

Z Katedry Systematyki i Geografii Roślin Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS  
Kierownik: prof. dr Józef Motyka

Jacek MALICKI

**Wpływ kwasów porostowych na mikroorganizmy glebowe. Część I.  
Wyplukiwanie kwasów do gleby**

**Влияние лишайниковых кислот на почвенные микроорганизмы.  
Часть I. Вымывание кислот в почву**

**The Effect of Lichen Acids on the Soil Microorganisms. Part I.  
The Washing down of the Acids into the Soil**

Porosty wytwarzają pewną ilość związków organicznych, które mają charakter kwasów i właściwości bakteriologiczne (3, 4, 7, 8). Kwasy te stosunkowo łatwo można wyekstrahować z porostów różnymi rozpuszczalnikami (1, 9). Celem niniejszej pracy jest zbadanie możliwości dostawania się substancji porostowych z wodą deszczową do gleby.

Najlepiej poznaną substancją porostową o właściwościach antybiotycznych jest kwas usninowy. Działa on hamująco na wzrost bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich i prątków kwasoopornych (8). Działanie bakteriostatyczne tego kwasu jest dość znaczne (patrz tab. 1). Występuje on w 3 postaciach optycznych: prawoskrętnej, lewoskrętnej i racemicznej o praktycznie takiej samej sile działania bakteriostatycznego. Nie rozpuszcza się w wodzie, słabo rozpuszcza się w niższych alkoholach, dobrze w chloroformie, benzenie, acetonie i wodnych roztworach zasad. Nie traci właściwości antybiotycznych nawet po kilkunastu latach przechowywania w warunkach laboratoryjnych (5, 7).

Kwas ten znajduje się w wielu rodzajach porostów, między innymi w porostach naziemnych:

<i>Cladonia deformis</i> Hoffm.	3%
<i>Cladonia alpestris</i> (L.) Rabenh.	0,6%
<i>Cladonia mitis</i> Sandst.	0,2%

<i>Cladonia sylvatica</i> (L.) Hoffm.	0,2%
<i>Alectoria ochroleuca</i> (Hoffm.) Mass.	4%
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	0,04%
<i>Cetraria cucullata</i> (Bell.) Ach.	0,6%
(zestawienie wg Sawicza, 7)	

Tab. 1. Porównanie siły bakteriostatycznej kwasu usninowego z penicyliną  
A comparison of the bacteriostatic action of usnic acid with that of penicillin

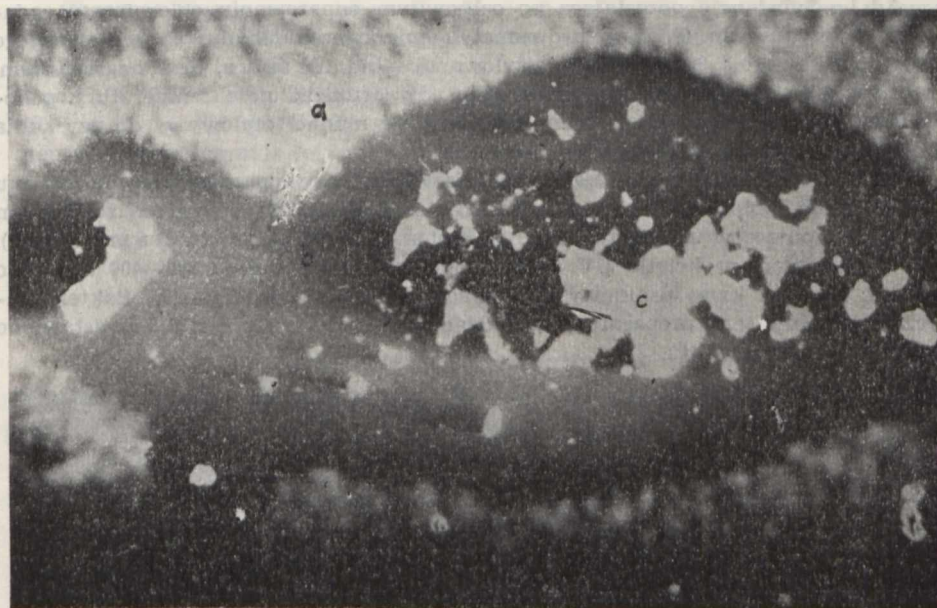
Lp. No.	Nazwa bakterii Name of bacteria	Stęż. hamujące penic. w $\mu\text{g/ml}$ . Inhibiting concentra- tion of penicillin in $\mu\text{g/ml}$ .	Stęż. hamujące kwasu w $\mu\text{g/ml}$ . Inhibiting concentra- tion of usnic acid in $\mu\text{g/ml}$ .
1	<i>Bacillus subtilis</i>	0,027	6,240
2	<i>Corynebacterium sp.</i>	0,250—4,800	0,015
3	<i>Mycobacterium phlei</i>	21,600	5,000
4	<i>Myc. smegmatis</i>	405,000	4,500
5	<i>Myc. tuberculosis</i>	12,000	6,000
6	<i>Micrococcus pyogenes</i>	5,100	7,000
7	<i>Streptococcus sp.</i>	252,000	7,000

