

---

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ МОЛЕКУЛЯРНОГО СТРОЕНИЯ И РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛИГНИНА**

**Н.Г. Баканова, Г.А. Калабин, В.В. Подгорский**

Экологический факультет  
Российский университет дружбы народов  
*Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 113093*

Выявлена связь между дескрипторами молекулярного состава гуминового препарата «Лигногумата®» и его ростстимулирующей активностью в отношении семян редиса. Статистический анализ данных спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  гуминовых веществ различного генезиса показал применимость метода для идентификации их сырьевой принадлежности. Проведены предварительные полевые испытания гуминовых препаратов на основе угля, торфа и лигнина.

**Ключевые слова:** гуминовые вещества, стохастические органические системы, спектроскопия ЯМР  $^{13}\text{C}$ , ростстимулирующая активность, идентификация, биотестирование.

Одна из фундаментальных задач экологизации сельского хозяйства и обеспечения безопасности пищевой продукции — замена большинства синтетических агрохимикатов и биоцидов на безвредные, экологичные и эффективные комплексные препараты природного происхождения. Среди последних важнейшее место принадлежит гуминовым веществам (ГВ), обладающим способностью уже в малых дозах (0,001—0,01% вес. в воде) существенно повышать рост и резистентность живых организмов к экстремальным воздействиям. Концепция экологизации агротехнологий России должна предусматривать широкое их использование для мобилизации внутренних защитных и продуктивных резервов биоты в неблагоприятных климатических и антропогенных условиях.

Широкому применению ГВ препятствует ряд причин. Во-первых, отсутствуют общепринятые методы объективной оценки важнейших характеристик их состава, ответственных за ростстимулирующие, адаптогенные и детоксицирующие свойства. Информация о промышленных препаратах ГВ в лучшем случае сводится к указанию их сырьевой принадлежности, содержанию полезных нативных или введенных искусственно макро- и микроэлементов, содержанию органических веществ. Выявление некачественных ГВ из такой информации невозможно. Во-вторых, рекомендации по технологиям и дозировкам внесения строятся на весьма ограниченном лабораторном и разовом или краткосрочном полевом опыте. Ценность последнего не очевидна, так как выработка рекомендаций требует проведения сложнейших многофакторных экспериментов даже для одной культуры, включающих вариации (для выбранного ГВ конкретного стабильного состава) сроков, схем и концентраций внесения при систематизации многолетних почвенно-климатических факторов различных регионов. С учетом того, что в настоящее время на рынке агрохимикатов представлены сотни различных твердых и жидких форм ГВ из разнообразного сырья помимо традиционных (из бурых углей и торфов), проведение подобных системных работ невозможно. Наконец, непонимание большинством потребителей того, что ГВ являются в первую очередь адаптогена-

ми и дают минимальный эффект в оптимальных условиях, — причина типичной недооценки их полезности.

Исследования последних двух десятилетий показали, что наиболее полную количественную информацию о составе, строении и даже свойствах многокомпонентных и стохастических (гуматы) органических систем, недоступную никаким другим методам анализа дает спектроскопия ЯМР [3], использованная нами в этой работе для исследования серии ГВ, полученных путем деструкции лигнинов как отходов производства целлюлозы. Спектроскопия ЯМР  $^{13}\text{C}$  позволяет выявить наличие в ГВ примесей или добавок индивидуальных компонентов (синтетических агрохимикатов), прогнозировать их эффективность как рост-стимуляторов по содержанию как высокоактивных функциональных групп  $-\text{COOH}$  и  $-\text{OH}$ , так и фрагментов  $\text{CarO}$ ,  $\text{CarC(H)}$ ,  $\text{СалкO}$  и  $\text{СалкC(H)}$ , играющих, как правило, второстепенную роль.

