

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

На правах рукописи

Куликова Наталья Александровна

**Защитное действие
гуминовых веществ
по отношению к растениям
в водной и почвенной средах
в условиях абиотических стрессов**

Специальности: 03.00.16 – Экология и 03.00.27 – Почвоведение

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

Доктор химических наук, профессор
И. В. Перминова

МОСКВА – 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	6
ВВЕДЕНИЕ	10
Глава 1. Выделение и характеристика ГВ различных природных сред	12
1.1. Отбор и характеристика почвенных образцов	20
1.2. Выделение препаратов ГВ из природных объектов.....	21
1.3. Модифицированные ГВ	29
1.3.1. Гидроксилированные ГВ	30
1.3.2. Привитые гуминовые полимеры	32
1.3.3. Сополимеры с салициловой и 2,3-дигидроксibenзойной кислотами.....	34
1.3.4. Гуминовые вещества, обогащённые железом.....	35
1.3.5. Гуминовые вещества, обогащённые кремнием	35
1.4. Характеристика ГВ.....	37
1.4.1. Характеристика элементного состава	37
1.4.2. Определение структурно-группового состава ГВ методом ЯМР- спектроскопии ¹³ C	44
1.4.3. Исследование молекулярно-массового распределения ГВ методом эксклюзионной хроматографии	51
1.4.4. Определение кислотных групп ГВ титриметрическими методами	56
Глава 2. Исследование защитного действия ГВ методами биотестирования: метрологическая характеристика и количественное описание детоксифицирующих свойств	60
2.1. Выбор тест-культуры.....	61
2.2. Метрологическая характеристика использованных методов биотестирования.....	70
2.2.1. Метрологическая характеристика методов биотестирования в водной среде.....	72
2.2.2. Метрологическая характеристика методов биотестирования в почвенной среде.....	76
2.3. Количественное описание защитного действия ГВ в присутствии токсикантов.....	79
Глава 3. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса.....	82

3.1. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса в водной среде	86
3.1.1. Связывающая способность ГВ по отношению к атразину в водной среде	86
3.1.2. Детоксифицирующее действие ГВ по отношению к атразину в водной среде.....	90
3.2. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса в почвенной среде	103
3.2.1. Связывающая способность ГВ по отношению к атразину в почвенной среде.....	105
3.2.2. Детоксифицирующее действие ГВ по отношению к атразину в почвенной среде.....	117
Глава 4. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами	128
4.1. Взаимодействие ГВ с тяжёлыми металлами: химические и токсикологические аспекты	128
4.1.1. Взаимодействие ГВ с тяжёлыми металлами.....	128
4.1.2. Влияние ГВ на токсичность тяжёлых металлов	130
4.2. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами, в водной среде.....	133
4.2.1. Защитное действие природных ГВ.....	133
4.2.2. Защитное действие модифицированных ГВ.....	135
4.2.3. Взаимосвязь структурных характеристик и детоксифицирующих свойств ГВ по отношению к тяжёлым металлам	140
4.2.4. Физиологическая активность природных и модифицированных ГВ	143
4.2.5. Взаимосвязь структурных характеристик и физиологической активности ГВ	145
4.3. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами, в почвенной среде	148
4.3.1. Защитное действие природных и модифицированных ГВ в почве	148
4.3.2. Последствие природных и модифицированных ГВ в почве	151
Глава 5. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза.....	156
5.1. Влияние ГВ на поступление микроэлементов в растения.....	156

5.2. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в водной среде	160
5.3. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почвенной среде	165
5.3.1. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в перлите	165
5.3.2. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почве	168
Глава 6. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита, солевого стресса и неблагоприятных температур.....	171
6.1. ГВ как универсальные адаптогены в условиях физико-химических стрессов.....	171
6.2. Природа защитного действия ГВ в условиях физико-химических стрессов.....	173
6.3. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита.....	175
6.3.1. Природа водного дефицита у растений.....	175
6.3.2. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита	175
6.3.3. Сопоставление физико-химических характеристик и проявляемого защитного действия ГВ в условиях водного дефицита	179
6.4. Защитное действие ГВ в условиях солевого стресса	182
6.4.1. Природа солевого стресса у растений.....	182
6.4.2. Защитное действие природных и модифицированных ГВ в условиях солевого стресса.....	183
6.5. Защитное действие ГВ в условиях температурного стресса	185
6.5.1. Природа температурного стресса у растений	185
6.5.2. Защитное действие природных и модифицированных ГВ в условиях температурного стресса	185
Глава 7. Природа защитного действия ГВ по отношению к растениям.....	191
7.1. Возможные механизмы защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов	191
7.2. Особенности защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов...	193
7.3. Поступление ГВ в растения в оптимальных и стрессовых условиях	196

7.3.1. Использование радиоактивных препаратов для количественной оценки поступления ГВ в растения.....	196
7.3.2. Исследование взаимодействия ГВ с живыми организмами с использованием меченных тритием препаратов	198
7.3.3. Исследование взаимодействия ГВ с живыми клетками в оптимальных и стрессовых условиях	201
7.3.4. Исследование поступления ГВ в растения в оптимальных и стрессовых условиях.....	209
7.3.5. Исследование распределения ГВ в растениях	226
7.3.6. Сравнительная оценка поглощения и распределения ГВ в растениях в оптимальных и стрессовых условиях.....	233
7.3.7. Идентификация ГВ в тканях растений.....	240
7.4. Природа защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов	251
7.4.1. Основные закономерности защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов.....	253
7.4.2. Антиоксидантная активность ГВ	254
7.4.3. Концептуальный механизм защитного действия ГВ.....	256
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	258
ВЫВОДЫ	259
ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ.....	261
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	262

Список сокращений и условных обозначений

АБТС – азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)

АМФ – аденозинмонофосфат

АОЕ – антиоксидантная ёмкость

АПТС – 3-аминопропилтриметоксисилан

АРГ – автордиография

АФК – активные формы кислорода

АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектроскопия с ионизацией образца в индуктивно-связанной плазме

БТШ – белки теплового шока

ГВ – гуминовые вещества

ГК – гуминовые кислоты

ГМК – гиматомелановые кислоты

ГХ – газовая хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТПА – диэтилентриаминпентауксусная кислота

ДЭАЭ– диэтиламиноэтил

ДЭДТК – диэтилдитиокарбоминовая кислота

ЖК – жирные кислоты

ЗФ – замедленная флуоресценция

ЛЖК – летучие жирные кислоты

ММ – молекулярная масса

ММР – молекулярно-массовое распределение

МС ИЦР – масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса

НТА – нитрилуксусная кислота

ОВ – органическое вещество

ПАУ – полиядерные ароматические углеводороды

ПД – дерново-подзолистая почва

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ 6000 – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 Да

РНК – рибонуклеиновая кислота

РОВ – растворённое органическое вещество

СЛ – серая лесная почва

T – токсичность

ТМ – тяжёлые металлы

Тролокс – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота

ТСХ – тонкослойная хроматография

ФК – фульвокислоты

ФС – фотосистема

Ч – чернозём

Э – элемент

ЭДДГА – этилендиаминдигидроксибензилдиуксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТЦ – электронтранспортная цепь

ЯМР ¹³C – спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ¹³C

$s_{\bar{x}}$ – среднее квадратическое отклонение среднего

\bar{x} – арифметическое среднее

a – доля токсиканта, находящегося в свободном состоянии

Salk – сумма углерода алифатических фрагментов

SC_{carb} – сумма углерода «карбогидратных» фрагментов

Gmax – максимальная адсорбция ГВ на границе раздела фаз толуол-вода, характеризует поверхностную активность ГВ

S_{ОБМ. ОСН.} – сумма обменных оснований

SC_{Ar} – сумма углерода ароматических фрагментов

α-СН – алифатические фрагменты в α-положении к электроотрицательной группе или ароматическому кольцу

¹O₂ – синглетный кислород

2УТ – питательная среда, состав (г/л): дрожжевой экстракт 10; триптон 16; NaCl 5

Ar-H,C – H-, C-замещенные ароматические фрагменты

Ar-O,N – O-, N-замещенные ароматические фрагменты

C=O – кетонные и хинонные группы

CH₃-O, CH₂-O,N, CH-O,N – метоксильные и O-, N-замещенные алифатические фрагменты («карбогидратные»)

СН-Н,С – С, Н-замещенные алифатические фрагменты
 СОО-Н,С – карбоксильные группы и их производные
 D – коэффициент детоксификации или оптическая плотность
 Fl – отношение количества активных функциональных групп в ГВ и C_{AlkO} фрагментов к общей ароматической составляющей
 F_m – максимальная флуоресценция
 F_o – минимальная (постоянная) флуоресценция
 f_{OC} – доля ГВ в составе органоминерального комплекса
 F_v – переменная флуоресценция, $F_v = F_m - F_o$
 F_v/F_m – относительный выход переменной флуоресценции, характеризующий квантовую эффективность первичной фотосинтетической реакции
 $F_{крит.}$ – табличное значение коэффициента Фишера
 $F_{эксп.}$ – рассчитываемое значение коэффициента Фишера
 H – коэффициент гистерезиса
 HO^\bullet – гидроксилрадикал
 H_T – гидролитическая кислотность
 I_p – выбираемая экспериментатором максимальная разница между истинным и выборочным средним, выраженная в процентах
 K_d – коэффициент распределения
 K_F – константа адсорбции Фрейндлиха
 K_m – константа Михаэлиса
 K_m – константа связывания с минералом
 K_{OC} – константа связывания
 K_{OC}^D – константа детоксификации
 L – светлота
 $lg K_{OW}$ – октанольно-водный коэффициент
 М9 – питательная среда, состав (г/л): $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ 15.1; KH_2PO_4 3.0; $NaCl$ 0.5; NH_4Cl 1.0, $MgSO_4 \times 12H_2O$ 0.5; $CaCl_2$ 0.0056; глюкоза 0.25
 M_n – среднечисловая молекулярная масса
 M_w – средневесовая молекулярная масса
 n – размер выборки
 n_F – показатель степени нелинейности изотермы Фрейндлиха

$O^{2\bullet-}$ – супероксид анион радикал

OC – органический углерод

$O-CH-O,N$ – алифатические фрагменты, дважды замещенные гетероатомами («аномерные»)

P – вероятность

pKa – константа кислотной диссоциации

r – коэффициент корреляции

R – тест-отклик

R^2 – коэффициент детерминации

s – стандартное отклонение

T_d – время задержки между импульсами при регистрации ЯМР спектров

t_p – коэффициент Стьюдента

V – коэффициент вариации

V – скорость поглощения вещества растением

V_{max} – максимальная скорость поглощения вещества растением

X_{max} – верхний предел обнаружения

X_{min} – нижний предел обнаружения

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая антропогенная нагрузка на окружающую среду обусловила возникновение такой глобальной задачи современности как целенаправленное регулирование нарушенного равновесия в экосистемах. Решение этой задачи включает в себя изучение детоксификации загрязняющих веществ и поиск безопасных средств защиты организмов от повреждающего действия токсикантов. В качестве таких средств защиты могут выступать природные физиологически активные соединения, к которым относятся гуминовые вещества (ГВ), содержащиеся во всех природных средах, включая природные воды, почвы, торфа, сапропели и угли. Образование ГВ представляет собой второй по масштабности после фотосинтеза процесс трансформации органического вещества в природе, в который вовлекается около 20 Гт углерода в год. ГВ выполняют ряд важных экологических функций в биосфере: аккумулятивную, транспортную, регуляторную, физиологическую и защитную. Особую актуальность в последнее время приобретает исследование защитной функции ГВ с целью ее дальнейшего практического применения, так как именно она отвечает за поддержание равновесия в экосистемах, подверженных сильной антропогенной нагрузке. Следовательно, установление механизма защитного действия ГВ позволит более эффективно использовать существующие гуминовые стимуляторы роста растений в сельском хозяйстве, а также указать пути к созданию нового поколения средств защиты растений на основе ГВ, например, гуминовых детоксикантов и биоактиваторов.

В настоящее время общепринятым является положение о том, что защитная функция ГВ в условиях химического стресса обеспечивается их способностью связывать загрязняющие вещества в комплексы, недоступные для живых организмов. При таком понимании защитного действия ГВ практически игнорируется роль их физиологической активности в процессах детоксификации загрязненных сред. Кроме того, при таком подходе остаётся нерешённой проблема защитного действия ГВ в условиях других абиотических стрессов, таких как неблагоприятная температура, недостаток влаги, засоление и др. Причиной этого является отсутствие систематических исследований по роли физиологической

активности в защитной функции ГВ. Поэтому целью работы было изучить природу защитного действия ГВ по отношению к растениям во взаимосвязи с их физиологической активностью в условиях различных абиотических стрессов в водной и почвенной средах и предложить пути практического использования полученных знаний для создания средств защиты нового поколения на основе ГВ.

Цель работы состояла в изучении природы защитного действия ГВ по отношению к растениям в водных и почвенных средах в условиях различных абиотических стрессов и оценке перспективности применения природных и модифицированных гуминовых препаратов в качестве средств защиты растений. В работе были поставлены следующие основные задачи:

- выделить и охарактеризовать ГВ из различных природных сред;
- изучить защитное действие ГВ и выявить его основные закономерности в условиях различных абиотических стрессов, включая присутствие токсикантов, железодефицитный хлороз, водный, солевой и температурный стрессы;
- изучить взаимодействие ГВ с клетками и растениями и предложить концептуальную модель защитного действия ГВ;
- оценить перспективность применения природных и модифицированных гуминовых препаратов в качестве средств защиты растений (детоксикантов, стимуляторов роста, корректоров хлороза, биоактиваторов).