Przeliczeń dokonano na podstawie danych zawartych u Korzybskiego (4) i Sawicza (7), przyjmując za jednostkę penicyliny aktywność przeciwbakteryjną, zawartą w  $0,6 \mu\text{g}$  najczystszej preparatu krystalicznej soli sodowej penicyliny benzylowej.

The author made calculations in the strenght of the data after Korzybski (4) and Sawicz (7) taking for the penicillin unit that degree of antibacterial activity which is contained in  $0,6 \mu\text{g}$  of the purest preparation of crystallin sodium benzyl penicillin.

Dość często główny składnik runa w borze sosnowym, zwłaszcza w podzespole *P.-v. myrtilli cladonietosum*, rosnącym na suchych i lek-  
kich piaskach, stanowią *Cladonia sylvatica* i *Cladonia rangiferina* (za-  
wierająca kwas protocetrariowy). Można tu także spotkać bardzo rzadką  
*Cladonia alpestris*. Na piaszczystych wydmach śródlądowych podczas  
optymalnej fazy zespołu *Corynephoretum canescentis* występują dość  
licznie chrobotki, rośnie tu także *Cetraria islandica*. Poza tym chro-  
botki spotyka się w wielu zespołach roślinnych porastających góry.

W naszym klimacie największe obszary zajmuje bór sosnowy  
z *Cladonia sylvatica* i *Cladonia rangiferina* panując niemal wyłącznie  
na glebach ubogich. W niektórych większych lasach północnej części  
woj. lubelskiego razem z poprzednio wymienionymi gatunkami rośnie  
również *Cladonia alpestris*. Ponieważ *Cladonia sylvatica* i *Cladonia*  
*alpestris* wytwarzają znaczne ilości kwasu usninowego, użyłem je do  
swoich badań.



Ryc. 1. Hamowanie wzrostu *Staphylococcus aureus* przez grudki kwasu usnino-  
wego (72 godz. 30°C); a — wzrost bakterii, b — strefa hamowania wzrostu,  
c — grudki kwasu usninowego; pow. 10 ×

The inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* by fragments of usnic acid  
(72 hrs. 30°C); a — growth of the bacteria, b — zone of the inhibited growth,  
c — fragments of usnic acid; magn. 10 ×

#### MATERIAŁ

Badania prowadziłem na *Cladonia sylvatica* i *Cladonia alpestris* oraz na glebie pobranej spod zwartych kępek tych porostów. Materiał był zbierany: 1) w borze chrobotkowym, znajdującym się na zachód od szosy Lubartów — Kock, w pobliżu jeziora Firlej, 2) w borze chrobotkowym, leżącym w odległości 8 km na południe od Włodawy, 3) na wydmach piaszczystych, leżących na wschód od miejscowości Brody, nad rzeką Wieprz.

