

## ЕЩЕ О ФУНКЦИИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ В ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

*Л. А. ХРИСТЕВА, доктор сельскохозяйственных наук*

Нами неоднократно высказывалось мнение, что первой причиной стимулирующего действия гуминовой кислоты является присутствие в ее молекуле группировок полифенольного и хиноидного характера, которые используются растением для усиления фенолазной окислительной системы, следствием чего является активизация дыхания и обмена веществ в целом [1, 2].

В доказательство высказанной гипотезы нами [2] проводились эксперименты, которые подтвердили увеличение поглощения кислорода растительной тканью под влиянием гуминовой кислоты. При этом было установлено, что растения, выращенные на гуминовой кислоте, имеют более активную пероксидазу. Кроме того, были констатированы и сдвиги в количествах дегидроформы аскорбиновой кислоты, превращение которой, как известно, часто бывает сопряжено с превращениями колифенолов.

Аналогичные результаты были получены и в работах В. Фляйга, Г. Отто, Е. Кюстера и К. Райнемунда [3], которые ставили опыты с различными полифенолами, рассматривая их как предшественников гуминовых кислот.

С. Гуминский [4] на основании многолетних исследований пришел к выводу, что физиологическое действие гумусовых веществ на растение связано с наличием в них оксигинонов, акцептирующих водород при окислении веществ в растительных тканях.

Но все же все эти опыты недостаточно полно показывают, что именно фенольные группировки являются теми химическими группами, которые обуславливают физиологическую активность гуминовых кислот, и только они ее определяют.

Для того чтобы изучить этот вопрос, нами в 1957 году были проведены как физиологические, так и биохимические исследования. В основу физиологических опытов было положено параллельное изучение стимулирующего действия гуминовых кислот различного происхождения, их производных, в которых фенольные гидроксилы замещены, различных полифенолов и их эфиров. В биохимическом исследовании изучалось влияние гуминовых кислот и их производных на оксидативный обмен в растительных тканях.

Общеизвестно, что основным путем биологического окисления является передача водорода окисляемых веществ через промежуточные катализаторы к кислороду воздуха.

Для того чтобы дифференцировать, через какую окислительную систему идет передача водорода к конечному акцептору, в биохимии пользуются методом ингибирования, т. е. подавлением определенного звена этих систем. Значит, если ввести в лист гуминовую кислоту и

одновременно ингибировать ту или иную ферментативную систему, то можно установить, какое звено окислительных процессов усиливается при помощи гуминовой кислоты.

Поскольку мы предполагали, что гуминовая кислота усиливает фенолазную окислительную систему, то прежде всего поставили цель подавить полифенолоксидазу, для чего в соответствии с указателем Джемса [5] применили паранитрофенол. Но так как при окислении полифенолов терминальной оксидазой не всегда является полифенолоксидаза, мы испытали еще один ингибитор — сероводород, который, как известно, подавляет ферменты, содержащие медь и железо.

Препараты гуминовых кислот и их производных, с которыми проводились исследования, были нами получены из ИГи АН СССР от доктора химических наук Т. А. Кухаренко, а тимогидрохинон из Почвенного института АН СССР от проф. М. М. Кононовой.

#### СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ И РАЗЛИЧНЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА РОСТ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ

Еще в 1949 году нами [6] был разработан своеобразный тест, позволяющий определять биологическую активность гуминовых кислот — это кратковременное выращивание проростков ячменя и некоторых других культур на дистиллированной воде и растворах исследуемых веществ с последующим измерением корневой системы. Этот методический прием себя полностью оправдал как у нас, так и за границей [3, 4], поэтому и в данном случае мы провели несколько опытов по этой методике.

Рассмотрим результаты опытов, в которых изучалось стимулирующее влияние различных гуминовых кислот и их производных. Для этих опытов раствор гуминовых кислот и продуктов их метелирования готовили следующим образом: в мерную колбу на 100 мл помещали 100 мг препарата, добавляли 1 мл 0,1 н NaOH и оставляли на сутки, затем добавляли некоторое количество воды, хорошо взбалтывали, а если препарат недостаточно хорошо растворялся, его подогревали. После растворения препарата колбу доливали водой до метки и получали раствор с титром 1 мг в 1 мл. Из этих растворов затем получали нужную концентрацию — 0,0005% и закладывали опыт. pH всех растворов после разведения было 6,8—6,9, т. е. отвечал реакции дистиллированной воды.