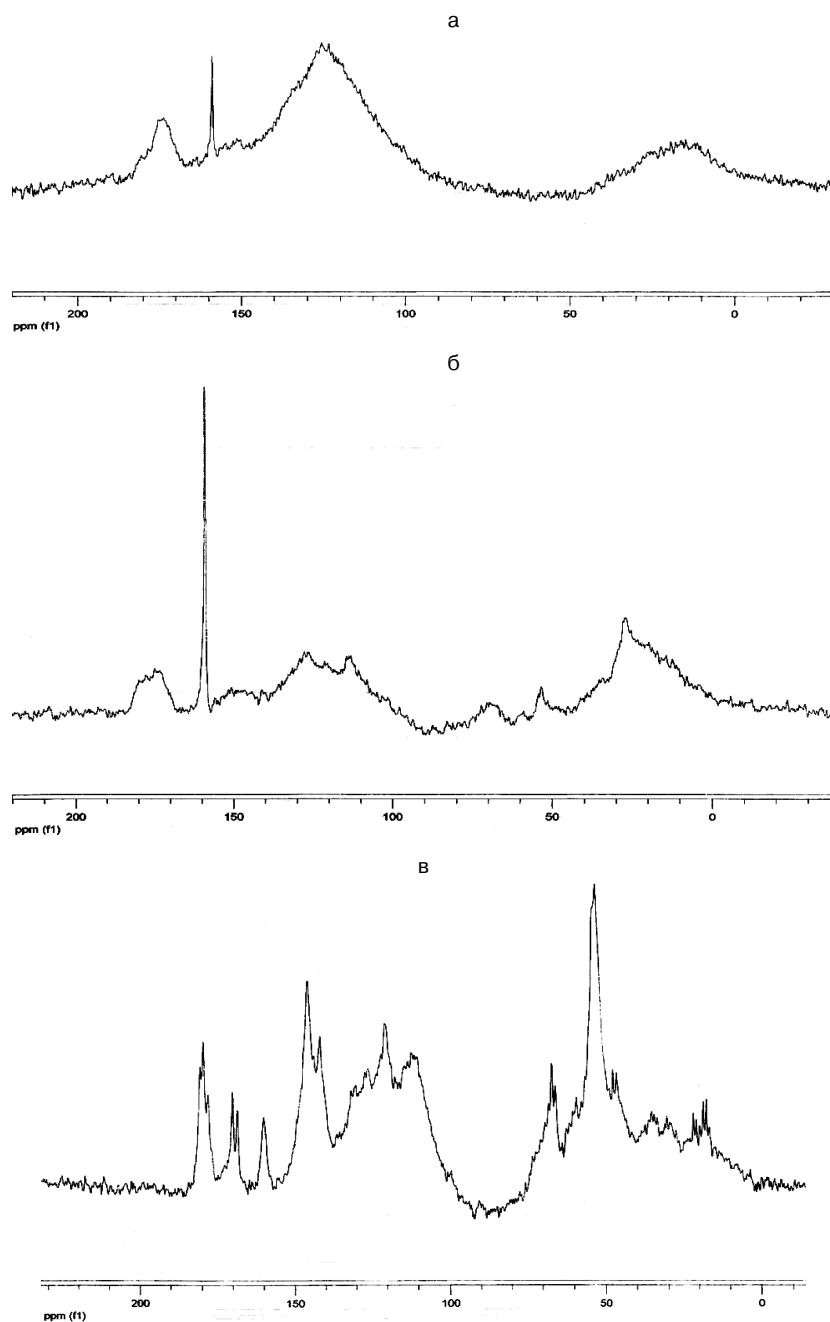
Исследованы спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  14 образцов ГВ препарата «Лигногумат®», полученных при различных условиях в промышленном эксперименте по оптимизации технологии его производства из лигносульфоната Выборгского ЦБК. Представленные образцы — водные растворы со средней концентрацией ГВ около 20% вес. Количественные спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  (2,5 мл раствора + 0,5 мл  $\text{D}_2\text{O}$ ) регистрировали при температуре 20 °С на спектрометре JNM-ECA 600 JEOL с рабочей частотой для ядер  $^{13}\text{C}$  150 МГц в ампулах Ø 10 мм (время задержки 5 с, число сканирований 9000—12000). Распределение углерода по основным структурным фрагментам образцов, для которых есть данные по биотестированию, представлено в таблице.