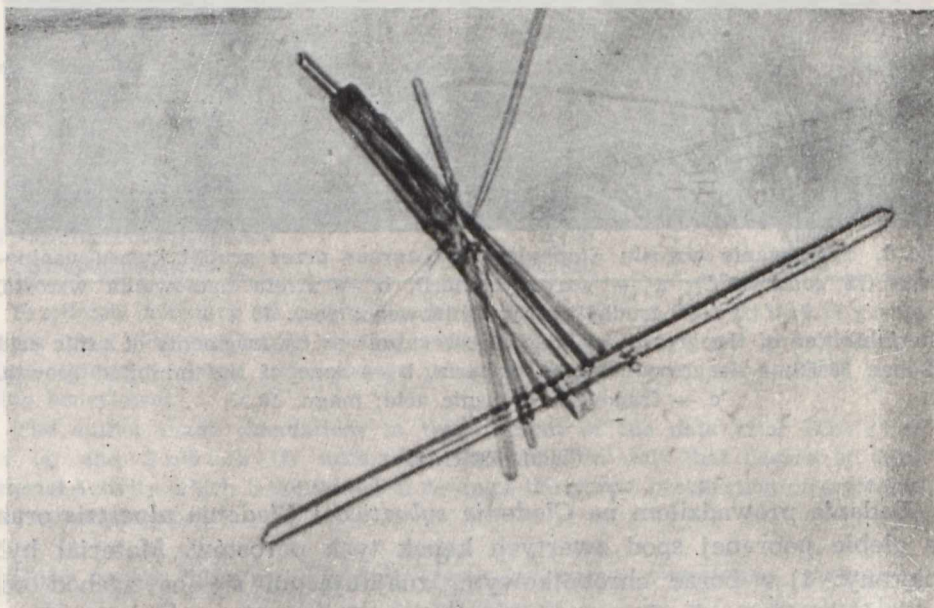
#### METODY

Glebę pobierałem w ten sposób, że usuwałem porosty i warstwę leżących pod nimi nie zbutwiałych części roślin, po czym wybierałem glebę warstwami o grubości 5 cm, do głębokości 1,5 m. Z wydm piaszczystych pobrałem tylko warstwę powierzchniową.

Na cały świeży krzaczek porostu wkraplałem z wysokości 10 cm 150 ml wody destylowanej, po czym w rozdzielaczu ekstrahowałem z wody kwas usninowy chloroformem i oznaczałem jego obecność według następujących metod: 1) odczynnikiem Ehrlicha, 2) chromatografią bibułową, 3) metodą mikrokryształiczną.

Ad 1. Substancję pozostającą po całkowitym odparowaniu chloroformu zadawałem odczynnikami (0,125 g n-dwumetyloaminobenzaldehydu, 65 ml stężonego kwasu siarkowego i 35 ml wody destylowanej — Moisiejewa, 5). Podgrzewałem aż całość uzyskała barwę ciemnoczerwoną. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej wlewałem delikatnie po ściankach naczynia alkohol etylowy aż do uzyskania w pierścieniu barwy niebieskiej.

Ad 2. Substancję pozostającą po niecałkowitym odparowaniu chloroformu nanosiłem na bibułę chromatograficzną Whatman nr 1. Chromatogram rozwijałem metodą zstępującą w układzie butanol — aceton — woda (5:1:2) wg Ramauta (6). Plamy oglądałem w świetle UV (lampa model SL 2 537 zakres 300—400  $\mu\mu$ ). Jako wzorzec posłużył kwas usninowy, otrzymany metodą Sawicza (7). Bakteriostaticzne działanie tego preparatu przedstawiono na ryc. 1. Na ryc. 2 przedstawiono kryształy tego preparatu.



Ryc. 2. Kryształy kwasu usninowego otrzymane metodą Sawicza; pow. 1500  $\times$   
Crystals of usnic acid obtained by the Sawicz method; magn. 1500  $\times$

Ad 3. Substancję pozostającą po niecałkowitym odparowaniu chloroformu nanosiłem na podstawowe szkiełko mikroskopowe i odparowywałem chloroform do końca. Na dolną powierzchnię szkiełka nakrywkowego dawałem kroplę lodowatego kwasu octowego wymieszanego z gliceryną w stosunku 3:1 i szkiełkiem tym nakrywałem substancję znajdującą się na szkiełku podstawowym (2). Po podgrzaniu szkiełka nad małym płomieniem palnika spirytusowego śledziłem pod mikroskopem powstawanie kryształów.

