

<https://doi.org/10.3176/biol.1967.3.09>

ВИЛЬВЕ ЯАСКА

### ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА АДЕНОЗИНТРИФОСФАТНУЮ АКТИВНОСТЬ

Науке и практике хорошо известно положительное влияние гуминовых кислот на рост растений и развитие их корневой системы. Причины же и механизм физиологической активности гуминовых кислот остаются пока окончательно не выясненными, несмотря на множество различных мнений по этому вопросу (Кононова, 1963). Очевидно, влияние гуминовых кислот как сложных соединений не ограничивается какой-нибудь одной стороной воздействия, а проявляется комплексно как непосредственно во многих самых различных процессах метаболизма, так и косвенно через воздействие на окружающую растению среду (Guminska и др., 1962).

По химической природе гуминовые кислоты определяют как высокомолекулярные соединения. Точная химическая структура их еще не вполне ясна. Известно, однако, что в состав гуминовых кислот в качестве одной из наиболее важных и характерных частей входят различные полифенолы и хиноны (Драгунов и др., 1948; Кухаренко, Савельев, 1951; Greene, Steelink, 1962).

Многие авторы отмечают активацию процессов дыхания растительных тканей в присутствии гуминовых кислот (Христева, 1957; Flaig, Saalbach, 1955; Pокoрná и др., 1963; Šmídová, 1960, 1962), что нередко объясняют их способностью активировать ферменты гликолиза (Pокoрná и др., 1963) или ферментные системы, участвующие в терминальном окислении водорода (Šmídová, 1962). Л. Христева (1955) связывает биологический эффект гуминовых кислот с усилением деятельности фенолазной окислительной системы. По В. Фляйгу (Flaig, 1965), основной механизм действия полифенолов и полихинонов заключается в частичном разобщении сопряженного с дыханием фосфорилирования. Дж. Рерабек, (Reřábek, 1962) высказывает мнение об активирующем влиянии гуминовых кислот на образование АТФ в ходе гликолиза.

С другой стороны, не исключено, что гуминовые кислоты могут действовать на процессы использования или регенерирования макроэргических фосфатных связей путем урегулирования АТФ-азной активности. В связи с этим представилось целесообразным изучить влияние некоторых гуминовых кислот на АТФ-азную активность гомогенатов из корней этиолированных проростков пшеницы и кукурузы. Пшеница и кукуруза, по данным Л. Христовой (1955), принадлежат к группе растений, хорошо реагирующих на воздействие гуминовых кислот.

### Методика

В опытах использовались корни этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта 'Пиккер' (Йыгеваская селекционно-опытная станция) и кукурузы (*Zea mays* L.) сорта 'Днепровский гибрид 98' (Синельниковская селекционно-опытная станция). Проростки выращивались по приведенной нами ранее (Яаска, 1967) методике Э. Эпштейна и К. Хагена (Epstein, Hagen, 1952) на  $2,5 \times 10^{-4}M$   $CaSO_4$  при постоянном продувании стерильным воздухом. Гомогенат приготавливали по описанной ранее методике (Яаска, 1967). Путем дифференциального центрифугирования при 900 g в течение 20 мин гомогенат был разделен на две фракции, из которых надосадочная была условно названа цитоплазматической, или второй фракцией, а оставшийся осадок, суспендированный в небольшом объеме раствора 0,25M сахарозы и 0,1M трис-НСI буфера, — фракцией клеточных стенок и ядер, или первой фракцией.

АТФ-азная активность определялась как в кислой среде при рН 5,7 (для пшеницы) и рН 5,1 (для кукурузы), так и в щелочной среде при рН 9,0.

В стандартную инкубационную среду входили компоненты в следующих концентрациях: 2 мМ АТФ (динатриевая соль фирмы «Reanal»), 3 мМ  $MgCl_2$ ; 0,2M Na-ацетатный (в кислой среде) или трис-НСI (в щелочной среде) буфера и 0,1 или 0,2 мл гомогената. Общий объем инкубационной среды — 2 мл. Различные гуминовые кислоты вводились в инкубационную среду в конечных концентрациях, которые по мнению А. Христовой и сотр. (1949) наиболее оптимальны по эффективности.

