	940	840	240
Brunatna wytworzona z utworów pyłowych; średnia	850	900	1100	1120	66
Brunatna wytworzona z utworów pyłowych; średnia	950	930	830	830	163

Po ustaleniu ilości wyciągu branego do jednorazowego oznaczenia, postanowiliśmy uzyskać krzywą plonów, aby móc odczytywać absolutne ilo-

ści manganu wymiennego w glebie. W tym celu do pożywki z octanem amonu (50 ml pożywki + 0,5 ml octanu amonu) dodawaliśmy wzrastające ilości manganu. Uzyskane wyniki przedstawia tablica 9 oraz rys. 7. Widać



Rys. 7. Krzywa standardowa plonu grzybni (dla Mn wymiennego)

z nich, że wzrastającym ilościom manganu odpowiadają coraz to większe plony grzybni. Optymalny jej plon (1100 mg) uzyskuje się przy 5 γ Mn/50 ml pożywki. Dodatek octanu amonu do pożywki zwiększa plon grzybni, zmniejszając zakres czułości metody.

Tablica 9

Rozwój *A. niger*: 1) na samej pożywce, 2) na pożywce z dodatkiem 0,5 ml roztworu octanu amonu służącego do sporządzania wyciągów przy wzrastających ilościach manganu

Wzrastające ilości Mn w γ/50 ml pożywki	Ciężar s. m. grzybni w mg							
	pożywka + 0,5 ml octanu amonu/50 ml				sama pożywka			
	I	II	III	średnio	I	II	III	średnio
0,0	650	720	680	683	550	530	540	542
0,5	765	770	790	773	680	640	685	668
1,0	845	855	800	833	750	800	799	783
2	940	900	908	917	830	845	880	852
3	970	980	935	961	970	925	940	945
4	1000	970	1010	993	1012	1015	980	1002
5	1065	1030	1040	1045	1060	1055	1035	1050
10	1020	1070	1058	1049	1028	1070	1045	1047
15	1060	1028	1040	1043	1035	1080	1020	1045

Za miarę dokładności oznaczeń manganu wymiennego posłużyły nam równoległe oznaczenia w glebach o różnej jego zawartości (według wyceny *A. niger*). Wyniki tych oznaczeń zamieszczone w tablicy 10 wskazują, że do-

T a b l i c a 10

Wahania równoległych plonów *A. niger* na pożywkach z wyciągami gleb w 1n octanu amonu (0,5 ml wyciągu/50 ml pożywki)

Gleba	Ciężar s. m. grzybni w mg				
	powtórzenia				średnio
	I	II	III	IV	
Brunatna lekka wytworzona z piasków	810	770	800	800	795
Brunatna średnia wytworzona z gliny zwałowej	750	650	760	695	714
Bielicowa lekka wytworzona z utworów pyłowych	713	650	735	730	707
Brunatna średnia wytworzona z gliny zwałowej	720	750	755	710	734
Brunatna lekka wytworzona z gliny zwałowej	670	660	610	660	650

Przedział ufności przy  $P = 5\%$  wynosi  $5\%$  (średni błąd oznaczenia =  $7,3\%$ ).

kładność tej metody wynosi około  $7\%$ , a więc wykazuje dokładność innych metod biologicznych. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że ilościową metodą *A. niger* można oznaczać mangan wymienny.

#### 4. PRZYDATNOŚĆ *A. NIGER* DO ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA MANGANU BEZPOŚREDNIO W PRÓBACH GLEBOWYCH

Do oznaczania manganu w wyciągach glebowych można mieć zastrzeżenia polegające na tym, że stwierdzany mangan (tj. mangan rozpuszczalny w wodzie i wymienny) nie daje właściwego obrazu zawartości manganu dostępnego. Dlatego też postanowiliśmy przystosować ilościową metodę *A. niger* do oznaczeń manganu wprost w próbkach glebowych, zakładając, że oznaczone w ten sposób ilości manganu można uważać jeśli nie za do pewnego stopnia dostępne dla roślin, to w każdym bądź razie dostępne dla grzyba.