Результаты этого опыта представлены в таблице 1.

Отсюда видно, что растворы гуминовых кислот как бурых, так и выветрившихся каменных углей являются биологически активными, но в начале опыта действие вторых было несколько слабее.

Метелирование фенольных гидроксидов привело к некоторому уменьшению стимулирующего действия этих препаратов, причем это также было более заметно в начале опыта.

На первый взгляд отсюда напрашивается вывод, что не полифенольные группировки обуславливают физиологически активные свойства гуминовых кислот.

Однако такой вывод был бы преждевременным, так как можно предполагать, что метилоферазы — ферменты, широко представленные в растительных тканях, отщепляют метильные группы от гуминовых кислот и переносят их на другие соединения, а фенольные гидроксилы

восстанавливаются и молекула гуминовых кислот опять проявляет стимулирующее действие.

Таблица 1  
Влияние гуминовых кислот и продуктов их метелирования на рост корневой системы ячменя

(Опыт заложен 23 июля, закончен 7 сентября 1957 г.)

Схема опыта	Измерение			
	30 августа		7 сентября	
	средняя длина корней 1-го порядка (мм ± m)	число корней 2-го порядка на 1 растение	средняя длина корней 1-го порядка (мм ± m)	число корней 2-го порядка на 1 растение
Дистиллированная вода . . . . .	126 ± 8	20	137 ± 11	21
Гуминовая кислота бурого угля „Ирица“ (Бородинское месторождение) . . . . .	260 ± 21	132	273 ± 18	180
Та же кислота, метелированная диметилсульфатом . . . . .	214 ± 15	72	280 ± 32	118
Гуминовая кислота выветрившегося каменного угля (Бойдаевское месторождение) . . . . .	211 ± 11	108	260 ± 31	163
Та же кислота, метелированная диметилсульфатом . . . . .	207 ± 19	115	260 ± 23	133

Подтверждение этой мысли мы находим и в опытах с полифенолами, в которых стимулирующее действие проявляют не только сами полифенолы, но и их эфиры (табл. 2). Очень важно подчеркнуть, что резорцин, не способный давать хинон, почти не стимулирует роста корней.

Таблица 2  
Влияние полифенолов и их производных на рост проростков ячменя  
(Опыт заложен 30 сентября 1957 г., учет — 20 октября 1957 г.)

Схема опыта	Средний вес одного проростка				Число корней 2-го порядка на 1 растение
	всего рас-течня, мг	в том числе корне-вой систе-мы, мг	всего рас-течня, %	в том числе корне-вой систе-мы, %	
Дистиллированная вода . . . . .	170	50	100	100	24
Пирокатехин 0,0001 % . . . . .	175	70	103	140	66
Гваякол 0,0001 % . . . . .	187	62	110	125	29
Гидрохинон 0,0001 % . . . . .	217	87	127	175	42
Тимогидрохинон 0,0001 % . . . . .	200	82	118	165	40
Резорцин 0,0001 % . . . . .	175	42	103	85	44
Танин 0,0001 % . . . . .	270	47	100	95	36

Р опыта по весу = 2,81 %

**ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ И НЕКОТОРЫХ ИНГИБИТОРОВ НА ОКСИДАТИВНЫЙ ОБМЕН У ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ И КУКУРУЗЫ**

Опыты, в которых изучалось влияние гуминовых кислот и некоторых ингибиторов на оксидативный обмен у проростков, проводились следующим образом.

Проростки ячменя или кукурузы инфильтрировались по методу А. Л. Кирсанова (разряжение 30 мм ртутного столба, экспозиция — 45 минут) водой и раствором гумата натрия в концентрации 0,005% и

паранитрофенолом или сероводородной водой. После этого определялась интенсивность дыхания в аппарате Варбурга.

Опыты проводились в двух повторностях, но для большей убедительности их ставили несколько раз. Так как предварительные опыты с применением паранитрофенола в концентрациях, указанных Джемсом (М : 1000), показали, что ингибирование не происходит, мы проводили опыт при концентрации М : 100.

Для того чтобы убедиться, что этим ингибитором подавляется именно фенолазная окислительная система, мы ввели вариант со специфическим субстратом для полифенолоксидазы — пирокатехином (0,01 п).

