

На правах рукописи

Неизвестная Наталья Геннадьевна

**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ ПРОМЫШЛЕННЫХ
ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗИСА
МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР**

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на кафедре системной экологии и в Центре «ПРИМА» ЦКП (НОЦ) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов»

Научный руководитель: **Калабин Геннадий Александрович,**
доктор химических наук,
профессор кафедры системной экологии
РУДН, директор Центра «ПРИМА» ЦКП
(НОЦ) РУДН

Официальные оппоненты: **Терехова Вера Александровна,**
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник Института
проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН

Горюнова Светлана Васильевна,
доктор биологических наук,
профессор кафедры безопасности
жизнедеятельности Московского
городского педагогического университета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова"

Защита состоится «__» _____ 2013 г. в ___ часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.17 при Российском университете дружбы народов по адресу: 115093, г. Москва, Подольское шоссе, д. 8/5.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
кандидат биологических наук, доцент

Е. А. Карпухина

I ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние десятилетия резко возрос поток информации об эффективности применения гуминовых веществ (ГВ) как адаптогенов, мелиорантов, рост-стимуляторов в обеспечении безопасности окружающей среды и современных агротехнологиях. Производится широкий ассортимент промышленных гуминовых препаратов (ППП) из сырья различного генезиса (торф, сапропели, уголь, лигнин, вермигуматы) с использованием различных технологий их выделения, обработки и применения. Однако, ответы на многие принципиальные вопросы их состава, функциональной активности и особенностей использования отсутствуют. Наиболее важный - механизмы воздействия ГВ на развитие растений на различных стадиях и ответственность их компонентов (фрагментов, атомов) за эти эффекты (ауксиноподобные, гиббереллиноподобные и т.д.). Для экологов и производителей агропродукции принципиально значимы вопросы безопасности, происхождения и состава ППП для их аутентификации с ранее успешно использованными, а также оптимальные технологии применения (сроки, формы и концентрации их внесения для отдельных культур в разнообразных почвенно-климатических условиях). Без ответа на них широкомасштабное использование ППП либо невозможно, либо дискредитирует их. Сложившуюся ситуацию усложняет противоречивая информация о составе и завышенной эффективности ППП. Необходима разработка и совершенствование единых тест-подходов для целей сертификации и анализа состава и свойств разнообразных ППП, позволяющих, в частности, выявлять в них присутствие экзогенных органических веществ и компонентов минеральных удобрений.

С учётом отсутствия стандартных ППП важнейшими подходами к оценке их строения должны стать универсальные методы их инструментального количественного анализа и биотестирования. Поскольку ППП – стохастическая смесь многообразных органических молекул, их элементный состав мало информативен, а количественный компонентный состав методами хромато-масс-спектрометрии не может быть определен. Из методов анализа фрагментного состава – спектроскопии ЯМР и молекулярной спектроскопии ИК/КРС – прямым количественным является только первый.

Наиболее надежные методы биотестирования ППП – многолетние полевые испытания на интересующих культурах в определенной почвенно-климатической зоне - крайне трудоемки. Хотя, результаты лабораторных экспресс-методов, например, на основе проращивания семян нельзя экстраполировать на весь цикл развития растений, они имеют несомненные достоинства: экономичность, быстрота, возможность моделирования различных факторов окружающей среды, что позволяет считать их приоритетными.

Основные экспериментальные методы настоящей работы – лабораторное биотестирование и мультитядерная спектроскопия ЯМР высокого разрешения в сильных магнитных полях.

Работа выполнялась в соответствии с проектом Минобрнауки России № 2.1.2/10916 «Создание новой технологии прогнозирования свойств гуминовых веществ в сельском хозяйстве и технике» аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2011 годы)».

Тема соответствует приоритетному направлению развития науки, технологий и техники в Российской Федерации – рациональное природопользование.

Глобальное направление исследования – вовлечение в ресурсосберегающие технологии природопользования ГВ различного генезиса, как экологически чистого и дешевого природного органического сырья, запасы которого в России наибольшие в мире, а применение весьма ограничено ввиду отсутствия системы показателей их качества.

Цель исследования – формирование научных основ использования эффективных и экологически дружественных ПГП в качестве рост-стимуляторов и адаптогенов в производстве сельскохозяйственной продукции и обеспечении безопасности окружающей среды.

Задачи исследования:

– изучение рост-стимулирующей активности серии ПГП в лабораторных и полевых условиях;

– изучение состава сырья, промежуточных продуктов и товарного полусинтетического ПГП «Лигногумат» методами биотестирования и ЯМР, поиск для них корреляционной модели вида «состав-свойство»;

– генерирование и верификация гипотезы о возможном синергизме эффектов изотопно-модифицированной воды и ПГП на рост-стимуляцию растений в благоприятных и стрессовых условиях;

– создание системного подхода к выявлению количественных особенностей строения ПГП из различных видов сырья для их аутентификации на основе единого метода – мультиядерной количественной спектроскопии ЯМР.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты лабораторных и полевых испытаний рост-стимулирующих и адаптогенных свойств ПГП различного генезиса.

2. Синергизм рост-стимуляции развития семян пшеницы под действием ПГП и изотопно-облегченной воды в условиях биотического стресса.

3. Алгоритм идентификации природы ГВ, выявления в них примесей индивидуальных органических и неорганических соединений на основе одного универсального подхода - спектроскопии ЯМР различных ядер, как наиболее информативного источника количественной информации при создании системы их сертификации.

4. Методами биотестирования и ЯМР ^{13}C установлена доминирующая роль содержания карбоксильных и ароксильных фрагментов в рост-стимулирующих свойствах природных и полусинтетических ГВ.

Научная новизна исследований. Впервые разработана классификационная модель идентификации сырьевого происхождения и состава ГВ исключительно на основе количественных характеристик строения из спектров ЯМР и выполнена ее верификация. Впервые в технологическом эксперименте изучена динамика преобразования углеродного и водородного состава промышленного лигносульфоната при его превращении в гуминоподобные вещества. Обнаружена аналогия эффектов ПГП из угля и лигнина, обусловленная преимущественно наличием COOH и OH -заместителей в ароматическом кольце. Впервые обнаружен синергизм физиологических эффектов ПГП и воды с пониженным содержанием дейтерия. Впервые проведено в единых условиях сравнительное изучение рост-стимулирующей активности и спектров ЯМР ПГП различного генезиса в лабораторных и полевых условиях.

Теоретическая значимость. Установлена возможность количественного описания состава и строения любых ПГП единым методом количественной спектроскопии ЯМР. Установлено, что независимо от сырьевого происхождения ПГП, наличие в них определенных кислород-содержащих фрагментов является основным фактором, определяющим их физиологическую активность.

Практическая значимость. Заложены основы, созданы алгоритм изучения состава и банк данных спектров ^{13}C ЯМР ПГП для их быстрой аутентификации. Полевые испытания подтвердили значительную эффективность ПГП, выбранных, исходя из их различного генезиса, а также с помощью прогностической модели. Показана применимость спектроскопии ЯМР для прогнозирования свойств ПГП.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Тема диссертационной работы соответствует паспорту специальности 03.02.08 – экология (биологические науки), так как изучение влияния экологически чистых гуминовых удобрений на рост, а также состояние растений и простейших отвечает задачам прикладной экологии в части разработки принципов создания искусственных экосистем и управления их функционированием. В том числе в плане исследования влияния антропогенных факторов на экосистемы различных уровней с целью разработки экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XIV Всероссийской научной конференции «Почвы в условиях природных и антропогенных стрессов» (Санкт-Петербург, 2011 г.), V Всероссийской конференции при участии зарубежных ученых с элементами школы для молодых исследователей «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (Казань, 2011 г.), VII Международной конференции «Спектроскопия координационных соединений» (Туапсе, 2011 г.), XIV и XV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования» (Москва, 2012 г., 2013 г.), XVI конференции Международного гуминового общества (IHSS) «Функции природных органических веществ в изменяющихся условиях» (Ханчжоу, 2012 г.), Второй международной конференции по гуминовым инновационным технологиям «Природные и синтетические наночастицы в технологиях очистки вод и почв» (Москва, 2012 г.), Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013 г.).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано десять работ (три статьи и семь тезисов докладов), две из которых в изданиях перечня ВАК РФ.

