

Wpływ dwunitro-orto-krezolu (DNOC) na fizjologię i morfologię grzybów glebowych. II.

Wpływ DNOC na pobieranie substratu azotowego (N-NO₃) i zawartość niektórych frakcji N-organicznego w grzybni

TERESA KORNIŁOWICZ

Instytut Gleboznawstwa i Chemii Rolnej Wydziału Rolniczego
Akademii Rolniczej w Lublinie

Korniłowicz T.: (Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry Faculty of Agriculture Agricultural Academy, Stanisława Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, Poland. *Effect of dinitroorthocresol (DNOC) on physiology and morphology of soil fungi. II. Effect of DNOC on uptake of nitrate and contents of some N-organic fractions in the mycelium.* Acta Mycol. 19(2): 297-307, 1983.

The purpose of the investigation was to study the influence of nitrophenol pesticide (DNOC) on nitrogen metabolism measured by growth reduction in the presence of low doses of DNOC. It was established that DNOC (5; 10 mcg/ml) increased the uptake of nitrates from the culture medium which was connected with an increase of the total content of low molecular weight nitrogen compounds and the amine fraction. In the presence of DNOC the quality and quantity of free amino acids was changed. On the other hand low concentrations of DNOC decreased the amount of high molecular weight compounds of nitrogen in the mycelium.

WSTĘP

Powszechnie wiadomo, że efektem rozprężenia fosforylacji oksydacyjnej i zakłócenia procesów komórkowych dostarczających energii pod wpływem dwunitrofenoli jest szereg zmian w metabolizmie drobnoustrojów. Stężenie dwunitrofenoli (tj. DNP, DNOC) tłumiące inkorporację fosforanu w bogate w energię związki fosforowe jednocześnie pobudzają oddychanie grzybów (Simon 1953; Stoppani i in. 1960, 1964; Niederpruem 1964). Towarzyszy temu wzmożone utlenianie cukrów prostych takich jak glikoza (Simon 1953; Korniłowicz 1982).

Wiadomo również, że obok zmian w katabolizmie węglowodanów konsekwencją zaburzeń bilansu energetycznego komórek w obecności pestycydów nitrofenolowych jest hamowanie procesów endoergicznych (Simon 1953). W obecności tych preparatów ulegają tłumieniu procesy biosyntezy różnych polimerów komórkowych (m.in. kwasów nukleinowych i białek) drobnoustrojów (Gale i Folks

1953; Riemersa 1968, cyt. za Simon 1953; Galcova i in. 1971). Dwunitrofenole wywierają również hamujący wpływ na pobieranie przez drobnoustroje substratów mineralnych i organicznych (Stoppani i in. 1964; Riemersa 1968; Bradfield i in. 1970; Haekette i in. 1970; Kotyk i in. 1971; Hunter, Segel 1974). Dotyczy to zwłaszcza aktywnego transportu tych substancji. Bradfield i in. (1970) w badaniach dotyczących pobierania siarczanów przez *Aspergillus nidulans* oraz Haekette i in. (1970) w doświadczeniach nad transportem amonu przez *Penicillium chrysogenum* wykazali, że w obecności 2,4-dwunitrofenolu (DNP) przenikanie tych jonów, zachodzące przy udziale specyficznych permeaz, ulega wydatnemu obniżeniu.

Istnieją jednak informacje (Bent, Moor 1966; Adams, Parks 1969; Galcova i in. 1971) wskazujące na możliwość pobudzenia syntezy niektórych monomerów i polimerów komórkowych grzybów hodowanych w obecności dwunitrofenolu. Również z badań własnych wynika, że grzyby rosnące z metylową pochodną dwunitrofenolu (DNOC) – mimo silnej redukcji biomasy – charakteryzowały się akumulacją całkowitego N-organicznego w grzybni (Kornilłowicz 1982).