Результаты этих опытов приведены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние гумата натрия, пирокатехина и ингибитора — Р-нитрофенола на дыхание проростков ячменя и кукурузы

Проростки инфильтрированы	Опыт			
	11 ноября		6 декабря	
	Поглощено O <sub>2</sub> навеской 0,25 г за 5 минут			
	мл <sup>3</sup>	%	мл <sup>3</sup>	%

#### Кукуруза ВР 49

Водой	178,6	100	200,6	100
Р-нитрофенолом	154,9	86,7	172,0	85,7
Гуматом натрия	234,9	131,1	260,3	130,0
Р-нитрофенолом и гуматом натрия	189,4	106,0	208,1	103,7
Пирокатехином	193,7	108,4	—	—
Р-нитрофенолом и пирокатехином	137,7	77,1	—	—

#### Ячмень ОД 9

Водой	172,2	100,0	229,1	100,0
Р-нитрофенолом	119,8	69,5	180,7	78,8
Гуматом натрия	230,3	133,7	258,1	112,0
Р-нитрофенолом и гуматом натрия	154,9	89,2	236,6	103,0
Пирокатехином	194,0	112,6	—	—
Р-нитрофенолом и пирокатехином	138,0	80,8	—	—

Из таблицы видно, что паранитрофенол у двухнедельных проростков кукурузы подавляет всего 15% дыхательного газообмена, а у проростков ячменя — 20—30%. Следовательно, удельное значение окислительных процессов, идущих с участием полифенолоксидазы, на этой фазе развития у ячменя больше, чем у кукурузы. Гумат натрия усиливает дыхание у обеих культур примерно на 30—40%, а пирокатехин — только на 10 процентов.

Совместное введение в лист паранитрофенола и гуминовой кислоты или пирокатехина заметно снижает их влияние на поглощение кислорода растительной ткани, но не снимает полностью. Это говорит о том, что гуминовая кислота, бесспорно, усиливает фенолазную ферментативную систему, где терминальной оксидазой является полифенолоксидаза. Но этим не исчерпывается ее влияние на окислительный обмен. Очень возможно, что в этом случае часть полифенольных групп гуминовых кислот функционировала как донатор водорода для других промежуточных акцепторов, благодаря чему активизация кислородного обмена шла и без участия полифенолоксидазы.

Таким же образом можно объяснить и то, что пирокатехин, введенный в лист совместно с паранитрофенолом, продолжал оказывать положительное влияние на поглощение кислорода растением.

О том, что полифенольные группировки гуминовой кислоты являются физиологически активными, говорят и результаты опыта с проростками ячменя от 6. XII 1957 г., в котором в лист вводили гуминовые кислоты и продукты их метелирования. Оказалось, что гуминовые кислоты из выветрившегося угля повысили оксидативный обмен на 58%, тогда как продукты их метелирования диметилсульфатом — всего на 32 процента.

Значит, метелирование фенольных гидроксиллов резко снижает влияние гуминовых кислот на поглощение кислорода, но полностью его не снимает. Это уже говорит о том, что в гуминовой кислоте есть и другие биологически активные группы, так как допущение, что метильные радикалы переносятся метилферазами на другой акцептор за такой короткий срок (продолжительность опыта 1—1,5 часа), маловероятно.

Для того чтобы выяснить, связана ли биохимическая функция этих группировок с усилением окислительно-восстановительных ферментативных систем, в состав которых входит медь и железо, были проведены опыты, в которых листья проростков тех же культур инфильтрировались сероводородной водой и гуматом натрия (условия инфильтрации те же). Результаты этих опытов представлены в таблице 4.

Таблица 4  
Влияния гуминовой кислоты и ингибитора  $H_2S$  на дыхание проростков кукурузы и ячменя

Проростки инфильтрированы	Опыт			
	11 ноября 1957 г.		26 ноября 1957 г.	
	Поглощено $O_2$ навеской 0,25 г за 5 минут			
	мл <sup>2</sup>	%	мл <sup>2</sup>	%
<b>Кукуруза</b>				
Водой . . . . .	178,6	100,0	238,9	100,0
Сероводородом . . . . .	135,6	75,9	172,2	72,6
Гуматом натрия . . . . .	234,9	131,5	324,1	135,6
Гуматом натрия + $H_2S$ . . . . .	156,5	87,6	205,1	85,6
<b>Ячмень</b>				
Водой . . . . .	172,2	100,0	146,3	100,0
Сероводородом . . . . .	122,8	71,3	90,4	61,8
Гуматом натрия . . . . .	230,3	133,7	228,2	155,2
Гуматом натрия + $H_2S$ . . . . .	152,8	88,7	116,5	79,6

Из приведенных данных видно, что этим ингибитором подавляется больший объем газообмена, чем при действии паранитрофенола.