Личный вклад автора. Основная часть исследования (90%) выполнена лично автором диссертационной работы. Во всех работах, выполненных с соавторами, автору принадлежит постановка задачи, концепция методов исследования, анализ полученных результатов, непосредственное участие автора в проведенных исследованиях.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, шести разделов, заключения и выводов. Объем работы составляет 125 страниц, включая 27 таблиц и 20 рисунков. Список литературы включает 153 источника.

II СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

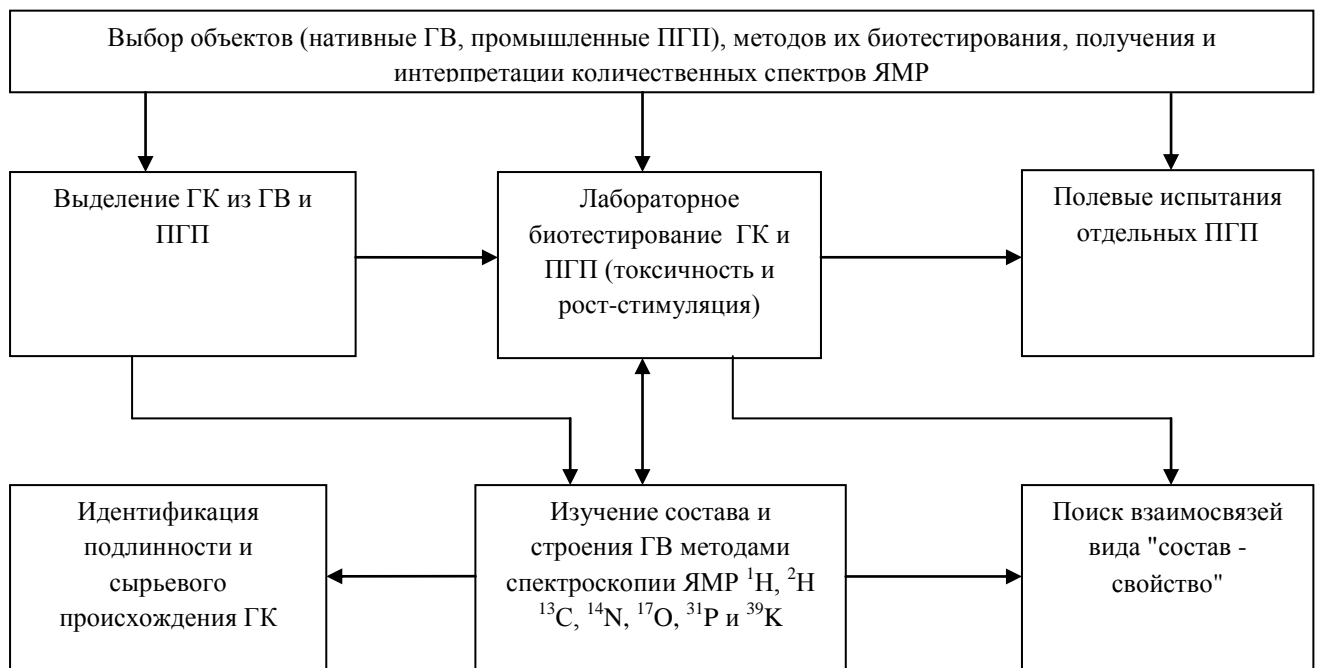
Во Введении обосновывается актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Раздел 1. Обзор литературы

Представлен обзор публикаций, посвященных вопросам строения и физиологической активности ГВ. Рассмотрены наиболее обсуждаемые механизмы действия гуминовых соединений, как биостимуляторов.

Раздел 2. Материалы и методы исследований

Исследован более 90 нативных ГВ и ПГП различного генезиса. ПГП представляют собой соли ГВ в виде порошков, гранул или водных растворов, выбор которых основывался на их эффективности по информации от производителей. Основные этапы экспериментального исследования представлены ниже на блок-схеме.



Для расширенного исследования использованы ГК (I - X), выделенные двойным переосаждением из следующих ПГП: I - «Гумат калия жидкий торфяной» марка Д, ООО «ФЛЕКСОМ», II - гумат калия «ЭкоОрганика» марка Г, ООО «Эко-органика», III - гумат натрия «Гуми» марка Гуми - 20М, ООО НВП «БашИнком», IV - гумат калия марка В, ЗАО «ТПК Техноэкспорт», V - гумат калия «Сахалинский» марка ВР 20, ООО «Биофит», VI - «ФлорГумат» марка ФлорГумат Концентрат универсальный, ООО «Гера СПб», VII - «Эдагум СМ», ООО «Спецоснастка М Сервис», VIII - «Лигногумат», марка БМ, ООО НПО «РЭТ», IX - гумат калия/натрия, ООО НПО «Сила жизни», X - «ГУМИМАКС» марка Гумимакс-универсальный концентрированный, ЗАО «Уралэкооил».

Лабораторное биотестирование ППП I-X включало 2 этапа. Первый - контроль токсичности с использованием микроорганизмов (дрожжи, инфузории). Второй - оценка рост-стимуляции на высших растениях (семена пшеницы, редиса).

При исследовании ППП «Лигногумат» методами биотестирования и спектроскопии ЯМР проанализирована серия образцов, полученных в производственном эксперименте с лигносульфонатом Выборгского ЦБК, подвергнутого преобразованию в различных условиях (время и интенсивность процесса). Все пробы (водные растворы со средней концентрацией 23%) для получения спектров ЯМР ^1H и ^{13}C использовались без разбавления, концентрация для биотестирования - 0,02%, что соответствует оптимальной, исходя из результатов специального исследования.

Образцы «легкой» (Л) воды, т.е. с пониженным содержанием дейтерия (ЛN, где N – содержание изотопа ^2H , ppm) готовились путём смешивания дистиллированной воды с содержанием изотопа ^2H 142 ppm с Л4, Л20 или Л50.

Абиотический стресс при проращивании семян инициирован пестицидом (П) глифосат (N-(фосфометил)глицин, $\text{C}_3\text{P}_8\text{NO}_5$) в концентрации 60 мг/л, который, ингибируя фермент 5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазу (КФ 2.5.1.19), затрудняет синтез соединений, необходимых для роста.

Метод изучения физиологической активности по оценке пенообразования дрожжей, основанный на измерении интенсивности пенообразования, довольно чувствителен, технически прост, легкодоступен и позволяет вести анализы без микробиологической техники. В качестве тест-культуры использованы коммерческие препараты сухих пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) «Саф-Момент» (производство Франция). Навеску дрожжей суспензировали в 5 мл раствора исследуемого соединения, тщательно перемешивали, затем добавляли D-глюкозу в количестве 10 мг/мл. Мерную пробирку объемом 10 мл с полученной дрожжевой суспензией помещали в термостат (30 °C) и инкубировали 15 минут, после чего определяли высоту столбика образовавшейся пены, оценивая степень ингибирующего или стимулирующего воздействия тестируемого соединения на дрожжи.