В опытах использовали гуминовые кислоты из торфа, из наростов трутового гриба (чаги) *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. и коммерческий препарат английской фирмы «Hannover». Препараты гуминовых кислот торфа и чаги выделены в Лаборатории геобихимии Института зоологии и ботаники Академии наук Эстонской ССР. Кроме упомянутых, испытывалось действие препарата гумизоль на АТФ-азную активность цитоплазматической фракции из корней проростков пшеницы. Гумизоль — богатый гуминовыми кислотами терапевтический препарат из хаапсалуской (ЭССР) морской грази (Кеель, 1961).

Уровень АТФ-азной активности фракций определяется по количеству выделившегося неорганического фосфора ( $P_n$ ) на 1 мг белка за 20 мин. Концентрация  $P_n$  устанавливалась спектрофотометрически по методике Лаури—Лопеса (Lowry, Lopez, 1946) в модификации В. Скулачева (1962). Содержание белка определяли после осаждения горячим спиртом (или 5%-ным ТХУ на холоду) фотометрически по несколько модифицированной методике О. Лаури (Lowry и др., 1951). Относительная ошибка определения АТФ-азной активности на одном и том же гомогенате в большинстве случаев не превышала 5%. В таблице приведены средние данные по двум параллельным инкубациям.

### Результаты исследований и их обсуждение

Данные о влиянии гуминовых кислот чаги, торфа и препарата «Hannover» на АТФ-азную активность двух фракций пшеницы приведены в таблице. Как видно, в кислой среде все гуминовые кислоты в высшей использованной концентрации (0,01%) понижают АТФ-азную активность. Подавляющий эффект уменьшается по мере снижения концентрации гуминовой кислоты. В щелочной среде при рН 9,0 гуминовые кислоты из чаги и торфа в более низких концентрациях действия не оказывали, а в повышенных — вызывали небольшое стимулирование АТФ-азной активности. Гуминовые кислоты оказывали на ферментативную активность обеих фракций практически одинаковое действие. На АТФ-азную активность цитоплазматической фракции из корней кукурузы гуминовые кислоты действовали таким же образом (данные в таблице не приведены), т. е. вызывали ингибирование (до 30%) в

слабокислой среде и небольшое (20—30%) стимулирование активности в щелочной среде.

### Влияние гуминовых кислот на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы

Препарат гуминовой кислоты	Концентрация, %	рН 5,7				рН 9,0			
		1-я фракция		2-я фракция		1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
из чаги	0	10,5	100	16,6	100	4,0	100	7,0	100
	10 <sup>-6</sup>	10,5	100	—	—	3,8	95	—	—
	10 <sup>-4</sup>	10,5	100	16,3	98	3,8	95	7,6	109
	10 <sup>-3</sup>	9,7	92	15,4	93	5,0	125	8,4	120
	10 <sup>-2</sup>	8,0	76	11,6	70	5,1	127	8,6	123
из торфа	0	10,1	100	16,8	100	3,2	100	7,2	100
	10 <sup>-4</sup>	9,7	96	16,1	96	3,2	100	7,3	101
	10 <sup>-3</sup>	8,8	87	14,9	89	3,2	100	7,9	110
	10 <sup>-2</sup>	8,4	83	12,2	73	4,5	141	8,0	111
английский	0	10,4	100	18,5	100	4,6	100	6,5	100
	10 <sup>-4</sup>	10,4	100	17,9	97	4,5	98	6,5	100
	10 <sup>-3</sup>	9,6	92	17,3	93	4,5	98	6,8	105
	10 <sup>-2</sup>	7,1	68	12,9	70	4,5	98	6,4	98

Примечание. Удельная активность выражена в мкА Р<sub>н</sub> на 1 мг белка за 20 мин при 30° С. Инкубационная среда: 3 мМ Mg<sup>++</sup>; 2 мМ АТФ; 200 мМ ацетатного или трис-НСl буфера.

В соответствии с этим, по данным Ф. Шеффера (Scheffer и др., 1962a, 1962b), препараты гуминовых кислот *in vitro* подавляют активность кислых фосфатаз из пшеницы и картофеля, но стимулируют активность щелочной фосфатазы кишечника телят.

Гуминовые кислоты английского препарата в отличие от двух предыдущих в таких же концентрациях при рН 9,0 активизирующего действия не оказывали.

По характеру действия гумизоль отличался от трех испытанных ранее гуминовых кислот. Как в кислой, так и в щелочной среде гумизоль на АТФ-азную активность цитоплазматической фракции практически никакого влияния не оказывал. Ранее на животных объектах было выявлено ингибирующее действие препарата гумизоль на АТФ-азу мозговой ткани и эритроцитов (Сибуль, 1963; Сибуль, Кильдема, 1965) как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. С другой стороны, имеются данные о том, что инъекции гумизоля не оказывали существенного влияния на активность легкорастворимой АТФ-азы в диафрагме белых крыс (Норман, 1966) и АТФ-азы митохондрий печени (Teras, 1966).