W celu przystosowania ilościowej metody *A. niger* do oznaczania man-

ganu wprost w glebie, należało ustalić wielkość naważki gleby branej do oznaczenia oraz odczyn pożywki. Przystępując do ustalenia wielkości naważki i odczynu pożywki, zdawaliśmy sobie sprawę z tego, że występuje tutaj odwrotna zależność; przy niższym odczynie pożywki naważka gleby, potrzebna do spowodowania optymalnego wzrostu *A. niger*, powinna być mniejsza, natomiast przy wyższej wartości *pH* pożywki powinna być większa. Najpierw postanowiliśmy więc ustalić odczyn pożywki.

#### Ustalenie odczynu pożywki

L ö h n i s [15] uważał, że *A. niger* nie będzie mógł znaleźć zastosowania do oznaczeń manganu wprost w glebach ze względu na zakwaszenie pożywki w czasie wzrostu i uruchamianie się w związku z tym z gleby dużych ilości manganu niedostępnego dla roślin.

N i c h o l a s [21] oraz D o n a l d, P a s s e y i S w a b y [10a i b], nie chcąc dopuścić do uruchamiania się z gleby manganu niedostępnego w czasie trwania wzrostu *A. niger*, alkalizowali pożywkę przed inkubacją, co pociągało za sobą konieczność pracy w warunkach sterylnych.

W e t t e r próbował oznaczać mangan wprost w próbkach glebowych nie alkalizując pożywki [44]. Największe odważki gleby, jakie jeszcze nie wnosiły optymalnej ilości manganu dla *A. niger*, wynosiły zaledwie 100 mg. W e t t e r uznał je za zbyt małe, aby można je było stosować do oznaczeń ilościowych.

Obaw L ö h n i s a i W e t t e r a nie podzielaliśmy w pełni, jednak w związku z nimi postanowiliśmy sprawdzić wzrost *A. niger* przy różnym wyjściowym odczynie pożywki. Dodawaliśmy także różne ilości gleby do zalkalizowanej pożywki i obserwowaliśmy wzrost i rozwój *A. niger*. Badania te prowadziliśmy w tym celu, aby móc stwierdzić, czy przy wyższych wyjściowych wartościach *pH* pożywki będzie można zwiększyć ilość dodawanej do niej gleby. Opis wyglądu zewnętrznego *A. niger* oraz plon grzybni przy różnym odczynie pożywki przedstawia tablica 11a i 11b. Widać z nich, że *A. niger* najlepiej rozwija się w środowisku o niskiej wartości *pH* (*pH* — 3). Stosunkowo nieźle rozwija się jeszcze na pożywce o wartości *pH* — 6. W miarę wzrostu odczynu pożywki plon grzybni *A. niger* maleje, opóźnia się jego rozwój, a zwiększa się ilość zarodników. W kombinacjach, w których pożywka została zalkalizowana w miarę trwania wzrostu *A. niger* pożywka zakwaszała się dochodząc po 90 godzinach do *pH* około 4 w kombinacji III (wyjściowe *pH* — 7) i *pH* około 6,0 w kombinacji IV (wyjściowe *pH* — 8) oraz do *pH* ok. 3 w kombinacji II (wyjściowe *pH* — 6).

Dane te wykazują, że przy wyższych wyjściowych wartościach *pH* pożywki, wielkość odważki gleby potrzebnej do optymalnego wzrostu *A. ni-*

Tablica 11a

Wpływ różnego wyjściowego pH pożywki na plon i zarodnikowanie *A. niger* przy dwóch poziomach manganu

Wyjściowe pH pożywki	Pożywka + 1,0 γ Mn na 50 ml		Pożywka + 10 γ Mn na 50 ml		końcowe pH pożywki
	plon suchej masy grzybni	zarodnikowanie	plon suchej masy grzybni	zarodnikowanie	
8	730	brak	1170	brak	2,8
7	640	brak	1050	ślady	3,2
6	570	ślady	900	<sup>1</sup> / <sub>3</sub> pow. pokryta	4,1
3	505	na całej pow.	750	na całej pow.	5,8

