

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 631.4:631:878

### ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ВОДНОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ВЫТЯЖЕК ТОРФА НА ФОТОСИНТЕЗ РАСТЕНИЙ

Н.А. Куликова, И.В. Перминова, Г.Ф. Лебедева, Д.Н. Маторин

(кафедра биофизики биологического факультета;  
кафедра общего земледелия факультета почвоведения;  
кафедра органической химии химического факультета)

Природное органическое вещество (ОВ) — неотъемлемый компонент всех естественных экосистем. Это обуславливает интерес исследователей к его влиянию на биоту, прежде всего на растения и микроорганизмы. Несмотря на разнообразие способов получения препаратов ОВ, большинство работ посвящено изучению образцов водорастворимого ОВ и гумусовых кислот. В первом случае извлекают наиболее подвижную компоненту — ОВ, содержащееся в почвенных растворах, болотных и речных водах, во втором — гумусовые кислоты, образующиеся вследствие полимеризации исходных продуктов разложения неспецифического природного ОВ. В качестве основных составляющих водорастворимого ОВ обычно указывают моно- и олигосахариды, уроновые кислоты, а также гумусовые вещества (ГВ) (главным образом фульвокислоты (Базин и др., 1992)), которые составляют от 50 до 90% (Petersen, 1991; Tulonen et al., 1992). Несмотря на общность строения гумусовых кислот, входящих в состав водорастворимого ОВ, и гумусовых кислот, извлекаемых методом щелочной экстракции, они различаются по молекулярной массе, поверхностной активности, содержанию функциональных групп и т.п. (Petersen, 1991). Этим, по-видимому, объясняется их разное влияние на жизнедеятельность растений (Баталкин и др., 1983; Visser, 1986; Алиев, 1987; Tulonen et al., 1992).

По существующим данным, низкомолекулярные компоненты ГВ (< 5000 Да) могут поступать в растения. В связи с этим высказываются гипотезы о том, что они могут, с одной стороны, улучшать минеральное питание растений путем переноса связывающихся с ними питательных элементов, а с другой — непосредственно влиять на некоторые метаболические процессы. В то же время ГВ с молекулярной массой > 5000 Да — верхний предел пропускания клеточных мембран (Dell'Agnola, Nardi, 1986) — могут влиять на растения лишь опосредованно, связывая разные ионы и препятствуя их поступлению в растения или же меняя свойства клеточных мембран.

Однако механизм действия природного ОВ гумусовой природы на состояние растений к настоящему времени еще окончательно не установлен. Это связано прежде всего со сложностью изучаемого объекта,

а именно нестехиометрическим составом и высокой полидисперсностью ГВ; другая причина — применение большинством исследователей для изучения влияния ГВ на растения вегетационного метода. Использование в качестве тест-функций таких интегральных показателей, как биомасса или размер разных частей растений, делает практически невозможным выявление конкретных механизмов влияния ГВ на жизнедеятельность растений. Для постановки такого исследования необходим метод, позволяющий фиксировать более специфичный показатель состояния растений, чем биомасса или размер.

Так как для растений таким показателем является интенсивность фотосинтетических процессов, для количественной регистрации которой существует целый ряд количественных методов, и исходя из данных о возможном непосредственном влиянии веществ гумусовой природы на фотосинтез высших растений (Бобырь, 1983), в качестве тест-функции действия ОВ на растения мы использовали показатель интенсивности фотосинтеза. Были поставлены следующие задачи: исследовать влияние ОВ водной и щелочной вытяжек торфа на интенсивность фотосинтеза высших растений с использованием метода замедленной флуоресценции; установить зависимость направленности этого действия от молекулярной массы ОВ.

#### Материалы и методы

Методики получения модельных препаратов водорастворимого органического вещества и гумусовых кислот. В качестве модельных препаратов природного ОВ использовали два типа препаратов ОВ торфа. Первый — это водная вытяжка из торфа, содержащая наиболее подвижную часть его ОВ и представляющая собой аналог природного растворимого ОВ. Второй препарат — гумусовые кислоты низинного и верхнего торфов (фракции подвижных и связанных с подвижными полуторными окислами гумусовых кислот).

