

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФА

О. С. Половецкая

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н.Толстого

Поступила в редакцию 02.10.2014 г.

Аннотация. Исследована взаимосвязь состава и строения гуминовых кислот торфа Ярославской области (Брейтовский р-он, с. Брейтово) с их биологической активностью с целью выявления основных функциональных групп, оказывающих стимулирующее действие на рост и развитие сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: торф, гуминовые кислоты, физико-химические характеристики, биологическая активность.

Abstract. The interrelation of the composition and structure of peat humic substances Yaroslavl region (Breytovsky district, S. Breytovo) with their biological activity with the purpose of identifying key functional groups, has a stimulating effect on the growth and development of agricultural plants.

Keywords: peat, humus substances, physico-chemical characterization, biological activity.

Месторождения каустобиолитов являются практически неограниченным источником гуминовых веществ (ГВ) - уникального продукта, который играет ключевую роль в процессе формирования и функционирования почвы и может быть использован для решения многих сельскохозяйственных и экологических проблем.

Территория, которая выбрана для изучения ГВ - Брейтовский район, с. Брейтово - расположена в северо-западной части Ярославской области на побережье Рыбинского водохранилища.

Основные виды ресурсов Ярославской области – это пески, песчано-гравийные смеси, глины, керамзитное сырьё – основа для производства бетонов, строительных растворов, кирпича. Также осуществляется добыча сырья для производства минеральных красок.

Кроме сырья для производства строительных материалов большую площадь на территории Ярославской области занимают торф и сапрпель. По состоянию на 1 января 2000 г. на территории области выявлено, разведано и учтено 931 торфяное месторождение общей площадью в границах

промышленной глубины торфяной залежи 81,1 тыс. га с запасами торфа 368,9 млн.т. Все крупные торфяные месторождения разведаны детально и запасы торфа по ним утверждены. Однако 306 торфяных месторождений выявлены на стадии поисков и запасы торфа по ним отнесены к прогнозным [1].

Поэтому, изучение химической природы и особенностей формирования гуминовых кислот (ГК), выделенных из торфа Ярославской области (Брейтовский район, с. Брейтово), представляет значительный интерес.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования использованы торф Ярославской области и препараты ГК, выделенные из него.

Для определения выхода ГК от остатка топлива, освобожденного от битумов, брали навеску, которую трехкратно обрабатывали 0,1 н раствором NaOH при температуре 80 °С в течение 2 ч при гидромодуле 1:150. Фильтраты подкисляли 10%-ным раствором HCl до pH 2. Образовавшийся осадок ГК отмывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на хлорид-ионы и высушивали при комнатной температуре в эксикаторе.

Технический анализ исходного сырья проводили по методикам [2-3], ботанический состав и степень разложения торфа определяли микроскопическим методом П.Д.Варлыгина с использованием определительных таблиц Н.И.Пьявченко и А.В. Пичугина [4].

Элементный анализ выполняли на автоматическом анализаторе фирмы «Carla Erba» модель 1100. Условия: температура в реакторе окисления, заполненного $\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{CuO}$, 1100 °С; газ-носитель - гелий. Температура в восстановительном реакторе 650 °С, наполнитель - медная стружка. Температура хроматографической колонки 127 °С, стационарная твердая фаза – хромосорб-102, детектор – катарометр по теплопроводности. Окислитель – AgMnO_4 , стандарт – 9-нитроантрацен.

Регистрацию спектров проводили на ИК-Фурье спектрометре Impact 400d (фирма Nicolet, США) в области спектра 4000-400 cm^{-1} с образцами в таблетках KBr. Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах проводилось в соответствии с [5].

Рентгено-флуоресцентный анализ выполняли на энергодисперсионном спектрометре «Oxford instruments ED-2000» при следующих условиях: для «средних» элементов - рентгеновская трубка с родиевым анодом, фильтр первичного рентгеновского излучения тонкий родиевый, напряжение на трубке 35 кВ, ток 31 мА, время съемки 300 с; для «тяжелых» элементов - фильтр первичного рентгеновского излучения толстый медный, напряжение на трубке 50 кВ, ток 242 мА, время съемки 300 с; для «легких» элементов - фильтр не использовали, напряжение на трубке 5 кВ, ток 485 мА, время съемки 300 с.

Молекулярная масса определялась методом криоскопии по Рау в 2,4,6-трибромфеноле [6].

Функциональный состав определяли: фенольные гидроксилы модифицированным баритовым методом [7]; спиртовые гидроксилы, кетонные, хиноидные группы, йодное число по методике [8]; карбоксильные группы - модифицированным хемосорбционным методом с ацетатом кальция.