Tablica 11b

Wpływ różnego wyjściowego pH pożywki z glebą na plon i zarodnikowanie *A. niger*

Gleba	Wyjściowe pH pożywki z glebą	Ciężar suchej masy w mg	Zarodnikowanie	Ciężar suchej masy w mg	Zarodnikowanie
		przy 20 mg gleby/50 ml pożywki		przy 50 mg gleby na 50 ml pożywki	
Gleba bielicowa wytworzona z utworu pyłowego — lekka	3	780	brak	1030	brak
	6	755	ślady	1023	ślady
	7	738	„	915	<sup>1</sup> / <sub>2</sub> pow. pokryte
	8	720	cała pow. pokryta	760	cała powierzchnia pokryta
Gleba bielicowa wytworzona z piasku — luźna	3	1055	brak	1041	brak
	6	1010	ślady	1000	ślady
	7	1000	„	940	<sup>2</sup> / <sub>3</sub> pow. pokryte
	8	400	cała pow. pokryta	760	cała pow. pokryta
Mada ciężka	3	1040	brak	1060	brak
	6	1030	ślady	1056	ślady
	7	900	„	978	<sup>2</sup> / <sub>3</sub> pow. pokryte
	8	780	cała pow. pokryta	900	cała pow. pokryta

ger może być większa; wówczas to jednak wzrost grzybni odbywa się słabo i nienormalnie. Z tego powodu zdecydowaliśmy się zrezygnować z alkalinizowania pożywki.

### Wielkość odważek glebowych

Ilość gleby, nadającą się do oznaczeń w niej manganu, zdecydowaliśmy się ustalić przy optymalnym odczynie dla wzrostu *A. niger* (pH — 3), zakładając w tym celu doświadczenie, w którym kropidlak rozwijał się na pożywce ze wzrastającymi naważkami różnego rodzaju gleb (20; 40; 100 mg gleby/50 ml pożywki). Wyniki zamieszczone w tablicy 12 wskazują, że przy

Tablica 12

Wpływ wzrastających ilości gleb o różnej zawartości manganu dostępnego na plon *A. Niger*\*

Gleba \ Wzrastające ilości gleby	20 mg	40 mg	100 mg	Mn dostępny w mg/kg gleby (przy odważce 20 mg)
	gleby/50 ml	gleby/50 ml	gleby/50 ml	
ciężar suchej masy grzybni w mg**				
Gleba bielnicowa wytworzona z piasków — luźna	1087	1035	1010	250
Gleba bielnicowa wytworzona z utworu pyłowego — średnia	1055	1110	1170	250
Gleba brunatna wytworzona z utworu pyłowego — średnia	989	983	1027	207
Gleba bielnicowa wytworzona z gliny zwałowej — lekka	967	987	1080	160
Gleba bielnicowa wytworzona z utworu pyłowego — lekka	680	972	1030	7
Gleba bielnicowa wytworzona z piasków — luźna	785	1005	1050	55
Mada ciężka	1075	1025	1090	250
Czarna ziemia wytworzona z utworu pyłowego — ciężka	990	1015	980	182
Gleba bielnicowa wytworzona z utworu pyłowego — lekka	880	1018	1037	100
Czarna ziemia wytworzona z utworu pyłowego — ciężka	975	988	1045	163

\* Plon suchej masy grzybni na pożywce bez dodatku gleby wyniósł 525 mg.

\*\* Średnia z 3 powtórzeń.

40 i 100 mg gleby/50 ml pożywki uzyskuje się przeważnie już optymalny wzrost grzybni *A. niger*. Tylko przy ilości 20 mg gleby/50 ml pożywki w przypadku części gleb plon grzybni był znacznie niższy od plonu uzyskanego przy optymalnej dawce manganu w środowisku. Tę więc ilość gleby uznaliśmy za właściwą i postanowiliśmy stosować w dalszych oznaczeniach.