Pokruszone porosty (3 krzaczki *Cladonia alpestris*) moczyłem w 250 ml wody destylowanej przez okres 18 godz. w temperaturze pokojowej. Po wstępnym oczyszczeniu na sączku z bibuły filtracyjnej wodę tę przepuszczałem partiami po 50 ml przez sączki jenajskie (1G1, 1G2, 1G3, 1G4 i 1G5). W przesączu po ekstrakcji chloroformem szukałem kwasu usninowego metodą mikrokrystaliczną.

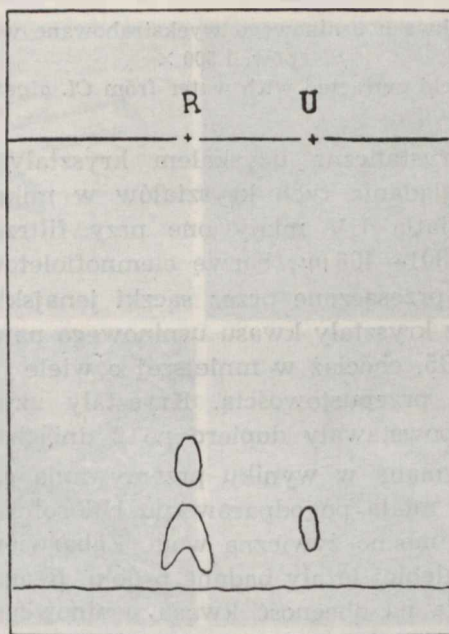
Obecność kwasu usninowego w pobranych próbkach gleby badałem w sposób następujący: 1) próbki gleby przemywałem chloroformem w aparacie Soxleta (ok. 100 g gleby i 250 ml chloroformu), 2) próbki gleby przemywałem chloroformem w kolumnach szklanych (ok. 100 g gleby i 200 ml chloroformu), 3) ok. 250 g gleby przygotowywałem jak do analizy składu mechanicznego metodą sedymentacyjną, po czym z tej części użytej wody, która zawierała cząstki spławialne, ekstrahowałem chloroformem w rozdzielaczu kwas usninowy.

We frakcji chloroformowej kwas usninowy oznaczałem odczynnikami Ehrlicha, chromatografią bibułową i metodą mikrokryształiczną.

### WYNIKI

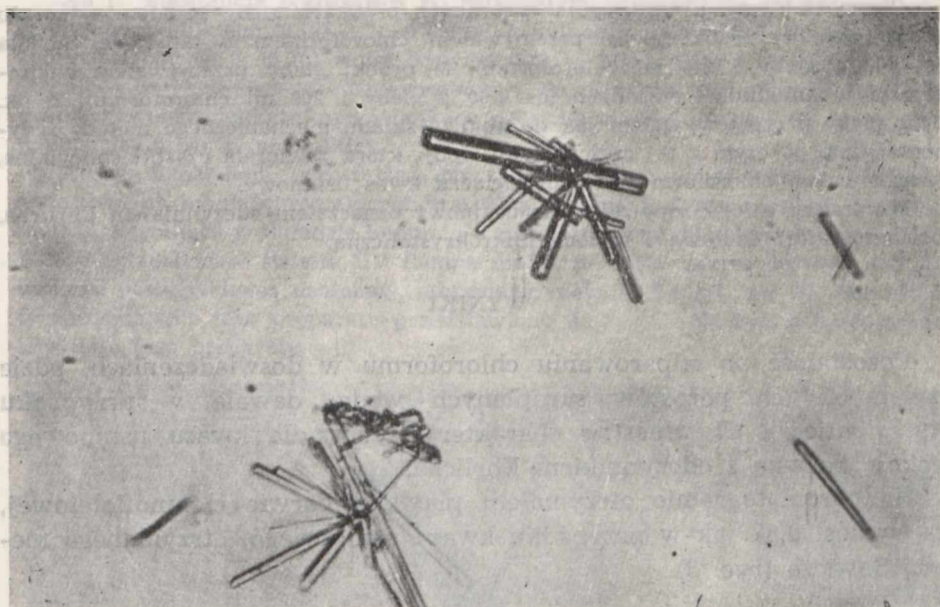
Pozostałość po odparowaniu chloroformu w doświadczeniach, gdzie użyłem całych porostów skraplanych wodą, dawała w przypadku *Cl. sylvatica* i *Cl. alpestris* charakterystyczną dla kwasu usninowego reakcję barwną z odczynnikiem Ehrlicha.