Для получения препаратов водной вытяжки 100 г воздушно-сухого торфа, просеянного через сито (2 мм), заливали 3 л дистиллированной воды и

оставляли на ночь. Затем вытяжку отфильтровывали через фильтр "синяя лента". Процедуру обработки навески торфа дистиллированной водой повторяли дважды. Отфильтрованные вытяжки объединяли и обессоливали на катионообменнике КУ-2-8, предварительно переведенном в Н-форму пропусканием 30 объемов 1М HCl. Обессоленный экстракт концентрировали на роторном испарителе при температуре 60°. Определение титра полученного концентрата проводили гравиметрически. В результате из 100 г верхового торфа было получено около 200 мл препарата с концентрацией 11 г/л, а из 100 г низинного — приблизительно 1 л с концентрацией 2,18 г/л. Готовые препараты в дальнейшем хранились в виде водного раствора при температуре +4°.

Гумусовые кислоты выделяли по общепринятой методике (Lowe, 1992). С этой целью навеску воздушно-сухого торфа 50 г дважды обрабатывали в течение 1 ч при взбалтывании 250 мл смеси бензол — этанол (1 : 1) для удаления битумов, экстракт отделяли фильтрованием, а обработанную навеску высушивали на воздухе приблизительно две недели (до отсутствия запаха бензола). Экстракцию гумусовых кислот из торфа проводили 3-кратной обработкой 0,1 М раствором NaOH: к обработанной бензол-этанольной смесью навеске приливали по 1 л щелочи, взбалтывали и оставляли на ночь. Полученный экстракт гумусовых кислот отфильтровывали через фильтр "синяя лента", обессоливали на катионообменнике КУ-2-8 и определяли титр гравиметрически. Для получения более концентрированного раствора гумусовых кислот после прохождения через катионообменник собирали лишь первые, наиболее концентрированные, порции. Таким образом, из 50 г низинного торфа получили приблизительно 2 л препарата гумусовых кислот с концентрацией 2,56 г/л; препарат гумусовых кислот верхового торфа имел концентрацию 1,20 г/л.

Характеристика органического вещества водной и щелочной вытяжек торфа. Для характеристики молекулярно-массового распределения препаратов и определения средней молекулярной массы препаратов ОВ использовали систему ВЭЖХ, состоящую из насоса Shimadzu (LC 9A, Germany), колонки 25 × 200 мм, упакованной гелем Toyoparl HW-50S (Toyo Soda, Japan), UV-детектора фирмы Gamma и высокочувствительного протонного детектора содержания органического углерода (Graepzel, Germany). Пробу объемом 2 мл вводили с использованием автоматического инжектора (Knaueg, Germany). Перед введением в колонку исходные растворы ОВ разводили до концентрации 1—3 мг С/л 0,028 М фосфатным буфером, который затем использовали в качестве элюента. Элюирование препаратов осуществляли со скоростью 1 мл/мин. Для калибровки использовали полистиролсульфоновые кислоты.

Для определения содержания свободных и связанных с ОВ олиго- и полисахаридов в пробах пре-

паратов водорастворимого ОВ проводили гидролиз при температуре 110° в течение 15 ч в присутствии 0,1 М HCl. В полученном растворе определяли количество моносахаров с использованием анионообменной хроматографической системы с импульсным амперометрическим детектором.

Элементный анализ осуществляли на CHSN-анализаторе Karla-Eder.

Оценка интенсивности фотосинтеза растений с использованием метода замедленной флуоресценции. В качестве тест-культуры использовали растения яровой пшеницы сорта Краснозерная в возрасте 14—15 дней, выращенные на питательной среде Прянишникова (Прянишников, 1940) в вегетационной камере ( $t = 22^\circ$ , фотопериод 14 ч, нормальная влажность). Эти растения помещали на 2 сут. в пробирки с исследуемыми растворами ОВ. Для измерения замедленной флуоресценции (ЗФ) использовали кончики нижнего и среднего (верхнего) листьев (в это время растения находились в фазе 2—3 листьев).

ЗФ растений определяли на установке, собранной на базе фосфороскопа, представляющего собой систему из трех коаксиальных цилиндров с зазором 0,5 мм между ними. В качестве детектора излучения использовали фотоумножитель ФЭУ-79, чувствительный в красной области спектра. Источником питания фотоумножителя служил высоковольтный стабилизированный выпрямитель ВС-23. Сигнал с фотоумножителя через усилитель постоянного тока (рН-метр 340) поступал на вход самопишущего потенциометра ЭПП-09. Возбуждение свечения осуществляли сфокусированным интенсивным светом от иодно-кварцевой лампы (КГМ 24-150) в сочетании со стеклянным светофильтром КС-14.