Таблица

**Фрагментный состав и прогнозная физиологическая активность (ФА) проб промышленного гуминового препарата «Лигногумат®»**

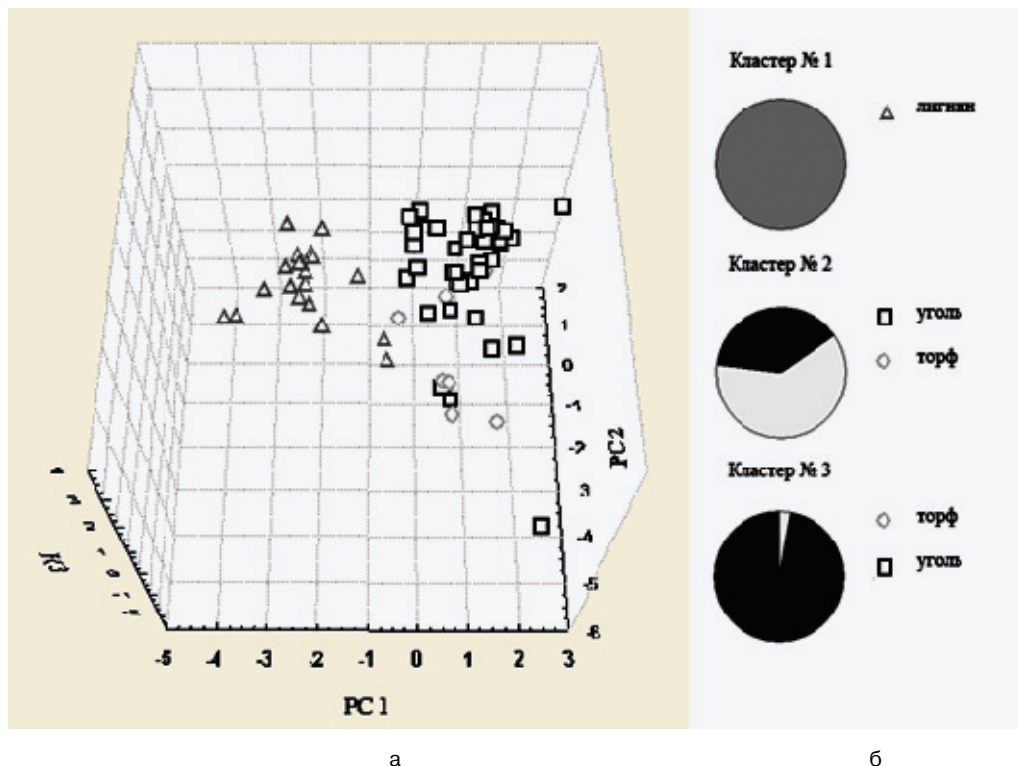
Содержание структурных фрагментов по диапазонам спектра ЯМР $^{13}\text{C}$ , м.д.					ФА	Прирост биомассы к контролю, %		
(195—165), COO	(165—140), CarO	(140—100), CarC,H	(100—50), СалкO	(50—0), Салк		корни	надземная часть	общий
2,11	20,34	33,95	39,55	4,02	1,81	4	0,6	1,2
7,22	19,40	39,06	21,56	12,73	3,78	31,9	0,7	6,4
9,59	18,13	36,22	24,27	11,71	3,27	9,9	7,5	8
11,51	18,28	31,51	25,40	13,25	3,75	5,1	12,7	11,3
10,29	19,04	32,79	27,02	10,82	3,66	17,6	10,7	11,9
7,08	17,38	35,38	28,20	11,88	2,29	1,8	2,5	2,4