Na chromatogramie otrzymałem plamę o barwie ciemnofioletowej,  $R_f$  wyniósł 0,87 jak w przypadku kwasu usninowego, otrzymanego metodą Sawicza (ryc. 3).



Ryc. 3. Chromatogram uzyskany metodą zstępującą w układzie aceton — butanol — woda (5:1:2); R — ekstrakt wodny z rośliny, U — kontrolny kwas usninowy, otrzymany metodą Sawicza

Chromatogram obtained by the descending method in the system: aceton — butanol — water (5:1:2); R — water extract from the plant, U — control usnic acid obtained by the Sawicz method



Ryc. 4. Kryształy kwasu usninowego wyekstrahowane wodą z *Cl. alpestris*;  
pow. 1 500 ×

Crystals of usnic acid extracted with water from *Cl. alpestris*; magn. 1 500 ×

Metodą mikrokryształiczną uzyskałem kryształy przedstawione na ryc. 4. Podczas oglądania tych kryształów w mikroskopie wyposażonym w źródło światła UV miały one przy filtrze UG 1/1,5, przepuszczającym falę 301—405  $\mu$ , barwę ciemnofioletową.

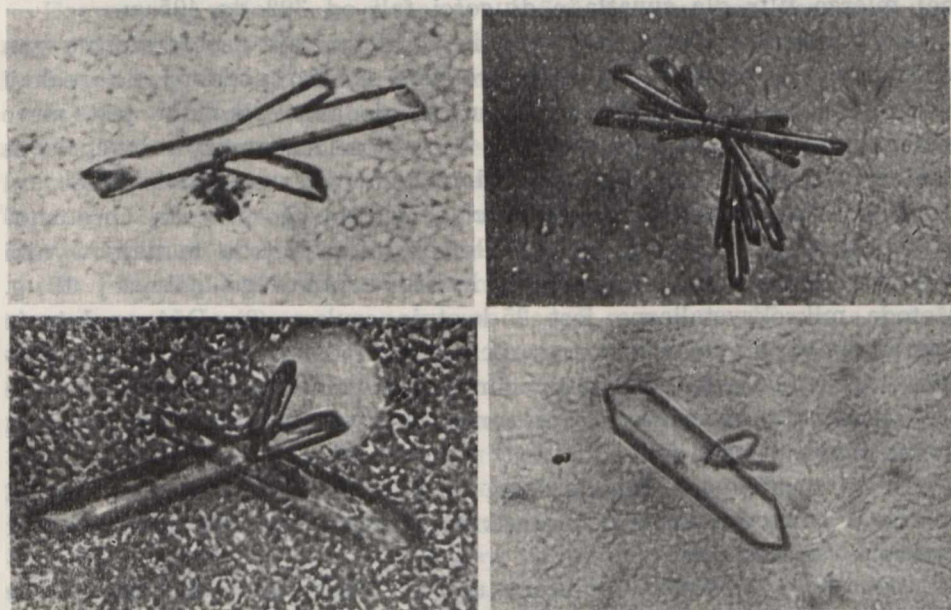
Wyciągi wodne przesączone przez sączki jenajskie, po odparowaniu chloroformu dawały kryształy kwasu usninowego nawet po przepuszczeniu przez sączek 1G5, chociaż w mniejszej o wiele ilości niż po użyciu sączków z większą przepustowością. Kryształy uzyskane z przesącza przez sączek 1G5 powstawały dopiero po 2 dniach.

Substancja otrzymana w wyniku przemywania gleby chloroformem w aparacie Soxleta miała po odparowaniu chloroformu barwę ciemnobrązowozieloną i mocno żywiczną woń. Zabarwienie substancji było tym jaśniejsze, im głębiej leżały badane próbki. Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha wskazywała na obecność kwasu usninowego w glebie z boru obok jeziora Firlej do głębokości ok. 45 cm, a z boru koło Włodawy do głębokości ok. 65 cm. Posługując się metodą mikrokryształiczną i metodą chromatografii bibułowej nie stwierdziłem w tej substancji obecności kwasu usninowego.