Для оценки состояния объекта в соответствии с методикой (Тарусов, Веселовский, 1978; Андреев и др., 1985) использовали показатель  $Y_{100}/Y_n$  как характеристику транспорта электронов. Возрастание этого отношения свидетельствует об усилении скорости транспорта электронов, т.е. о возрастании интенсивности фотосинтетических процессов.

Исследование действия органического вещества торфа методом лабораторно-вегетационных опытов. В качестве тест-культуры использовали яровую пшеницу сорта Краснозерная. Эксперименты проводили в лабораторных условиях в вегетационных сосудах с дерново-подзолистой почвой, отобранной на территории учебно-опытного почвенно-экологического центра "Чашниково" (Московская обл.). Почва имела следующие характеристики (данные предоставлены сотрудниками кафедры общего земледелия факультета почвоведения):  $pH_{KCl}$  6,65; содержание  $K_2O$  и  $P_2O_5$  — 7,0 и 34,5 мг/100 г почвы; содержание  $N_{орг}$  и гумуса — 0,174 и 2,2% соответственно; по механическому составу — средний суглинок.

В вегетационные сосуды объемом 500 см<sup>3</sup> помещали 500 г воздушно-сухой почвы. В подготовленную почву вносили торфа в дозах 10, 20, 40 и 80 г/кг почвы, что соответствовало внесению 10, 20, 40 и 80 т/га. Через неделю в подготовленную таким образом почву, увлажненную 25 мл водопроводной воды, высевали пророщенные семена пшеницы (12 штук на сосуд) и засыпали их сантиметровым слоем почвы, предварительно извлеченной из сосуда. Затем в каждый сосуд вносили еще по 25 мл воды. Впоследствии растения поливали 25—50 мл водопроводной воды по мере пересыхания почвы. Дополнительное освещение осуществляли лампами дневного света. Растения убирали через 40 дней после посева, срезая их на уровне почвы. Тест-функцией служила усредненная сырая биомасса одного растения.

Для оценки влияния ОВ на растения при обработке результатов использовали показатель удобрительного эффекта (Уд):

$$Уд = (Од - Ок) / Ок,$$

где Ок — отклик тест-функции в контрольном варианте; Од — в варианте с исследуемыми фракциями ОВ.

Как следует из приведенного уравнения, при  $Уд > 0$  исследуемое вещество положительно влияет на тест-культуру, в то время как отрицательные значения Уд свидетельствуют о негативном влиянии.

### Результаты и их обсуждение

Характеристика выделенных препаратов органического вещества водной и щелочной вытяжек торфа. Результаты исследования химического и молекулярно-массового состава выделенных препаратов ОВ водной и щелочной вытяжек торфа приведены в таблице.

Характеристики модельных препаратов водорастворимого органического вещества и гумусовых кислот

Препарат	Средняя молекулярная масса, Да	Элементный анализ, %				
		С	Н	N	O	зольность
Водорастворимое ОВ:						
верхового торфа	4009	44,1	5,67	0,97	49,3	1,06
низинного торфа	3540	42,2	5,34	1,00	50,2	3,30
Гумусовые кислоты:						
верхового торфа	7724	50,1	4,8	2,10	43,0	1,40
низинного торфа	8455	50,7	4,7	2,50	42,1	2,10

На основе проведенных исследований можно сделать заключение о сходстве молекулярно-массового распределения водных экстрактов обоих торфов, при этом средняя молекулярная масса водного экстракта низинного торфа несколько ниже, чем верхового; щелочные экстракты обоих торфов также близки по фракционному составу, при этом средняя молекулярная масса гумусовых кислот низинного торфа выше, чем верхового. Кроме того, щелочные экстракты можно рассматривать как совокупность высоко- и низкомолекулярных фракций, в то время как водные экстракты практически целиком состоят из низкомолекулярных веществ.

Анализы показали, что содержание олиго- и полисахаридов в препаратах водорастворимого ОВ не превышает 20% от его общего количества, т.е. в использованных препаратах водорастворимого ОВ преобладают гумусовые кислоты, определенные как фульвокислоты по молекулярным массам и результатам элементного анализа. Гумусовые кислоты щелочных вытяжек по сравнению с препаратами водорастворимого ОВ обогащены углеродом и азотом, обеднены кислородом и, по всей видимости, представлены в основном гуминовыми кислотами.