Гуминовые препараты тестировали на биологическую активность методом проростков по стандартным методикам. Рабочие концентрации растворов гуминовых препаратов торфа – 0,0001-0,01 %; подопытные культуры – горох сахарный сорта «Первенец», ячмень яровой сорта «Ратник», пшеница озимая сорта «Московская 39». Семена в чашках Петри обрабатывали растворами ГВ и помещали в термостат при температуре 25°С. Повторность опыта 3-кратная. Контрольный вариант обрабатывали H_2O . На 3-й день эксперимента определяли всхожесть и энергию прорастания семян, на 7-й – их морфологические характеристики: среднюю длину ростков и корней, количество и суммарную длину корней.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные характеристики исследуемого торфа приведены в табл. 1. Исследованный образец торфа характеризуется высокими значениями влажности и зольности, высокой степенью разложения, растительные остатки незаметны, торф легко продавливается и сильно мажет руки.

Исследованный торф относится к гипновому низинному или переходному типу, так как содержит в своём ботаническом составе более 85% остатков мхов, из которых более половины составляют остатки зелёных мхов подкласса Bryales. Данный торф образовался в условиях повышенной обводнённости и минерализации питающих вод.

Таблица 1

Общая характеристика, ботанический состав и степень разложения торфа

Влажность, Wa %	Зольность, A%	Степень разложения, R%	Степень сохранности растительных остатков	Продавливание при сжимании и мягкость при растирании	Ботанический состав, %
47,32	48,86	более 75	Растительные остатки незаметны	Легко продавливается и сильно мажет руки	Древесина хвойных, 5 Кора березы, 2 Хвощ, 1 Тростник, 5 Камыш, + Другие травы, 2 Зеленые или гипновые мхи (стебли и спорангии), 85 Сфагновый мох, +

Рентгено-флуоресцентным анализом установлено, что основным зольным элементом торфа является железо (48.24 масс.% оксида железа(III) от минеральной части) с незначительным вкладом в минеральную часть других элементов, в том числе магния, кальция, кремния, алюминия и т.д. (табл. 2), что согласуется с современными представлениями о генезисе торфа, образовавшегося путем глубоких превращений исходного биологического материала при активной деятельности микроорганизмов [9].

Исследованный торф характеризуется высоким содержанием ГК – 34% в пересчете на исходное воздушно-сухое сырье.

По данным элементного анализа полученные торфяные ГК имеют высокие значения $N/C_{ат}$ (1.26) и $O/C_{ат}$ (0.83) (табл. 3). Величина $N/C_{ат}$, указывающая на соотношение алифатических и ароматических компонентов, свидетельствует о том, что в ГК преобладают алифатические структуры с достаточно развитой периферической частью, имеющей ярко выраженный окисленный характер, что подтверждается значениями степени окисленности (+0.42) и ароматичности (3.17). Согласно данным табл. 3, повышенное содержание кислорода находит отражение в накоплении и характере кислородсодержащих функциональных

групп; соотношение $N/C_{ат}$ равное 0.055 показывает, что молекулы ГК достаточно сильно обогащены азотом.

Суммарное содержание функциональных групп, оказывающих высокое влияние на реакционную способность ГК, и как следствие уровень их биологической активности, в данном препарате составило 17.08 (мг-экв/г).

Таким образом, данные элементного и функционального анализов позволяют предположить, что выделенные ГК будут биологически активными.

ГК, выделенные из торфа, были проанализированы методом ИК Фурье-спектроскопии. Спектр поглощения приведен на рис. 1.

В области 3200-3600 $см^{-1}$ (максимум п.п. 3420.8 $см^{-1}$) проявляются валентные колебания ОН-групп, связанных межмолекулярными водородными связями. Малоинтенсивные п.п. СН-, СН₂-, СН₃- групп алкановых и циклоалкановых структур идентифицируются в области (2920, 2850, 1450, 1320, 1220, 760 $см^{-1}$); принимая во внимание весьма слабую интенсивность п.п. (760 $см^{-1}$), длина алкильных цепей незначительна (1100-1000, 2920, 2850, 1450, 1320 $см^{-1}$), а именно (СН₂)_n, где $n \leq 4$ (2925, 2847 $см^{-1}$); п.п. метильных концевых групп-СН₃ проявляются при (2847 $см^{-1}$) и могут быть представлены ОСН₃-группами.