Pozostałość po odparowaniu chloroformu, w przypadku doświadczenia, w którym użyłem kolumn szklanych, miała zapach i barwę po-

dobną do zapachu i barwy substancji uzyskanej przy pomocy aparatu Soxleta, z wyjątkiem gleby z wydm (nie ekstrahowanej w aparacie Soxleta), gdzie ekstrakt miał zapach siana. Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha wskazywała na obecność kwasu usninowego w glebie, z boru obok jeziora do głębokości średnio 40 cm, z boru koło Włodawy do głębokości 70 cm, a z wydm w całej badanej próbce (do głębokości 10 cm). Stosując metodę mikrokryształów i metodę chromatografii bibułowej nie stwierdziłem w wyżej wymienionej substancji obecności kwasu usninowego.

Po ekstrakcji chloroformem substancji zawartych w wodzie z cząstkami spławialnymi gleby i po odparowaniu chloroformu pozostałość miała barwę jaśniejszą niż poprzednio opisane, uzyskane samym chloroformem. Utrzymywał się jednak zapach. Substancja ta nie była przebadana odczynnikiem Ehrlicha, a chromatografia bibułowa nie wykazała w niej obecności kwasu usninowego. Natomiast metodą mikrokryształiczną w próbkach gleby ze wszystkich stanowisk stwierdziłem obecność substancji dającej kryształy (ryc. 5).



Ryc. 5. Kryształy wyekstrahowane z gleby; pow. 1 650 ×  
Crystals extracted from the soil; magn. 1 650 ×

Kryształy te powstają bardzo wolno, niekiedy dopiero po kilku dniach. Otrzymałem je tylko z wierzchnich warstw gleby do 10 cm głębokości. W mikroskopie z UV nie mają barwy ciemnofioletowej, za-

chowując barwę widoczną w mikroskopie ze zwykłym oświetleniem. Natomiast silnie czerwonoceglaną barwę posiada substancja, w której znajdują się te kryształy.

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

Badania niniejsze wykazały, że kwas usninowy z porostów może być wyplukiwany przez wodę. Nawet sączek 1G5 nie zatrzymuje całkowicie kwasu usninowego. Można z tego wnioskować, że albo wydostaje się on z porostów w postaci kryształów mniejszych niż  $1,7\mu$ , albo w pierwotnej postaci przed przekryształizowaniem z chloroformu ma o wiele lepszą rozpuszczalność w wodzie niż kwas usninowy, otrzymany metodą Sawicza (7), Zopfa (9) i Asahina (1).

Obecność w glebie substancji tworzącej po odparowaniu chloroformu kryształy z gliceryną i kwasem octowym wskazuje na możliwość dostawania się do gleby kwasu usninowego razem z wodą deszczową. Brak zmiany barwy tych kryształów w świetle UV wynika prawdopodobnie z obecności czerwono świecącej substancji, stanowiącej w pewnej mierze filtr dla światła o długości fali od 302 do  $405\mu$ .

Ze względu na fakt, że odczynnik Ehrlicha daje z chloroformowym wyciągiem ze szpilek sosnowych reakcję bardzo podobną do reakcji z kwasem usninowym (kolor płynu po dodaniu alkoholu jest nieco zielonawy, a nie niebieski) uważam, że w ilościach wykrywalnych kwas usninowy znajduje się tylko w powierzchniowych warstwach gleby.

Negatywne wyniki badania wyciągu glebowego metodą chromatograficzną mogą pochodzić z jej małej czułości. Metoda ta daje wyniki dodatnie dopiero przy zawartości kwasu usninowego powyżej  $10\mu\text{g}$ . Metoda mikrokryształiczna jest 25-krotnie czulsza (2). Duże nałożenie substancji na bibułę chromatograficzną prowadzi do powstawania ogonów i uniemożliwia odczytanie chromatogramu, a z gleby otrzymuje się substancję uważaną przeze mnie za kwas usninowy z ogromną ilością żywic i smół.

Celem następnych badań będą próby stwierdzenia, czy wyciągi wodne z porostów działają na mikroorganizmy glebowe podobnie jak czysty kwas usninowy.

