

УДК 662.73: 547.992.2: 631.811.98

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2020 г. С. И. Жеребцов^{1,*}, Н. В. Малышенко^{1,**}, К. С. Вотолин^{1,***},
К. М. Шпакодраев^{1,****}, З. Р. Исмагилов^{1,*****}

¹ ФГБУН Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, 650000 Кемерово, Россия

*e-mail: sizh@yandex.ru

**e-mail: profkemsc@yandex.ru

***e-mail: kostvot@mail.ru

****e-mail: shpakodraevkm@mail.ru

*****e-mail: zinfer1@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2020 г.

После доработки 24.03.2020 г.

Принята к публикации 30.03.2020 г.

Получены образцы нативных и модифицированных пероксидом водорода гуминовых кислот (ГК), выделенных из бурых углей Тисульского месторождения Канско-Ачинского бассейна. Образцы ГК охарактеризованы инструментальными методами: элементным и техническим анализом, ЭПР-спектроскопией. Модифицирование ГК влияет на структурно-групповой состав и уменьшает содержание парамагнитных центров (ПМЦ). Методом фитотестирования на примере семян сортовой пшеницы “Ирень” проведена оценка биологической активности (БА) нативных и модифицированных гуминовых кислот. Наибольшая БА проявляется при концентрации ГК 0.005%. Выявлена тенденция снижения биологической активности при уменьшении содержания ПМЦ.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, биологическая активность, индекс фитоактивности, парамагнитные центры

DOI: 10.31857/S002311772004009X

ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые кислоты – природные высокомолекулярные соединения нерегулярного строения, содержащиеся в торфе, бурых и окисленных каменных углях, почве, донных отложениях. Полученные из разных источников ГК различаются по элементному составу, степени конденсированности, замещенности ароматических ядер, соотношению гидрофильных и гидрофобных фрагментов. В состав макромолекул ГК входят различные функциональные группы: карбонильные, карбоксильные, гидроксильные. Благодаря уникальности своего строения ГК способны вступать в окислительно-восстановительные реакции, реакции комплексообразования и ионного обмена с катионами металлов, что в свою очередь определяет широкий спектр их применения [1]. Как сорбенты катионов различных металлов ГК применяются для борьбы с химическими загрязнителями, очистки промышленных стоков, детоксикации загрязненных почв и т.д. Они используются для ремедиации и рекультивации деградированных почв, улучшая их структуру и повышая плодородие. В последнее время возрос интерес к

применению гуминовых кислот и препаратов на их основе в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста растений. В результате повышается урожайность культур, резистентность к заболеваниям, сокращается поступление тяжелых металлов и радионуклидов в растения. В настоящее время накоплен большой экспериментальный опыт, свидетельствующий о положительном влиянии биологической активности (БА) гуминовых веществ на урожайность и качество сельскохозяйственных культур [2]. Обнаружена полуколичественная взаимосвязь БА и содержания парамагнитных центров (ПМЦ) [3], хиноидных групп и фенольных гидроксильных, степени ароматичности (f_a) [4, 5]. Показано, что соотношение гидрофильно-гидрофобных фрагментов в структуре ГК – один из определяющих факторов их биологической активности [6]. Однако взгляды на природу биологической активности ГК неоднозначны и противоречивы. В настоящее время нет четкого понимания, какие структурные параметры ГК являются определяющими для проявления биологической активности.

Таблица 1. Технический и элементный анализ исследуемых образцов, %

Образец	W^a	A^d	V^{daf}	C^{daf}	H^{daf}	$(O + N + S)^{daf}$ по разности	C/H атом.	$(HA)_i^{daf}$
БУТС	8.0	6.1	48.1	64.3	4.7	31.0	1.1	21.3
БУТСО	13.5	46.6	90.8	55.1	2.7	42.2	1.7	60.9
ГК БУТС	4.9	9.2	—	59.1	4.9	36.0	1.0	—
ГК БУТСО	7.0	15.2	—	61.6	5.4	33.0	1.0	—

Примечание: W^a – влага аналитическая; A^d – зольность на сухую пробу; V^{daf} – содержание летучих веществ; C, H, O, N, S – содержание углерода, водорода, кислорода, азота и серы; $(HA)_i^{daf}$ – выход гуминовых кислот; daf – сухое беззольное состояние образца.