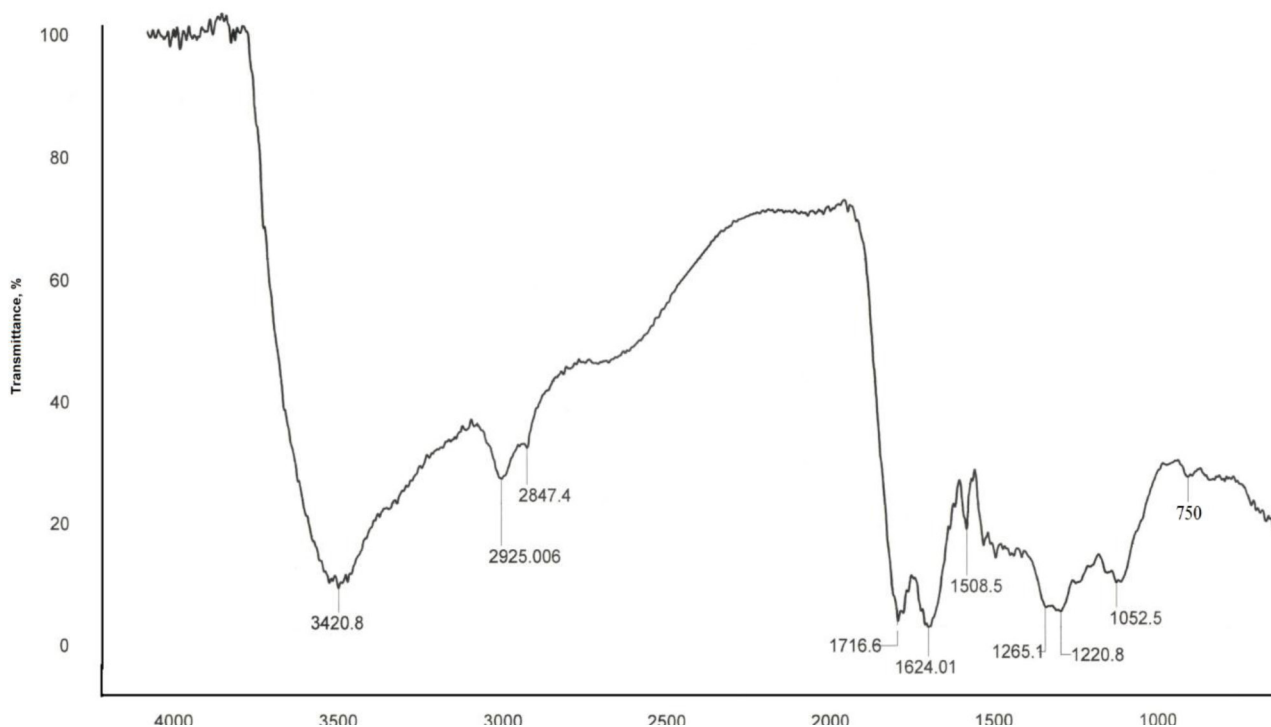


Рис. 1. ИК Фурье-спектр ГК торфа

Таблица 2

Элементный состав и состав минеральной части торфа

Элементный состав торфа, масс. % от daf											
C		H		N		O		S			
51.98		5.65		2.43		39.80		0.14			
Минеральная часть торфа (масс. % от минеральной части, в пересчете на следующие соединения)											
MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	SO ₃	CaO	MnO	Fe ₂ O ₃	Cr	TiO ₂	Zn	R ₂ O
0,69	2,56	18,33	2,34	1,99	19,68	0,38	48,24	0,005	0,19	-	1,40

Таблица 3

Физико-химические характеристики ГК торфа

Зольность ГК, %	Элементный состав, масс. % daf					H/C _{ат}	O/C _{ат}	N/C _{ат}	ω
	C	H	N	O	S				
3.2	43.7	4.6	2.8	48.5	0.4	1.26	0.83	0.055	0.42
Молекулярная масса, а.е.м.	Функциональный состав, мг-экв/г					Показатель ароматичности		Молекулярная формула	
	ФГ	ХГ	КрГ	КГ	ИЧ	N	B		
1796	5.35	6.73	3.25	1.75	1.85	3.17	0.50	C _{65,37} H _{82,61} N _{3,59} O _{54,42} S _{0,22}	

где: ω - степень окисленности; N - показатель ароматизации; B - число ароматических колец; функциональный анализ: ФГ- фенольные группы, ХГ – хиноидные, КрГ – карбоксильные, КГ – кетонные, ИЧ – иодное число.