Глава 1.

Выделение и характеристика ГВ различных природных сред

Отличительной особенностью ГВ является стохастический характер, обусловленный особенностями их образования в результате отбора биотермодинамически устойчивых структур. Как следствие, к фундаментальным свойствам ГВ относятся нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность. Поэтому для ГВ неприменимо понятие молекулы, а вероятную схему их строения представляют с помощью так называемой структурной ячейки, то есть минимального по размеру фрагмента молекулы, который содержит все важнейшие структурные единицы. Сложность строения ГВ хорошо иллюстрирует модель структурного фрагмента ГК почв, опубликованная в 1970 г. Кляйнхемпелем (рис. 1.1). Указанная формула представляет собой попытку одновременно сохранить детальное описание структуры ГВ и показать ее статистический характер. Это достигается за счет чрезмерной громоздкости формулы, в которой автор приводит практически все возможные элементы структуры и способы их сочленения. Данная формула наиболее полно отражает набор структурных фрагментов ГВ, хотя она неоднократно подвергалась критике, в частности, в связи с чрезмерно высоким содержанием азота.

Как видно из приведенного структурного фрагмента, по своей химической природе ГВ представляют собой нерегулярные сополимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот с включениями азотсодержащих и углеводных фрагментов. Указанное строение – наличие каркасной части, т.е. ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, среди которых преобладают карбоксильные, гидроксильные и метоксильные, и периферической части, обогащенной полисахаридными и полипептидными фрагментами, – является общим для ГВ всех источников происхождения.

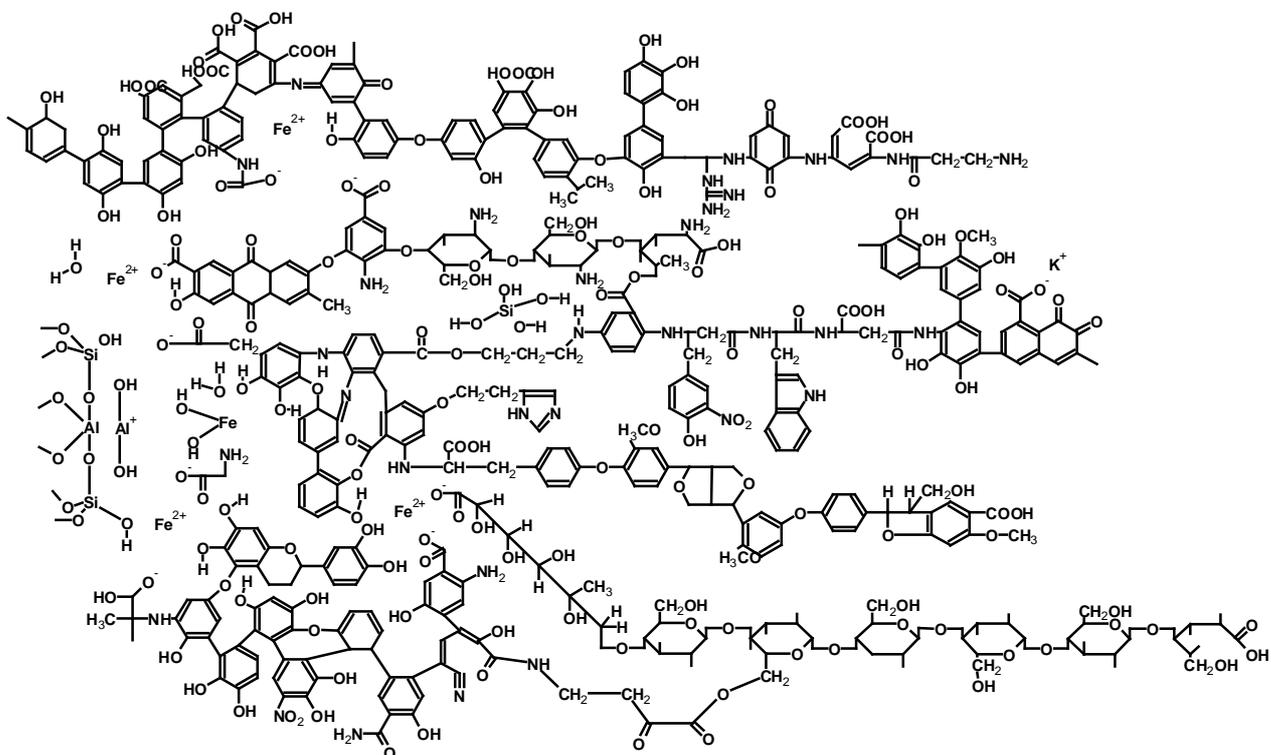


Рисунок 1.1. Гипотетический структурный фрагмент ГВ почв [Kleinhempel, 1970].

Отсутствие адекватного аналитического обеспечения и методологических подходов к анализу и численному описанию строения ГВ привело к тому, что, несмотря на двухсотлетнюю историю изучения, определение класса ГВ до сих пор основано на способе экстракции из природных объектов, а их общепринятая классификация – на процедуре фракционирования. ГВ подразделяют на гумин (нерастворим во всем диапазоне pH), гуминовые кислоты (ГК, нерастворимы при $\text{pH} < 2$) и фульвокислоты (ФК, растворимы во всем диапазоне pH). Последние два класса объединяют под общим названием гумусовые кислоты. Эта схема дополняется иногда также выделением гиматомелановых кислот (ГМК), отделяемых воздействием на сырой осадок ГК этанолом.

Стохастический характер ГВ является следствием специфики процесса их образования, который, в отличие от биохимического синтеза живого вещества, не имеет генетического кода. Синтез ГВ происходит по принципу естественного отбора наиболее устойчивых к биоразложению структур: их время жизни в окружающей среде исчисляется сотнями и тысячами лет [Орлов, 1992; Орлов, 1993]. Как видно из приведенного структурного фрагмента, по своей химической природе они представляют собой нерегулярные сополимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот с включениями азотсодержащих и

углеводных фрагментов. Указанное строение – наличие каркасной части, т.е. ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, среди которых преобладают карбоксильные, гидроксильные и метоксильные, и периферической части, обогащенной полисахаридными и полипептидными фрагментами, – является общим для ГВ всех источников происхождения. По этой причине ГВ занимают одну из самых высоких ступенек в иерархии сложности строения природных органических соединений, превосходя нефти, лигнины и угли.

Большинство существующих моделей строения ГВ основаны на теориях гумификации (лигниновая, полифенольная, теория сахаро-аминной конденсации и др.) в предположении об образовании ГВ из индивидуальных соединений путём абиотических реакций конденсации. Так, Чешир с сотр. [Cheshire et al., 1968] высказали предположения о возможности образования фенольных фрагментов в ГВ вследствие реакций алдольной конденсации из фурфуралей, получаемых при дегидратации углеводов. В работах Майлларда [Maillard, 1916] приведены результаты, свидетельствующие об образовании ГВ при абиотических реакциях между сахарами и аминогруппами белков. Наиболее полный обзор возможных абиотических реакции гумификации и модели образующихся соединений приведены в обзоре Стивенсона [Stevenson, 1994].

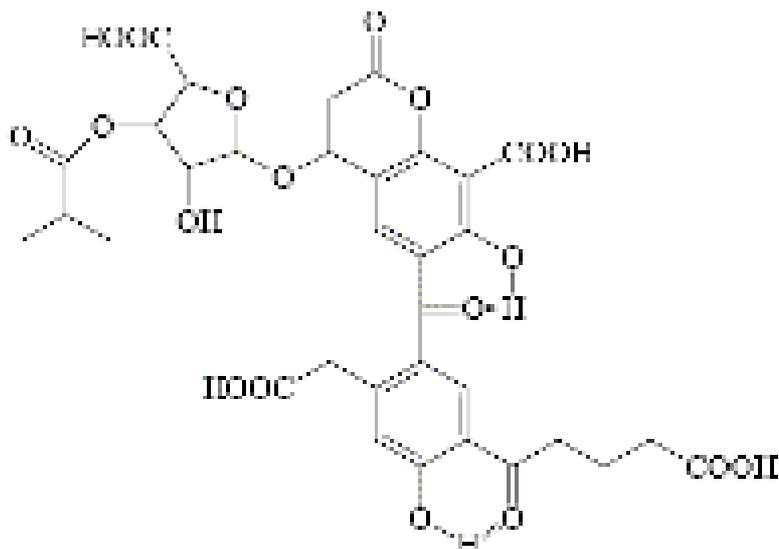
Развитие аналитических методов привело к разработке целого ряда новых моделей, основанных на результатах газохроматографического анализа соединений, образующихся при окислительной дегградации ГВ [Schnitzer, 1978; Christman & Ghassemi, 1966]. Так, при анализе метилированных продуктов окисления ГВ природных вод были обнаружены низкомолекулярные фенольные соединения кислотной природы, обычно образующиеся при разложении лигнинов и танинов [Christman & Ghassemi, 1966]. На основании этого была предложена модель ГВ, в которой «ядро» ГВ соединено с низкомолекулярными ароматическими соединениями (карбоксильными кислотами, фенолами и хинонами) и кремнием [Gjessing, 1976]. В работе [Bracewell et al., 1989; Bruchet et al., 1990] при анализе продуктов деструкции ГВ методом масс-спектрометрии наряду с фенольными соединениями было также продемонстрировано образование таких продуктов как аминокислоты, аминсахара и нейтральные углеводы.

Следующим прорывом в понимании структуры ГВ стало использование спектроскопии ЯМР [Wilson, 1987]. Благодаря этому методу впервые было установлено, что в ГВ содержится более высокий процент алифатических и более низкий – фенольных структур, чем это позволяли определять деструктивные методы. На основании данных ЯМР были впервые смоделированы структуры морских ГВ как сшитых алифатических цепочек, имеющих на своих концах карбоксильные группы [Harvey et al., 1984]. С помощью метода ЯМР в ГВ впервые также были обнаружены ацильные олигосахариды [Aluwihare et al., 1997] и терпеноиды [Leenheer et al., 2003]. Неоспоримым достоинством ЯМР спектроскопии является то, что она позволяет получать количественные данные о содержании в ГВ различных структурных фрагментов [Ковалевский и др., 2000]. Кроме того, проведение двумерных ЯМР экспериментов, позволило установить специфические связи между атомами углерода, водорода и азота в ГВ [Mao et al., 2000].

В последнее время все большее развитие для идентификации ГВ получает метод масс-спектрометрии с ионизацией образца в электроспрее, позволяющий получать информацию о нелетучих компонентах ГВ при минимальном разложении образца [Leenheer et al., 2001; Gaspar et al., 2008]. Высокая разрешающая способность этого метода, особенно при одновременном применении ионно-циклотронных ловушек, позволила определить в ФК природных вод 4626 индивидуальных соединений [Stenson et al., 2003]. Несмотря на перспективность использования указанного подхода для определения структуры ГВ, следует отметить ряд его ограничений, таких как отсутствие аналитических стандартов и невозможность получения количественной информации [Leenheer, 2007]. Кроме того, получаемые результаты позволили к настоящему моменту определять в ГВ только соединения с молекулярной массой, не превышающей 2000 Да, что существенно меньше молекулярных масс ГВ, которые могут достигать первых десятков килодальтон.