Warto zwrócić uwagę na to, że jest to dwukrotnie większa ilość gleby od tej, jaką ustalono dla jakościowej metody opartej na zarodnikowaniu *A. niger*. Podobnie w metodzie jakościowej trzeba więcej wyciągu wodnego z gleby, aby spowodować różnice w zarodnikowaniu niż w metodzie wagowej.

Jest rzeczą ciekawą, że u Wettera dopiero ilość gleby wynosząca 0,1 g/50 ml pożywki dawała w przypadku różnych gleb już optymalny plon *A. niger*, i mimo to zdecydował się on oznaczać mangan w wyciągach wodnych, uważając przypuszczalnie, że naważki mniejsze od 100 mg gleby/50 ml pożywki wiązałyby się ze zbyt dużym błędem oznaczania.

### Dokładność metody

Aby sprawdzić miarę dokładności metody opartej na ciężarze suchej masy grzybni przy ustalonej ilości 20 mg gleby/50 ml pożywki, założyliśmy doświadczenie w kilku powtórzeniach na glebach o różnej zawartości man-

Tablica 13

Wahania równoległych plonów *A. niger* przy oznaczaniu manganu bezpośrednio w glebie (20 ml gleby/50 ml pożywki)

Gleba	Plon grzybni w mg										średni plon
	powtórzenia										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Gleba brunatna ciężka wytworzona z gliny zwałowej	915	980	1015	1020	1030	1040	1040	1040	1130	1150	1036
Gleba bielicowa średnia wytworzona z utworu pyłowego	905	965	995	1000	1005	1005	1005	1005	1010	1015	991
Gleba bielicowa średnia wytworzona z gliny zwałowej	735	740	785	790	820	830	830	850	855	880	790

Przedział ufności przy  $P = 5\%$  wynosi 64,1. Średni błąd oznaczenia wyniósł  $\approx 8,0\%$ ; błąd pojedynczego oznaczenia obliczono ze wzoru  $c = \sqrt{\frac{(\Sigma M - x)^2}{n}}$ .

ganu (według wyceny *A. niger*) i oznaczaliśmy błąd równoległych oznaczeń. Wyniki zamieszczone w tablicy 13 wskazują na to, że dokładność oznaczeń przy tak małych naważkach gleby jest stosunkowo dość dobra, gdyż błąd równoległego oznaczenia wynosi około 8%.

#### WNIOSKI

1. Za pomocą *A. niger* można ilościowo oznaczać mangan wprost w próbkach glebowych rozartych w moździerzku oraz w wyciągach wodnych gleb i w wyciągach stosowanych do ekstrakcji manganu wymiennego, stosując bardzo małe nakłady odważki gleb względnie ilości wyciągów zawierające nie więcej niż 5  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki.

2. Dokładność wyników przy oznaczaniu manganu wprost w glebie jest dość duża (około 8%), mimo stosowania bardzo małych odważek gleb: 20 mg (krystalizator); z większymi odważkami wprowadza się optymalne ilości manganu do pożywki nawet w przypadku gleb średnio zasobnych w mangan, przy 58  $\gamma$  Mn/40 ml pożywki uzyskuje się już optymalny wzrost *A. niger*.

3. Za pomocą *A. niger* można oznaczać mangan jakościowo (na podstawie zarodnikowania) wprost w glebie oraz w wyciągach glebowych.

4. Ilości manganu wykrywane przez *A. niger* bezpośrednio w próbkach glebowych (przy warunkach zakwaszania się naturalnego pożywki w czasie wzrostu) są zbliżone do ilości manganu aktywnego.

5. Dalsze badania powinny pójść w kierunku: a) porównania manganu dostępnego dla *A. niger* (w warunkach naturalnego zakwaszania się środowiska) z manganem aktywnym, jako z formą manganu najlepiej wskazującą na potrzeby nawozowe gleb w stosunku do tego mikroelementu, b) zbadania przydatności *A. niger* do ilościowego oznaczania manganu w wyciągach z manganem aktywnym.