Starając się poznać zmiany w metabolizmie azotowym grzybów, cechujących się nagromadzeniem organicznych połączeń azotowych, w grzybni hodowanej z DNOC zbadano wpływ tego preparatu na pobieranie N-mineralnego z podłoża oraz zawartość niektórych drobno- i wysokocząsteczkowych połączeń azotowych w grzybni wrażliwych (redukcja biomasy) szczepów grzybów.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano szczepy grzybów glebowych, u których w obecności DNOC użytego już w niskich dawkach (5 i 10 mcg/ml) występował wyraźny przyrost całkowitego azotu organicznego w grzybni (Kornilłowicz 1982). Były to szczepy *Rhizopus nigricans* Ehrenberg – nr 4 i *Penicillium purpurogenum* Stoll – nr 6. W badaniach dotyczących zużycia N-mineralnego przez grzyby zamiast szczepu *Rhizopus* użyto *P. purpurogenum* Stoll – nr 8 (Kornilłowicz 1982).

Do doświadczeń użyto 4,6-dwunitro-orto-krezol firmy Merck, stosowany również w zacytowanej pracy. Większość badań prowadzono z użyciem dawki 10 mcg DNOC/ml wywołującej wyraźne zakłócenia wzrostu i aktywności metabolicznej wielu mikrogrzybów glebowych (Kornilłowicz 1982). Niektóre doświadczenia (pobieranie N-mineralnego) przeprowadzono z użyciem szerszego spektrum stężeń DNOC (5; 10; 50 mcg/ml).

Hodowle *Rhizopus nigricans* prowadzono na pożywce Saundersa (Szajer i in. 1969), a hodowle *Penicillium purpurogenum* na pożywce Czapek-Doxa z zastosowaniem uprzednio przytoczonej (Kornilłowicz 1982) zmiany składu pożywki oraz opisanej metody hodowli. Jedynie w badaniach wpływu DNOC na stopień wykorzystania N-mineralnego z podłoża zastosowano oryginalną pożywkę Czapek-Dox z N-NO₃ jako źródłem azotu.

Hodowle grzybów (stosowano płynne podłoża) służyły do określania zawartości w grzybni azotu związków nisko- i wysokocząsteczkowych, azotu aminowego związków niskocząsteczkowych oraz zużycia azotanów z podłoża hodowlanego.

Oznaczanie N-wysokocząsteczkowego. Próbkę grzybni kontrolnej oraz hodowlanej z DNOC (10 mcg/ml) przygotowano w następujący sposób: zebraną grzybnię przemywano wielokrotnie wodą destylowaną i redestylowaną. Grzybnię ważono, a następnie równe wagowo naważki świeżej biomasy (30g) zawieszano w wodzie redestylowanej w stosunku 1:3. Przygotowaną zawiesinę grzybni homogenizowano na zimno przez 10 minut przy 14 tys. obr./min, stosując homogenizator nożykowy typ 302-Unipan. Stopień dezintegracji grzybni oceniano mikroskopowo. Otrzymaną z obydwu kombinacji doświadczalnych gęstą homogeniczną zawiesinę dzielono na 4 równe części.

W dwóch próbkach, po otrzymaniu suchej masy grzybni, oznaczono N-organiczny zmodyfikowaną metodą Kjeldahla (Kornilłowicz 1982), stosując do wiązania oddestylowanego amoniaku 2% kwas borowy z dodatkiem czerwieni metylowej i zieleni bromokrezolowej, a do miareczkowania 0,01 n HCL (Kłyszczko-Stefanowicz 1972; Kowalkowski i in. 1973). Pozostałe, równe objętościowo porcje grzybni, dializowano wobec 100 ml wody redestylowanej. Do dializy stosowano węże dializacyjne „Visking” (typ 20/32) firmy Serva. Dializę prowadzono w 4°C stosując mieszanie. Po 24 i 48 godzinach zmieniano płyn dializujący wprowadzając świeżą porcję (100ml) wody redestylowanej. Dializę przerywano, gdy w dializatach stwierdzono brak pozytywnej reakcji z ninhydryną.

W grzybni poddanej dializie określano zawartość azotu metodą Kjeldahla w mg N-NH₄/l g s.m. grzybni; uznano go za azot związków wysokocząsteczkowych.

Zawartość azotu związków niskocząsteczkowych obliczano z różnicy pomiędzy azotem grzybni niedializowanej i dializowanej. Ze względu na to, że w uzyskanych dializatach nie stwierdzono azotu w formie mineralnej, wyznaczoną zawartość uznano za pulę azotu wchodzącego w skład organicznych związków drobnocząsteczkowych.