Методика исследования токсичности на инфузориях основана на определении смертности парameций (*Paramecium caudatum*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контролем. Острое токсическое действие исследуемой пробы на парameций определяют по их смертности (А, %) за определенную экспозицию. Критерием острой токсичности принята гибель 50 % и более парameций за 24 часа в исследуемой пробе, при условии, что в контроле гибель не превышает 10 %.

Исследование рост-стимулирующей активности рулонным методом выполнялось на семенах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Немчиновка, которые предварительно промывали слабым раствором KMnO_4 , затем дистиллированной водой, всплывшие (пустые) семена отбрасывали. Семена, закрученные в рулоны, (три повторности по 30-50 шт.) помещали в приготовленные рабочие растворы ППП и выдерживали в термостате в течение 120 часов при температуре +25°C. Определяли следующие биометрические параметры: всхожесть, среднюю длину корня (ДК) и проростка (ДП), а также среднюю массу одного корня (МК) и проростка (МП) после высушивания при 105°C до постоянной массы.

При исследовании рост-стимулирующей активности в чашках Петри в качестве тест-культуры использованы семена редиса (*Raphanus sativus L.*) сорта Чемпион. В стерильные чашки Петри укладывался слой фильтровальной бумаги (синяя лента, диаметром 90 мм), наливался рабочий раствор исследуемого образца (5 мл). В каждую чашку пинцетом укладывалось по 20-50 семян (3 повторности). Опыт проводился с использованием термостата при температуре +22 °С. На 3-4-е сутки в чашки с проклюнувшимися семенами по мере высыхания вносилось еще 5 мл рабочего раствора. По истечении 7 дней определяли следующие биометрические параметры: всхожесть, ДК, ДП, МК и МП после высушивания при 105 °С до постоянной массы.

Количественные спектры ЯМР ¹³С растворов ППП или выделенных двойным переосаждением ГК в воде ²H₂O (99,95%) регистрировали при температуре 20 °С на спектрометре JNM-ECA 600 «JEOL» с рабочей частотой для ядер ¹³С 150 МГц в ампулах ø 10 мм, время задержки 8 с и более, число сканирований 10³-10⁴. Содержание углерода в различных структурных фрагментах определяли интегрированием их спектральных областей (м.д.): карбоксильные группы СОО (195-165), кислородзамещенные ароматические атомы углерода СаpО (165-140), углерод- и водородзамещенные ароматические атомы углерода СаpС,Н (140-100), кислородзамещенные алифатические атомы углерода СалкО (100-50), алифатические атомы углерода Салк (50-0). Средняя ошибка оценки содержаний фрагментов при интегрировании составляет 2 %.

Спектры ЯМР ¹Н регистрировались на частоте 600 МГц, время задержки 5 с, число сканирований 10¹-10³. С целью устранения сигнала воды использована методика преднасыщения. Спектры ЯМР ²Н, ¹⁴Н, ³¹Р, ¹⁷О и ³⁹К регистрировались в количественных условиях на этом же спектрометре при рабочих частотах 92,1, 43,3, 242,9, 81,3 и 28,0 МГц, соответственно. Спектроскопия ЯМР ²Н и ¹⁷О использована для определения содержания в воде изотопов ²Н и ¹⁷О, а также их времени релаксации. Спектры ЯМР ¹⁴Н, ³¹Р и ³⁹К позволяют выявлять наличие в ППП добавок индивидуальных неорганических веществ.

Нахождение взаимосвязей вида «фрагментный состав - свойство» выполнялось с использованием стандартных методов одномерного и многомерного корреляционного анализа, имеющейся в пакете программного продукта STATISTICA v.6 фирмы StatSoft.

Раздел 3. Изучение токсичности и рост-стимулирующей активности промышленных гуминовых препаратов в лабораторных и полевых условиях

В РФ отсутствует общепринятая практика производства и сертификации ППП. Помимо ГВ они могут содержать добавки индивидуальных органических рост-стимуляторов, Р-, N-, К-содержащих компонентов, микроэлементов. Будучи созданными из различных видов нативного (уголь, торф) или преобразованного (лигнин, бытовые и иные отходы) природного органического сырья, ППП отличаются концентрацией водно-щелочных растворов товарных форм, содержанием в них ГВ (преимущественно ГК), концентрациями рабочих растворов, рекомендациями по методам использования и т.д. Все это усложняет их успешное использование в агротехнологиях.

Изучение состава десяти ППП (I-X) и выделенных из них двойным переосаждением ГК показало (таблица 1) существенные отличия содержания в

них сухого остатка (более чем в 20 раз), органических веществ (в 30 раз), содержание ГК в препарате и относительно органики (более чем в 200 и 9 раз, соответственно), наконец, содержание неорганических компонентов в ГК (в 12 раз). Существенно отличаются и структурные дескрипторы (фрагментный состав) самих ГК, определенные методом количественной спектроскопии ЯМР ^{13}C в водно-щелочном растворе (таблица 2), особенно для $\text{C}_{\text{алк}}\text{O}$ (более 10 раз) и $\text{C}=\text{O}$ (около 7 раз) при вариации остальных характеристик в 2-3 раза.

Таблица 1
Характеристика ППП и выделенных из них ГК, %

Образец	pH	Сухой остаток	Содержание органики	Содержание ГК	ГК от органики	Зольность сухого остатка	Зольность ГК
I	8,18	5,81	4,14	4,11	99,28	28,77	9,83
II	7,86	1,87	1,29	1,19	92,25	30,88	1,95
III	9,93	20,09	14,54	13,52	92,98	27,62	12,07
IV	8,81	12,40	9,80	9,40	95,92	20,93	4,36
V	10,28	18,50	11,00	9,60	87,27	40,50	16,41
VI	9,46	0,95	0,48	0,06	11,67	49,25	11,07
VII	9,78	4,08	2,59	2,31	89,19	36,56	2,29
VIII	9,20	19,98	12,08	11,46	94,87	39,55	24,61
IX	9,96	9,11	6,05	6,01	99,17	33,57	7,82
X	7,43	1,32	0,71	0,57	80,28	46,59	6,28

Таблица 2
Параметры фрагментного состава ГК I-X

Образец	Фрагментный состав, %					
	$\text{C}=\text{O}$	COO	$\text{C}_{\text{ар}}\text{O}$	$\text{C}_{\text{ар}}$	$\text{C}_{\text{алк}}\text{O}$	$\text{C}_{\text{алк}}$
I	3	9	7	32	16	33
II	3	10	6	31	20	30
III	4	9	6	30	8	43
IV	3	15	9	52	2	19
V	4	16	10	49	3	18
VI	3	11	4	23	24	35
VII	1	8	7	40	27	17
VIII	5	15	11	48	3	18
IX	7	12	6	24	21	30

Оценка токсичности ГК I-X по гибели парameций показала, что все они в концентрациях до 0,1 г/л не являются токсичными, а наоборот, обеспечивают рост их выживаемости.

Оценка физиологической активности ГК I-X по интенсивности пенообразования дрожжей

показала их положительный эффект в концентрации 0,1 г/л для большинства образцов за исключением I, VI и VII, которые стимулировали пенообразование в более низких концентрациях. Для исходных ППП также характерны положительные эффекты, наиболее выраженные для препаратов IV-VIII (таблица 3).