#### STRESZCZENIE

Różnice w zarodnikowaniu *A. niger* na pożywce z dodatkiem kwasu tanninowego (20g/l) zależą od stężenia manganu w środowisku. Zależność ta pozwala na jakościowe oznaczanie manganu wprost w glebie lub w wyciągach.

Wzrost *A. niger* zależy od stężenia manganu w środowisku. Na zmodyfikowanej przez Wettera pożywce (oczyszczonej metodą Sakamury) bez dodatku manganu plon suchej masy grzybni wynosi około 400 mg i pod wpływem wzrastających ilości manganu dochodzi do 1100 mg (przy

5  $\gamma$  Mn/50 ml pożywki). Zależność ta pozwala na ilościowe oznaczanie manganu wprost w glebie oraz w wyciągach wodnych i innych.

\*

Pracę tę wykonaliśmy pod kierunkiem prof. dr M. Górskiego: tu chcielibyśmy podziękować Panu Profesorowi za pomoc i cenne wskazówki.

#### LITERATURA

- [1] Albert A., Gledhill W. S. — The Choice of Chelating Agent for Inactivating Trace Metals I. A Survey of Commercially Available Chelating Agents. *Biochem. J.* 41 (1947) 525—533.
- [2] Arinuszkińska E. W. — Chemiczeskij analiz poczw i gruntow. Moskwa (1952) 54—57.
- [3] Baron A. — Simultaneous Extraction and Determination of the Easily Soluble Fractions of the Trace Elements B, Fe, Cu, Mg, Mn, Mo, Zn, in Soil. *Landw. Forsch.* 7 (1955) 82—89.
- [4] Bentley O. G., Snell E. E. and Phillips P. H. — A Microbiological Method for the Determination of Manganese. *J. Biol. Chem.* 170 (1947) 343.
- [5] Bertrand G., Javillier M. — Influence du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 152 (1911) 225.
- [6] Bertrand G. — Sur l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse. *Bull. Soc. Chim. France Sér.* 5 (1942) 400—406.
- [7] Boken E. — On the Effect of Storage and Temperature on the Exchangeable Manganese in Soil Samples. *Plant and Soil* 4 (1952) 154—163.
- [8] Charney J. — A Microbiological Assay Method for Microgram Quantities of Manganese in Biological Material. *Science* 114 (1950) 687—688.
- [9] Donald C. A., Passey B. J., Swaby R. J. — Availability of Trace Elements from Rocks and Minerals. *Australian Journ. of Agr. Res.* 4 (1953) 292—304.
- [10a] Donald C. A., Passey B. J., Swaby R. J. — A Comparison of Methods for Removing Trace Metals from Microbiological Media. *J. Gen. Microbiol.* 7 (1952) 211—220.
- [10b] Donald C. A., Passey B. J., Swaby R. J. — Bioassay of Available Trace Metals from Australian Soils. *Australian Journ. Agr. Res.* 3 (1952) 305—325.
- [11] Gerretsen F. C. — On the Use of *Aspergillus niger* for the Determination of Plant Nutrients in the Soil. *Annal. Chim. Acta* 2 (1948) 782—789.
- [12] Jogeswari L. — Trace Elements Nutrition of Fungi. The Effect of Boron, Zinc and Manganese on *Fus.* *Spec. Proc. Indian Acad. Sci.* 28 (1948) 177—201.
- [13] Lavollay J. — Sur l'activité et l'interdépendance des aliments dans la nutrition d'*Aspergillus niger*. Trace elements in plant physiology 1950 Wallace USA.
- [14] Leeper G. W. — The Forms and Reactions of Manganese in the Soil. *Soil Sci.* 63 (1947) 79—94.