В последнее время большой интерес исследователей направлен на химическое модифицирование гуминовых кислот, дающее возможность получить препараты на их основе с ценными свойствами, превосходящими свойства исходных ГК. С помощью направленного химического модифицирования за счет изменения функционально-группового состава можно повысить сорбционную способность, биологическую активность, регулировать окислительно-восстановительные свойства [7, 8]. Модификация ГК может быть использована для исследования структуры, а также для установления связи структура—свойство. Для модифицирования применяются различные реакции, например окислительно-восстановительные, гидролиза, алкилирования, ацилирования и т.д. Проведение реакций гидробромирования ГК, введение в их структуру индолсодержащих фрагментов способствует повышению БА [8, 9]. В работе [10] исследована биологическая активность природных и модифицированных ГК и показано, что окисленные перманганатом калия, а также алкилированные метилом ГК – самые эффективные по сравнению с исходными гуминовыми кислотами. Ранее было показано [7, 11, 12], что окисление гуминовых кислот пероксидом водорода увеличивает содержание карбонильных, карбоксильных, кислородосодержащих алкильных фрагментов. В результате этого повышается сорбционная способность ГК по отношению к катионам металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}). Модифицирование пероксидом водорода снижает содержание ПМЦ в гуминовых кислотах по сравнению с исходными, так как H_2O_2 как источник ОН-радикалов и кислорода может приводить к гибели органических радикалов [13].

Цель настоящей работы – изучение зависимости биологической активности от содержания ПМЦ нативных и модифицированных пероксидом водорода гуминовых кислот, выделенных из бурых углей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения гуминовых кислот использовали образцы бурого угля Тисульского месторождения Канско-Ачинского бассейна (БУТС) и его окисленной в пласте формы (БУТСО). Гуминовые кислоты выделяли из угля обработкой раствором гидроксида натрия и последующим осаждением соляной кислотой [14]. Характеристики образцов исследуемых бурых углей и полученных из них гуминовых кислот приведены в табл. 1. Окисленный уголь отличается более высокой степенью ароматичности ($C/H = 1.72$) и более высоким выходом гуминовых кислот.

Модифицирование гуминовых кислот пероксидом водорода проводилось следующим образом: к определенному объему растворов, содержащих 5 г гумата натрия, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке из бюретки добавляли по каплям с одинаковой скоростью пероксид водорода ($C = 32\%$, $V = 5, 10, 15$ мл), после добавления H_2O_2 перемешивали еще 5 мин и осаждали ГК соляной кислотой.

Полученные осадки отфильтровали, промывали водой до pH дистиллированной воды, высушивали при температуре $70^\circ C$ до постоянного веса.

Спектры ЭПР исследуемых образцов регистрировали при комнатной температуре на ЭПР-спектрометре “BrukerEMX-m40X” на частоте 9.86 ГГц. Условия записи ЭПР-спектров для всех образцов идентичны: уровень мощности 1.8–1.9 мВт, частота модуляции 100 кГц. Для определения количества органических парамагнитных центров (ПМЦ) в качестве стандарта использовали ионы Mn^{2+} в оксиде магния MgO. Характеристики ЭПР-спектров рассчитывали с помощью программы BrukerWinEPR.

