

В. А. БИБЕР

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
ГУМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ***

(Представлено академиком А. И. Опариным 31 XII 1951)

Способность гуминовых кислот легко окисляться кислородом воздуха в щелочном растворе до последнего времени не принималась во внимание при выделении их из почвы, торфа и других источников. Эта способность гуминовых кислот была должным образом учтена С. С. Драгуновым, Н. Н. Желховцевой и Е. Н. Стрелковой (1). Извлечение гуминовых кислот щелочью велось ими в атмосфере азота. Результаты исследований позволили авторам опровергнуть старые представления об одинаковом составе и строении почвенной и торфяной гуминовых кислот. Следовало ожидать, что окисление гуминовых кислот кислородом воздуха отразится на величине биологической активности их. В результате такого окисления гуминовая кислота, содержащая, по С. С. Драгуну, двойные связи, должна была хотя бы частично утратить непределельный характер. Наши опыты по изучению сравнительной биологической активности коричной и гидрокоричной кислот установили более высокую активность непределельной коричной кислоты. Поэтому изучение стимулирующей активности окисленной и неокисленной гуминовых кислот, кроме практического значения, способствовало дальнейшему выяснению зависимости между биологической активностью и непределельностью соединений.

Гуминовая кислота получалась из искусственного многолетнего чернозема. Проба была взята на глубине 25—30 см с участка, не удобрявшегося 6 лет. Предварительная обработка чернозема состояла в измельчении, удалении неизменившихся растительных остатков, декальцировании с помощью 1% соляной кислоты, отмытии водой, высушивании на воздухе и обработке смесью спирта и бензола. После высушивания при комнатной температуре из одной части чернозема гуминовая кислота извлекалась на воздухе равным по весу количеством 1% щелочи при нагревании в течение 30 мин. до 70° с последующим 15-часовым настаиванием в закрытой колбе. Из другой порции чернозема извлечение гуминовой кислоты велось точно так же, за исключением того, что воздух из колбы, в которой находился чернозем, был вытеснен азотом и весь процесс экстракции щелочью был проведен в атмосфере азота. После нагревания и настаивания (15 час.) щелочная вытяжка, не приходя в соприкосновение с воздухом, сифонировалась через трубку, опущенную в стакан с 2% соляной кислотой. Широкий конец сифонной трубки, опущенный в соляную кислоту, был снабжен матерчатым фильтром, который предохранял вытяжку от попадания механических примесей при сифонировании. Осадки гуминовых кислот,

* В работе принимала участие И. А. Шапиро.

полученные от прибавления соляной кислоты к щелочным вытяжкам, обрабатывались одинаково: промывались на фильтре 0,5% соляной кислотой, 2—3 раза водой и подсушивались при 60—65°.

Растертые с водой осадки подвергались диализу, который продолжался несколько дней, до отрицательной реакции диализата на ионы хлора. Для получения водорастворимой кислоты очищенную диализом гуминовую кислоту многократно обрабатывали при нагревании небольшими порциями воды (до получения бесцветной вытяжки) и соединенные вытяжки фильтровали. Содержание водорастворимой гуминовой кислоты во взятом нами черноземе составляло около 0,06%. Растворы гуминовых кислот, содержащие в 1 л 300—450 мг органического плотного остатка, были подвергнуты анализу, методика которого описана нами ранее (2). Результаты анализов растворов гуминовых кислот, рассчитанные на 1 г органического плотного остатка, приведены в табл. 1.

Таблица 1

№№ опытов	Условия выделения гуминовых кислот	Кислотность в мл 0,1 N кислоты	Окисляемость в мг кислорода	Иодопогло- тельная способность в мг иода
1	На воздухе	60,0	608,7	99,3
	В атмосфере азота	56,8	1280,0	184,4
2	На воздухе	51,7	894,1	53,8
	В атмосфере азота	57,1	1285,7	137,0

Как и следовало ожидать, окисление гуминовой кислоты кислородом воздуха не отражается на кислотности, тогда как окисляемость и иодопогло- тительная способность у окисленной и неокисленной гуминовых кислот резко отличны. Следует отметить, что величина окисляемости гуминовой кислоты, выделенной в атмосфере азота из разных порций одного и того же чернозема, представляет постоянную величину и значительно превышает окисляемость гуминовой кислоты, выделенной на воздухе. Колебания в величинах окисляемости полученной на воздухе гуминовой кислоты вполне понятны, так как интенсивность окисления гуминовой кислоты в щелочном растворе зависит от ряда факторов, в том числе и от величины поверхности щелочного раствора. Вследствие этого при доступе воздуха редко удается из отдельных порций одной и той же почвы получить одинаково окисленную гуминовую кислоту. Величина иодопогло- тительной способности, позволяющая составить представление о неопределенности соединения, значительно больше у гуминовой кислоты, выделенной в атмосфере азота, но, в отличие от окисляемости, не является постоянной величиной. Это обстоятельство позволяет думать, что окисление гуминовой кислоты кислородом воздуха по местам ненасыщенных связей может происходить не только в щелочном растворе, а например, при сушке гуминовой кислоты в шкафу при 65° перед диализом. Анализы показали, что при извлечении гуминовой кислоты щелочью при доступе воздуха происходят изменения в составе водорастворимой гуминовой кислоты, в результате которых в значительной степени утрачивается неопределенный характер кислоты.