В области (1720-1700, 1200-1029, 2750, 2680 см⁻¹) проявляются валентные колебания С=О карбоксильных и карбонильных групп, частично других карбонильных групп, например кетонных (1740-1720, 1700, 1685, 1100 см⁻¹), в т.ч.: ненасыщенных (1685 см⁻¹) и α-гидроксикетонов (1740-1700, 1636, 1540-1520 см⁻¹); карбоновых кислот (1300-1200, 1450, 1740, 2500-3000 см⁻¹).

Присутствие бензоидных структур (C=C_{ароматич.}) определяется наличием п.п. при 1640-1610, 1450-1500 см⁻¹ (максимум при 1624 см⁻¹).

О наличии углеводных структур свидетельствует п.п. 1100-1000 см⁻¹ (максимум при 1052 см⁻¹). Указанная п.п. соответствует деформационным колебаниям –ОН спиртовых групп, также характерна для СО-углеводов, циклических и алифатических эфиров.

Хорошо выраженные п.п. (1080-1029, 750 см⁻¹) относятся к полисахаридам, (1160-1060 см⁻¹) - простым эфирам, (1680-1665 см⁻¹) – хинонам, (1665-1639 см⁻¹) – свидетельствуют о наличии двух групп СО в одном кольце.

Наличие сопряженных пиррольных циклов порфиринов и хлорофиллов подтверждается п.п. (3550, 3520, 3421, 3040, 1520, 1040 см⁻¹); аминокислот п.п. (3130-3030, 1665-1620, 1545-1480, 840, 680 см⁻¹); первичных (3500, 3405, 3350, 3180 см⁻¹) и вторичных аминов (3450-3405, 3440-3421,

3325-3270 см⁻¹); первичных и вторичных амидов (п.п. амид II) (1680-1620, 1560-1520 см⁻¹).

В подтверждение того, что торфяные препараты ГК являются биологически активными, проведено исследование взаимосвязи между структурой ГК и биологической активностью с использованием программ PASSOnline, ISIS Draw 2.4, а также влияния концентрации растворов гуминовых препаратов на продуктивность и урожайность сельскохозяйственных растений методом проростков.

Компьютерная программа PASS, разработанная Институтом биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАНН, позволяет получать прогноз спектра биологической активности на основе структурной формулы химического соединения через Интернет [10].

Анализ полученных данных позволяет констатировать, что фрагменты молекул ГК с высокой степенью вероятности (P_a = 0.640 – 0.926) обладают выраженными противоопухолевыми, антибактериальными, противовирусными, антиканцерогенными свойствами, могут быть эффективны при лечении экзем, себореи, нервных расстройств, урологических, грибковых и других заболеваний.

Результаты прогноза активности фрагментов молекулы ГК послужили основой для проведения экспериментальных исследований биологической активности методом проростков.

Установлено положительное воздействие препаратов ГВ на все изучаемые показатели (табл. 4).

ГП хорошо воздействовали на горох сахарный и пшеницу озимую. Превышение над контролем достигало 30 %. При сравнении действия разных концентраций растворов стимулирующее действие было максимальным для концентрации 0,0005 %.

Горох сахарный сорт «Первенец». На энергию прорастания лучше влияли растворы с концентрациями ГВ 0,001 и 0,0005. На всхожесть и морфологию проростков также лучше влияли растворы с указанными концентрациями ГВ. Длина ростка была больше контрольной на 2,4% (концентрация 0,0005%); максимальное превышение над контролем отмечено для показателя «суммарная длина корней» до 45,4% для 0,0005 % препарата ГК. Среднее количество корней почти во всех вариантах опыта было выше контроля.

Ячмень яровой сорт «Ратник». У ячменя на все определяемые показатели лучше влияли растворы ГК с концентрацией 0,01%. Все остальные препараты ГК во всех вариантах концентраций показали результаты ниже контроля.

Пшеница озимая сорт «Московская 39». На энергию прорастания, всхожесть и морфологию проростков в одинаковой степени лучше влияли растворы ГВ торфа с концентрациями 0,001 и 0,0005 %. Средняя длина ростка была больше контрольной на 99,5-125,8%; на «среднюю» и «суммарную длину корней» положительно влияли препараты в концентрациях 0,005; 0,001 и 0,0005 %. Максимальное превышение над контролем от-

мечено для показателя суммарная длина корней до 147,9% для 0,0005 % препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования показано, что исследуемые торфяные ГК представляют собой соединения с высокой долей алифатических фрагментов, представленных длинными цепями. В составе периферических структур присутствуют в основном углеводы и пептиды, вклад CN- , CH_2- , CH_3 групп алкановых и циклоалкановых структур незначителен. Установлено, ГК торфяного происхождения отличаются высокими значениями $\text{H/C}_{\text{ат}}$ и $\text{O/C}_{\text{ат}}$, имеют ярко выраженный окисленный характер, что подтверждается значениями степени окисленности и ароматичности. Основными функциональными группами являются фенольные, карбоксильные и хиноидные.