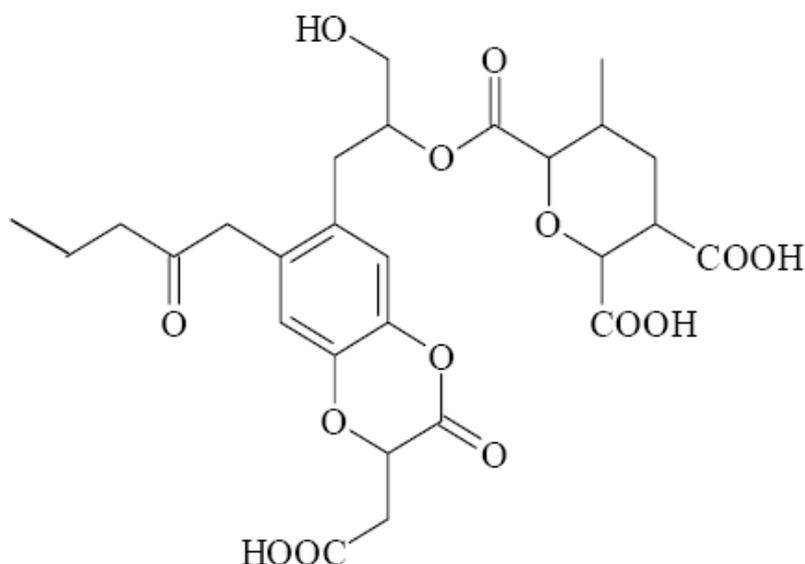
Особо следует упомянуть такой подход к установлению структуры ГВ как аналитическое моделирование, основанное на данных об их свойствах: молекулярной массе, содержании ароматических и алифатических фрагментов, количественное определение функциональных групп и пр. Наиболее часто

подобные модели разрабатывали для стандартов международного гуминового общества (International Humic Substances Society, IHSS), так как именно эти ГВ являются наиболее охарактеризованными. Одна из первых предложенных моделей приведена ниже:



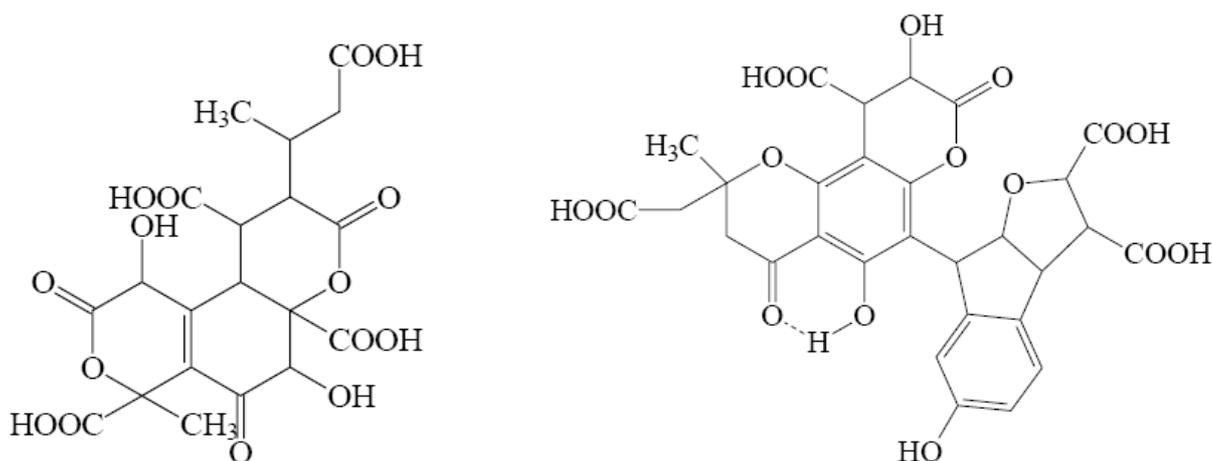
Данная модель была разработана для SRFA – ФК природных вод, выделяемых из реки Суванни (США) и являющихся стандартным образцом IHSS. Модель отражает обогащённость ФК кольцевыми структурами, как алифатическими, так и ароматическими, а также присутствие карбоксильных групп [Leenheer et al., 2004].

Вторая модель SRFA была разработана на основе данных, полученных при характеристике фракций, получаемых в ходе хроматографирования на силикагеле [Leenheer et al., 1995]:



В указанной модели авторы отразили кислотную природу ФК ($pK_a = 2$), образующуюся из-за кластеризации карбоксильных групп с алифатическими С-О и эфирными связями.

В качестве примера можно также привести модели, отражающие терпеноидную (слева) и таниновую (справа) природу ФК:



Как видно из представленных выше структур, их молекулярная масса не превышает 800 Да, что значительно ниже обычно приводимых в литературе молекулярных масс ГВ. При этом построение аналитических моделей возможно только для узких фракций ГВ. Поэтому существует также ряд полимерных моделей ГВ, основанных на предположениях, что ГВ представляют собой рандомизованные макромолекулы, образующиеся в ходе реакций конденсации и окислительного связывания [Swift, 1999; Sutton & Sposito, 2005; Langford & Melton, 2005; Wrobel et al., 2003]. При этом предполагается, что молекулы ГВ образуют между собой агрегаты, обусловленные водородными связями, а также ковалентными связями через металлы и кремний.

Наконец, в работе [Diallo et al., 2003] была предложена трёхмерная компьютерная модель ГК почв, учитывающая ряд количественных характеристик ГК. Однако компьютерное моделирование ГВ в настоящее время имеет ограниченное применение, так как ГВ представляют собой сложную смесь органических веществ, и характеристика любого свойства нефракционированных препаратов не может быть отнесена к каким-либо отдельным молекулам, а является среднестатистической величиной [Lennheer, 2007].

Таким образом, на настоящий момент описание структуры ГВ является актуальной проблемой современной химии, решение которой возможно лишь при

дальнейшем развитии аналитических методов высокого разрешения и новых подходов к фракционированию ГВ.

В силу сложности строения, уникально широк спектр взаимодействий, в которые могут вступать ГВ и, в особенности, их наиболее реакционноспособная часть – ГК. Наличие таких групп как карбоксильная, гидроксильная, карбонильная в сочетании с присутствием ароматических структур обеспечивает способность ГВ вступать в ионные и донорно-акцепторные взаимодействия, образовывать водородные связи, активно участвовать в сорбционных процессах. Так, ГВ хорошо связывают воду, способны к ионному обмену, образуют комплексы с металлами и аддукты с различными классами органических соединений.

Обладая указанными свойствами, ГВ выполняют целый набор важных биосферных функций. К их числу относятся структурирование почвы [Martin, Waksman, 1941; Chaney, Swift, 1984; Piccolo & Mbagwu, 1999; Imbufe et al., 2005; John et al., 2005], накопление питательных элементов и микроэлементов в доступной для растений форме [Tate & Theng, 1980; Devedre & Horwath, 2001; Chen et al., 2004; Garcia-Mina et al., 2004], регулирование геохимических потоков металлов в водных и почвенных экосистемах [Линник и Набиванец, 1986; Орлов, 1993; Agebenin & Olojo, 2004; Khwaja et al., 2006; Pegoraro, 2005]. К концу двадцатого века, одной из основных проблем которого является химическое загрязнение окружающей среды, добавилась еще и защитная, или протекторная функция. Под защитным действием ГВ подразумевают их способность помогать живым организмам противостоять неблагоприятным условиям (стрессовым факторам) окружающей среды. Так в присутствии химических стрессоров (токсикантов) ГВ могут связывать в прочные комплексы как ионы металлов, так и ксенобиотики в загрязненных водных и почвенных средах [Орлов, 1993; Abelmann et al., 2005; Gu et al., 2006; Skyllberg et al., 2006]. Экологические последствия такого связывания – изменение форм существования токсикантов и их миграционной способности [Варшал и др., 1993; Ma et al., 2006], уменьшение биодоступности [Landrum et al, 1987; Black and McCarthy, 1988; Gu et al., 2001] и токсичности [Bollag and Mayers, 1992; Baraud et al., 2005]. Последнее обстоятельство весьма важно и связано с тем, что максимальной активностью обладает свободная форма токсиканта. Связанное вещество свою токсичность теряет. На этом основании ГВ

можно рассматривать как природные детоксиканты. В условиях других абиотических стрессов (неблагоприятные температуры, pH, влажность и пр.) ГВ также обладают способностью снижать негативное воздействие различных стрессоров на живые организмы как в водных, так и в почвенных средах.

Таким образом, создание моделей биогеохимических циклов загрязняющих веществ, прогностические оценки их опасности, скорости накопления и времени жизни в окружающей среде невозможны без учета их взаимодействия с ГВ, которое коренным образом меняет как химическое, так и токсикологическое поведение токсикантов. Это обусловило настоятельную потребность в получении количественных характеристик взаимодействия ГВ с различными токсикантами, а также защитного действия ГВ как в присутствии токсикантов, так и при наличии в окружающей среде других стрессовых факторов.

В связи с тем, что ГВ характеризуются нестехиометричностью состава, нерегулярностью строения и гетерогенностью структурных элементов, на первом этапе необходимо было создать представительную выборку препаратов ГВ с широким разнообразием состава и свойств, адекватную стохастическому характеру объекта. Принцип формирования рабочих выборок препаратов ГВ был ориентирован на выявление возможных корреляций между строением и свойствами ГВ. Поэтому при создании каждой выборки стремились к максимальному разнообразию строения и свойств ГВ за счет включения препаратов различного происхождения (уголь, торф, почва, природные воды) и фракционного состава (нефракционированная смесь гуминовых и фульвокислот – ГВ, фракции гуминовых кислот – ГК и фульвокислот – ФК).

Всего в работе было использовано 66 препаратов ГВ из различных природных источников, включая торфа (18 препаратов), почвы (23 препарата), угли (18 препаратов), природные воды (5 препаратов) и донные отложения (2 препарата). Из них 13 препаратов (4 препарата ГВ торфа, 6 препаратов ГК и ФК из трех почв, а также 3 препарата почвенных водорастворимых ГВ) были выделены самостоятельно, 13 препаратов являлись коммерческими, а остальные 38 были предоставлены лабораторией физической органической химии (ФОХ) кафедры органической химии химического факультета МГУ и Центром по исследованию окружающей среды UFZ (Германия). Для исследования в работе использовали

также 36 препаратов модифицированных ГВ, искусственно обогащенных различными функциональными группами. Препараты были синтезированы и предоставлены лабораторией ФОХ Химфака МГУ. Таким образом, в работе использовали 102 препарата природных и модифицированных ГВ.

1.1. Отбор и характеристика почвенных образцов

Для выделения препаратов ГВ и проведения токсикологических экспериментов были использованы три дерново-подзолистые почвы, расположенные на участках с различной степенью окультуренности территории УОПЭЦ «Чашниково»: целинном под лесом ($P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$), пахотном ($P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$) и огородном ($P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$), серой лесной почвы Тульской области (СЛ) и чернозема Курской области (Ч). Полные названия почв приведены в табл. 1.1.

Индивидуальные пробы (каждая проба составляла около 20 кг) отбирали с почвенного участка площадью примерно 10 м^2 из верхнего гумусированного горизонта на глубине 0-5 см. В целинном варианте $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ предварительно удаляли слой подстилки. Отобранные образцы почвы сушили до воздушно-сухого состояния и затем просеивали через сито с диаметром ячеек 1 мм. Из подготовленной таким образом почвы составляли средний образец, который использовали для биотестирования, химических анализов и выделения препаратов ГВ.

В отобранных почвенных образцах были определены $pH_{\text{водн}}$, $pH_{\text{КС}}$, гидролитическая кислотность по Каппену $H_{\text{Г}}$ и сумма обменных оснований по Каппену-Гильковицу [Воробьева, 1998]. Общее содержание органического углерода было определено по методу Тюрина [Орлов и Гришина, 1981]. Названия и свойства использованных в работе почв приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Некоторые физико-химические свойства использованных почв

$pH_{водн}$	pH_{KCl}	OC, %	$C_{ГК}/C_{ФК}$	$S_{ОБМ. осн.}$	$H_{Г}$
мг-экв/100 г					
Дерново-подзолистая целинная дерново-подзолистая слабодерновая глубокоподзолистая среднесуглинистая на покровном суглинке					
5.0	4.5	4.3	0.2	7.2	5.5
Дерново-подзолистая окультуренная дерново-подзолистая среднепахотная среднесуглинистая слабосмытая на покровном суглинке					
7.8	–	1.5	0.7	17.1	2.0
Дерново-подзолистая культурная дерново-подзолистая глубокопахотная среднесуглинистая					
7.3	–	3.8	0.3	37.1	1.3
Серая лесная целинная глубоковскипающая среднемощная среднесуглинистая на покровном суглинке					
6.8	–	2.0		19.8	
Чернозем типичный глубоковскипающий среднемощный целинный на лессовидном суглинке					
6.8	–	5.8		38.1	

Из приведенных данных видно, что из всех исследованных почв целинная дерново-подзолистая почва характеризовалась наибольшим уровнем кислотности почвенного раствора. Для чернозема и серой лесной почвы pH водной вытяжки были приближены к нейтральному значению. Для чернозема характерно более высокое содержание OC (5.8%), по сравнению с дерново-подзолистыми и серой лесной почвами. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, приводимыми в литературе об уровне кислотности и содержании органического вещества в почвах [Орлов, 1992].

1.2. Выделение препаратов ГВ из природных объектов

Как уже говорилось выше, в настоящее время определение понятие ГВ до сих пор основано на процессах выделения этих веществ из природных объектов. Существует целый ряд исследований, посвященных зависимости свойств

получаемых препаратов ГВ от методов, использованных для их экстракции [Li et al., 2003; Kölbl et al., 2005; Koprivnjak et al., 2006; Hayes, 2007]. Поэтому мы посчитали необходимым более подробно остановиться на методах получения ГВ из различных природных источников, использованных в нашей работе.

Гуминовые вещества торфа. Препараты торфяных ГВ выделяли щелочной экстракцией из торфа согласно [Lowe, 1992]. С целью сохранения водорастворимой фракции ГВ была опущена начальная стадия обработки торфа горячей водой. Согласно выбранной методике измельченный торф несколько раз обрабатывали смесью бензол-этанол (1:1) в соотношении торф:экстрагент 1:3. Обработку проводили до тех пор, пока экстрагируемый раствор не становился почти бесцветным. После экстракции торф высушивали при температуре 40-60°C в течение ~8 часов до исчезновения запаха бензола. Затем торф заливали раствором 0.1 М NaOH в соотношении 1:3 и оставляли на ночь. Щелочной раствор сливали и отфильтровывали, экстракцию повторяли несколько раз до тех пор, пока экстракт не становился слабо окрашенным. Порции щелочного экстракта объединяли и обессоливали пропусканием через катионит КУ-23 в Н-форме (рН полученных таким образом растворов составлял 2.95-3.4). Для разделения полученного водного концентрата на ГК и ФК его подкисляли с помощью HCl до рН 2 и оставляли на ночь. Затем декантированием отделяли раствор ФК от осадка ГК. Осадок ГК растворяли в 0.1 М КОН и добавляли твердый KCl из расчета получить суммарную концентрацию 0.3 М [K⁺]. Полученный раствор фильтровали и снова подкисляли до рН 2, отделяли осадок ГК центрифугированием и очищали при помощи электродиализа, используя целлофановые мембраны с пределом пропускания пор 14 кДа. Фракцию ФК сорбировали на смоле Амберлит XAD-2, промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции выходящего с колонки элюата на ионы Cl⁻, а затем элюировали ФК 0.1 М раствором NaOH. Полученный щелочной экстракт обессоливали пропусканием через катионит КУ-23 в Н⁺-форме.