- [15a] L ö h n i s M. P. — Manganese Toxicity in Field and Market Garden Crops. *Plant and Soil* 3 (1951) 193 — 222.
- [15b] L ö h n i s M. P. — The Action of Manganese on the Development of *Aspergillus niger*. *Antonie van Leeuwenhoek* 10 (1952) 101—122.
- [16] M a k s i m o w A. — Mikroelementy i ich znaczenie w życiu organizmów (1954) 119—132.
- [17] M u l d e r E. G. — The Microbiological Estimation of Copper, Magnesium and Manganese in Soil and Plant Material. *Anal. Chim. Acta* 2 (1948) 793 — 800.
- [18] M u l d e r E. G., G e r r e t s e n F. C. — Soil Manganese in Relation to Plant Growth. *Advanc. in agr.* 4 (1952) 221 — 277.
- [19] M u l d e r E. G. — The Essentiality of Trace Elements for Microorganisms and their Microbiological Determination. *Proc. 6-th. Intern. Microbiol. Congr. Roma* (1953 — in press).
- [20] N i c h o l a s D. J. D., F i e l d i n g A. H. — The Use of *A. niger* for the Determination of Magnesium, Zinc, Copper and Molybdenum Available in Soils to Crop Plants. *Jour. Hortic. Sci.* 26 (1951) 126 — 147.
- [21] N i c h o l a s D. J. D. — The Use of Fungi for Determining Trace Metals in Biological Materials. *Analyst* 77 (1952) 629 — 642 (Univ. Bristol Long Ashton).
- [22] N o w o s i e l s k i O. — „Dostępne formy manganu” a potrzeby nawozowe gleb. *W: Roczniki Gleboznawcze t. 7, 1958.*
- [23] N o w o t n y - M i e c z y Ń s k a A. — Nowe drogi badań nad mikroelementami. *Post. Wiedzy Roln.* 2 (1950) 4.
- [23] N o w o t n y - M i e c z y Ń s k a A., R u s z k o w s k a M. — Próba opracowania biologicznej metody oznaczania przyswajalnego manganu w glebie. *Rocz. N. Roln.* 66-A-1 (1952) 181 — 182.
- [24] P a s s e y B. J. — The Use of Microorganisms in the Biological Assay of Trace Elements. *Austr. Conf. Soil Sci. Adelaide I, 3* (1953) 5.
- [25] Q u a s t e l J. H., H e w i t t E. J., N i c h o l a s D. J. P. — The Control of Manganese Deficiency in Soil. *The Jour. of Agricult. Science* 38 (1948) 315.
- [26] R o t h V. H., P f a f f C. — Über ein Verfahren zur Bestimmung des pflanzenaufnehmbaren Mangans. *Landw. Forsch.* 6 (1955) 41 — 47 Sonderheft.
- [27] R u s z k o w s k a M. — Makrobiologiczna metoda oznaczania przyswajalnego manganu w glebie. *Referaty Zjazdu Naukowego PTG* 20 — 23.IV. 1956. *Warszawa* (1956) 100 — 103.
- [28] S a f f e r t K. G. — Über den Einfluss des Mangans auf Wachstum und Physiologie von *Aspergillus oryzae* und über eine Bestimmungsmethode von Mangan mit Hilfe dieses Pilzes. *Dissertation, Weihenstephan* 1951.
- [29] S a k a m u r a T. — Über einige für die Kultur von *Aspergillus* notwendige Schwermetalle und das Befreiungsverfahren der Nährlösung von ihren Spuren. *Journ. Sci. Hokkaido Ymp. Uni V* (1936) 99 — 117.
- [30a] S c h a c h t s c h a b e l P. — Der Nährstoffgehalt des idealen Bodens. *Landw. Forsch.* 6 (1955) 50 — 63 Sonderheft.
- [30b] S c h a c h t s c h a b e l P. — Die Bestimmung des Mangan ... Zeflanzen, *Dung.* 78 (1957) 147 — 167.
- [31] S t a p p C. u. W e l t e r C. — Beiträge zum quantitativen microbiologischen Nachweis von Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, Mo in Boden. *Landw. Forsch.* 5 (1953) 167 — 180.