Oznaczanie azotu aminowego po dializie. Prowadzono w każdej porcji płynów otrzymanych po dializie grzybni. Ilość N-NH₂ określano kolorymetrycznie metodą ninhydrynową przy długości fali 570 nm (Kłyszczko-Stefanowicz 1972). Zawartość N-aminowego odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej względem leucyny. Wyniki podawano w mcg N-NH₂ przeliczonego na 100 mg s.m. grzybni.

Analiza wolnych aminokwasów. W celu orientacyjnego prównania składu aminokwasów płynów dializacyjnych kontrolnych oraz uzyskanych z grzybni hodowanej w obecności 10 mcg DNOC/ml, prowadzono chromatograficzny rozdział tych płynów na płytkach z żelazem krzemionkowym DC - Fertigplatten Kieselgel 60 firmy Merck, stosując do rozdziału aminokwasów układ n-

butanol: kwas octowy: woda w stosunku 12:3:5. Chromatogramy wywoływano spryskując płytki 1% acetonowym roztworem ninhydryny.

Dalszej analizie poddano płyny po dializacji grzybni *Penicillium purpurogenum* nr 6, w których zaobserwowano wyraźne różnice w wielkości plam. Do oznaczeń używano zliofilizowane dializaty uzyskane z grzybni kontrolnej i wyhodowanej w obecności DNOC (10 mcg/ml). Rozpuszczano je w 10 ml buforu cytrynianowego o pH 2,2 z dodatkiem norleucyny stosowanej jako wzorzec. Do rozdzielania aminokwasów zastosowano automatyczny analizator typ AAA 881 firmy Mikrotechna Praha. Skład jakościowy i ilościowy aminokwasów odczytywano z krzywej rozdzielania aminokwasów. Zawartość aminokwasów uzyskaną w μM na 1 ml dializatu przeliczano następnie na mcg tych związków w 100 g s.m. grzybni.

Oznaczanie stopnia wykorzystania azotu mineralnego. Do doświadczeń wybrano grzyby (*Penicillium purpurogenum* – nr 6 i 8), które obok wzrostu zawartości N-organicznego w grzybni hodowanej z DNOC (Kornilłowicz 1982) charakteryzowały się zdolnością wykorzystania azotu w formie azotanowej. Wybór azotanów jako substratu (zamiast N-NH_2) pozwolił w oznaczaniu pozostałości azotu wprowadzonego do podłoża wykluczyć błąd spowodowany obecnością w płynach pohodowlanych azotu uwalnianego z grzybni. Oznaczanie pozostałości N-NO_3 w pożywce pohodowlanej przeprowadzono przy użyciu selektywnej elektrody azotanowej firmy Orion (model 92-07) wobec elektrody odniesienia (model 92-02) na mierniku Orion (model 901). Umożliwiło to bezpośredni pomiar aktywności jonów w środowisku, w którym nie można było zastosować oznaczeń kolorymetrycznych.

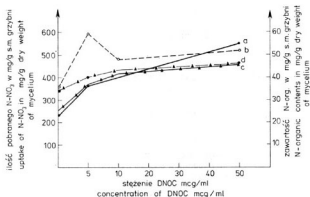
W płynach pohodowlanych określano równocześnie poziom jonów chlorkowych interferujących, z oznaczeniem azotanów wymienioną metodą (Gliński, Stępniewska 1975). Ze względu na niską zawartość tych jonów w płynach pohodowlanych (około 10-krotnie mniejszą od zawartości azotanów), pominięto je przy określaniu stężenia azotanów.

Wyniki odczytywano w molach NO_3/l z krzywej wzorcowej sporządzonej względem KNO_3 . Ilość pobranych azotanów odczytywano z różnicy pomiędzy ilością azotanów wprowadzoną do pożywki a ich zawartością końcową. Dla ujednolicenia ostateczne wyniki podawano w mg azotanów asymilowanych przez 1 g s.m. grzybni.

WYNIKI

Wpływ DNOC na pobieranie azotu mineralnego. Poziom N-DNOC w pożywce był znacznie mniejszy niż ilość azotu w grzybni (Kornilłowicz 1982). Fakt ten pozwala sądzić, że głównym substratem azotowym był azot mineralny dodany do pożywki. Dlatego też zainteresowano się wpływem DNOC na pobieranie N-mineralnego z podłoża.