Таблица 3

Исследование биологической активности ПГП (без переосаждения ГК)

Концентрация, г/л	VIII		IV		«POWHUMUS»	
	высота столбца пены, см	ср. кол-во инфузорий после 24 ч, шт	высота столбца пены, см	ср. кол-во инфузорий после 24 ч, шт	высота столбца пены, см	ср. кол-во инфузорий после 24 ч, шт
контроль	0,25	10,0	0,25	10,0	0,25	10,2
0,1	0,12	14,6	2,55	11,6	0,55	15,6
0,5	0,15	17,2	4,10	21,2	0,63	21,4
1	2,30	12,8	5,77	9,6	0,73	17,8
1,5	0,95	1,60	4,62	5,0	0,03	9,6
2	1,22	2,60	1,97	0	0,13	10,2

Проведено несколько серий экспериментов по биотестированию переосажденных ГК I-X по биометрическим параметрам всхожести семян озимой пшеницы. В отдельных сериях прирост всхожести составлял 14-34% к контролю (исключение ГК X), прирост массы проростков 10-27%, корней 5-31% (исключение ГК II) (рисунок 1). Между результатами биотестирования и структурными дескрипторами ГК I-X количественной связи не обнаружено. Это вполне ожидаемо ввиду существенно разного фрагментного состава ГК (таблица 2) и содержания в них связанных неорганических элементов (2-25%, таблица 1).

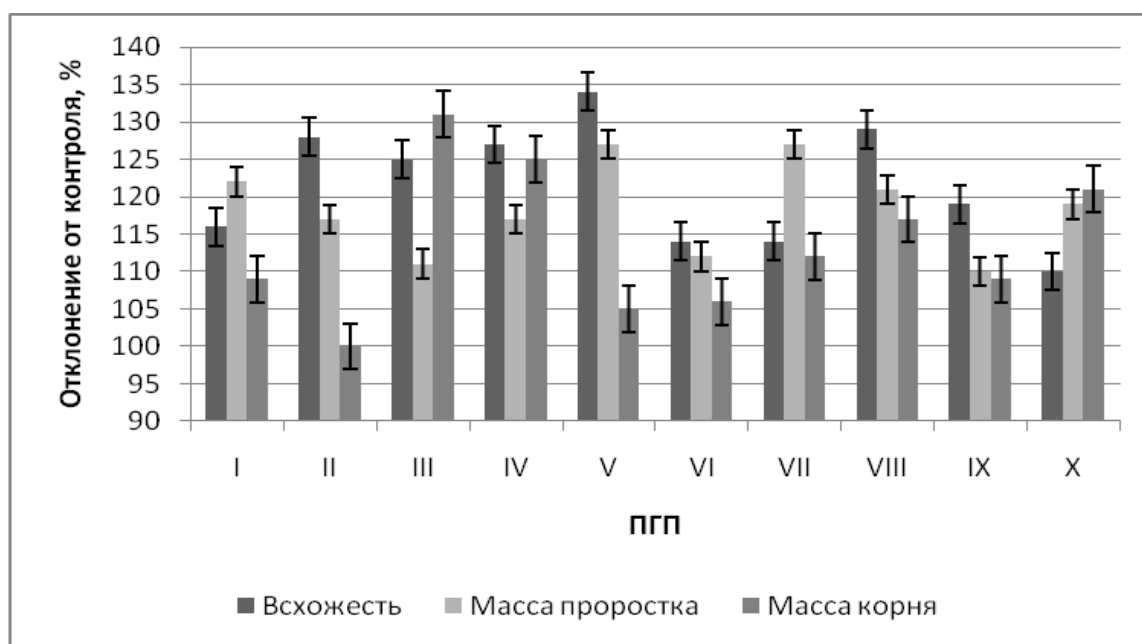


Рисунок 1. Исследование влияния ГК, выделенных из ПГП, на всхожесть и рост озимой пшеницы (контроль - дистиллированная вода - принят за 100%).

Анализ совокупности результатов по лабораторному биотестированию ПГП и ГК I-X позволил выбрать ПГП I, IV и VIII, как наиболее перспективные для продолжения испытаний в полевых условиях.

Испытания проводились в ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства РАСХН.

Урожайность винограда определяется сортовыми особенностями, нагрузкой глазками, побегами и соцветиями (гроздьями), которую оставляют на кустах во время обрезки, уровнем агротехники, применением удобрений. Испытания ППП заметно повлияли на формирование урожая 2010 года, для которого были характерны неблагоприятные климатические условия (засуха) (таблица 4).

Таблица 4

Влияние обработок винограда ППП различного генезиса на урожай и его качество, % (контроль принят за 100 %)

ППП	Урожай с 1 га	Гроздей на кусте	Масса грозди	Сахаристость ягод
1 Каберне- Совиньон				
I	119	139	85	89
2 Первенец Магарача				
I	118	99	119	100
IV	104	89	117	105
VIII	139	121	115	104
3 Дунавски лазур				
I	156	145	107	96

Из сравнения данных таблицы 4 следует, что даже если принимать их с максимальной для биотестирования допустимой ошибкой $\pm 10\%$, ППП I и VIII обеспечивают увеличение урожая. Сахаристость и число гроздей изменяется разнонаправлено.

Данные агробиологических учетов 2011 года на сортах винограда Августин и Мерло подтвердили эффективность ППП I, IV и VIII по сорту Августин (рост урожая 35-41%) и по сорту Мерло (11-16 %). Во всех случаях обработки оба сорта увеличивали число соцветий на 2-4 грозди, среднюю массу гроздей по сорту Августин от 393 г в контроле до 465 г при использовании ППП IV. По сорту Мерло рост средней массы грозди колеблется в пределах 15-29 г при использовании ППП. Полученное увеличение сахаристости на 1,1-2,5 г/100 см³ по отношению к необработанному контролю не менее существенно, т.к. позволяет значительно улучшить качество производимой винопродукции.

Представляется целесообразным продолжение экспериментов по сравнительному биотестированию в лабораторных и полевых условиях ППП I, IV и VIII, как широкодоступных и различных по источнику сырья (торф, уголь, лигнин) ППП с доказанной эффективностью.

Раздел 4. Исследование серии образцов гуминового препарата «Лигногумат», полученных в результате промышленного эксперимента

Количественно проанализирована с помощью спектроскопии ЯМР ¹³C серия образцов ППП, полученных в ходе промышленного эксперимента по преобразованию лигносульфоната - отхода целлюлозно-бумажной промышленности (таблица 5). Ранее при исследовании серии ГК из окисленных

бурых углей (Г.А. Калабин и А.Д. Дашицыренова) получено корреляционное уравнение, описывающее связь дескрипторов их молекулярного строения и эффективности стимуляции ими роста колеоптиля пшеницы (ФА), которое имело следующий вид:

$$\text{ФА} = 1.00 + 7.5(\text{COO}) + 44.7(\text{C}_{\text{ар}}\text{O}) - 8.9(\text{C}_{\text{ар}}\text{C}, \text{H}) - 13.7(\text{C}_{\text{алк}}\text{O}), \quad r = 0.96$$

Подстановка в это уравнение представленных данных из количественных спектров ЯМР ^{13}C дает для них высокие значения ФА – в 2-3 раза выше таковой для ранее изученных ПГП из окисленных углей. Наибольшую активность должны проявлять образцы VIII-4 и VIII-8, а наименьшую – VIII-1. Это инициировало проведение прямого эксперимента, т.е. сопоставления дескрипторов фрагментного состава с результатами проведенного лабораторного тестирования этих ПГП, выполненного на семенах редиса.