Для установления зависимости “структура—свойство” были проведены тесты (фитотестирование) [15, 16] с использованием сортовых семян пшеницы “Ирень”. Определение биологической активности ГК в виде гуматов натрия (ГумNa), концентрация 0.01, 0.005 и 0.0005%, полученных как из исходных, так и модифицированных пероксидом водорода гуминовых кислот, проводи-

Таблица 2. Величины тест-функций и интегральный индекс фитоактивности гуминовых препаратов

№	Образец	Концентрация, %	КК	ДК	ВП	ЭП	ИФ	ПМЦ × 10 ⁻¹⁸ , спин/г
			% к контролю					
1	ГумNa БУТС	0.005	115	118	109	115	1.14	7.57
2	ГумNa БУТС	0.0005	102	96	108	107	1.04	–
3	ГумNa БУТС	0.001	102	94	100	93	0.96	–
4	ГумNa БУТС (5)	0.005	113	104	118	112	1.11	3.77
5	ГумNa БУТС (10)	0.005	107	91	88	93	0.91	3.12
6	ГумNa БУТС (15)	0.005	103	83	78	101	0.87	2.87
7	ГумNa БУТСО	0.005	104	123	138	106	1.22	0.87
9	ГумNa БУТСО	0.0005	–	101	103	108	1.04	–
10	ГумNa БУТСО (5)	0.005	101	101	125	103	1.10	0.56
11	ГумNa БУТСО (10)	0.005	99	105	120	98	1.08	0.29
12	ГумNa БУТСО (10)	0.0005	–	101	103	108	1.04	–
13	ГумNa БУТСО (15)	0.005	101	85	79	107	0.90	0.28

Примечание. В скобках указано количество H₂O₂ (мл), применяемое при модифицировании.

ли в соответствии с ГОСТ 12038-84 и ГОСТ 54221-2010 [17, 18]. Для этого семена проращивали при постоянной температуре 20°C в темноте в специальных растительных – лотках. Биологическую активность нативных и модифицированных ГК оценивали по величине интегрального индекса фитоактивности (ИФ) с учетом трех тест-функций: энергии прорастания семян (ЭП), длины корня (ДК) и высоты проростка (ВП). Величина ИФ является обобщающим индексом, отражает отклонения от контроля и вычисляется как средняя величина суммы показателей ЭП, ДК и ВП, выраженная в долях единицы:

$$ИФ = \frac{(ЭП + ДК + ВП)}{3 \cdot 100},$$

где ЭП, ДК и ВП – средние величины по трем лоткам.

Повторность эксперимента трехкратная: по 50 семян в каждом лотке для каждого вида ГК и столько же для контроля. Для контрольного теста использовалась дистиллированная вода. ЭП, ВП и ДК, а также количество корней (КК) замеряли на 5 сут.

Относительная ошибка во всех экспериментах составляла 3–5% для уровня значимости α = 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 приведены экспериментальные данные по определению биологической активности гуминовых кислот посредством фитотестирования, в процессе которого были установлены не только эффекты, стимулирующие развитие растений, но и подавление тех или иных тест-функций. Одним из факторов, влияющих на биоло-

гическую активность, является концентрация используемых гуминовых препаратов. При концентрации 0.005% наблюдается наибольшее значение ИФ для всех исследуемых образцов гуминовых препаратов (табл. 2).

При этом следует отметить положительное влияние ГК на энергию прорастания семян, длину корней и высоту проростков. Более высокая биологическая активность свойственна гуматам, полученным из естественно-окисленной формы бурого угля (ГумNa БУТСО), применение которого дает максимальные значения высоты проростка и длины корня (38 и 23% к контролю). На примере модифицированных ГумNa БУТСО показано, что уменьшение концентрации гуминовых препаратов от 0.005 до 0.0005% также приводит к снижению ИФ.

Химическое модифицирование, изменяя функционально-групповой состав гуминовых кислот [19], должно оказывать влияние на биологическую активность ГК. Действительно, как видно из табл. 2, применение модифицированных пероксидом водорода ГК приводит к уменьшению значений тест-функций и индекса фитоактивности для всех исследуемых образцов по сравнению с нативными.