Wykazano, że wszystkie zastosowane dawki DNOC (5; 10 i 50 mcg/ml) powo-



Ryc. 1. Wpływ DNOC na pobieranie azotanów i zawartość N-organicznej w grzybni *Penicillium purpurogenum*

Effect of DNOC on nitrate uptake and N-organic content in the mycelium of *Penicillium purpurogenum*

szcepek nr 8 (strain no 8): a - pobrany N-NO₃ (taken up N-NO₃), b - N-org. w grzybni (N-org. in mycelium); szcepek nr 6 (strain no 6): c - pobrany N-NO₃ (taken up N-NO₃), d - N-org. w grzybni (N-org. in mycelium)

Gatunek Species	Stężenie Concentration of DNOC mcg/ml	N-organiczny w mg/g s.m. grzybni N-organic in mg/g dry weight in mycelium					
		5	10	20	30	40	50
Rhizopus nigricans szcepek nr 4 strain nr 4	0	[Horizontal bars for total N-organic (a), high MW (b), low MW (c)]					
	10	[Horizontal bars for total N-organic (a), high MW (b), low MW (c)]					
Penicillium purpurogenum szcepek nr 6 strain nr 6	0	[Horizontal bars for total N-organic (a), high MW (b), low MW (c)]					
	10	[Horizontal bars for total N-organic (a), high MW (b), low MW (c)]					

Ryc.2. Wpływ DNOC na zawartość azotu organicznego drobnocząsteczkowych i wielocząsteczkowych połączeń w grzybni szczepów *Rhizopus nigricans* i *Penicillium purpurogenum*

Effect of DNOC on N-organic content - high molecular weight compounds and low molecular weight compounds in mycelium of *Rhizopus nigricans* and *Penicillium purpurogenum* strains

a - N-org. całkowity (total N-organic); b - N związków wysokocząsteczkowych (high molecular compounds of nitrogen); c - N związków niskocząsteczkowych (low molecular weight compounds of nitrogen)

dowały wzrost zużycia N-NO₃ przez badane szczepy grzybów. Zaobserwowano przy tym, że stopień wykorzystania N-azotanowego wzrastał wraz ze wzrostem stężenia DNOC od 5 do 50 mcg/ml, osiągając nawet 3-krotnie wyższy poziom w porównaniu do kontroli (*P. purpurogenum* – nr 8 wobec 50 mcg/ml, ryc. 1). Stymulacji pobierania azotanów pod wpływem DNOC towarzyszyło więc nagromadzenie większych ilości N-organicznego w grzybni.

Wpływ DNOC na zawartość azotu w nisko- i wysokocząsteczkowych połączeniach organicznych.

Badania te podjęto ze względu na często obserwowany przyrost zawartości

Tabela 1 – Table 1

Zawartość azotu aminowego* związków niskocząsteczkowych w grzybni uzyskanej z hodowli w podłożu z DNOC

The contents of amine* nitrogen – low molecular weight compounds in mycelium cultivated with DNOC

Gatunek Species	Stężenie DNOC (mcg/ml) Concentration of DNOC (mcg/ml)	
	0	10
<i>Rhizopus nigricans</i> – szczep nr 4 (strain No.4)	8,4	11,5
<i>Penicillium purpurogenum</i> – szczep nr 6 (strain No.6)	25	40,2

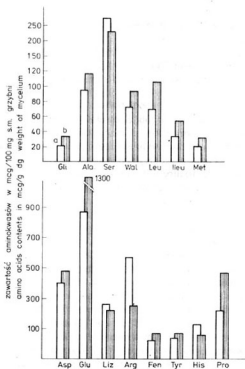
*w mcg N-NH₂/100 mg s.m. grzybni

in mcg N-NH₂/100 mg dry weight of mycelium

całkowitego azotu organicznego w grzybni o biomase zredukowanej pod wpływem DNOC (Kornilłowicz 1982).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wzrostowi zawartości całkowitego azotu organicznego w grzybni hodowanej z DNOC (10 mcg/ml) towarzyszył spadek wysokocząsteczkowej puli organicznych połączeń azotowych, wzrastała natomiast ilość azotowych związków niskocząsteczkowych (ryc. 2). Efekt ten wskazywał na obniżenie syntezy wielkocząsteczkowych połączeń azotu, co mogło być jedną z przyczyn zanotowanego wcześniej spadku biomasy grzybów w podłożu z DNOC (Kornilłowicz 1982).