В этом случае, когда сероводород вводится в лист совместно с гуматом натрия, действие последнего ослабляется более резко, чем при совместном введении с паранитрофенолом, но, опять-таки, полностью не снимается. Поскольку этот ингибитор подавляет фенолазную, цитохромную и окислительную системы с участием аскорбиновой кислоты, приходится допустить, что в данном случае под влиянием гуминовой кислоты усиливается флавиновая окислительная система. Однако никаких экспериментальных данных для такого утверждения у нас еще

нет, и природа этого «остаточного» влияния гуминовой кислоты на кислородный обмен остается пока неясной.

Одно можно сказать определенно, что и это физиологически активное качество гуминовой кислоты связано с ее органической, а не минеральной частью. Об этом говорят результаты опыта, в котором гумат натрия окислялся перекисью водорода и в лист вводились параллельно окисленные и неокисленные гуматы в эквивалентном количестве. Так как зольная часть гуминовых кислот часто содержит железо и медь, в проростки вводили и сероводород, который блокирует эти элементы. Данные опыта приведены в таблице 5.

Таблица 5

Влияние продуктов окисления гуминовых кислот на интенсивность дыхания проростков ячменя

По опыту от 5 декабря 1957 г.

Проростки инфильтрованы	Поглощено $O_2$ навеской в 0,25 г за 5 минут	
	мм <sup>3</sup>	%
Водой . . . . .	136	100
Гуматом натрия, окисленным $H_2O_2$ . . . . .	150	110
Гуматом натрия . . . . .	200	147
Сероводородом . . . . .	84	62
Гуматом натрия, окисленным $H_2O_2-H_2S$ . . . . .	90	66

Эти данные убедительно показывают, что зольная часть гуминовой кислоты почти не оказывает влияния на поглощение кислорода растением и не имеет ведущего значения в природе этого явления.

## ВЫВОДЫ

1. В основе стимулирующего влияния гуминовых кислот на рост растений лежит их влияние на оксидативный обмен и увеличение благодаря этому энергетического потенциала растительного организма.
2. Усиление оксидативного обмена под влиянием гуминовой кислоты обуславливается тем, что она, поступив в растение, используется им для усиления ферментативного аппарата клетки.
3. Главными физиологически активными группами в гуминовых кислотах нужно считать полифенольные и хинонные группировки, но этим не исчерпывается природа ее биологической активности.
4. В природе стимулирующего действия гуминовых кислот их зольная часть играет незначительную роль.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. А. Христева. Роль гуминовых кислот в питании высших растений и гуминовые удобрения. Труды Почвенного института АН СССР им. В. В. Докучаева, т. 38, 1951.
2. Л. А. Христева. Физиологическая функция гуминовых кислот в процессах обмена веществ у высших растений. Сб. «Гуминовые удобрения, теория и практика их применения». Изд. ХГУ, 1957 г.
3. В. Фляйг, Г. Отто, К. Райнемунд. (W. Flaig, H. Otto, E. Küster, K. Reinemund), Über die Einwirkung von chemischen Verwandten von Huminsäurenveresterten auf das Langwachstum von Wurzeln\*. Overdrukt uit het Landbouwkundig Tijdschrift 66 ste Jaargang, № 66 Mei (Juni 1954).

4. С. Гуминский. Механизм и условия физиологического действия гумусовых веществ на растительный организм. Ж. «Почвоведение», № 12, 1957 г.
5. Джемс. Дыхание растений. Изд. Иностранной литературы, 1955 г.
6. Л. А. Христова с соавторами. Влияние гуминовых кислот на развитие корней у различных сельскохозяйственных растений. Доклады ВАСХНИЛ, № 8, 1949 г.

*Проблемная лаборатория по гуминовым удобрениям при Днепропетровском сельскохозяйственном институте.*