При этом наблюдается незначительное уменьшение количества корней. При обработке семян препаратами ГумNa БУТС (10), ГумNa БУТС (15), ГумNa БУТСО (15) индекс фитоактивности ниже ИФ в контрольных опытах с водой (рис. 1). Значения всех тест-функций ДК, ВП и ЭП в этих опытах ниже контрольных.

В табл. 2 также представлено содержание ПМЦ исследуемых образцов нативных и модифицированных гуминовых кислот. Оценивая

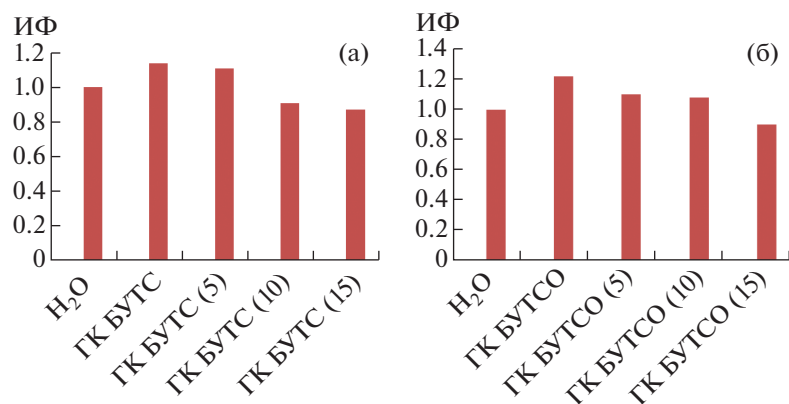


Рис. 1. Индекс фитоактивности нативных и модифицированных гуминовых кислот, полученных из бурых углей БУТС (а) и БУТСО (б).

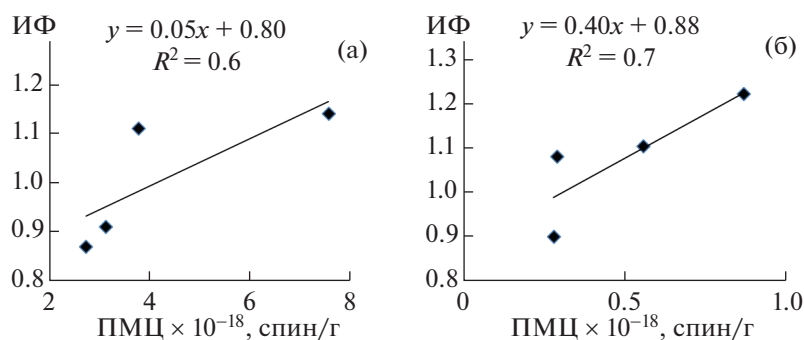


Рис. 2. Зависимость индекса фитоактивности от содержания ПМЦ нативных и модифицированных пероксидом водорода гуминовых кислот, полученных из бурых углей БУТС (а) и БУТСО (б).

связь биологической активности ГК с парамагнитными свойствами, следует отметить о наличии тенденции снижения значений ИФ с понижением содержания ПМЦ в процессе модификации гуминовых кислот пероксидом водорода. Нативные гуминовые кислоты с более высоким уровнем парамагнетизма наиболее биологически активны. Линейная зависимость имеет довольно низкие коэффициенты детерминации $R^2 = 0.6$ для ГК БУТС и 0.7 для ГК БУТСО (рис. 2).