Stosując tę samą koncentrację DNOC wykazano następnie, że w obecności tego preparatu zwiększeniu całkowitej zawartości drobnocząsteczkowych związków azotowych w grzybni towarzyszył wzrost frakcji aminowej tych połączeń (tab. 1). Zjawisko to zaznaczyło się znacznie wyraźniej w przypadku szczepu *Penicillium purpurogenum* nr 6, niż u szczepu *Rhizopus nigricans* nr 4 (tab. 1). Przyrost N-aminowego związków niskocząsteczkowych w grzybni tego szczepu hodowanego z DNOC był o 60% wyższy niż w kontroli, co mogłoby wskazywać na zakłócenie przemian metabolizmu azotowego w komórce.



Ryc. 3. Skład jakościowo-ilościowy wolnych aminokwasów w grzybni szczepu *Penicillium purpurogenum* nr 6 w podłożu z DNOC

Amounts and kinds of free amino acids in the mycelium *Penicillium purpurogenum* strain No. 6 cultivated with DNOC

a - kontrola (control), b - 10 mcg DNOC/ml (10 mcg DNOC/ml); Gli - glicyna (glycine), Ala - alanina (alanine), Ser - seryna (serine), Wal - walina (valine), Leu - leucyna (leucine), Ileu - izoleucyna (isoleucine), Met - metionina (methionine), Liz - lizyna (lysine), Arg - arginina (arginine), Fen - fenylalanina (phenylalanine), Tyr - tyrozyna (tyrosine), His - histydylna (histidine), Pro - prolina (proline), Asp - kwas asparaginowy (aspartic acid), Glu - kwas glutaminowy (glutamic acid)

Wpływ DNOC na skład aminokwasów. Otrzymane wyniki wskazują na zmiany w zawartości poszczególnych aminokwasów w grzybni wyhodowanej w podłożu z DNOC (ryc. 3). Przeważająca ilość aminokwasów osiągnęła wyższy poziom w grzybni pochodzącej z hodowli w podłożu z DNOC, niż w kontroli. Dotyczyło to szczególnie prolina, której zawartość wzrastała prawie dwukrotnie pod wpływem tego preparatu. W obecności DNOC podwyższeniu uległa również zawartość aminokwasów pierwotnych, takich jak kwas glutaminowy, kwas asparaginowy i alanina, a także ilość niektórych innych aminokwasów

wywodzących się z tych monomerów. Dwunitro-orto-krezol powodował natomiast zmniejszenie ilości wolnych aminokwasów zasadowych w grzybni, szczególnie argininy (ryc. 3).

Z powyższych obserwacji wynikałoby, że DNOC interferuje ze szlakami biosyntezy aminokwasów w komórkach grzybów. Otrzymane wyniki mogą także wskazywać na zakłócenia w wykorzystaniu aminokwasów do biosyntezy białka.

DYSKUSJA

W prezentowanej pracy wykazano, że dwunitro-orto-krezol (DNOC) użyty w dawkach zbliżonych do norm polowych pestycydów nitrofenolowych indukował zaburzenia w metabolizmie azotowym wybranych grzybów glebowych. Wskazuje na to wzmożone pobieranie przez grzyby N-azotanowego z podłoża zawierającego niskie stężenia DNOC (5-10 mcg/ml). Zwiększeniu pobierania azotu mineralnego towarzyszył wzrost zawartości N-organicznego w grzybni. Natomiast biomasa tych grzybów malała (Kornilowicz 1982).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat pobierania N-NO₃ przez grzyby rosnące z DNOC. Z obszernego przeglądu prac przedstawionych przez Simona (1953) oraz z badań Haekette i in. (1970) wynika, że nitrofenole powodują hamowanie pobierania azotu mineralnego (w formie NH₄) przez różne grzyby. Pandey i Rai (1975) donoszą także o spadku zawartości N-ogólnego w grzybni o zredukowanej biomase pod wpływem dwunitrofenolu.