Влияние органического вещества водной и щелочной вытяжек торфа на интенсивность фотосинтеза растений пшеницы. Концентрационные зависимости удобрительного эффекта водорастворимого ОВ верхового и низинного торфов на интенсивность фотосинтеза растений пшеницы в целом имеют сходный характер (рис. 1). При концентрациях водорастворимого ОВ до 0,30 г/л наблюдался положительный удобрительный эффект; дальнейшее возрастание содержания ОВ сопровождалось угнетением фотосинтеза растений по сравнению с исходным. Максимальное усиление интенсивности фотосинтеза отмечалось при концентрации ОВ 0,10—0,20 г/л. Интересно отметить, что водорастворимое ОВ низинного торфа, имеющее более низкую среднюю молекулярную массу по сравнению с таковой водорастворимого ОВ верхового, обладало более выраженным как положительным ( $Уд_{max} = 0,27$  по сравнению с 0,12 для ОВ из верхового торфа), так и отрицательным действием ( $Уд_{min} = -0,42$  по сравнению с  $-0,22$  для ОВ из верхового торфа).

Зависимости интенсивности фотосинтеза от концентрации гумусовых кислот щелочных вытяжек обоих торфов также имеют сходный характер (рис. 1). Однако в отличие от действия водорастворимого ОВ внесение гумусовых кислот уже в минимальных концентрациях сопровождалось снижением интенсивности фотосинтеза растений по сравнению с контролем. Удобрительный эффект гумусовых кислот низинного торфа при наименьшей исследованной концентрации (0,03 г/л) составлял  $-0,26$ , а для гумусовых кислот верхового торфа (0,02 г/л) —  $-0,39$ .