Таким образом, действие гуминовых кислот различного происхождения не проявляется всегда одинаково. Характер влияния их на АТФ-азную активность зависит от реакции среды.

Для выяснения действия гуминовых кислот на энергетический обмен растений необходимо изучить влияние этих веществ на ферментные системы не только в опытах *in vitro*, но *in vivo*. Несмотря на то, что поступление углерода гуминовых кислот в корни доказано (Prat, Prospíšil, 1959), пока нет данных о форме и размерах молекул гуминовых кислот, проникающих в корень, и тем самым действие гуминовых кислот в опытах *in vitro* и *in vivo* может существенно различаться. Так, тимогидрохиноновые модели гуминовых кислот В. Фляйга (Flaig и др., 1957) почти не действовали на фосфатазу проростков пшеницы *in vitro*, но подавляли ферментативную активность в опытах *in vivo*. По последним данным В. Фляйга (Flaig, 1965), корни могут поглощать не макромолекулы гуминовых кислот, а продукты их распада, возникающие в ходе опыта.

### Выводы

В опытах *in vitro* изучалось влияние гуминовых кислот из чаги, торфа, препаратов «Напповер» и гумизоль на АТФ-азную активность гомогенатов пшеницы и кукурузы. Гуминовые кислоты из торфа, чаги и английского препарата оказывали на АТФ-азную активность в кислой среде подавляющий эффект. В щелочной среде гуминовые кислоты из чаги и торфа вызывали небольшое повышение АТФ-азной активности. Препарат гумизоль ни в щелочной, ни в кислой среде на нее не влиял. Таким образом, характер влияния гуминовых кислот на АТФ-азную активность зависит от рН и природы препарата.

### ЛИТЕРАТУРА

- Драгунов С. С., Желоховцева Н. Н., Стрелкова Е. И., 1948. Сравнительное исследование почвенных и торфяных гуминовых кислот. Почвоведение 7 : 409—420.
- Кеель Э. Ю., 1961. Биохимическая характеристика и биологическая активность фракции гуминовых кислот эстонской лечебной грязи. Труды I биохимической конференции Прибалтийских республик и Белоруссии : 447—457. Тарту.
- Кононова М. М., 1963. Органическое вещество почвы : 127—133. М. (Изд. АН СССР).
- Кухаренко Т. А., Савельев И. С., 1951. Гидрогенизация гуминовых кислот над никелевым катализатором. Докл. АН СССР 76 (1) : 77—80.
- Норман Х., 1966. Влияние гумизоля на активность легкорастворимой аденозинтрифосфатазы мышечных тканей. Изв. АН ЭССР 15 (3) : 435—439.
- Сибуль И. К., 1963. Экспериментальные данные к механизму лечебного действия гумизоля. В сб.: Труды по курортологии 1 : 38—49. Таллин. (Изд. АН ЭССР).
- Сибуль И. К., Кильдема Л. А., 1965. О действии гумизоля на активность аденозинтрифосфатазы и гексокиназы эритроцитов. Материалы II биохим. конф. Прибалт. республик и Белорусской ССР : 419—420. Рига.
- Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М. (Изд. АН СССР).
- Христева Л. А., 1955. Участие гуминовых кислот и других органических веществ в питании высших растений и агрохимическое значение этого вида питания. Изв. АН СССР, сер. биол. 4 : 58—83.
- Христева Л. А., 1957. Физиологическая функция гуминовой кислоты в процессах обмена веществ высших растений. В сб.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения 1 : 95—107. Киев.
- Христева Л. А., Новек-Хлебников П. А., Зуев А. И., Спивак Н. Ц., Гусак З. Ф., 1949. Влияние гуминовых кислот на развитие корней у различных сельскохозяйственных растений. Докл. ВАСХНИЛ 8 : 23—28.
- Яска В. Х., 1967. Биохимическая характеристика аденозинтрифосфатазной активности в корнях проростков пшеницы. Изв. АН ЭССР, сер. биол. 16 (2) : 175—188.