Wyniki badań własnych nastrożają trudności interpretacyjne. Wobec danych innych autorów (Gale, Folkes 1953; Simon 1953; Riemersa 1968; Haekette i in. 1970; Hunter i Segel 1973) wskazujących na hamowanie procesów endoergicznych przez dwunitrofenole, możliwe jest, że przy zakłóceniu bilansu energetycznego w komórkach mikroorganizmów, transport jonów mineralnych w obecności nitrofenoli może zachodzić na drodze dyfuzji. Ta sugestia byłaby zgodna z informacjami takich autorów jak Mc Millan (cyt. za Haekette i in. 1970) oraz Kotyk i in. (1971) zwracających uwagę na możliwość pobierania przez grzyby nieorganicznych i organicznych związków azotowych (NH₄, aminokwasy) drogą transportu biernego. Podtrzymywałyby ją również badania Riemersa (1968) donoszącego o przyspieszeniu przez 2,4-dwunitrofenol biernego pobierania niektórych jonów (tj. H⁺ i K⁺) przez komórki drożdży. Jako przyczynę tego zjawiska wymieniony autor podaje zmiany w przepuszczalności błony cytoplazmatycznej tych drobnoustrojów. Na podstawie danych innych autorów (Borecki i in. 1965; Corden 1969) wskazujących na możliwość działania nitrofenoli jako surfaktantów można przypuszczać, że również DNOC wywołując zmiany przepuszczalności błony komórkowej (na co zwrócono uwagę we wcześniejszych badaniach własnych – Kornilowicz 1982) może przyczyniać się do zakłócenia transportu komórkowego.

Przyjmując, że dwunitro-orto-krezol hamuje fosforylację oksydacyjną nie tłumiąc jednak (zachodzącej w glikozie) fosforylacji substratowej (Simon 1953;

Slater 1961) prawdopodobne jest również, że wytworzona pula ATP mogła być wykorzystana m.in. do pobierania N-nieorganicznego przez grzyby.

Wiadomo jest, że regulatorami transportu N-mineralnego w metabolizmie grzybów nitkowatych jest wewnątrzkomórkowy poziom asparaginy i glutaminy (Kinghorn, Pateman 1977, cyt. za Haekette i in. 1970). Synteza tych związków jest ściśle związana z poziomem ketokwasów powstających w wyniku utleniania substratu węglowego w komórce. Wydaje się więc prawdopodobne, że nagromadzenie produktów pośrednich katabolizmu glikozy w komórkach grzybów wskutek pobudzenia glikolizy przez DNOC (Simon 1953) mogło wzmacniać pobieranie N-mineralnego z podłoża. W tych warunkach wytlumaczalny byłby również wzrost zawartości niektórych niskocząsteczkowych połączeń organicznych azotu w komórkach drobnoustrojów.

Z doświadczeń własnych wynika, że dwunitro-orto-krezol sprzyjał biosyntezie drobnocząsteczkowych połączeń azotowych (tab. 1, ryc. 2). Można by więc sądzić, że grzyby hodowane w obecności DNOC energię uzyskaną głównie z procesów glikolizy wykorzystują w pierwszym rzędzie do pobierania substratu węglowego (Kornilłowicz 1982) i azotowego (doświadczenie niniejsze). Prawdopodobnie poziom ATP w komórkach grzybów hodowlanych w obecności DNOC był wystarczający również do syntezy niektórych podstawowych podjednostek azotowych, takich jak kwas glutaminowy i asparaginowy oraz ich amidów. Przypuszczenie to potwierdzają wyniki analizy zawartości wolnych aminokwasów wskazujące na wzrost ilości aminokwasów pierwotnych, tj. alaniny, kwasu glutaminowego i asparaginowego w grzybni niektórych grzybów hodowanych z DNOC (ryc. 3). Przyjmuje się bowiem (cyt. za L u k e n s e m 1971), że te połączenia azotowe stanowią pierwotną pulę grup aminowych w komórkach grzybów. Powyższe spostrzeżenia byłyby zgodne z obserwacjami Bent'a (Bent, Moor 1966), który stwierdził wzrost ilości glutaminy w grzybni *Botrytis allii* hodowanego w pożywce z dwunitrofenolem.