Таблица 5

Фрагментный состав, прогнозная физиологическая активность (ФА_{пр}) и результаты биотестирования некоторых проб ПГП «Лигногумат»

№ образца	Содержание структурных фрагментов по диапазонам спектра ЯМР ^{13}C , %					ФА _{пр}	Прирост биомассы к контролю, %		
	195-165 м.д., COO	165-140 м.д., Саp O	140-100 м.д., Саp C, H	100-50 м.д., Салк O	50-0 м.д., Салк		корней	проростков	общий
VIII-1	2	20	34	40	4	1,81	4±3	1±3	1±3
VIII-4	7	19	39	22	13	3,78	32±6	1±1	6±2
VIII-6	10	18	36	24	12	3,27	10±6	8±2	8±2
VIII-8	12	18	32	25	13	3,75	5±2	13±2	11±2
VIII-12	10	19	33	27	11	3,66	18±9	11±0,4	12±1
VIII-14	7	17	36	28	12	2,29	2±7	3±0,8	2±1

По значениям отклонений ФА образцов ПГП «Лигногумат» от контроля (проведение проращивания без добавления препарата) и данным из ЯМР ^{13}C , проведен многомерный корреляционный анализ, в результате которого получено следующее двухпараметровое уравнение:

$$\text{ФА} = -0,49(\pm 0,06) + 1,62(\pm 0,10)(\text{COO}) + 2,28(\pm 0,31)(\text{C}_{\text{ар}}\text{O}), \quad r^2 = 0,990$$

В полученном уравнении коэффициенты перед аргументами COO и СаpO отличаются незначительно. В уравнении, представленном в начале этого раздела, коэффициент для фрагмента СаpO в 6 раз больше, чем для фрагмента COO (44.7 и 7.5, соответственно). Такая особенность обусловлена тем, что в лигногуматах помимо ОН-групп, присоединенных к ароматическому кольцу и повышающих активность гуминовых препаратов, за сигналы в области СаpO ответственны также заместители ОСН₃, ОСН₂, ОСН и ОС, характерные для лигниновых молекул. Последнее, как правило, не приводит к повышению физиологической активности лигногуматов. Поэтому по полученным коэффициентам первого (общего для различных угольных объектов, содержащих мало таких групп) и второго уравнений можно оценить содержание гидроксиароматических фрагментов СаpОН, как 10-20% от суммы СаpO-Салк и Саp-O-H. Такое заключение логично следует из абсолютных значений содержания фрагментов

СалкО (20-30%) и СаpО в лигногуматах. Характерно, что основные изменения фрагментного состава наблюдаются между образцами VIII-1 (исходное сырье) и VIII-4 (окисление в течении 30 минут). При этом утраивается содержание сопряженных фрагментов СОО и Салк за счет существенного уменьшения содержания фрагментов СалкО, что можно представить итоговой гипотетической схемой преобразования: СалкО-Саp→Салк-СОО-Саp.

Для ее подтверждения необходимо знать технологические условия производителей лигногуматов (катализатор, иные особенности, нам неизвестные).

Главный результат этого раздела – найденные количественные связи ФА и содержания в лигногумате активных центров открывает большие потенциальные возможности ЯМР ^{13}C для прогнозирования рост-стимуляции ГВ без проведения биотестирования в рамках отдельных серий генетически родственных ПГП.

Раздел 5. Стимуляция прорастания семян пшеницы ПГП и водой с пониженным содержанием дейтерия в благоприятных и стрессовых условиях

Общепринятым растворителем при использовании ПГП в виде растворов является вода. Имеются сведения (Petrus-Vancea et al., 2010, Cachiță-Cosma et al., 2002, Рахманин с соавт., 2004), что вода с пониженным по отношению к природному уровню содержания изотопа ^2H оказывает рост-стимулирующие эффекты при проращивании растений. Эти результаты мотивировали наш интерес к вопросу о возможности комплементарности эффектов ПГП и изотопно-облегченной воды на стимуляцию развития семян растений на примере пшеницы.

Серией экспериментов установлена статистическая незначимость эффектов ПГП IV и воды с пониженным содержанием дейтерия на всхожесть семян пшеницы, обусловленная высокими значениями (>85% от числа семян в пробе) этого показателя в контроле (рисунок 2).

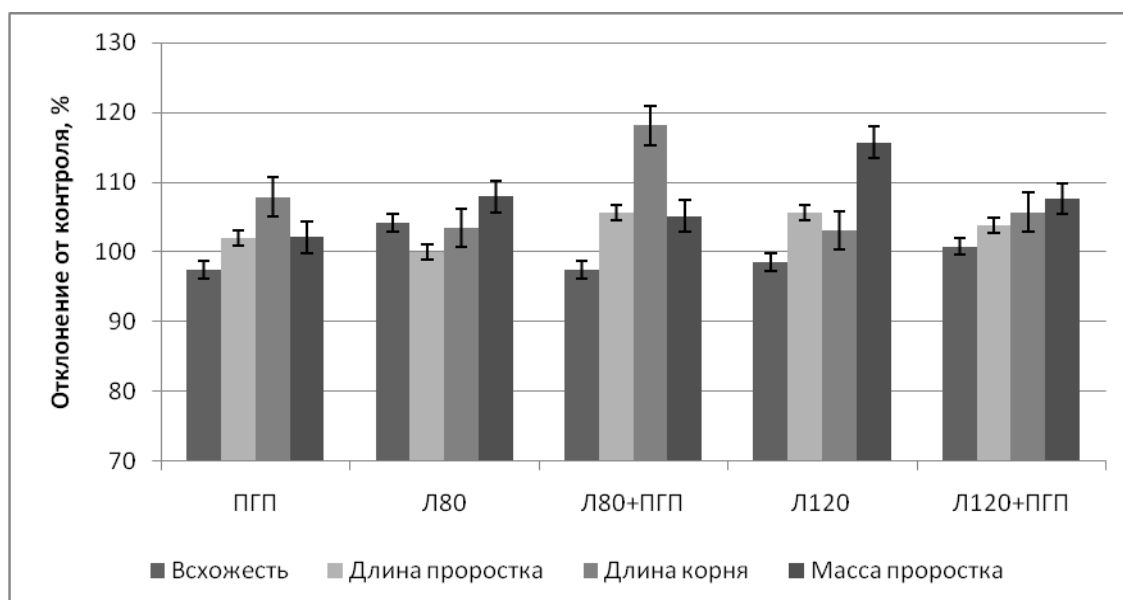


Рисунок 2. Результаты одного из биотестирований в оптимальных условиях. Контроль (дистиллированная вода) – 100%, концентрация ПГП IV – 50 мг/л.

Наибольший эффект в благоприятных условиях эксперимента имели образцы с содержанием изотопа ^2H 80-120 ppm, которые использовались в дальнейших опытах, однако статистическая надежность этих результатов остается под вопросом. Совокупность результатов обусловлена близостью к предельному ресурсу рост-стимуляции для выбранного объекта и условий биотестирования. Проведение серии опытов по проращиванию семян в менее благоприятных условиях путём понижения температуры на 5°C не проявило себя как заметный стрессовый абиотический фактор.

Добавление в тест-растворы гербицида глифосат приводит к резкому уменьшению (на 40-50%) показателей прорастания. Это позволяет в условиях искусственно созданного стрессового фактора проявиться рост-стимулирующему эффекту изотопно-облегченной воды и ПГП IV (рисунок 3). В отношении всхожести семян, ДП, ДК и МП добавление только ПГП или использование только воды Л120 дают положительные эффекты менее 10%. Использование Л80 увеличивает эти показатели до 10-25%, а добавление ПГП IV к Л80 проявилось исключительно в увеличении ДК (15%). Синергизм эффектов ПГП IV и Л120 (превосходит 150%).