Для выявления возможности идентификации сырьевого происхождения ГВ из лигнина методом ЯМР  $^{13}\text{C}$  проведен статистический анализ показателей их фрагментного состава вместе с ранее полученными результатами для ГВ из угля и торфа (более 50 образцов). Априори было установлено, что параметры типичных спектров ЯМР ГВ из угля (рис. 1а), торфа (рис. 1б) и лигнина (рис. 1в) значительно отличаются. Особенность спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  ГВ из лигнина, нетипичная для ГВ из угля и торфа, — наличие сигналов кислот (узкие линии в области 160 м.д.) и сигналов фрагментов  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCH}_2$ - и  $\text{OCH}$  в области 50—70 м.д. Поскольку основу лигнина составляют  $\text{OH}$ - и  $\text{OCH}_3$ -замещенные фенилпропановые фрагменты, последний сигнал — характерный признак ГВ из лигнина.



**Рис. 1.** Спектры <sup>13</sup>С ГВ из угля (а), торфа (б) и лигнина (в)

Методом главных компонент факторного анализа (рис. 2а) и KNN кластерного анализа (kNN, k nearest neighbors) (рис. 2б) показано, что ГВ из лигнина существенно иные, чем из угля и торфа. Полученные кластеры приблизительно соответствуют стадиям превращения: растительные остатки → торф → уголь. Модель, построенная методом проекций на скрытые переменные (PLS, projection to latent structures), на 84,8% объясняет наблюдаемую дисперсию.



**Рис. 2.** Статистический анализ данных ЯМР  $^{13}\text{C}$  ГВ:

а — образцы в факторном пространстве главных компонент 1—3, полученном методом главных компонент; б — распределение образцов в трех кластерах, полученных кластеризацией по методу «*k* ближайших соседей»

При изучении спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  из окисленных бурых углей различных регионов нами ранее была выявлена формальная взаимосвязь между их характеристиками-дескрипторами молекулярного строения (содержанием отдельных фрагментов и функциональных групп) и физиологической активностью (ФА) [1]. В случае стимуляции роста coleoptily пшеницы она имела следующий вид:

$$\text{ФА} = 1,00 + 7,5(\text{COO}) + 44,7(\text{C}_{\text{ар}}\text{O}) - 8,9(\text{C}_{\text{ар}}\text{C},\text{H}) - 13,7(\text{C}_{\text{алк}}\text{O}),$$

$$r = 0,96, n = 8. \quad (1)$$

Использование этого уравнения для характеристик количественных спектров образцов лигногумата дает прогнозные значения ФА исследованных образцов, по которым наибольшую активность следует предполагать у образцов 4, 8 и 12, хотя статистические показатели корреляции низкие.

В качестве одного из методов контроля качества продукции производители препарата «Лигногумата®» используют модифицированную методику биотестирования по Гродзинскому [2], оценивая относительно контроля общий прирост массы, а также проростков и корней в отдельности для семян редиса «Чемпион» при  $22\text{ }^\circ\text{C}$  в воде по истечении 7 сут. с (без) добавлением 0,02% сухих ГВ. Результаты биотестирования для шести образцов были нам представлены и указаны

в таблице (см.). Связь между результатами для общего прироста массы и характеристиками спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  этих ГВ имеет вид

$$\begin{aligned} \text{ФА} = & 0,7(\pm 0,3) + 2,00(\pm 0,5)(\text{COO}) + 2,3(\pm 0,3)(\text{C}_{\text{ар}}\text{O}) + \\ & + 0,2(\pm 0,4)(\text{C}_{\text{ар}}\text{C},\text{H}) + 0,2(\pm 0,3)(\text{C}_{\text{алк}}\text{O}), \end{aligned} \quad (2)$$