Растворённое органическое вещество (РОВ) торфа. Тщательно перетертый воздушно-сухой торф, просеянный через сито 2-мм, заливали дистиллированной водой (1:30; масс.) и оставляли на ночь. Затем вытяжку отфильтровывали через фильтр «синяя лента». Процедуру обработки навески торфа дистиллированной водой повторяли дважды. Отфильтрованные вытяжки

объединяли и обессоливали на катионообменнике КУ-23, предварительно переведенном в H^+ -форму пропусканием 30-ти объемов 1 М НСl. Обессоленный экстракт концентрировали на роторном испарителе при 60°C.

Гуминовые вещества почв. Из почвенного образца отбирали крупные корни, затем почву растирали и пропускали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Экстракцию ГВ, включающую предварительное декальцирование почвы, проводили согласно [Орлов и Гришина, 1981]. Для декальцирования навеску почвы заливали 0.05 М H_2SO_4 или 2.7 М НСl (в случае карбонатных почв, т.е. черноземов) в отношении почва:раствор 1:5 (масс.). После отстаивания суспензии раствор сливали и операцию повторяли, пока качественная проба на кальций не обнаруживала только следы последнего в растворе. После декальцирования почву промывали 1-2 раза дистиллированной водой и приливали 0.1 М раствор NaOH в соотношении почва:раствор 1:6. Щелочной раствор гумусовых кислот сливали и отфильтровывали; экстракцию повторяли до заметного осветления щелочного экстракта. В полученный раствор гумусовых кислот почвы добавляли NaCl для коагулирования минеральных примесей. После отстаивания раствор центрифугировали для отделения минеральных коллоидов. Для выделения препаратов ГВ почвы проводили обессоливание полученного супернатанта на катионообменнике КУ-23, предварительно переведенном в H-форму. Для осаждения гуминовых кислот к супернатанту при осторожном перемешивании добавляли 1 М H_2SO_4 из расчета 20-25 мл на литр экстракта до появления первых признаков коагуляции (значение pH устанавливалось в пределах 1-2). После отстаивания осадка ГК надосадочную жидкость, содержащую ФК, сливали, а рыхлый осадок ГК центрифугировали для полного отделения от надосадочной жидкости. Обессоливание препаратов ГК проводили методом электродиализа до отсутствия положительной реакции на Cl^- и SO_4^- во внешнем растворе. Выделение ФК из полученного после отделения ГК кислого раствора проводили аналогично ФК торфа, описанному выше.

Гуминовые вещества почвенного раствора. Выделение данной группы препаратов ГВ проводили по оригинальной методике, основанной на классических методах получения почвенного РОВ [Когут, 1996] и выделения препаратов ГВ из

природных вод [Mantoura, Riley, 1975]. Схема выделения ГВ почвенного раствора приведена на рис. 1.2.

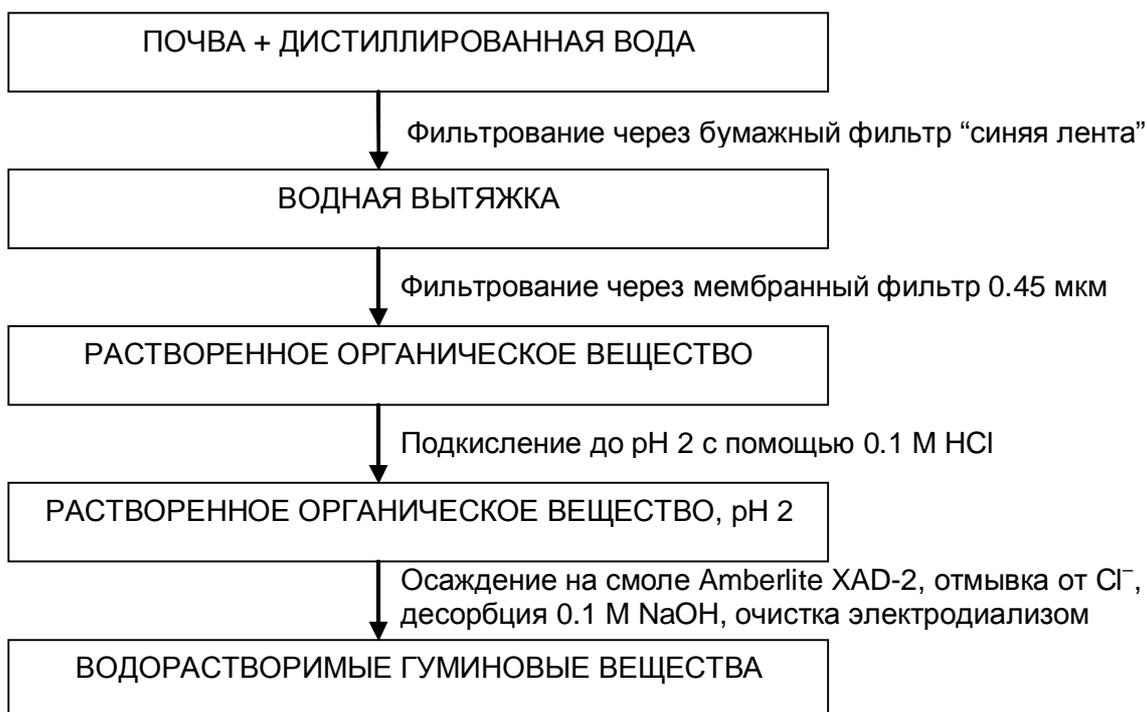


Рисунок 1.2. Схема выделения почвенных водорастворимых гуминовых веществ.

Навеску воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с размером ячеек 1 мм, заливали дистиллированной водой в соотношении почва:вода 1:2, тщательно взбалтывали и оставляли на ночь. Полученную водную вытяжку отфильтровывали через бумажный фильтр «синяя лента» и мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм для отделения истинно растворенного органического вещества от коллоидного. Отфильтрованные вытяжки подкисляли до pH 1-2 с помощью 0.1 М HCl и пропускали через стеклянную колонку, заполненную смолой XAD-2, для осаждения ГВ. Процедуры элюирования препарата ГВ почвенного раствора с колонки и последующего обессоливания были аналогичны описанным для выделения ФК торфов и почв.

Гуминовые вещества природных вод. Препараты водных ГВ выделяли согласно методике [Mantoura, Riley, 1975]. Природную воду фильтровали через сложенную в несколько слоев стеклоткань (предварительно тщательно промытую метанолом) или пропускали через фильтр 0.45 мкм и подкисляли до pH 2 концентрированной HCl. После этого раствор пропускали через колонку, заполненную макроситовой смолой Amberlite XAD-2 или XAD-8 до насыщенно-желтого окрашивания смолы (в отдельных случаях использовали ДЭАЭ-целлюлозу

согласно [Першина и др., 1989]). Затем колонку промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на ионы Cl^- . ГВ десорбировали с колонки 0.1 М NaOH до обесцвечивания элюата. Щелочной концентрат ГВ природных вод обессоливали аналогично препаратам ГВ торфа и почв.

Гуминовые вещества угля. Выделение ГК угля проводили согласно [Fong et al., 2006] с небольшими модификациями. Образец угля высушивали, растирали и пропускали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Далее к углю приливали раствор 0.1 М NaOH в соотношении 1:10. Щелочной раствор отделяли от осадка центрифугированием, а полученную надосадочную жидкость подкисляли до pH 1-2 концентрированной H_2SO_4 . После отстаивания осадка ГК надосадочную жидкость, содержащую ФК, сливали, а рыхлый осадок ГК центрифугировали для полного отделения от надосадочной жидкости. Обессоливание препаратов ГК проводили методом электродиализа. Выделение ФК из полученного после отделения ГК кислого раствора проводили аналогично ФК торфа, описанному выше.

Выделение всех препаратов в твердом виде осуществляли выпариванием или методом лиофильной сушки.

Шифры всех использованных в работе препаратов приведены в табл. 1.2. В основу названия препаратов был положен источник их происхождения (торф, уголь, почва, поверхностные воды) и фракционный состав [Перминова, 2000]. Под фракциями понимали ГК и ФК. Сумму ГК и ФК обозначали ГВ, а нефракционированное растворенное органическое вещество природных вод и почвенного раствора – РОВ. Во избежание разночтений при публикации результатов в русско- и англоязычной литературе, для составления шифров использовали латинские аббревиатуры. Шифр состоял из классификационной части, которая включает в себя обозначение источника происхождения (вода, почва, и т.д.) и фракционного состава препарата (ГК, ФК или ГВ), и специальной части, состоящей из обозначения конкретного источника и (в большинстве случаев) года выделения препарата. Классификационная часть отделяется от специальной части дефисом. Схема образования классификационной части шифра:

- первая буква (A, B, C, P, S) обозначает источник происхождения (aqua/вода, coal/уголь, peat/торф, soil/почва, соответственно);

- две (три) последующие буквы (DOM, FA, HA, HF) обозначают фракционный состав (dissolved organic matter/РОВ, fulvic acids/ФК, humic acids/ГК, sum of humic and fulvic acids/ГВ, соответственно).

Например, шифр РНФ-Т198 означает, что это препарат ГВ, выделенный из торфа Т1 в 1998 г., SHA-Pw96 – препарат ГК почв, выделенный из дерново-подзолистой почвы.

В состав природных объектов, из которых осуществлялось выделение препаратов ГВ, вошли верховые и низинные торфа различного геоботанического состава (группы моховая, травяная, древесная, древесно-травяная), почвы различной зональности (дерново-подзолистые, серые лесные и черноземы) и вида использования (лесные, пахотные и огородные участки), поверхностные воды. В работе было использовано 7 препаратов ГК угля, полученных путём обессоливания коммерческих гуматов и 1 препарат ГМК, полученный на основе коммерческого препарата. В случае если в работе использовали коммерческие препараты без предварительного обессоливания (5 препаратов), классификационная часть обозначалась как Ну. В работе использовали также 1 предварительно обессоленный коммерческий препарат ГК торфа (РНА-НТО) и стандартные образцы Международного общества по изучению гуминовых веществ (International Humic Substances Society, IHSS): ФК природных вод АФА-SR, ГК природных вод АНА-SR и РОВ DOM-SR.

Таблица 1.2. Шифры и описание использованных в работе препаратов ГВ

Препарат	Природный источник	Год выделения
Гуминовые вещества торфа		
Нефракционированная сумма ГК и ФК торфа (РНФ)		
РНФ-Т4Н98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
РНФ-Т7Н98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
РНФ-ТНН	Сосново-пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
РНФ-ТТЛ	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1994
РНФ-Sk300	Осоковый торф (Ивановская обл.)	2000
ГК торфа (РНА)		
РНА-Т4Н98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
РНА-Т5Н98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
РНА-Sk300	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	2000

Препарат	Природный источник	Год выделения
ФК торфа (peat FA => PFA)		
PFA-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.) “–“	1998
PFA-T7H98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-T3L98	Осоковый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-Sk00	Осоковый торф (Ивановская обл.)	2000
PFA-Sk300	Тростниково-осоковый торф (Ивановская обл.)	2000
РОВ торфа (peat dissolved organic matter => PDOM)		
PDOM-TНН	Верх. сосново-пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
PDOM-TTL	Низ. тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1994
Другое		
PНА-НТО	ГК торфа, коммерческий препарат НПО Биолар	–
PНА-ТН8	ГК торфа UFZ (ФРГ)	–
Гуминовые вещества почв		
ГВ почв (soil HF => SHF)		
SHF-Ст98	Чернозем луговой (Ставропольский кр.)	1998
ГК почв (soil HA => SHA)		
<i>Дерново-подзолистые почвы</i>		
SHA-Pw94	Целинная (Московская обл.)	1994
SHA-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996
SHA-Pw98	Целинная (Московская обл.)	1998
SHA-PwN	Целинная (Новгородская обл.)	1994
SHA-Pr94	Окультуренная (Московская обл.)	1994
SHA-Pr96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
SHA-Pg94	Культурная (Московская обл.)	1994
SHA-Pg96	Культурная (Московская обл.)	1996
<i>Серые лесные почвы</i>		
SHA-Gw94	Целинная (Тульская обл.)	1994
SHA-Gp94	Окультуренная (Тульская обл.)	1994
<i>Черноземы</i>		
SHA-Ст94	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1994
SHA-СтV94	Чернозем типичный (Воронежская обл.)	1994
ФК почв (soil FA => SFA)		
<i>Дерново-подзолистые почвы</i>		
SFA-Pw94	Целинная (Московская обл.)	1994
SFA-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996