- Epstein E., Hagen C. E., 1952. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol.* **27** (3) : 457—474.
- Flaig W., 1965. Action des produits de dégradation de la lignine sur le métabolisme végétal. Mécanisme possible de cette action. *C. r. Acad. agric. France* **51** (17) : 1118—1138.
- Flaig W., Saalbach E., 1955. Zur Kenntnis der Huminsäuren. XI. Die Beeinflussung der Keimung von Getreide durch Thymohydrochinon als Modellsubstanz von Vorstufen bzw. Abbauprodukten von Huminsäuren. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* **71** (3) : 215—224.
- Flaig W., Scharrer K., Scholl G., 1957. Zur Kenntnis der Huminsäuren. XVI. Über den Einfluß von Thymohydrochinon als Modellsubstanz von Humusstoffen auf die Aktivität verschiedener Enzyme des Roggens. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde* **76** (3) : 201—209.
- Greene G., Steelink C., 1962. Structure of soil humic acid. II. Some copper oxide oxidation products. *J. Org. Chem.* **27** (1) : 170—174.
- Guminska Z., Guminski S., Badura L., 1962. Über die direkte und indirekte Wirkung der Humusverbindungen auf den pflanzlichen Organismus. Vorläufige Mitteilung. *Acta Soc. Bot. Polon* **31** (2) : 265—268.
- Lowry O. H., Lopez J. A., 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* **162** : 421—428.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1) : 265—275.
- Pokorná V., Lustinec J., Petrů E., 1963. The influence of Na-humate on the respiration of wheat roots and leaves. *Biol. Plantarum* **5** (4) : 265—270.
- Prat S., Prospišil F., 1959. Humic acids with C<sup>14</sup>. *Biol. Plantarum* **1** (1) : 71—80.
- Reřábek J., 1962. The relation of humic acid to the control of straight growth of the plant cell. In: *Studies about Humus. Symposium on Humus and Plant*: 245—254. Prague.
- Scheffer F., Ziechmann W., Rochus W., 1962a. Die Wirkung synthetischer Huminsäuren auf Phosphatasen. *Naturwissenschaften* **49** (6) : 131—132.
- Scheffer F., Ziechmann W., Rochus W., 1962b. Die Beeinflussung von Phosphatase-Aktivitäten durch Huminstoffe. *Naturwissenschaften* **49** (7) : 157—158.
- Smídová M., 1960. The influence of humus acid on the respiration of plant roots. *Biol. Plantarum* **2** (2) : 152—164.
- Smídová M., 1962. Über den Einfluß von Na-Humat auf die Oxydations-Reduktions Prozesse in den Wurzeln von Winterweizenpflanzen. In: *Studies about Humus. Symposium on Humus and Plant*: 291—304. Prague.
- Teras L., 1966. Humisooli ja rutiini koostoimest oksüdatiivsesse fosforüleerumisse maksakoe mitokondrites. *ENSV TA Toimet., Biol. Seeria* **15** (3) : 423—429.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
9/11 1967

V. JAASKA

## HUMIINHAPETE TOIME ADENOSIINTRIFOSFATAASI AKTIIVSUSESSE

### Resümee

Uuriti kolme erineva humiinhappe preparaadi toimet etioleeritud nisu- ja maisitõusmete juurtest diferentsiaalsentrifugeerimise teel eraldatud fraktsioonide ATF-aasi aktiivsusesse. Leiti, et humiinhapete toime viis ATF-aasi aktiivsusesse sõltub keskkonna pH-st. Happelises keskkonnas optimaalse pH puhul põhjustasid kõik kolm humiinhapet kontsentratsiooniga 0,01—0,1 g/l ATF-aasi aktiivsuse languse. Leeliselises keskkonnas pH 9,0 puhul täheldati turbast ja kasekännast (*Inonotus obliquus* (Fr.) Pil.) eraldatud humiinhapete mõjul ATF-aasi aktiivsuse vähest tõusu.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse  
9. II 1967

V. JAASKA

### THE EFFECT OF HUMIC ACIDS ON ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY

#### Summary

The effect of three different humic acid preparations on the ATP-ase activity of cellular fractions from wheat and maize seedling roots was investigated. The mode of action of humic acids *in vitro* was dependent on the pH of the medium. In the acid range at a pH optimum, all the three humic acids in concentrations of 0.01—0.1 g/l had a slightly inhibitory effect. At pH 9.0, the humic acids from peat and fungus *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. caused a slight rise in the ATP-ase activity.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany

Received,  
Feb. 9, 1967