$r = 0,998, n = 6.$

Поскольку коэффициенты уравнения при аргументах  $\text{C}_{\text{ар}}\text{C},\text{H}$  или  $\text{C}_{\text{алк}}\text{O}$  статистически незначимы и на порядок меньше двух других коэффициентов, уравнение представлено как двухпараметровое:

$$\begin{aligned} \text{ФА} = & 1,00 (\pm 0,12) + 3,24(\pm 0,20)(\text{COO}) + 4,56(\pm 0,62)(\text{C}_{\text{ар}}\text{O}), \end{aligned} \quad (3)$$

$r = 0,995, n = 6.$

В этом уравнении коэффициенты при аргументах  $\text{COO}$  и  $\text{C}_{\text{ар}}\text{O}$  отличаются незначительно, хотя в уравнении (1) коэффициент для фрагмента  $\text{C}_{\text{ар}}\text{O}$  в 6 раз больше, чем для фрагмента  $\text{COO}$  (44,7 и 7,5 соответственно). Такую особенность мы объясняем тем, что в лигногуматах помимо  $\text{OH}$ -групп, присоединенных к ароматическому кольцу и обеспечивающих активность гуминовых препаратов, за сигналы  $\text{C}_{\text{ар}}\text{O}$  ответственны также группы  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{OCH}$ . Их наличие не приводит к повышению физиологической активности лигногуматов. Поэтому по полученным коэффициентам уравнений (1) и (3) можно оценить содержание фрагментов  $\text{C}_{\text{ар}}\text{OH}$  как 10—20% от их суммы с  $\text{C}_{\text{ар}}\text{O}$  –Салк. Такое значение согласуется с высокими значениями содержания фрагментов СалкО (20—30%).

Осуществлен первый этап полевого биотестирования ГВ гуматов калия из угля (от ТПК «Техноэкспорт»), торфа (от ОАО «Флексом») и лигнина (от ООО «НПО РЭТ») на сорте винограда «Первенец Магарача» (выполнен по нашему заказу в 2010 г. в НИИ Садоводства и виноградарства СКНЦ ВАСХ, г. Краснодар). Установлено, что рост урожайности с использованием ГВ из угля достигал 35%, а для ГВ из торфа и лигнина — 17—18% при увеличении средней массы грозди во всех случаях на 15—18% и незначительном увеличении сахаристости. В 2011 г. эти эксперименты продолжались.

Полученные в настоящей работе результаты показали, что идентификация ГВ из лигнина методом ЯМР  $^{13}\text{C}$  однозначна. Связь ФА лигногуматов с параметрами молекулярного строения имеет вид, подобный установленному нами ранее для ГВ их угля и торфа. Эффективность использования ГВ в отношении урожайности винограда, по-видимому, сопоставима с таковой для ГВ из торфа, но ниже, чем таковая для ГВ из угля, являющихся, по нашему мнению, наиболее перспективными.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Дашицыренова А.Д.* Гумусовые кислоты окисленных углей Республики Бурятия: состав, строение, свойства: Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. — М.: Изд-во РУДН, 2006.
- [2] *Гродзинский А.М.* Прямые методы биотестирования почвы и метаболитов микроорганизмов // Аллелопатия и продуктивность растений. — Киев: Наукова думка, 1990.
- [3] *Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарёв Д.Ф.* Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. — М.: Химия, 2000.

## **RELATIONSHIP OF MOLECULAR STRUCTURE AND THE GROWTH STIMULATING ACTIVITY OF HUMIC SUBSTANCES FROM LIGNIN**

**N.G. Bakanova, G.A. Kalabin, V.V. Podgorsky**

Ecological Faculty  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Podolskoye shosse, 8/5, Moscow, Russia, 113093*

Relationship between the descriptors of the molecular composition of humic preparation «Lignohumate®» and growth stimulating activity against radish seeds is found. Statistical analysis of the NMR  $^{13}\text{C}$  spectra  $^{13}\text{C}$  humic substances of different origin has shown the applicability of the method for the identification of their raw material supplies. Preliminary field testing of humic substances on the basis of coal, peat and lignin.

**Key words:** humic substances, organic stochastic systems,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, growth stimulating activity, identification, biological testing.