Биологическая активность гуминовых кислот, выделенных на воздухе и в атмосфере азота, взятых в растворах с одинаковой концентрацией, устанавливалась действием их на брожение дрожжей, на развитие прорастающих семян и на заживление кожных дефектов у животных. В опытах с дрожжами и семенами испытывались растворы,

содержащие 1 и 0,5 мг гуминовой кислоты в литре; животным вводились более концентрированные растворы, содержащие 250 мг кислоты в литре. Опыты с дрожжами велись по описанной нами методике (3). 10% раствор сахара сбразивался суспензией прессованных дрожжей. Растворы гуминовых кислот (1 мг в литре) добавлялись к бродильно-

Таблица 2

Гуминовая кислота	Разность между опытом и контролем в мл CO ₂ (средн. из 5 опытов)
Выделенная из воздуха	10,4 (от 8 до 12)
Выделенная в атмосфере азота	21,7 (от 18 до 24)

му раствору, объем которого был равен 200 мл, в количестве 1—2 мл. В контрольном опыте к бродильному раствору добавляли 1—2 мл воды. Разность в объемах CO₂, выделившегося в опыте и контроле, позволяла судить об интенсивности процесса, причем в параллельных контрольных опытах расхождение в объемах CO₂ не превышало 1—2 мл при общем объеме 150—160 мл. Результаты опытов приведены в табл. 2.

В опытах с семенами прорастание зерен кукурузы велось в закрытых чашках при температуре 19—22°. В каждую чашку помещали по 12 промытых водой зерен почти одинакового размера, весом 2,8—3,1 г. В чашки вливали по 2 мл раствора Кнопа и равный объем раствора гуминовой кислоты. В контрольные чашки к 2 мл раствора Кнопа прибавляли 2 мл дистиллированной воды. Измерение производилось на 6-е сутки. Действие растворов каждой кислоты было проверено на 400 зернах. Результаты 4 серий опытов приведены в табл. 3.

Из данных табл. 3 видно, что гуминовая кислота в концентрации 0,5 мг/л, выделенная в атмосфере азота, сильнее стимулировала развитие корневой системы, чем раствор гуминовой кислоты той же концентрации, выделенной на воздухе.

Действие растворов гуминовых кислот было испытано на 14 кроликах, в контрольном опыте было 6 кроликов. У всех кроликов в день опыта кожа иссекалась на внутренней поверхности уха трепаном диаметром 14 мм, и высеченный кружок отсепаровывался ножницами. Кролики были одного возраста и почти одинакового веса. Растворы гуминовых кислот вводились кроликам под кожу, в область спины, через

Таблица 3

Раствор	Концентрация в мг/л	Длина корня в мм	Длина ростка в мм	Объем 100 корней в см ³	Объем 100 ростков в см ³
Гуминовая к-та выдел. на воздухе	{ 0,5	74,4 (66—84)	35,5 (30—42)	9,2 (7,6—11,7)	10,2 (9,6—10,8)
		72,7 (60—85)	44,4 (40—49)	8,5 (7,3—9,7)	15,3 (15—16)
выдел. в атмосфере азота	{ 0,5	76,9 (65—90)	44,3 (39—55)	7,4 (6,7—8,4)	12,8 (10—15,8)
		85,6 (79—93)	41,8 (39—45)	9,6 (8,8—10,4)	19,8 (17—21)
Раствор Кнопа		67,5 (59—72)	40,4 (32—42)	7,2 (6,5—7,9)	13,5 (11—16)

день по 0,5 мл. Контрольным кроликам вводился такой же объем физиологического раствора. У кроликов, инъецированных гуминовой кислотой, выделенной на воздухе, дефекты зажили на 43—48-й день. В группе кроликов, получавших гуминовую кислоту, выделенную в атмосфере азота, дефекты заживали между 39—47-м днем. У контроль-

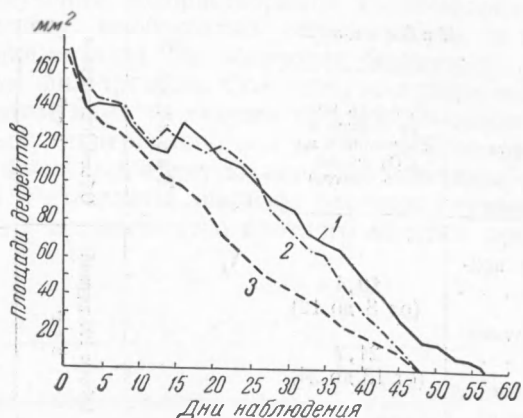


Рис. 1. Влияние гуминовых кислот из чернозема на скорость заживления кожных дефектов у кроликов. 1—контроль, 2—окисленная гуминовая кислота, 3—неокисленная гуминовая кислота

ных кроликов заживление начиналось на 43-й день и заканчивалось на 55-й день. Столь большие сроки заживления дефектов объясняются тем, что опыты были проведены в ноябре, летом срок заживления такого же дефекта сокращается почти вдвое. Средние результаты опытов представлены на рис. 1. Рассмотрение хода кривых показывает, что неокисленная гуминовая кислота оказывает более сильное стимулирующее действие.

Украинский экспериментальный институт
глазных болезней
им. В. П. Филатова

Поступило
29 XI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ С. С. Драгунов, Н. Н. Желховцева и Е. Н. Стрелкова, Почвоведение, № 7, 409 (1948). ² В. А. Бибер и Н. С. Боголюбова, ДАН, 76, № 2 (1951). ³ В. П. Филатов, В. А. Бибер и Л. И. Адаманис, Уч. зап. Укр. эксперим. ин-та глазн. болезней им. Филатова, 1 (1949).