- [32] S e r a s w a t h i D. — Bio-Assay of Heavy Metals by *Aspergillus niger* Sensitivity of a New Strain. Prog. Indian Acad. Sci. 40 (1954) 1—7 (Univ. Madras).
- [33a] S t e i n b e r g R. A. — Nutrient-Solution Purification for Removal of Heavy Metals in Deficiency Investigations with *A. niger*. Jour. Agric. Res. 51—(1935) 413—424.
- [33b] S t e i n b e r g R. A. — Effects of Nitrogen Compound and Trace-Elements on Growth *A. niger*. Jour. Agr. Res. 59 (1939) 713—744.
- [33c] S t e i n b e r g R. A. — Influence of Carbon Dioxide on Response of *Aspergillus niger* to Trace Elements. Plant Physiol. 17 (1942) 129—132.
- [33d] S t e i n b e r g R. A. — Effect of Trace Elements on Growth of *Aspergillus niger* with Aminoacids. Journ. Agr. Res. 64 — (1942) 455—475.
- [33e] S t e i n b e r g R. A. — Use of Microorganisms to Determine Essentiality of Minor Elements. Soil Sci. 60 (1945) 185—189.
- [34] S t i l e s W. — Trace Elements in Plants and Animals (1946). Тlum. ros. (1949) Moskwa, 31—32.
- [35] T o m l i s o n N., C a m p b e l l J. R. — The Influence of Zinc, Iron, Copper and Manganese on the Production of Citric Acid by *A. niger*. Jour. Bact. 2 (1950) 217—230.
- [36] W a n g T. S. — Nouvelle méthode de dosage des éléments minéraux fertilisants du sols partes. Azotobacter Plant and Soil 3 (1951) 41—46.
- [37] W e t t e r C. — Über ein Verfahren zur Quantitativen Bestimmung von Mangan an Boden mit Hilfe von *A. niger*. Landw. Forsch. 6 (1954) 114—119.

ОЛЬГЕРД НОВОСЕЛЬСКИ и Т. СЕВЕРИН

## О ПРИГОДНОСТИ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ПОЧВЕ ДОСТУПНОГО МАРГАНЦА

Лаборатория агрономической химии Варшавской Высшей  
Сельскохозяйственной Школы

### Резюме

Различия в образовании спор у *A. niger* на питательной среде с добавкой танниновой кислоты (20 г./литр) обуславливаются содержанием марганца в среде. Благодаря этой зависимости оказывается возможным качественное определение содержания марганца непосредственно в почве или в вытяжках.

Прирост у *A. niger* зависит от содержания марганца в среде. На среде видоизмененной Веттером и очищенной по методу Сакамуры при отсутствии марганца урожай сухого вещества мицелия составляет около 400 мг., но при действии повышающихся доз марганца достигает 1100 мг./ 5  $\mu$  Mn/50 мя. питательной среды). Благодаря этой зависимости является возможным количественное определение марганца непосредственно в почве а также в водных и других вытяжках.

O. NOWOSIELSKI, T. SEWERYN

*ASPERGILLUS NIGER*, AN APPROPRIATE INDICATOR  
OF AVAILABLE MANGANESE IN SOILS

Dep. of. Agricultural Chemistry SGGW — Warsaw

S u m m a r y

Sporulation variation in *A. niger* on a medium to which tannic acid (20 g/l) has been added depends on manganese concentration in the medium. This correlation permits direct qualitative determination of manganese in the soil and in solutions.

Growth of *A. niger* depends on manganese concentration in the environment. On Wetter's modified medium (purified by the Sakamura method), with no addition of manganese, the yield of mycelium dry matter is abt. 400 mg and reaches with rising manganese content 1100 mg (at 5 g Mn per 50 ml of medium). This correlation permits also direct quantitative determination of manganese in the soil, and in water- and other solutions.