Препарат	Природный источник	Год выделения
SFA-Pp94	Культурная (Московская обл.)	1994
SFA-Pp96	Культурная (Московская обл.)	1996
SFA-Pg94	Окультуренная (Московская обл.)	1994
SFA-Pg96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
<i>Серые лесные почвы</i>		
SFA-Gw94	Целинная (Тульская обл.)	1994
<i>Черноземы</i>		
SFA-CtL00	Чернозем типичный (Липецкая обл.)	2000
ГВ почвенного раствора (soil dissolved HF => SDHF)		
<i>Дерново-подзолистые почвы</i>		
SDHF-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996
SDHF-Pp96	Культурная (Московская обл.)	1996
SDHF-Pg96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
Гуминовые вещества углей		
ГК углей (coal HA => CHA)		
CHA-AGK	Коммерческий препарат АО Спецбиотех (Россия)	–
CHA-ALD	Коммерческий препарат Aldrich (ФРГ)	–
CHA-RO	Коммерческий препарат (ФРГ) UFZ	–
CHA-Pow	Коммерческий препарат Humintech (ФРГ)	–
CHA-H80	Коммерческий препарат Гумат-80 (Россия)	–
CHA-Sah	Коммерческий препарат Гумат Сахалинский (Россия)	–
CHA-GL02	ГК угля месторождения Гусиноозёрское (Россия)	2002
IHuNa-GB	Коммерческий препарат гумата Na (Green Belt, Россия)	–
IHuK-Kat	Коммерческий препарат гумата К (КатэкНИИУголь, Россия)	–
IHuK-Ru	Коммерческий препарат гумата К (Россия)	–
IHuK-USA	Коммерческий препарат гумата К (США)	–
IHuK-Chi	Коммерческий препарат гумата К (КНР)	–
ФК углей (coal HA => CFA)		
CFA-GL02	ФК угля месторождения Гусиноозёрское (Россия)	2002
Другое		

Препарат	Природный источник	Год выделения
CHR-GL02	ГК без фракции ГМК угля месторождения Гусиноозёрское (Россия)	2002
CHM-GL02	ГМК угля месторождения Гусиноозёрское (Россия)	2002
CHM-Pow	ГМК коммерческого препарата Humintech (ФРГ)	2002
CHG-GL02	Серые ГК угля месторождения Гусиноозёрское (Россия)	2002
CHB-GL02	Бурые ГК угля месторождения Гусиноозёрское (Россия)	2002
Гуминовые вещества природных вод		
ГВ природных вод (aquatic HF=> AHF)		
AHF-RMX2	р. Москва (XAD-2) (Московская обл.)	1995
ГК природных вод (aquatic HA => АНА)		
АНА-SH013	Болотные воды (XAD-8) (оз. Hohlosee, ФРГ)	
АНА-SR	Стандартный образец IHSS	
ФК природных вод (aquatic FA => АФА)		
АФА-SR	Стандартный образец IHSS	
РОВ природных вод (aquatic DOM => ADOM)		
ADOM-SR	Стандартный образец IHSS	
Гуминовые вещества донных отложений		
ГВ донных отложений (bottom sediments HF => BHF)		
BHA-Sk00	Озеро Сахтыш (Ивановская обл.)	2000
BFA-Sk01	Озеро Сахтыш (Ивановская обл.)	2001

1.3. Модифицированные ГВ

Наряду с ГВ из различных природных источников, в нашей работе также были использованы модифицированные ГВ, любезно предоставленные научной группой проф. д.х.н. Перминовой И.В. (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Модифицированные препараты использовали при проведении исследований, направленных на оценку защитных свойств ГВ в присутствии тяжёлых металлов (ТМ), в условиях железодефицитного хлороза и в условиях солевого стресса. В первом случае модификация ГВ была направлена на получение производных, обладающих повышенной связывающей способностью к металлам, во втором – на получение производных, обогащённых железом, а в третьем – кремнием. Выбор кремния в качестве модифицирующего агента был обусловлен тем, что по современным представлениям кремний способствует

адаптации растений как к абиотическим, так и биотическим стрессам, что привело к введению силикатов в качестве добавок к ряду удобрений [Currie, Perry, 2007; Liang et al., 2007].

Всего в работе исследовали 36 препаратов модифицированных ГВ; в качестве исходного препарата ГВ использовали ГК угля США-Pow, полученные путём обессоливания коммерческого препарата Powhumus (Humintech, ФРГ).

В настоящее время хорошо известно, что взаимодействие ТМ с ГВ происходит преимущественно по механизму образования комплексных соединений с координационной связью ГВ-металл, при этом определяющую роль играют карбоксильные и фенольные группы. Так как комплексообразующие свойства наиболее сильно выражены у ГВ, обогащенных кислородсодержащими функциональными группами, то это обстоятельство может быть использовано для получения гуминовых реагентов, обладающих большей комплексообразующей способностью, путем внедрения в структуру ГВ фрагментов, обогащенных фенольными гидроксилами. С другой стороны, для усиления связывающих свойств ГВ по отношению к ТМ представляется перспективным получение сшитых гуминовых производных, обогащенных функциональными группами, что усилит сорбционные и комплексообразующие свойства ГВ. Такие реагенты могут быть использованы в качестве эффективных сорбентов. Поэтому в данной работе была проведена оценка защитных свойств фенол- и хинонобогащённых производных ГВ, а также ряда сшитых гуминовых производных, полученных на их основе.

1.3.1. Гидроксилированные ГВ

Одним из способов модификации для обогащения структуры ГК хиноидными фрагментами послужил подход, основанный на конверсии фенольных фрагментов, присутствующих в структуре ГК, в хиноны. С этой целью были выбраны широко используемые препаративные и промышленные методы окисления фенолов в хиноны, которые бы позволяли проводить реакцию в воде в щелочной среде, что дало бы возможность работать с полностью растворенной формой ГК. Для получения модифицированных ГК использовали три метода:

- реакция Тойбера (соль Фреми, нитрозодисульфат калия);
- реакция Эльбса (персульфат калия);
- реакция Фентона (пероксид водорода в присутствии катионов железа(II)).

Механизмы реакции Тойбера, Эльбса и Фреми можно описать общей схемой, представленной на рис. 1.3.

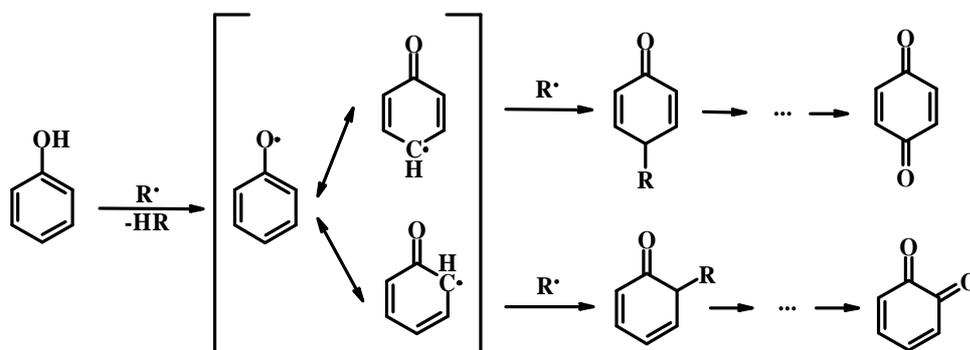


Рисунок 1.3. Механизм реакций гидроксирования фенолов. В качестве R• в реакции Тойбера выступает радикал Фреми, в реакции Эльбса – радикал $\cdot\text{OSO}_3^-$, образующийся по реакции $\text{ArO}^- + \text{S}_2\text{O}_8^{2-} = \text{ArO}\cdot + \text{SO}_4^{2-} + \cdot\text{OSO}_3^-$, а в реакции Фентона – радикал $\text{OH}\cdot$, генерируемый в реакции $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$.

Как видно из приведенной схемы, на первой стадии реакции радикал окислителя отщепляет от фенола водород с образованием феноксильного радикала. Далее вторая молекула радикала окислителя рекомбинирует с феноксильным радикалом, образуя орто- и пара-замещенные производные. Помимо этого феноксильные радикалы могут рекомбинировать друг с другом, образуя димеры. Поэтому при гидроксировании как правило образуется смесь продуктов. Получение единственного продукта возможно только в случае замещенных фенолов.

Для проведения гидроксирования по каждой из методик препарат СНА-Row предварительно растворяли в щелочи, затем к нему добавляли гидроксилирующий реагент и полученную смесь перемешивали в течение времени, необходимого для завершения реакции. Персульфат калия и пероксид водорода вводили в реакцию в количестве эквимольном общему количеству кислотных групп в навеске ГК, а соль Фреми в двухкратном избытке к этому количеству согласно стехиометрии этих реакций при взаимодействии с фенолами.

Реакция Тойбера относится к реакциям конверсии фенолов в хиноны, а реакции Эльбса и Фентона – к реакциям гидроксирования, но так как окислители брались в заведомом избытке к количеству фенольных фрагментов в структуре ГК, то во всех случаях следовало ожидать окисления образующихся гидрохинонных фрагментов в хиноны. Поэтому все препараты, полученные в реакциях, делили на две части. Одну часть выделяли и характеризовали без дальнейшей модификации, а

вторую дополнительно восстанавливали сульфитом натрия в щелочной среде для перевода хинонных фрагментов в гидрохинонные. Сульфит натрия был выбран как восстановитель, легко отделяемый от ГК с помощью электродиализа.

В дальнейшем для удобства все препараты, полученные по этим трем реакциям с последующим восстановлением и без такового, будут называться гидроксированными. Рабочие шифры, используемые в дальнейшем тексте для обозначения препаратов, указаны в табл. 1.3.

Таблица 1.3. Обозначения гидроксированных препаратов ГК

Шифр препарата	Характеристика препарата
СНР-OFr	ГК угля СНА-Pow, окисленные солью Фреми
СНР-RFr	ГК угля СНА-Pow, окисленные солью Фреми и восстановленные Na_2SO_3
СНР-OEl	ГК угля СНА-Pow, окисленные персульфатом калия
СНР-REl	ГК угля СНА-Pow, окисленные персульфатом калия и восстановленные Na_2SO_3
СНР-OFe	ГК угля СНА-Pow, окисленные H_2O_2 в присутствии Fe^{2+}
СНР-RFe	ГК угля СНА-Pow, окисленные H_2O_2 в присутствии Fe^{2+} восстановленные Na_2SO_3

1.3.2. Привитые гуминовые полимеры

Второй подход, использованный для получения ГК с повышенным содержанием хинонов, был основан на введении в структуру ГК готовых хиноидных фрагментов по методу фенолформальдегидной привитой поликонденсации, когда мономер полимеризуется в присутствии полимера. Такие методы модификации описаны не только для синтетических полимеров, но и для некоторых природных полимеров, например, лигнина, который является предшественником ГВ [Ziechmann, 1960; Flaig & Salfeld, 1958; Flaig & Salfeld, 1960] и ГВ [Shcherbina et al., 2007].

В качестве модифицирующих агентов использовали фенол, гидрохинон, пирокатехин (полимеризация по новолачному типу) и п-бензохинона (окислительная полимеризация). С использованием полученного подхода было получено несколько серий препаратов модифицированных ГК с массовыми соотношениями исходных ГК и мономера 1 г:100 мг, 1 г:250 мг и 1 г:500 мг соответственно. Варьирование количества мономера, вводимого в реакцию,

проводили с целью выяснения его влияния на свойства получаемых привитых полимеров. Для нескольких модифицированных ГК дополнительно были получены их сшитые производные.

Рабочие шифры полимеров и гуминовых производных, используемые в дальнейшем тексте для обозначения препаратов, указаны в табл. 1.4.