Wyniki analiz przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazały ponadto wzrost zawartości w grzybni takich aminokwasów, których szlaki syntezy wywodzą się z w.w. monomerów. Wyraźny ubytek w zawartości innych aminokwasów (głównie zasadowych) w grzybni hodowanej z DNOC mógłby świadczyć o zakłóceniu transaminacji. Wydaje się, że w obecności DNOC zapas energii w komórkach grzybów był niewystarczający do normalnego przebiegu procesów transaminacji i polimeryzacji, a tym samym syntezy biopolimerów azotowych niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju grzybów. Hipotezę tę potwierdzałyby wyniki wskazujące na obniżenie zawartości wielkocząsteczkowej substancji azotowej w grzybni hodowanej z DNOC (ryc. 2). O spadku zawartości białka w komórkach mikroorganizmów rosnących w środowisku zawierającym nitrofenol donosili także inni autorzy (Gale; Folkes 1953; Simon 1953).

Aczkolwiek istnieją informacje (Imšeniecki, Piotrova 1957; Adams, Parks 1969; Gálcova i in. 1971; Strzelczyk 1976) wskazujące na pobu-

dzenie syntezy niektórych polimerów (tłuszcze) grzybów rosnących w obecności nitro- i chloropochodnych fenolu, to synteza tych związków, jak zaznaczono wcześniej, wymaga mniejszego nakładu energii niż synteza biopolimerów azotowych, a zwłaszcza białka.

Należy więc przypuszczać, że w warunkach silnego zakłócenia gospodarki energetycznej grzyby znajdujące się w środowisku z DNOC przeprowadzają jedynie syntezę tych materiałów komórkowych, które są niezbędne do przetrwania warunków ograniczających ich wzrost i rozwój. Przy deficycie energetycznym zgromadzone intermedyaty i substancje zapasowe nie mogą być jednak wykorzystane do syntezy nowego materiału komórkowego, a tym samym wzrostu i różnicowania grzybni.

SUMMARY

The present work is a continuation of previous investigations (Kornilłowicz 1982, part I) on the effects of dinitroorthocresol (DNOC) on physiology of sensitive soil microfungi.

The aim of the work is the investigation of the effects of the above-mentioned pesticide on nitrogen metabolism of the fungi growing low DNOC concentrations—approaching the field concentration. *Rhizopus nigricans* (1 strain) and *Penicillium purpurogenum* (2 strains) were used in the experiments. Fungal cultures were grown on modified Czapek-Dox and Saunders media. In the investigation uptake of inorganic N from the culture medium, the original Czapek-Dox medium was used.

In the mycelium of the investigated fungal strains the contents of a few fractions of N-organic compounds was determined by the following methods:

High molecular weight compounds of nitrogen — modified Kjeldahl's method (Kłyszczko-Stefanowicz 1972, Kowalkowski et al 1973).

Total low soluble compounds of nitrogen were calculated from the difference of nitrogen contents in dialyzed and un-dialyzed mycelia determined by Kjeldahl's method (see above).

N-amine of low molecular weight compounds — ninhydrin method (Kłyszczko-Stefanowicz 1972).

The amounts and kinds of free amino acids — ions exchange chromatography method.

The uptake of N-nitrate from culture medium was analyzed with using a nitrate ion selective electrode (Gliński and Stępniewska 1975).

It was established that DNOC in low dosage of 5, 10 mcg/ml caused clear disturbances in the nitrogen metabolism of the investigated fungi. They showed an increase of the total contents of low molecular weight nitrogen compounds and their amine fraction and an increased uptake of nitrates from the culture medium. A decrease of high molecular weight compounds containing nitrogen was also observed. DNOC also caused changes in the amounts and kinds of free amino acids present in the mycelium.

LITERATURA

- Adams B.G., Parks L., 1960, Differential effect of respiratory inhibitors on ergosterol synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to oxygen. *J. Bacteriol.* 100 : 370
- Bent K.I., Moor R.H., 1966, The mode action of griseofulvin. Symposium Soc. Gen. Microbiol., Univ. Press 16 : 32, London—Cambridge.
- Borecki Z., Czerwińska E., Ecstein Z., Kowalik R., 1965, Chemiczne środki grzybobójcze. PWRiL, Warszawa.