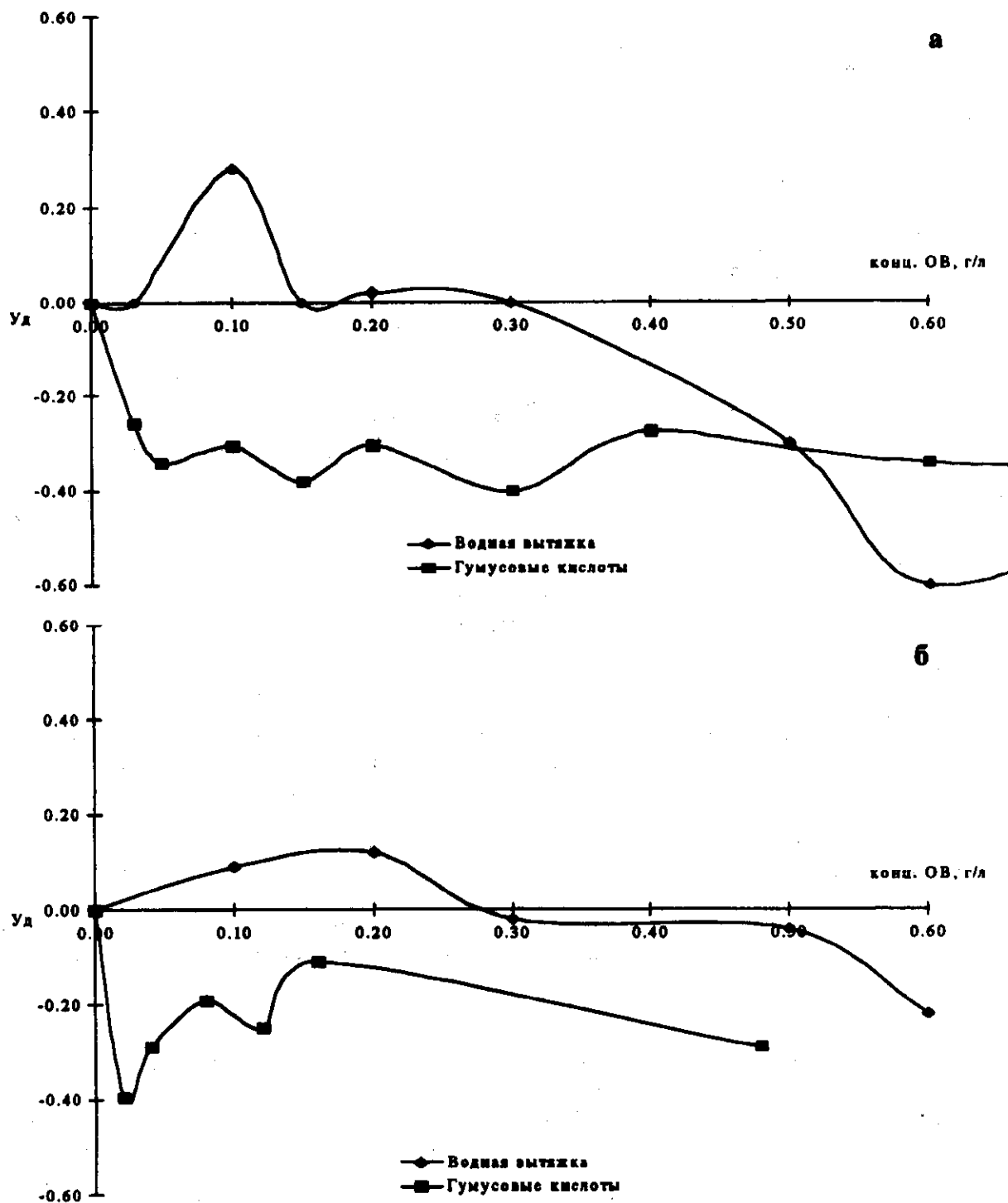


Рис. 1. Влияние органического вещества водной и щелочной вытяжек низинного (а) и верхового (б) торфов на интенсивность фотосинтеза растений пшеницы

Несмотря на то что анализ кривых на рис. 1 не позволяет говорить о какой-либо определенной зависимости действия гумусовых кислот на фотосинтез пшеницы от их концентрации, необходимо отметить развитие негативного действия торфяных гумусовых кислот на растения пшеницы при всех исследованных концентрациях.

Как показали эксперименты (рис. 1), водные и щелочные экстракты из торфов принципиально раз-

личаются по своему действию на растения. Торфяные гумусовые кислоты снижали скорость нециклического транспорта электронов уже в начальных концентрациях, тогда как водорастворимые фракции ОВ торфа в тех же концентрациях проявляли стимулирующее действие.

Так как средняя молекулярная масса препаратов щелочной вытяжки ОВ превышает 5000 Да (таблица), можно предположить, что снижение интенсив-