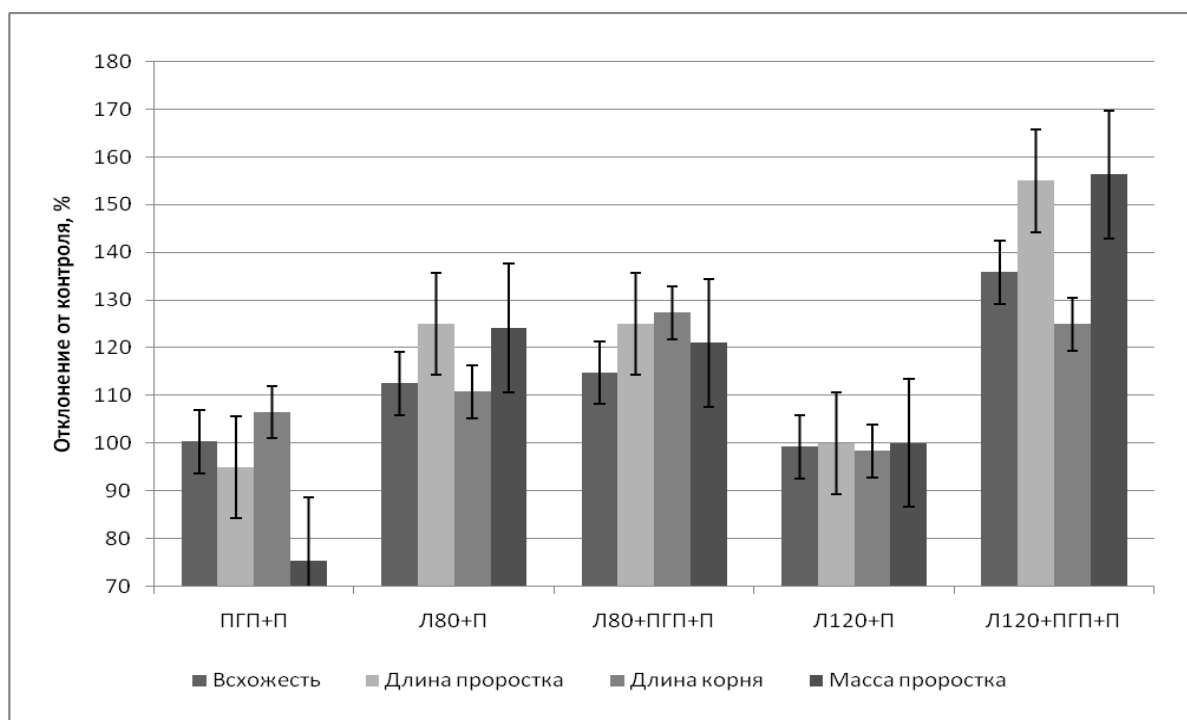


Рисунок 3. Результаты биотестирования в стрессовых условиях. Контроль (раствор гербицида, П) – 100%, концентрация ПГП IV – 50 мг/л, П – 60 мг/л.

Результаты других серий опытов с вариацией ПГП, их концентраций в воде с пониженным содержанием изотопа ^2H , экспозицией процедуры проращивания подтвердили наличие синергизма рост-стимулирующих эффектов гуматов и воды с пониженным (относительно природного для центрального региона России) содержанием изотопа ^2H .

Анализ механизма антистрессового действия сочетания ПГП и воды, обедненной ^2H , весьма затруднителен. С одной стороны, активность ПГП, т.е.

изменение процесса синтеза фитогормонов, отвечающих за распознавание и регулирование генетических процессов, изучена недостаточно. С другой, столь незначительное понижение изотопного содержания ^2H в воде (до значения, характерного для Северного полюса – 120 ppm) вряд ли могут влиять на ее свойства в масштабе известных отличий воды $^1\text{H}_2\text{O}$ от $^2\text{H}_2\text{O}$, поскольку, исходя из линейной интерполяции, они должны изменять свойства воды не более чем на 0,001%. Поэтому изучение синергизма рост-стимулирующих эффектов ПГП и воды с пониженным содержанием изотопа ^2H на прорастание семян в условиях стресса требует дополнительных исследований на других культурах и условиях биотестирования. Возможно, оно может найти практическое применение для повышения качества такого процесса для семян особо ценных культур.

Раздел 6. Новый алгоритм изучения состава, строения и классификации сырьевой природы ПГП методами количественной спектроскопии ЯМР

Идентификация сырьевой основы ПГП путём измерения методами ЯМР их количественного фрагментного состава, выявление в них добавок индивидуальных минеральных компонентов и физиологически активных органических соединений, наконец, предсказание их рост-стимулирующей активности без биотестирования осуществлялись с использованием разработанного оригинального алгоритма их комплексного анализа методами спектроскопии ЯМР, состоящего из нескольких основных этапов.

Этап 1 - количественная оценка водородсодержащих фрагментов и выявление примесей индивидуальных органических соединений. Осуществляется путём регистрации спектров ЯМР ^1H на рабочей частоте 600 МГц в режиме подавления сигнала растворителя. Спектр гумата, как стохастической многокомпонентной системы, содержит плохо разрешенные широкие сигналы алифатических и ароматических протонов. Присутствие в спектре ПГП из угля и торфа узких синглетов и мультиплетов – свидетельство и количественная мера добавления в гуматы каких-то индивидуальных веществ, показывающее, что такие препараты не являются гуматами. Однако, подобные сигналы характерны для ПГП из лигнина, вермикомпостов, а также почв (рисунок 4).

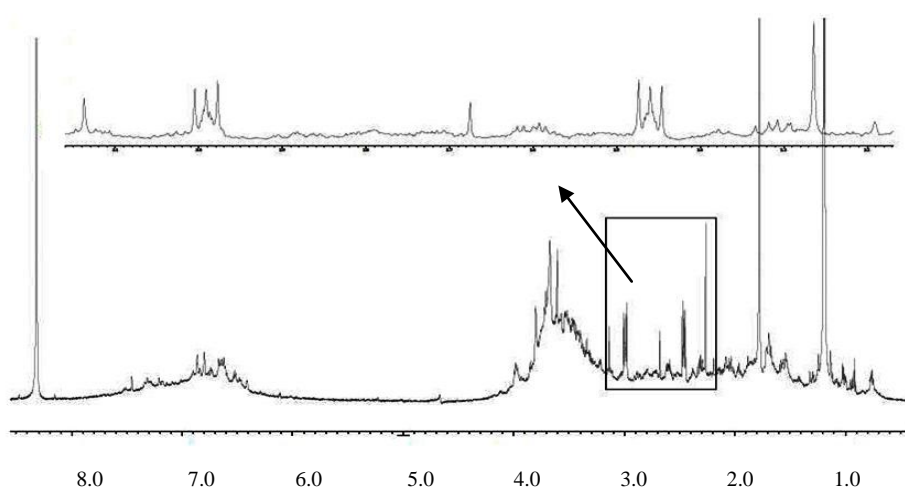


Рисунок 4. Спектр ЯМР ^1H с подавлением сигнала воды (4,7 м.д.) водного раствора ПГП VIII, содержащего эндогенные индивидуальные окси- и аминокислоты (узкие сигналы).