Анализ взаимосвязи между структурой ГК и биологической активностью, выполненный с использованием программ PASSOnline, ISIS Draw 2.4, позволяет констатировать, что фрагменты молекул ГК с высокой степенью вероятности обладают высокой биологической активностью.

По результатам опытов по изучению биологической активности методом проростков на сельскохозяйственных культурах горох сахарный сорта «Первенец», ячмень яровой сорта «Ратник», пшеница озимая сорта «Московская 39» выявлено стимулирующее действие гуминовых препаратов на энергию прорастания, всхожесть и морфологию проростков.

Таблица 4

Влияние биологической активности ГВ угля на всхожесть и морфологию растений, % к контролю

Концентрация ГВ, %	Горох сахарный сорта «Первенец»				Ячмень яровой сорта «Ратник»				Пшеница озимая сорта «Московская 39»			
	Всхожесть	Средняя длина ростка, мм	Средняя длина корней, мм	Суммарная длина корней, мм	Всхожесть, мм	Средняя длина ростка, мм	Средняя длина корней, мм	Суммарная длина корней, мм	Всхожесть	Средняя длина ростка, мм	Средняя длина корней, мм	Суммарная длина корней, мм
0.01	105.5	92.6	94.6	89.5	105.3	96.2	95.8	74.1	100.0	66.3	88.1	95.4
0.005	111.1	95.4	96.8	104.2	77.7	73.4	85.4	56.8	105.3	84.2	104.2	102.3
0.001	111.1	98.3	111.8	126.5	42.8	60.6	80.9	34.6	111.1	199.5	188.6	198.7
0.0005	111.1	102.4	124.5	145.4	11.1	-	11.8	12.4	111.1	225.8	215.4	247.9
0.0001	88.88	86.5	74.5	72.0	-	-	-	-	111.1	84.5	89.8	102.1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Месторождения полезных ископаемых. URL: http://www.catalogmineralov.ru/deposit/yaroslavskaya_oblast/
2. ГОСТ 11305-83. Торф. Методы определения влаги. — Введ. 1983-02-18. — М.: Государственный комитет СССР по стандартам: Изд-во стандартов, 1983. — 12с.
3. ГОСТ 11306-83. Торф и продукты его переработки. Методы определения зольности. — Введ. 1985-01-01. — М.: Государственный комитет СССР по стандартам: Изд-во стандартов, 1983. — 8с.
4. Пьявченко Н.И. Лесное болотоведение (основные вопросы) / Н.И. Пьявченко. — М.: Изд-во АН СССР, 1963. — 192 с.
5. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений [пер. с англ. Н.Б.Куплетской и Л.М.Эпштейн] / К. Наканиси. — М.: Мир, 1965. — 216с.
6. Некрасов В.В. Руководство к малому практикуму по органической химии / В.В. Некрасов. — М.: Химия, 1975. — 328с.
7. Драгунов С.С. Исследование химической природы гуминовых кислот: (Гидролиз гуминовых кислот и ускоренные методы определения функциональных групп) / С.С. Драгунов, Н.Н. Желоховцева, Е.И. Стрелкова // Почвоведение. — 1950. — № 3. — С. 34-39.
8. Новые методы исследования гуминовых кислот / Л.И. Глебко, О.Б. Максимов; под общ. ред. Г.Б. Елякова. — Владивосток: Приморский полиграфический комбинат. — 1972. — 214с.
9. Горохова В.В. Экосистемы болот Ярославской области: состояние и охрана / В.В. Горохова, О.А. Маракаев. Ярославский гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль: ЯрГУ. — 2009. — 160 с.
10. Определение биологического потенциала. URL: <http://pharmaexpert.ru/PASSOnline/index.php>.

Половецкая Ольга Сергеевна — кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры «Химия» Тульского государственного педагогического университета им. Л.Н.Толстого; e-mail: olplov71@mail.ru.

Polovetskaya Olga S. — the candidate of chemical Sciences, associate professor of the Department “Chemistry” of the Tula state pedagogical University Leo Tolstoy; e-mail: olplov71@mail.ru.