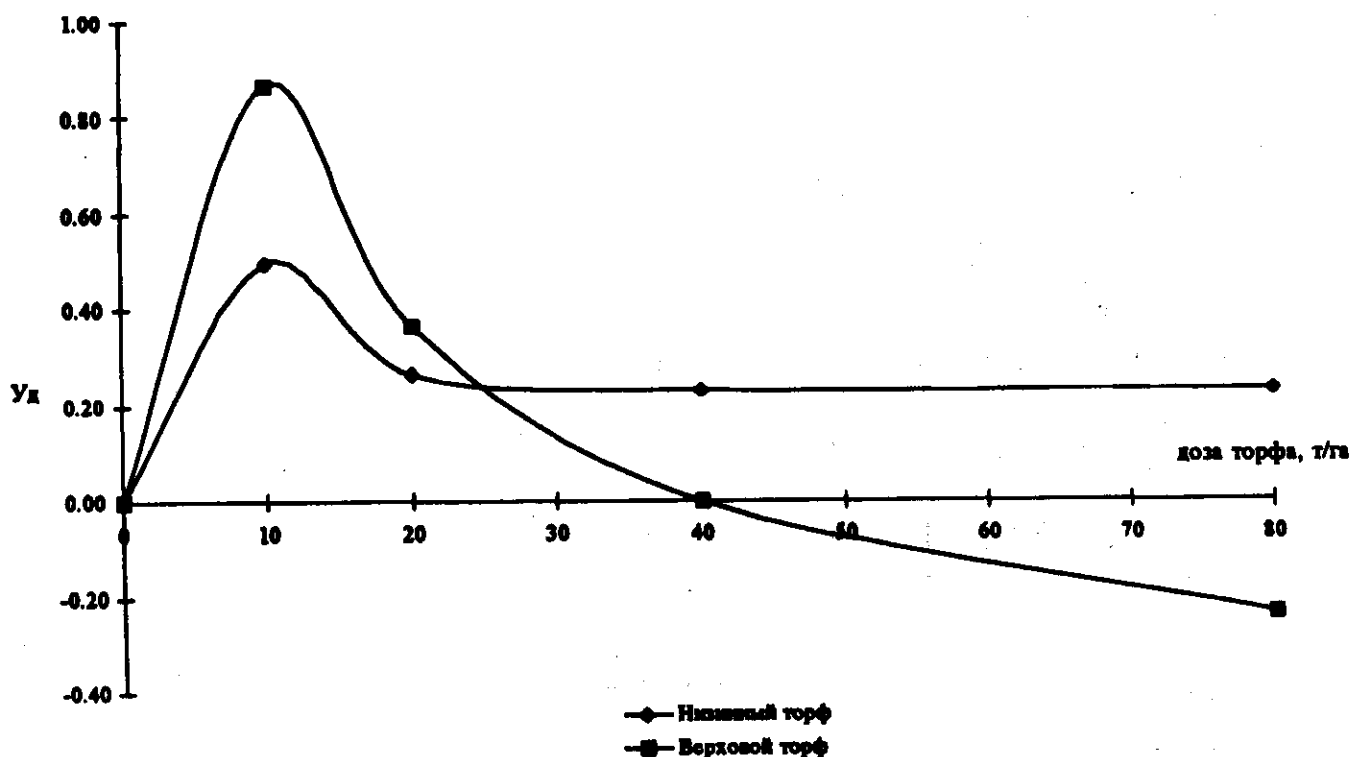


Рис. 2. Влияние разных доз низинного и верхового торфов на накопление биомассы растениями пшеницы

ности фотосинтеза растений в присутствии гумусовых кислот происходит за счет уменьшения количества поступающих в растения питательных элементов (в нашем случае микроэлементов, так как эксперимент проводили на дистиллированной воде), которые связываются гумусовыми кислотами. Другими словами, снижение интенсивности фотосинтеза — это не результат прямого действия гумусовых кислот, а лишь отражение ухудшения общего состояния растения. С другой стороны, препараты водорастворимого ОВ, средняя молекулярная масса которых была меньше 5000 Да, обладали способностью проникать в растения и могли выступать в качестве переносчика питательных элементов. Однако снижение интенсивности фотосинтеза при высоких концентрациях водорастворимого ОВ свидетельствует о наличии негативного влияния самого ОВ, так как модельные препараты ОВ были приготовлены на дистиллированной воде и в растворе могли присутствовать лишь следовые количества элементов, т.е. возможность поступления в растения избыточного количества каких-либо из них исключена. Среди возможных причин этого явления можно выделить наличие у низкомолекулярных компонентов ГВ мембранотропных свойств (Visser, 1986). Кроме того, существуют данные о способности фенольных компонентов природного ОВ разобщать процессы фосфорилирования в растениях (Visser, 1986).

Исследование удобрительного эффекта торфа на растения пшеницы в условиях лабораторно-вегетацион-

ного опыта. Результаты вегетационных опытов (рис. 2) показали, что общий вид зависимости накопления биомассы растениями пшеницы от вносимой дозы торфа сходен у верхового и низинного торфов. В начальных дозах наблюдали значительную стимуляцию роста пшеницы. При внесении 10 т/га удобрительный эффект для верхового торфа составил 0,83, а для низинного — 0,50. В дальнейшем наблюдалось снижение эффективности действия торфа как удобрения. Так, для низинного торфа при дозе 80 т/га этот показатель снизился до 0,17, а верховой торф в этой же дозе начал угнетать растения ( $Уд = -0,23$ ). Интересно отметить, что общий вид зависимости накопления биомассы растениями пшеницы от дозы торфов сходен с зависимостью интенсивности фотосинтеза пшеницы от концентрации водорастворимого торфяного ОВ. При малых концентрациях наблюдали стимуляцию жизнедеятельности растений, а при больших — угнетение. Исходя из этого можно высказать предположение о том, что действующим началом торфа служит водорастворимая часть ОВ.