Этап 2 - выявление примесей минеральных удобрений по спектрам ЯМР ^{14}N , ^{31}P и ^{39}K за время эксперимента до 30 минут. Гуматы не должны содержать индивидуальных сигналов в спектрах ЯМР этих ядер (исключение - сигнал ^{39}K , если в качестве щелочи использовался КОН). Их присутствие – следствие фальсификации ПГП, если эти добавки не регламентированы. Спектры ЯМР ^{31}P и ^{39}K позволяют обнаруживать соединения с содержанием этих элементов на уровне 0,01% вес. в ПГП. Уровень обнаружения азота методом ЯМР ^{14}N в случае иона NH_4 подобен, но для многих других азотсодержащих фрагментов ниже, т.к. ширина сигнала ^{14}N существенно зависит от симметрии окружения этого квадрупольного ядра.

Этап 3 - выявление сырьевой природы гумата на основе количественных спектров ЯМР ^{13}C . Как наиболее трудоемкий (10 часов и более), его целесообразно выполнять, если два первых этапа подтвердили принадлежность препарата к гуматам, ввиду отсутствия чужеродных сигналов. В противном – спектр не информативен, что может привести к неправильному установлению сырьевой природы гумата, а также невозможности использовать результаты из ЯМР ^{13}C для прогнозирования их эффектов. Рисунок 5 демонстрирует чувствительность спектра ЯМР ^{13}C к присутствию экзогенной примеси.

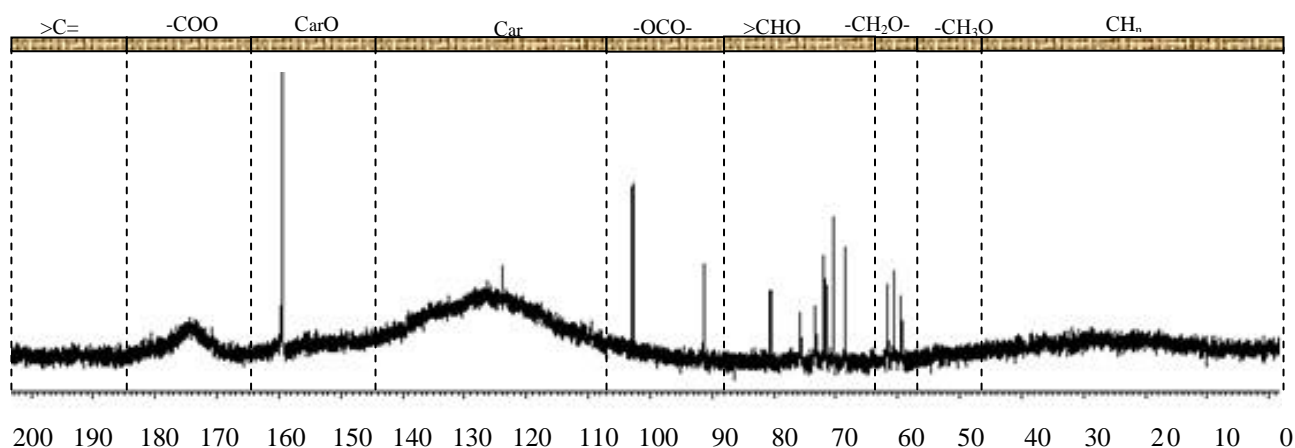


Рисунок 5. Количественный спектр ЯМР ^{13}C водного раствора ПГП IV (5 % масс.) с добавкой рост-стимулирующего препарата «Гетероауксин» (в концентрации 0,001 моль/л). Время регистрации спектра 12 часов.

Для построения рабочей модели идентификации сырьевой природы гумата по спектрам ЯМР использована совокупность количественных спектров ЯМР ^{13}C гуминовых препаратов различного происхождения. В выборку из 87 образцов вошли препараты, полученные из нативных и обработанных различным образом образцов лигнина, угля, торфа. Доступные нам ПГП из вермикомпостов были немногочисленны, частично оказались отбракованы по результатам двух первых этапов, их спектры ЯМР ^{13}C не характерны и далее не рассматривались, как и ГВ почв.

Статистический анализ дескрипторов фрагментного состава из спектров ЯМР проведен с помощью кластерного анализа методом К ближайших соседей (kNN, k nearest neighbors). Образцы разделились на 3 кластера. На рисунке 6 показано соотношение образцов различного происхождения в процентах в каждом из трех полученных кластеров.

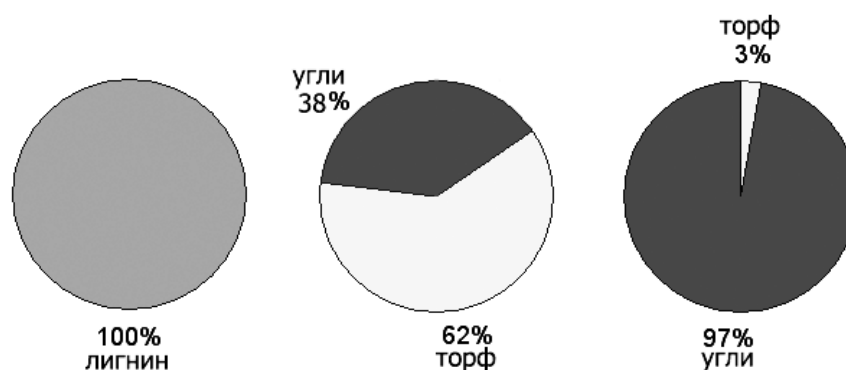


Рисунок 6. Результаты кластерного анализа данных спектроскопии ЯМР ^{13}C гуминовых препаратов.

Полученные кластеры отражают стадии превращения растительных остатков в торф, а затем в бурые угли. Статистический анализ исследованной выборки образцов показал, что даже результаты моделирования без обучения с хорошей точностью предсказывают генезис гуминовых препаратов. Модель с обучением позволила достичь прогнозирования генезиса препаратов с ошибкой менее 5 %. Такой анализ нельзя осуществить иными методами измерений и способами обработки ввиду высокой сложности исследуемого объекта и необходимости получения количественной информации о фрагментном составе.

Этап 4 – прогнозирование относительных рост-стимулирующих свойств ППП из однородного сырья по верификационным корреляционным соотношениям вида «состав-свойство».

Таким образом, для сертификации любых ППП нами предлагается уникальная методология анализа и представления результатов с помощью измерения дескрипторов строения, удовлетворяющих критериям фундаментальности, воспроизводимости и специфичности. Использование внутренних стандартов позволяет при необходимости получить абсолютные значения содержания в ГВ атомов водорода и углерода, а использование водорастворимых парамагнитных релаксантов – сократить экспериментальную трудоемкость получения количественных спектров ЯМР ^{13}C .

III ВЫВОДЫ

1. Анализ информации о стимуляции гуминовыми веществами роста и развития растений показал ее несогласованность и возможность реализации ряда независимых механизмов: окисление ризосферы, активация протонного насоса плазматических мембран, влияние на транспорт нитратов или пролиферацию корневой системы.
2. Впервые осуществлено сравнительное изучение токсичности, рост-стимулирующей активности и дескрипторов строения серии гуминовых кислот, выделенных из промышленных гуминовых препаратов различного генезиса. Охарактеризованы их эффекты на прорастание и развитие семян пшеницы в лабораторных условиях.
3. Показана высокая эффективность ряда промышленных гуминовых препаратов различного генезиса (торф, уголь, лигнин) на урожайность винограда в полевых условиях.
4. Количественно изучен процесс преобразования фрагментного состава промышленного лигносульфоната в гуминоподобное соединение «Лигногумат». Установлено, что относительное содержание карбоксильных и ароксильных фрагментов оказывает доминирующее влияние на рост-стимулирующие свойства.
5. Обнаружен синергизм рост-стимулирующих эффектов гуминовых веществ и воды с пониженным содержанием изотопа ^2H (80-120 ppm) в условиях искусственно созданного биотического стресса, не выявленный в благоприятных условиях развития семян пшеницы.
6. Разработан алгоритм классификации и сертификации промышленных гуминовых препаратов на основе совокупности количественных методов спектроскопии ЯМР ^1H , ^2H , ^{14}N , ^{31}P , ^{17}O и ^{39}K , позволяющий устанавливать их состав и строение, идентифицировать примеси, выявлять подлинность и прогнозировать некоторые свойства без проведения дополнительных исследований.
7. Показано, что совокупность разработанных и использованных методик биотестирования и спектроскопии ЯМР может способствовать созданию единой системы стандартизации промышленных гуминовых препаратов.