Таблица 1.4. Обозначения модифицированных ГК, полученных методом фенолформальдегидной конденсации

Шифр препарата	Характеристика препарата
Сополимеры ГК с гидрохиноном	
СНР-НQ100	ГК угля СНА-Рow, поликонденсированные с гидрохиноном по новолачному типу (ГК:гидрохинон:формальдегид = 1 г:100 мг:180 мг)
СНР-НQ250	ГК угля СНА-Рow, поликонденсированные с гидрохиноном по новолачному типу (ГК:гидрохинон:формальдегид = 1 г:250 мг:250 мг)
СНР-НQ500	ГК угля СНА-Рow, поликонденсированные с гидрохиноном по новолачному типу (ГК:гидрохинон:формальдегид = 1 г:500 мг:350 мг)
Сополимеры ГК с пирокатехином	
СНР-РС100	ГК угля СНА-Рow, поликонденсированные с пирокатехином по новолачному типу (ГК:пирокатехин:формальдегид = 1 г:100 мг:180 мг)
СНР-РС250	ГК угля СНА-Рow, поликонденсированные с пирокатехином по новолачному типу (ГК:пирокатехин:формальдегид = 1 г:250 мг:250 мг)
СНР-РС500	ГК угля СНА-Рow, поликонденсированные с пирокатехином по новолачному типу (ГК:пирокатехин:формальдегид = 1 г:100 мг:350 мг)
Сополимеры ГК с п-бензохиноном	
СНР-ВQ100	ГК угля СНА-Рow, полимеризованные с п-бензохиноном (ГК:п-бензохинон = 1 г:100 мг)
СНР-ВQ250	ГК угля СНА-Рow, полимеризованные с п-бензохиноном (ГК:п-бензохинон = 1 г:250 мг)
СНР-ВQ500	ГК угля СНА-Рow, полимеризованные с п-бензохиноном (ГК:п-бензохинон = 1 г:500 мг)
Сополимеры ГК с фенолом	

СНР-РН-N100	ГК угля СНА-Pow, поликонденсированные с фенолом по новолачному типу (ГК: фенол = 1 г:100 мг)
СНР-РН-N250	ГК угля СНА-Pow, поликонденсированные с фенолом по новолачному типу (ГК: фенол = 1 г:250 мг)
СНР-РН-HQ250	ГК угля СНА-Pow, поликонденсированные с фенол:гидрохиноном по новолачному типу (ГК:фенол:гидрохинон = 1000:125:125 мг)
СНР-РН-PC250	ГК угля СНА-Pow, поликонденсированные с фенол:пирокатехином по новолачному типу (ГК:фенол:пирокатехин = 1000:125:125 мг)
Сшитые сополимеры ГК с фенолом	
СНР-РН-HQ250-A	Новолак ГК угля СНА-Pow:фенол:гидрохинон, сшитый гексаметилентетрамином
СНР-РН-PC250-A	Новолак ГК угля СНА-Pow:фенол:пирокатехин, сшитый гексаметилентетрамином
Сополимеры ГК с гидрохиноном	
СНР-НВQ250-5%	ГК угля СНА-Pow, поликонденсированные с гидрохиноном в присутствии H_2O_2 и Fe^{2+} (ГК:гидрохинон = 1 г:250 мг) при концентрации ГК 5%
СНР-НВQ250-12%	ГК угля СНА-Pow, поликонденсированные с гидрохиноном в присутствии H_2O_2 и Fe^{2+} (ГК:гидрохинон = 1 г:250 мг) при концентрации ГК 12%

1.3.3. Сополимеры с салициловой и 2,3-дигидроксибензойной кислотами

Получение сополимеров ГК угля с салициловой кислотой и 2,3-дигидроксибензойной кислоты согласно [Mathur, Schnitzer, 1978; Перминова и др., 2007]. Для инициации процесса полимеризации использовали персульфат калия $K_2S_2O_8$. Для удаления избытка персульфата в качестве восстановителей использовали глюкозу или аскорбиновую кислоту. Список и описание использованных в работе модифицированных препаратов приведён в табл. 1.5.

Таблица 1.5. Обозначения использованных в работе сополимеров ГК с салициловой и 2,3-дигидроксибензойной кислотой

Шифр препарата	Характеристика препарата
Сополимеры ГК с салициловой кислотой	
СНР-SA250	Сополимер ГК угля СНА-Pow с салициловой кислотой (ГК:салициловая кислота = 1 г:250 мг)
СНР-SA250G	Сополимер ГК угля СНА-Pow с салициловой кислотой (ГК:салициловая кислота = 1 г:250 мг), восстановленный глюкозой
СНР-SA250A	Сополимер ГК угля СНА-Pow с салициловой кислотой (ГК:салициловая кислота = 1 г:250 мг), восстановленный аскорбиновой кислотой
Сополимеры ГК с 2,3-дигидроксибензойной кислотой	
СНР-DHBA250	Сополимер ГК угля СНА-Pow с 2,3-дигидроксибензойной кислотой (ГК:салициловая кислота = 1 г:250 мг)
СНР-DHBA250G	Сополимер ГК угля СНА-Pow с 2,3-дигидроксибензойной кислотой (ГК:салициловая кислота = 1 г:250 мг), восстановленный глюкозой
СНР-DHBA250A	Сополимер ГК угля СНА-Pow с 2,3-дигидроксибензойной кислотой (ГК:салициловая кислота = 1 г:250 мг), восстановленный аскорбиновой кислотой

1.3.4. Гуминовые вещества, обогащённые железом

Получение ГВ, обогащённых железом, осуществляли путём введения в раствор ГВ простой соли двухвалентного железа в виде $FeSO_4 \times 7H_2O$. Выбор концентрации железа был основан на концентрациях, рекомендуемых для приготовления питательных сред, а соотношение ГК : железо рассчитывали исходя из содержания фенольных групп в ГК, т.к. в условиях железодефицитного хлороза (рН = 8 или выше) для связывания железа предположительно доступны только эти группы (а не сумма карбоксильных и фенольных групп). Приготовление раствора проводили непосредственно перед биотестированием.

1.3.5. Гуминовые вещества, обогащённые кремнием

Гуминовые препараты, обогащённые кремнием, получали путём введения в гуминовые вещества алкоксисилильных группы $-Si(OCH_3)_3$ [Карпюк и др., 2007]. Для введения алкоксисилильных групп в структуру ГВ использовали коммерчески

доступный органосилан 3-аминопропилтриметоксисилан (АПТС). При этом предполагали, что АПТС будет реагировать с карбоксильными группами ГВ (рис. 1.4).

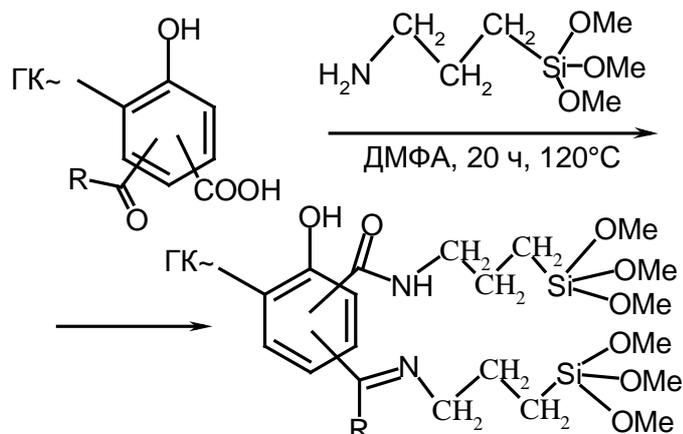


Рисунок 1.4. Предполагаемый механизм реакции ГВ с АПТС.

Количество АПТС, необходимое для модификации ГВ, рассчитывали на основании содержания в ГВ карбоксильных групп. Чтобы получить препараты ГВ с различным содержанием кремния, при модификации использовали различные количества АПТС, соответствующие 5-200% от эквимолярного. Всего было исследовано 5 препаратов модифицированных ГВ с содержанием кремния 3-11% (табл. 1.6).

Таблица 1.6. Обозначения и описание исследованных препаратов ГК, обогащённых кремнием

Шифр препарата	Характеристика препарата
СНР-АPТS5	ГК угля СНА-Рow, модифицированные АПТС в молярном соотношении 1:0.05, содержание кремния 2.6%
СНР-АPТS20	ГК угля СНА-Рow, модифицированные АПТС в молярном соотношении 1:0.2, содержание кремния 3.2%
СНР-АPТS50	ГК угля СНА-Рow, модифицированные АПТС в молярном соотношении 1:0.5, содержание кремния 6.4%
СНР-АPТS100	ГК угля СНА-Рow, модифицированные АПТС в молярном соотношении 1:1, содержание кремния 7.9%
СНР-АPТS200	ГК угля СНА-Рow, модифицированные АПТС в молярном соотношении 1:1, содержание кремния 11.3%

1.4. Характеристика ГВ

Исследованные в работе ГВ были охарактеризованы методами элементного анализа, ^{13}C ЯМР-спектроскопии, эксклюзионной хроматографии и потенциометрического титрования.

1.4.1. Характеристика элементного состава

Содержание С, Н, N определяли на элементном анализаторе Carlo Erba Strumentazione-1106. Содержание О рассчитывали по разности. Элементный состав рассчитывали на беззольное органическое вещество (табл. 1.7).

Таблица 1.7. Данные по элементному составу препаратов природных и модифицированных ГВ, исправленные на зольность и влажность, и атомные отношения

Препарат ГВ	Содержание, % масс.				Атомные отношения			Зольность, %
	С	Н	N	О	H/C	O/C	C/N	
Гуминовые вещества торфов								
PHF-T4H98	58.6	4.2	3.6	30.9	0.86	0.40	20	1
PHF-T7H98	56.9	4.1	1.3	36.8	0.87	0.48	53	9
PHF-TНН	56.0	3.9	1.8	36.8	0.87	0.51	36	1
PHF-TTL94	54.6	3.7	2.7	37.3	0.83	0.52	24	2
PHА-T4H98	54.6	4.2	2.3	37.9	0.92	0.52	28	5
PHА-T5H98	55.2	4.3	2.4	37.1	0.93	0.50	27	4
PHА-Sk300	47.1	4.5	3.2	42.2	1.15	0.66	17	3
PFA-T4H98	53.6	3.9	0.5	41.0	0.86	0.57	127	0
PFA-T5H98	49.0	4.2	2.0	43.8	1.02	0.67	28	1
PFA-T7H98	52.1	4.3	0.8	41.7	1.00	0.60	75	4
PFA-T3L98	50.8	3.2	0.5	44.5	0.76	0.66	120	0
PFA-Sk00	47.1	3.4	2.0	46.4	0.88	0.74	27	11
PFA-Sk300	38.2	3.8	1.7	49.7	1.18	0.89	27	11
PDOM-TНН	48.0	4.7	1.9	42.6	0.67	1.18	29	1
PDOM-TTL	49.0	5.2	1.1	43.8	0.67	1.27	52	3
Гуминовые вещества почв								

Препарат ГВ	Содержание, % масс.				Атомные отношения			Зольность, %
	С	Н	Н	О	Н/С	О/С	С/Н	
SHA-Pw94	56.3	3.9	5.7	30.9	0.92	0.46	12	12
SHA-Pw96	55.2	5.1	4.6	34.1	1.10	0.46	14	10
SHA-Pw98	58.1	5.1	4.5	31.3	1.05	0.40	15	8
SHA-PwN	57.2	4.5	4.0	31.9	0.93	0.41	17	2
SHA-Pg94	56.9	4.5	4.9	32.6	1.00	0.45	14	22
SHA-Pg96	55.3	4.3	4.1	35.3	0.93	0.48	16	11
SHA-Pp94	52.1	4.3	4.7	37.9	1.09	0.60	13	9
SHA-Pp96	54.0	5.0	5.5	34.5	1.11	0.48	11	22
SHA-Gp94	50.5	4.0	4.8	38.7	1.06	0.63	12	9
SHA-Gw94	56.7	4.3	5.8	30.7	0.96	0.43	12	10
SHA-Cm94	63.3	3.0	5.4	25.1	0.66	0.34	14	7
SHA-CtV94	61.2	2.7	4.5	30.6	0.62	0.42	16	7
SHA-CtL00	62.0	4.0	5.1	22.9	0.79	0.35	14	6
SFA-Pg94	51.8	4.0	3.4	39.7	0.92	0.58	18	11
SFA-Pg96	50.8	3.7	3.0	41.4	0.88	0.61	19	6
SFA-Pp94	50.9	4.5	4.8	38.8	1.06	0.57	12	11
SFA-Pp96	52.0	4.0	5.4	37.7	0.91	0.54	11	5
SFA-Pw94	51.7	3.9	2.2	41.2	0.90	0.60	27	18
SFA-Pw96	51.7	4.0	3.5	39.7	0.94	0.58	17	7
SFA-Pw98	51.0	3.6	1.5	42.9	0.84	0.63	40	2
SFA-Gw94	53.2	4.3	4.1	37.3	0.98	0.53	15	8
SFA-CtL00	44.7	4.0	3.3	39.0	0.81	0.52	16	9
SDHF-Pg96	49.9	4.4	0.4	44.3	0.67	1.06	146	31
SDHF-Pp96	48.5	4.6	0.2	45.6	0.71	1.14	283	47
SDHF-Pw96	42.9	4.1	0.3	51.7	0.90	1.15	167	60
Гуминовые вещества углей								
CHA-AGK	67.0	4.1	0.7	25.8	0.79	0.32	112	17
CHA-ALD	66.4	4.5	1.0	27.1	0.81	0.31	77	27

Препарат ГВ	Содержание, % масс.				Атомные отношения			Зольность, %
	С	Н	Н	О	Н/С	О/С	С/Н	
CHA-RO	59.8	3.9	1.3	34.1	0.78	0.43	55	10
CHA-Pow	60.7	4.7	1.4	33.3	0.93	0.41	53	12
CHA-GL02	69.4	4.2	3.6	22.8	0.72	0.25	23	3
CFA-GL02	62.5	4.6	2.1	30.8	0.89	0.37	35	5
CHR-GL02	65.8	4.2	2.9	27.1	0.76	0.31	26	3
CHM-GL02	42.7	2.8	3.3	42.2	0.82	0.50	15	9
CHM-Pow	42.8	2.9	3.3	42.0	0.82	0.49	15	9
CHG-GL02	66.6	4.2	2.5	26.8	0.74	0.30	31	12
CHB-GL02	72.2	4.2	3.3	20.3	0.69	0.21	26	25
Гуминовые вещества природных вод								
AHF-RMX2	53.6	4.0	1.1	39.3	0.88	0.55	55	1
AHA-SR	52.6	4.3	1.2	42.0	0.98	0.59	51	1
AFA-SR	52.3	4.7	0.7	42.9	1.08	0.62	88	1
ADOM-SR	52.5	4.2	1.1	42.7	0.96	0.61	56	7
Гуминовые вещества донных отложений								
BHA-Sk00	57.5	5.3	3.8	32.3	0.42	1.1	17	7
BFA-Sk01	47.1	3.1	2.9	45.9	0.73	0.79	19	7
Модифицированные гуминовые вещества								
CHP-OFr	61.1	4.1	0.9	33.9	0.81	0.42	53	7
CHP-RFr	60.8	4.1	0.9	34.2	0.81	0.42	54	6
CHP-OEl	61.8	4.4	1.5	31.3	0.85	0.38	53	8
CHP-REl	61.7	4.6	1.5	31.0	0.89	0.38	52	8
CHP-OFe	61.6	6.1	1.4	30.1	1.18	0.37	52	8
CHP-RFe	61.4	4.3	1.6	31.2	0.85	0.38	53	8
CHP-HQ100	67.7	6.6	1.3	23.1	1.18	0.26	53	17
CHP-HQ250	63.5	6.1	0.9	28.6	1.15	0.34	54	8
CHP-HQ500	61.6	6.1	0.7	30.9	1.20	0.38	55	4
CHP-PC100	60.3	3.8	1.1	34.8	0.76	0.43	52	5
CHP-PC250	62.0	4.1	1.2	32.7	0.80	0.40	53	5