Снижение биомассы при внесении высоких доз торфов по результатам проведенных опытов нельзя трактовать однозначно. Вносимые торфа имели кислый характер ( $pH_{КС1}$  составили 2,96 и 2,89 для верхового и низинного торфов соответственно) и довольно значительное содержание обменного алюминия (7,42 и 4,07 мэкв/100 г). Поэтому при внесении верхового торфа в дозе 10 т/га в почве наблюдалось увеличение содержания обменного алюминия с 1,62 до 2,40 мэкв/100 г почвы, а при внесении максималь-

ной дозы (80 т/га) оно составило 5,04 мэкв/100 г почвы. Такое содержание алюминия токсично для растений. Однако связывать проявляемую торфами при их высоких дозах токсичность по отношению к растениям только с содержанием алюминия не представляется целесообразным, так как начало угнетения накопления растениями биомассы наблюдали уже при дозе торфа 20 т/га ( $Уд = 0,37$ ), когда содержание подвижного алюминия в почве (3,49 мэкв/100 г) не представляло опасности для растений. Кроме этого результаты проведенных экспериментов ясно показали неблагоприятное воздействие водных вытяжек из торфа, предварительно обессоленных на катионообменнике, т.е. не содержащих алюминия.

### Выводы

1. Установлено, что водорастворимая фракция ОВ торфа влияет на фотосинтез растений пшеницы, причем в низких концентрациях (до 0,3 г/л) это влияние можно охарактеризовать как положительное, а в высоких (больше 0,3 г/л) — как отрицательное.
2. Гумусовые кислоты щелочной вытяжки торфа снижают интенсивность фотосинтеза растений во всем исследованном диапазоне концентраций (0,1—1 г/л).
3. Препараты водорастворимого ОВ и гумусовых кислот, различающиеся по молекулярным массам, по-разному действуют на растения, что отражается на интенсивности их фотосинтеза.
4. Исходя из сходства общего вида зависимости накопления растениями пшеницы биомассы от дозы вносимых торфов с зависимостью интенсивности фотосинтеза пшеницы от концентрации водорастворимого ОВ (стимуляция жизнедеятельности растений при низких дозах и угнетение при высоких), можно предположить, что водорастворимая фракция ОВ является действующим началом физиологической активности торфа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (N 96-04-49838) и Госкомитета РФ по высшему образованию (4-26).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алиев С.А. 1987. Парамагнетизм органического вещества почв. Новосибирск.
- Андреевко Т.И., Быстрых Е.Е., Маторин Д.Н. 1985. Изучение замедленной флуоресценции листьев яровой пшеницы в связи с продуктивностью // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 3. 30—35.
- Базин Е.Т., Копенкин В.Д., Косов В.И., Корчунов С.С., Петрович В.М. 1992. Технический анализ торфа. М.
- Баталкин Г.А., Кочанов М.М., Махно М.Ю. 1983. Проницаемость мембран для некоторых веществ гумусовой природы и их вклад в физиологическую активность препаратов гумата Na // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 8. Днепропетровск. С. 117—121.
- Бобырь Л.Ф. 1983. Изменение фотоассимиляции  $CO_2$  под влиянием гумусовых веществ // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 8. Днепропетровск. С. 97—102.
- Прянишников Д.Н. 1940. Агрохимия. М.
- Тарусов Б.Н., Веселовский В.А. 1978. Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение. М.
- Dell'Agnola G., Nardi S. 1986. News about biological effect of humic substances // Humic substances effect on soil and plant. Italy, Reda. P. 78—88.
- Lowe L.E. 1992. Studies on the nature of sulfur in peat humic acids from Fraser River delta, British Columbia // Sci. Total Env. 113. 133—145.
- Petersen R.C.Jr. 1991. The contradictory biological behavior of humic substances in the aquatic environment // Humic substances in the aquatic and terrestrial environment. Berlin; Heidelberg. P. 369—390.
- Tulonen T., Salonen K., Arvola L. 1992. Effect of different molecular weight fraction of dissolved organic matter on the growth of Bacteria, Algae, and Protozoa from a highly humic lake // Hydrobiologia. 229. 239—252.
- Visser S.A. 1986. Effect of humic substances on plant growth // Humic substances effect on soil and plant. Italy, Reda. P. 89—135.

Поступила в редакцию  
01.12.95

### INFLUENCE OF ORGANIC MATTER OF PEAT AQUEOUS AND ALKALINE EXTRACTS ON PLANT PHOTOSYNTHESIS

N.A. Kulikova, I.V. Perminova, G.F. Lebedeva, D.N. Matorin

Using delayed fluorescence method we showed that the peat water the soluble organic matter (OM) from and humic acids differ in their influence *Triticum aestivum* photosynthesis. The low molecular weight fraction of peat OM was hypothesized to play a basic role in determining peat physiological activity.