- Bradfield G., Somerfield, Meyn T., Holby M., Bobcock D., Bradley D., Segel I.H., 1970, Regulation of sulfate transport in filamentous fungi. *Plant Physiol* 46 : 720.
- Corden M.E. 1969, Aromatic compounds. W: *Fungicides - an Advanced Treatise*. II : 477. Chem. Physiol., Torgerson D.G., Acad. Press. New York-London.
- Galcova R.D., Larikova G.A., Liapunova T.G., Vakina I.P., 1971, Vlijanje 2,4-dinitrofenola na sterinoobrazovanje u drożdževih mikroorganizmov. *Microbiologia* 40 : 34.
- Gale E.F., Folkes I.B., 1953, The assimilation of aminoacids by bacteria. 15, *J.Bacteriol.* 53 : 483.
- Gliński J., Stępniewska Z., 1975, Zastosowanie elektrod selektywnych w badaniach gleboznawczych. *Probl. Agrofizyki, Zakład Narod. im. Ossolińskich. Wrocław-Warszawa-Kraków-Gdańsk. Wyd. PAN.*
- Haekette S.L., Skye G.E., Burton G., Segel H., 1970, Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium - 14 C as the substrate. *J.Biol. Chem.* 245: 4241.
- Hunter D.R., Segel I.H., 1973, Effect of weak acids on aminoacid transport by *Penicillium chrysogenum*: Evidence for a proton at charge gradient as the driving force. *J. Bacteriol.* 113 : 1184.
- Imšeniecki A.A., Piotrova K.E., 1957, Morfološko-fizjologičeskaja charakteristika drożdžej adaptirovanych k fenolu ilii suljenie. *Mikrobiologia* 26 : 296.
- Kinghorn I.R., Pateman I.A., 1977, Nitrogen metabolism. In: Smith I.E., Pateman A.I., *Genetics and Physiology of Aspergillus*, Acad. Press. London-New York-San Francisco.
- Kłysejko-Stefanowicz L., 1972, Ćwiczenia z biochemii. PWN, Warszawa.
- Kornilowicz T., 1982, Wpływ dwunitro-orto-krezolu (DNOC) na fizjologię i morfologię grzybów glebowych. *I. Ann. UMCS. sec. E.* 37 (w druku).
- Kotyk A., Rihova L., Ponec M., 1971, Uptake of amino acids by actidione - treated yeast cells. II. *Folia Microbiol.* 16 : 445.
- Kowalkowski A., Król H., Ostrowska A., Sytek I., Szczubiatka Z., 1973, Instrukcja laboratoryjna dla pracowni gleboznawczo nawożeniowych. Warszawa-Sękocin.
- Lukens R.J., 1971, *Chemistry of Fungicidal Action*. Wyd. Springer. Berlin-Heidelberg-New York.
- Niederpruem D.I., 1964, Respiration of basidiospores of *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* 88 : 210.
- Pandey K.K., Rai O.P., 1975, Effect of 2,4-dinitrophenol on growth performance of some *Penicillia*. *Sci. and Cult.* 41 : 180.
- Riemersa I.C., 1968, Effect of sodium azide and 2,4-dinitrophenol on phosphorylation reactions ion fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim. Biophys.* 153 : 80.
- Simon E.W. 1953, Mechanism of dinitrophenol toxicity *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 28 : 453.
- Slater E.C., 1961, Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation by nitrofenols. *Proc. 5th. Intern. Cong. Bioch.* 5 : 325. Perg. Press. Oxford 1963.
- Stoppani A.O., Ramos E.H., Widuczyński I., 1960, Different action of 2,4-dinitrophenol on the oxidation of exogenous and endogenous substrates by bakers yeast. *Nature* 188 : 1188.
- Stoppani A.O.M., Bennum A., Pahn E.M., 1964, Effect of 2,4-dinitrophenol on Krebs cycle and phosphate metabolism in baker's yeast. *Arch. Bioch. Bioph.* 108 : 258.
- Strzelczyk A., 1976, Adaptation to fungicides of fungi damaging paper I. *Int. Biodetn. Bull.* 12 : 49.
- Szajer Cz., Strzelczyk A., Strzelczyk E., 1969, *Metody badania aktywności celulołitycznej grzybów*. Wyd. PTG.