Препарат ГВ	Содержание, % масс.				Атомные отношения			Зольность, %
	С	Н	Н	О	Н/С	О/С	С/Н	
CHP-PC500	61.5	4.2	1.0	33.7	0.81	0.41	52	5
CHP-BQ100	61.5	5.4	1.2	30.5	1.05	0.37	55	9
CHP-BQ250	63.4	3.7	1.7	31.2	0.71	0.37	54	12
CHP-BQ500	63.9	5.4	0.4	28.9	1.01	0.34	54	4
CHP-PH-N100	61.6	3.9	1.1	33.3	0.41	0.77	54	10
CHP-PH-N250	61.9	4.1	1.1	32.9	0.40	0.80	52	8
CHP-PH-HQ250	61.9	3.8	1.6	32.8	0.40	0.73	53	9
CHP-PH-PC250	63.0	4.1	1.3	31.6	0.38	0.77	51	9
CHP-PH-HQ250-A	58.7	4.2	3.2	33.8	0.85	0.43	53	6
CHP-PH-PC250-A	58.1	4.2	2.7	35.0	0.86	0.45	53	5
CHP-HBQ250-5%	63.8	4.5	1.5	31.3	0.85	0.36	53	5
CHP-HBQ250-12%	63.9	4.6	1.6	32.3	0.89	0.35	54	6
CHP-SA250	59.7	3.9	1.3	35.1	0.79	0.44	53	7
CHP-SA250G	59.7	3.9	1.3	35.0	0.80	0.44	53	7
CHP-SA250A	59.5	3.9	1.3	35.2	0.79	0.44	55	7
CHP-DHBA250	62.1	3.9	1.3	32.5	0.77	0.39	52	6
CHP-DHBA250G	62.2	3.9	1.3	32.5	0.77	0.39	51	6
CHP-DHBA250A	62.5	3.9	1.3	32.3	0.75	0.39	53	5
CHP-APTS5	55.5	4.90	6.44	30.6	1.06		10	11
CHP-APTS20	53.3	4.97	5.51	32	1.12		11	13
CHP-APTS50	51.5	5.53	7.82	28.7	1.29		8	13
CHP-APTS100	61.8	7.40	6.72	15.8	1.43		11	18
CHP-APTS200	43.2	5.35	8.76	31.4	1.49		6	29

Разнообразие свойств использованных в работе препаратов хорошо иллюстрирует диаграмма ванн Кревелена (рис. 1.5), отражающая распределение ГВ по степени их ненасыщенности (атомное отношение Н/С) и обогащенности кислородом (атомное отношение О/С).

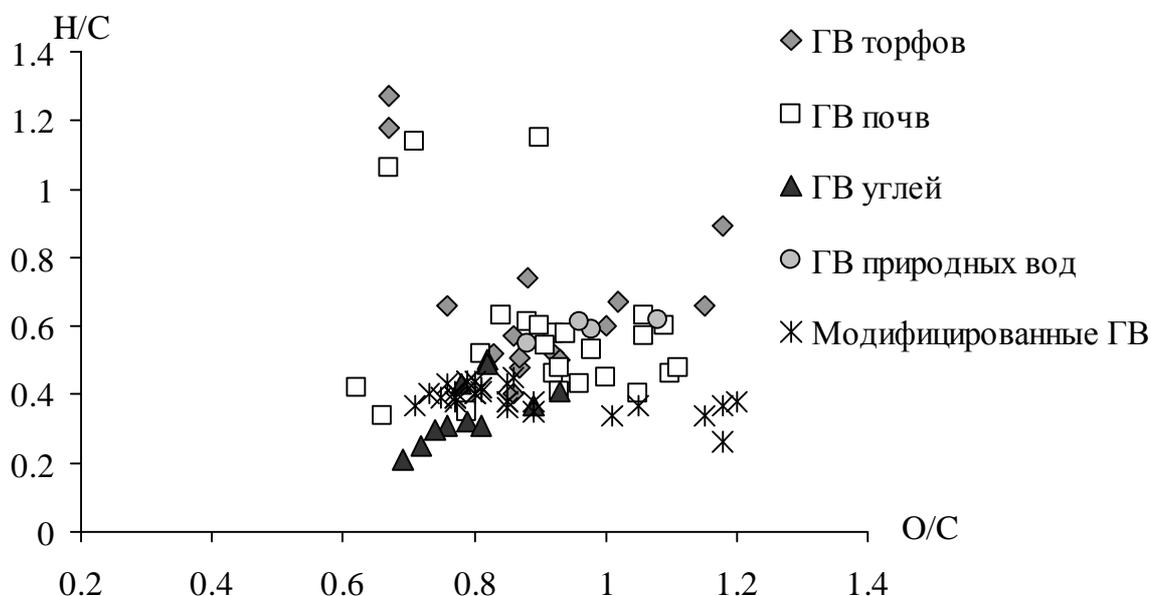


Рисунок 1.5. Диаграмма Ван Кревелена для исследованных препаратов ГВ.

Как видно из представленного рисунка, использованные в работе ГВ характеризуются разбросом значений атомных отношений Н/С и О/С 0.62-1.11 и 0.31-1.27 соответственно, что позволяет сделать вывод о представительности созданной выборки препаратов. При этом наиболее узким разбросом значений атомных отношений характеризовались ГВ углей и природных вод, тогда как ГВ почв и торфов обладали широким диапазоном указанных величин, что указывает на важность зависимость свойств почвенных и торфяных ГВ от источника выделения.

Наименьшими значениями отношения О/С и Н/С характеризовались препараты ГВ угля. Это свидетельствует о преимущественном содержании ароматических структур в этих препаратах и относительно небольшом количестве кислородсодержащих функциональных групп. Самые высокие значения отношения Н/С были зарегистрированы для ряда ГВ торфов (в основном, ФК) и почв (ФК и ГК дерново-подзолистых пахотных почв), что указывает на значительный вклад периферической части в их структуру и обогащённость алифатическими фрагментами. Максимальные значения отношения О/С были обнаружены для модифицированных препаратов ГВ, что связано, с искусственным введением в их структуру кислородсодержащих функциональных групп. При этом сходными значениями О/С характеризовались также препараты торфяного РОВ, что объясняется, по-видимому, высоким содержанием в них окисленных фрагментов.

Зольность всех исследованных в работе препаратов ГВ определяли методом ручного сжигания в лаборатории физико-химических методов органического анализа МГУ. Содержание золы в исследованных препаратах составляло от 0.1 до 60%. Для выяснения состава зольной части нами было проведено определение состава зольных элементов. При этом учитывали, что высокая зольность могла быть обусловлена двумя причинами. Во-первых, неполным обессоливанием препаратов (в данном случае преобладающим зольным элементом будет натрий). Во-вторых, наличием минеральных компонентов, неотделимых от органической части ГВ при помощи процедур, использованных при выделении препаратов.

Расчет компонентного состава минеральной части был проведен для 26 препаратов ГВ различного происхождения на основании данных. Для этой цели определяли содержание элементов в растворах препаратов известной концентрации. Из полученных данных рассчитывали молярное содержание соответствующего элемента в исходном препарате. Затем на основании химических свойств элемента делали предположение о форме, в которой он присутствует в золе. Для каждого элемента определяли массу зольной формы в расчете на единицу массы препарата ГВ и рассчитывали суммарную массу золы по данным АЭС-ИСП. Полученные величины соотносили с результатами прямого определения зольности.

Учитывая трудность разложения соответствующих карбонатов, считали, что все щелочные металлы в условиях определения превращаются в карбонаты, а остальные элементы – в оксиды (Жилин, 1998). Однако необходимо было принять во внимание наличие в золе кислотных оксидов (SiO_2 , TiO_2 , V_2O_3 , Al_2O_3), которые могут реагировать с карбонатами с выделением углекислого газа:



Поэтому содержание золы в ГВ из данных АЭС-ИСП рассчитывали для двух крайних случаев: (1) реакция кислотных оксидов с карбонатами отсутствует и (2) кислотные оксиды реагируют с карбонатами в соотношении 1:1. Полученные результаты приведены в табл. 1.8.

Таблица 1.8. Состав и содержание зольных форм элементов, входящих в минеральную часть препаратов ГВ

Элемент Форма	Содержание зольной формы элемента в препарате ГВ, мг/г ОВ												Зола, %	
	Na	K	Ca	Mg	Al	Fe	Si	Ti	Mn	Zn	B	Cu	мин.-	экс.
	Na ₂ CO ₃	K ₂ CO ₃	CaCO ₃	MgCO ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	TiO ₂	MnO ₂	ZnO	B ₂ O ₃	CuO	макс.	
Гуминовые вещества торфа														
PHF-T4H94	4.4	22	34	6.4	5.9	3.3	24		0.23	2.0	0.9	0.31	8.6-10	2
PHF-T5H94	10.3	5	32	6.9	2.9	2.6	22		0.35	0.6		0.10	6.7-8.3	2
PHF-T6H94	17.4	17	73	16.4	7.6	2.7	45		0.32	1.1	3.4	0.23	15-18	2
PHF-THH	2.9	5	32	2.8	2.2	0.8	18		0.26	0.4		0.10	5.2-6.5	1
PHF-TTL	5.2	10	15	2.9	2.5	3.6	12		0.27	0.5		0.17	4.4-5.3	2
PHA-THTO	71.4	н/о	0.9	0.2	1.0	0.3	6	0.1	0.36	0.03	0.5	0.02	8.1-8.9	12
PHA-TH8	30.2	н/о	0.6	0.1	1.0	0.2	3		0.14	0.01	0.2	0.01	3.4-3.5	5
PDOM-TT	6.1	20.2	2.6	0.4	0.3	0.1	5		0.11	0.05	0.8	0.01	1.5-3.5	3
Гуминовые вещества почв														
SHA-Pw94	14.9	н/о	0.3	0.1	1.4	2.2	1	0.2	0.05	0.01	0.0	0.02	2.0-22	12
SHA-Pw96	39.0	н/о	0.8	0.3	2.9	3.1	5	0.4	0.24	0.03	0.2	0.03	5.2-7.9	9
SHA-Pp96	58.8	н/о	1.6	1.4	6.8	2.5	16	0.3	0.30	0.15	0.3	0.05	8.8-22	21
SHA-Pg94	14.1	н/о	0.5	1.0	5.9	3.0	11	0.2	0.06	0.02	0.1	0.03	3.3-3.6	22
SHA-Pg96	49.8	н/о	0.9	0.7	4.4	1.5	11	0.1	0.28	0.06	0.3	0.05	6.9-15	11
SHA-Gw94	45.2	н/о	1.2	0.3	2.0	0.9	4	0.1	0.21	0.04	0.2	0.04	5.4-5.5	1
SHA-Cm94	83.6	н/о	1.7	0.4	1.8	0.6	8	0.1	0.46	0.05	0.6	0.10	9.7-9.8	5
SHA-CtV94	48.4	н/о	0.9	0.2	0.7	0.2	5		0.23	0.03	0.4	0.04	5.5-5.6	7
SFA-Pw96	6.2	170.0	1.3	0.2	0.8	0.4	14	0.1	0.17	0.07	1.2	0.02	1.4-19	8
SFA-Pp96	18.6	963.1	13.9	0.4	1.7	0.6	47	0.1	0.52	0.10	3.3	0.16	4.9-10	2
SFA-Pg96	25.5	21.5	9.4	0.5	2.9	1.9	100	0.2	0.56	0.29	9.6	0.09	10-17	7
SFA-Gw94	9.5	330.5	10.5	2.0	2.2	1.8	9	0.1	0.36	0.46	6.3	0.10	1.1-37	17
SDHF-Pw96	72.3	1.8	8.6	1.2	3.5	1.9	2328	0.4	1.37	0.39	2.7	0.13	233-255	60
SDHF-Pp96	29.2	1.9	4.8	1.5	1.6	0.7	618	0.2	0.95	0.15	1.6	0.14	62-66	47
SDHF-Pg96	30.4	1.6	7.1	1.0	3.9	1.6	921	0.3	2.12	0.28	3.2	0.22	92-97	31
Гуминовые вещества углей														
CHA-AGK	18.5	16	18	0.8	16.6	33.4	27	2.4	0.38	0.4		0.19	11-13	15
CHA-ALD	3.9	17	24	3.5	4.6	11.7	24		0.54	1.3	8.2	0.61	8.2-9.9	27
CHA-RO	46.9	н/о	1.7	0.3	1.4	1.8	5	0.1	0.27	0.02	0.3	0.02	5.7-5.8	10

н/о – содержание К не определяли, т.к. образцы для ИСП готовили в растворе КОН.