Prof. drowi J. Motyce za cenne uwagi i wskazówki oraz udostępnienie literatury składam tą drogą serdeczne podziękowanie.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Asahina Y.: Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. Journ. Japan. Bot., vol. XIII, nr 7, Tokyo 1937.
2. Culberson Ch. F.: Sensitivities of some Microchemical Tests for Usnic Acid and Atranorin. Microchem. Journ., vol. VII, nr 2, Durham 1963.



3. Hess D.: Über die Papierchromatographie von Flechtenstoffen. *Planta*, vol. 52, 1958.
4. Korzybski T., Kuryłowicz W.: *Antybiotyki*. PWN, Warszawa 1959.
5. Moisiejewa E. N.: *Biochimyckieskije swojstwa liszajnikow i ich praktičeskoje značenieje*. Izdat. Akad. Nauk SSSR, Moskwa — Leningrad 1961.
6. Ramaut J. L., Schumacker R.: Étude par chromatographie de partage sur papier des Lichens du genre *Parmelia* en Belgique. II. *Parmelia* de la section „*Amphigymnia*” Vain. *Revue Bryol. et Lichenol.*, t. XXX, fasc. 1—2, Paris 1961.
7. Sawicz W. P. i współprac.: O nowom antibiotikie iz liszajnikow — natriewoj soli usninowej kisloty. *Sporowyje Rastienija*. Izdat. Akad. Nauk SSSR, Moskwa — Leningrad 1956.
8. Szemjakin M. M., Rassadina K. A., Chochołow A. S.: *Chimija antibioticzeskich wieszczestw*. Gos. Naucz., Techn. Izdat. Chim. Literat., Moskwa — Leningrad 1953.
9. Zopf W.: *Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung*. Jena 1907.

---

## РЕЗЮМЕ

Настоящая работа представляет собой результаты исследований над возможностью прохождения в естественных условиях антибиотических субстанций из лишайников внутрь почвы.

В качестве материала использовано лишайники: *Cladonia sylvatica* и *Cladonia alpestris*, а также почвы из-под этих же лишайников (местообитания, 1 — бор *Pineto cladonietosum* из окрестностей Любартова, 2 — бор *Pineto cladonietosum* из окрестностей Влодавы, 3 — песчаные дюны из местности Броды).

Из лишайников экстрагировано усниновую кислоту дестиллированной водой, орошая все растения водой с высоты 10 см, а также оставляя раздробленные растения в воде в течение 18 часов. Усниновая кислота была переведена из воды в хлороформ и определена при помощи реакции Эрлиха, методом хроматографическим на бумаге и микрокристаллическим методом. Все эти методы дали положительный ответ. Из почвы экстрагировано усниновую кислоту: 1) хлороформом в аппарате Сокслета, 2) в стеклянных трубках, 3) почва готовилась как к анализу механического состава седиментационным методом; воду с удаляемыми частицами встряхивали в распределителе с хлороформом, чтобы получить из этой фракции усниновую кислоту. Лишь только последний метод дал положительные результаты.

Результаты исследований дают возможность прийти к заключению, что усниновая кислота проходит вместе с атмосферными осадками в почву.

## SUMMARY

The paper presents the results of investigating the possibility of the washing down of antibiotic substances from the lichens into the soil.

The material used for the examination were *Cladonia sylvatica*, *Cladonia alpestris* and soils on which the lichens grew. The material came from the following places: *Pineto cladonietosum* in the environs of Lubartów, Włodawa, and the dunes in Brody.

Usnic acid was extracted from the lichens with distilled water by spraying the whole plants from the height of 10 cm, and by keeping ground plants in distilled water for 18 hours. After the usnic acid had been passed from the water into chloroform, it was determined by the Ehrlich reagent, paper chromatography and the microcrystallographic method. The results obtained were positive in all cases. Usnic acid was extracted from the soil using chloroform in Soxhlet apparatus and in glass columns. The soil was prepared through the sedimentation method as for the analysis of the mechanical composition, and water with silt fraction was shaken with chloroform in order to obtain usnic acid from this fraction. Only the last method ensured positive results.

On the strength of the data obtained the conclusion may be reached that usnic acid is washed down by rainfall into the soil.