Вероятно, связь между содержанием ПМЦ и биологической активностью не является простой и однозначной. Есть мнение, что парамагнетизм ГК обусловлен синергическим эффектом взаимодействия ароматических систем полисопряжения и водородных связей, образованных функциональными группами [20], и определяется содержанием хиноидных групп и фенольных гидроксильных групп [4]. Таким образом, направленная химическая модификация ГК может изменить функционально-групповой состав ГК, а контроль содержания ПМЦ позволит оценить биологическую активность ГК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИУХМ ФИЦ УУХ СО РАН (проект АААА-А17-117041910148-9) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-55-91033).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ФИЦ УУХ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stevenson F.J.* Humus Chemistry. Second Edition. N.Y.: John Wiley & Sons. Inc. 1994. 496 p.
2. *Senesi E.N., Miano T.M.* Humic substances in global environment and implication on humin health. Amsterdam: Elsevier Sci., 1994. 910 p.
3. *Чуков С.Н., Талашкина В.Д., Надпорожская М.А.* // Почвоведение. 1995. № 2. С. 169.
4. *Кухаренко Т.А.* // ХТТ. 1976. № 2. С. 24.
5. *Жеребцов С.И., Малышенко Н.В., Вотолин К.С., Андроханов В.А., Соколов Д.А., Дугаржав Ж., Исмаилов З.Р.* // ХТТ. 2019. Т. 53. № 3. С. 19. [Solid Fuel Chemistry. 2019. Vol. 53, no. 3. p. 145.]

- <https://doi.org/10.3103/S0361521919030121>]
<https://doi.org/10.1134/S0023117719030137>
6. Бямбагар Б., Кушнарев Д.Ф., Федорова Т.Е., Новикова Л.Н., Яковлева Ю.Н., Островская Р.М., Проидаков А.Г., Калабин Г.А. // ХТТ. 2003. № 1. С. 83.
 7. Жеребцов С.И., Малышенко Н.В., Смотрина О.В., Брюховецкая Л.В., Исмагилов З.Р. // Химия в интересах устойчивого развития. 2016. Т. 24. № 3. С. 399. <https://doi.org/10.15372/KhUR20160316>
 8. Лебедева Г.Ф., Яркова Т.А., Платонов В.В., Проскуряков В.А., Чернышева Н.И. // ЖПХ. 2005. Т. 78. Вып. 8. С. 1384.
 9. Яркова Т.А. // ХТТ. 2011. № 4. С. 49.
 10. Dobbss L.B., Canellas L.P., Olivares F.L. Aguiar N.O., Peres L.E., Azavedo M., Spraccini R., Picollo A., Facanha A.R. // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. № 6. P. 3681.
 11. Малышенко Н.В., Жеребцов С.И., Смотрина О.В., Брюховецкая Л.В., Исмагилов З.Р. // Химия в интересах устойчивого развития. 2015. Т. 23. № 4. С. 451. <https://doi.org/10.15372/KhUR20150415>
 12. Жеребцов С.И., Малышенко Н.В., Брюховецкая Л.В., Исмагилов З.Р. // Коксхимия. 2017. № 11. С. 43.
 13. Нонхибел Д., Уолтон Дж. Химия свободных радикалов. М.: Мир, 1977. 606 с.
 14. Тайц Е.М., Андреева И.А. Методы анализа и испытания углей. М.: Недра, 1983. 301 с.
 15. Воронина Л.П., Якименко О.С., Терехова В.А. // Агрехимия. 2012. № 6. С. 50.
 16. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. Практикум по растениеводству. М.: Колос, 1983. 352 с.
 17. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. М.: Издательство стандартов, 1984. 30 с.
 18. ГОСТ Р 54221-2010. Гуминовые препараты из бурых и окисленных каменных углей. Методы испытания. М.: Стандартинформ, 2012. 10 с.
 19. Жеребцов С.И., Малышенко Н.В., Брюховецкая Л.В., Лыричиков С.Ю., Никитин А.П., Исмагилов З.Р. // Кокс и химия. 2018. Т. 61. № 10. С. 28. [Coke and Chemistry. 2018. Vol.61, no. 10. p. 396. <https://doi.org/10.3103/S1068364X18100083>.]
 20. Наумова Г.В., Стригуцкий В.П., Жмакова Н.А., Овчинникова Т.Ф. // ХТТ. 2001. № 2. С. 3.