IV СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

* - публикации в изданиях перечня ВАК РФ

1. *Подгорский В.В. Новые направления исследований в области спектроскопии ЯМР в РУДН / В.В. Подгорский, Б.Р. Садыков, А.В. Чертков, Л.А. Боронина, Н.Г. Баканова, Л.И. Куркиева, Г.А. Калабин // Вестник Российского университета дружбы народов, серия Экология и безопасность жизнедеятельности. - 2010. - № 1. – С.5-13.

2. Баканова Н.Г. Новый алгоритм идентификации сырьевой и технологической природы промышленных гуминовых препаратов для с/х методами спектроскопии ЯМР / Н.Г. Баканова, Б.Р. Садыков, В.В. Подгорский // Материалы Всероссийской научной конференции XIV Докучаевские молодежные чтения «Почвы в условиях природных и антропогенных стрессов» / Под ред. Б.Ф. Апарина. – СПб.: Издательский дом С.-Петербургского государственного университета, 2011. – С. 193-195.

3. Калабин Г.А. Идентификация промышленных гуминовых препаратов и прогнозирование некоторых их свойств методами количественной спектроскопии ЯМР / Г.А. Калабин, Б.Р. Садыков, Н.Г. Баканова // Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях. Сборник тезисов V Всероссийской конференции при участии зарубежных ученых с элементами школы для молодых исследователей, Казань 20-22 апреля 2011 г. – Казань, 2011. – С. 153-154.

4. Калабин Г.А. Применение координационных соединений для расширения возможностей спектроскопии ЯМР высокого разрешения в жидкости / Калабин Г.А. Садыков Б.Р., Баканова Н.Г., Горяинов С.В. Кушнарев Д.Ф. // Спектроскопия координационных соединений. Сборник тезисов VII Международной конференции, Туапсе 19-23 сентября 2011 г.. – Туапсе, 2011. - С. 15-16.

5. Баканова Н.Г. Возможность синергизма рост-стимулирующих эффектов гуминовых веществ и воды с пониженным содержанием дейтерия на прорастание семян пшеницы в благоприятных и стрессовых условиях / Баканова Н.Г., Тимаков А.А., Торгаутова Г., Калабин Г.А. // Актуальные проблемы экологии и природопользования: сб. науч. тр - Вып. 14. – М.: РУДН, 2012. Ч. 1- С. 86-93.

6. *Баканова Н.Г. Взаимосвязь молекулярного строения и рост-стимулирующей активности гуминовых веществ из лигнина / Н.Г. Баканова, Г.А. Калабин, В.В. Подгорский // Вестник Российского университета дружбы народов, серия Экология и безопасность жизнедеятельности. - 2012. - № 2. – С.13-18.

7. Bakanova N.G. Possibility for synergic growth-stimulating effects of humic substances and water with low isotope ²H content on the germination of wheat seeds under favorable and stress conditions / Bakanova NG, Timakov AA, Smirnov AI, Kalabin GA // Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment. - Springer-Verlag GmbH China, 2012. - pp 627-629.

8. Bakanova N.G. Lignohumate – new results of NMR and MS / Natalia Bakanova, Sergey Goryainov, Gennady Kalabin, Rodion Poloskin, Oleg Gladkov, Olesya Osipova // Natural and engineered nanoparticles in clean water and soil technologies. Abstracts of the Second International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies, Moscow October 29 – November 2, 2012. – Moscow: Lomonosov Moscow State University, 2012. – 6 p.

9. Баканова Н.Г. Стимуляция прорастания семян пшеницы водой с пониженным содержанием дейтерия и гуминовым препаратом в благоприятных и

стрессовых условиях / Баканова Н.Г., Тимаков А.А., Калабин Г.А. // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тезисы докладов Международной конференции, Москва 4-6 февраля 2013 г. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – С. 15.

10. Неизвестная Н.Г. Новые результаты исследования Лигногумата методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии / Неизвестная Н.Г., Горяинов С.В., Калабин Г.А. // Актуальные проблемы экологии и природопользования: сб. науч. тр / отв. ред. Н.А. Черных. - Вып. 15. – М.: РУДН, 2013. - С. 100-103.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Выражаю признательность моему научному руководителю профессору кафедры системной экологии РУДН, д.х.н., Г.А. Калабину за неоценимую помощь на всех этапах исследования, особую благодарность выражаю начальнику научно-исследовательского отдела группы компаний «ФЛЕКСОМ» Д.Б. Артюхову – за предоставление ряда ППП, методики выделения ГК и биотестирования, сотрудникам ООО НПО «РЭТ» - за предоставленные образцы ППП «Лигногумат», ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства РАСХН – за помощь в полевых испытаниях ряда ППП, к.х.н. А.А. Тимакову – за предоставленные образцы воды с пониженным содержанием дейтерия, д.б.н. Д.И. Стому и А.Н. Пономаревой – за консультации по методическим вопросам.

Неизвестная Наталья Геннадьевна (Россия)

Изучение состава и свойств промышленных гуминовых препаратов различного генезиса методами биотестирования и количественной спектроскопии ЯМР

Выполнено сравнительное изучение токсичности, рост-стимулирующей активности и дескрипторов строения серии промышленных гуминовых препаратов, охарактеризована их физиологическая активность в лабораторных и полевых условиях. Выявлена связь между дескрипторами фрагментного состава гуминового препарата «Лигногумат» и его рост-стимулирующей активностью в отношении семян редиса. Изучена рост-стимулирующая активность воды с пониженным относительно природного содержанием изотопа ^2H и промышленного гуминового препарата из угля на процесс прорастания семян пшеницы в благоприятных и стрессовых условиях. При искусственно созданном абиотическом стрессе (использование гербицида) обнаружено проявление синергизма двух факторов. Статистический анализ данных спектров ЯМР ^{13}C гуминовых веществ различного генезиса показал применимость метода для идентификации их сырьевой принадлежности.

Neizvestnaya Natalia G. (Russia)

Study of the composition and properties of commercial humic products of different origin by biotesting methods and quantitative NMR spectroscopy

A comparative study of the toxicity, the growth-promoting activity and the descriptors of the fragment structure of commercial humic products, characterized by their biological activity in laboratory and field trials. Relationship between the descriptors of fragment structure of humic product «Lignohumat» and biological activity against radish seeds was found. The growth-promoting activity in the water with a low content of deuterium compared to natural abundance of the isotope ^2H in water and commercial humic product from coal in the germination of wheat seeds in favorable and stress conditions was studied. With artificially created abiotic stress (herbicide) the synergies expression growth-promoting effect of the two factors was showed. Statistical analysis of the NMR spectra ^{13}C humic substances of different origin has shown the applicability of the method for the identification of their raw material supplies.