Проведенные исследования показали, что основными зольными элементами в исследованных препаратах ГВ являются Na, K, Ca, Si. При этом Ca преобладает в ряде нефракционированных препаратов ГВ торфа и почв, тогда как Si – в препаратах ГВ водных вытяжек из почв. Принимая во внимание, что процедура

выделения препаратов ГВ почвенного раствора включала в себя фильтрование через 0.45 мкм мембранный фильтр, можно сделать вывод о том, что кремнеземные фрагменты прочно связаны с ГВ, а не являются механическими примесями. Это может указывать на то, что значительная часть экстрагирующихся ГВ представлена их комплексами с глинистыми минералами.

1.4.2. Определение структурно-группового состава ГВ методом ЯМР-спектроскопии ^{13}C

При определении структурно-группового состава ГВ в качестве основной задачи рассматривали установление набора структурных фрагментов, полностью описывающих распределение основного скелетообразующего элемента – углерода – в структуре ГВ, содержание которых поддавалось бы количественному определению. Оптимальным методом для решения указанной проблемы является одномерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^{13}C .

Типичные ^{13}C ЯМР спектры ГВ различного происхождения и фракционного состава показаны на рис. 1.6. ^{13}C ЯМР спектры характеризуются широкими полосами поглощения, обусловленными перекрыванием большого количества сигналов. Максимумы интенсивности достигаются в области незамещенных алифатических фрагментов (НС), в «карбогидратной» (НСО – фрагменты) и ароматической (Ar) области спектра. Особенно интенсивные, сильно перекрывающиеся пики наблюдаются в «карбогидратной» области. Такое распределение спектральной плотности согласуется с априорной информацией о наличии в структуре ГВ высокозамещенного ароматического каркаса и углеводно-пептидной периферии. Ввиду сильного перекрывания, отнесение сигналов в подобных спектрах возможно только «поинтервально» – согласно положению резонансов атомов со сходным химическим окружением, как это показано в табл. 1.9.

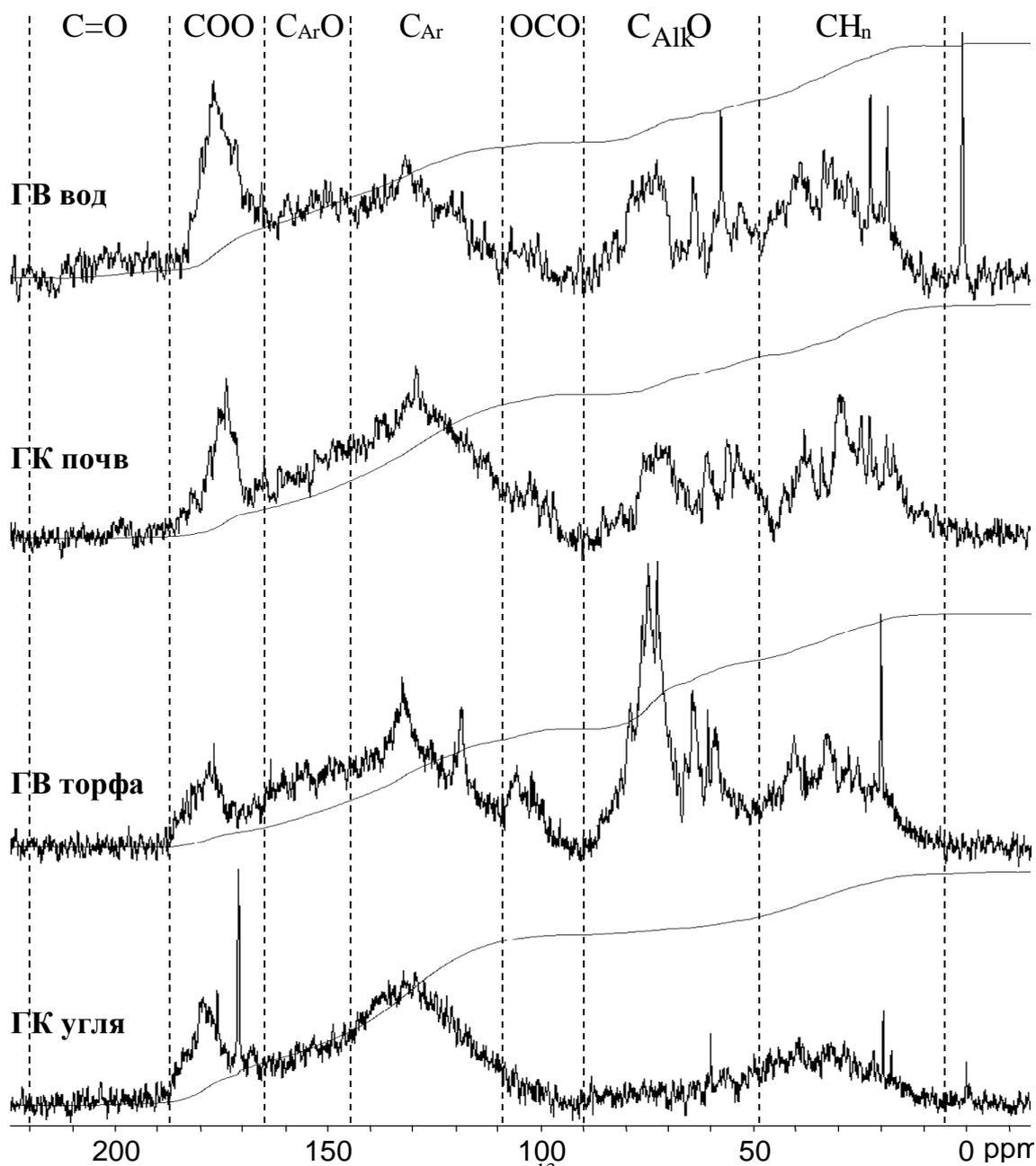


Рисунок 1.6. Типичные спектры ЯМР ^{13}C ГВ различного происхождения и фракционного состава.

Таблица 1.9. Отнесения в ^{13}C ЯМР-спектрах ГВ

Фрагмент	Интервал, м.д.	Описание
CH-N,C α -CH	5-48	C, N-замещенные алифатические фрагменты алифатические фрагменты в α -положении к электроотр. группе или ароматическому кольцу
CH ₃ -O	48-58	метоксильные и O-, N-замещенные алифатические фрагменты
CH ₂ -O,N	58-64	(«карбогидратные»)
CH-O,N	64-90	
O-CH-O,N	90-108	алифатические фрагменты, дважды замещенные гетероатомами («аномерные»)
Ar-H,C	108-145	H-, C-замещенные ароматические фрагменты
Ar-O,N	145-165	O, N-замещенные ароматические фрагменты
COO-H,C	165-187	карбоксильные группы и их производные
C=O	187-220	кетонные и хинонные группы

Максимальный уровень детализации позволяет выделить в ^{13}C ЯМР спектре 9 интервалов, интегрирование которых может быть осуществлено с необходимой точностью. Величины указанных парциальных интегралов, сумма которых описывает полный интеграл спектра, могут быть использованы как интегральные дескрипторы структурно-группового состава, если они пропорциональны содержанию атомов C в соответствующих фрагментах [Перминова, 2000]. Из-за различия времен релаксации ядер C разного типа, пропорциональность величины интеграла количеству атомов C в ^{13}C ЯМР спектре достигается только в количественных условиях его регистрации [Ковалевский и др., 2000]. Они включают в себя (1) использование времени задержки между импульсами (T_d), достаточного для полной релаксации третичных и четвертичных ядер углерода, и (2) устранение ядерного эффекта Оверхаузера. Количественные ^{13}C ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре VXR-400 при времени задержки 4-8 с.

Содержание углерода различных типов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м. д.): 220-187 – C кетонных и хинонных групп ($\text{C}_{\text{C=O}}$); 187-165 – C карбоксильных и сложноэфирных групп (C_{COO}); 165-108 – C ароматических фрагментов (C_{Ar}); 108-5 – C алифатических фрагментов (C_{Alk}). В описанных выше условиях были зарегистрированы ^{13}C ЯМР спектры ГВ,

использованных в работе. Все ^{13}C ЯМР спектры регистрировали на ЯМР спектрометре VXR-400 (Varian) на рабочей частоте 400 МГц. Навеска препарата 100 мг, растворитель 0.1 М NaOD (3 мл), 8 мм датчик. Результаты количественной обработки спектров всех исследованных препаратов приведены в табл. 1.10.

Таблица 1.10. Распределение углерода по структурным фрагментам (в % от общего содержания углерода) в природных и модифицированных препаратах ГВ

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CNO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	SC _{Ar}	SC _{Carb}
Гуминовые вещества торфа											
PHF-T4H94	0.5	13.4	17.2	29.4	2.9	16.1	2.8	2.6	15.9	46.6	21.8
PHF-T7H98	3.6	12.0	9.2	26.3	0.5	22.7	4.3	3.2	18.1	35.5	27.5
PHF-TНН	1.3	15.5	13.8	33.0	3.5	10.7	1.8	3.6	16.8	46.9	16.0
PHF-TTL	2.4	17.0	16.1	29.5	3.0	8.4	2.6	4.5	17.4	45.5	14.0
PHA-T5H98	2.3	12.8	6.7	32.2	4.3	12.4	3.4	3.9	22.0	38.8	20.1
PHA-TН8	1.6	17.5	20.6	37.9	1.7	3.7	1.0	2.6	13.3	58.6	6.4
PHA-THTO	2.6	15.0	16.5	32.1	1.1	11.6	2.2	4.1	14.8	48.6	15.0
PFA-T4H98	1.1	12.1	4.9	21.6	5.8	24.7	5.6	2.6	21.6	26.5	36.1
PFA-T5H98	3.0	15.2	8.1	24.3	6.2	26.6	2.2	1.2	13.2	32.3	35.1
PFA-T7H98	2.2	11.8	10.9	24.0	9.6	24.1	3.5	2.0	11.9	34.9	37.2
Гуминовые вещества почв											
SHF-CtV98	2.2	15.4	7.4	41.7	7.4	10.5	2.6	0.7	12.1	49.1	20.5
SHA-Cm94	1.5	14.3	8.7	48.1	2.0	6.0	0.8	4.6	14.2	56.8	8.8
SHA-CtV94	3.0	15.0	11.0	43.0	3.0	7.0	2.0	3.0	13.0	54.0	12.0
SHA-Gp94	2.0	15.0	12.0	34.0	3.0	10.0	1.0	4.0	19.0	46.0	14.0
SHA-Gw94	1.0	19.0	13.0	35.0	2.0	8.0	2.0	4.0	16.0	48.0	12.0
SHA-Pg94	1.1	15.2	12.8	32.8	3.0	10.0	2.1	5.8	17.5	45.6	15.1
SHA-Pg96	2.0	17.0	11.0	31.0	2.0	10.0	2.0	4.0	22.0	42.0	14.0
SHA-Pg98	2.5	14.4	9.7	28.6	2.8	12.2	3.1	4.9	21.8	38.3	18.0
SHA-Pp94	1.9	15.6	11.7	32.1	4.0	9.3	2.5	5.6	17.3	43.8	15.8
SHA-Pp96	3.0	17.0	10.0	21.0	4.0	12.0	3.0	5.0	25.0	31.0	19.0
SHA-Pw94	1.0	17.0	13.0	33.0	2.0	8.0	2.5	5.5	17.0	46.0	12.5
SHA-Pw96	4.0	19.0	9.0	25.0	2.0	8.0	2.0	4.0	26.0	34.0	12.0

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CHO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	SC _{Ar}	SC _{Carb}
SHA-Pw98	2.5	17.7	7.0	26.7	4.1	10.2	3.5	5.3	23.1	33.7	17.8
SHA-PwN	2.0	15.0	13.0	30.0	3.0	11.0	2.0	5.0	19.0	43.0	16.0
SFA-Pg96	3.1	18.0	13.1	28.2	2.0	11.0	2.4	4.2	17.6	41.3	15.4
SFA-Pp96	2.0	23.0	7.0	19.0	3.0	15.0	3.0	4.0	22.0	26.0	21.0
SFA-Pw96	4.0	19.5	9.8	23.5	2.0	10.0	2.5	3.5	25.1	33.3	14.5
SFA-Pw98	3.4	19.8	7.6	25.5	2.3	9.9	2.0	4.5	25.1	33.1	14.2
Гуминовые вещества углей											
CHA-AGK	0.5	16.9	10.0	47.8	0.0	0.0	1.0	3.0	20.8	57.8	1.0
CHA-ALD	1.0	15.0	13.0	43.0	0.0	0.0	1.0	6.0	21.0	56.0	1.0
CHA-RO	2.9	17.7	17.9	48.0	0.0	1.1	0.1	1.6	10.8	65.9	1.2
CHA-Pow	3.1	15.2	19.3	38.0	4.8	6.9	1.0	2.7	8.9	57.3	10.6
CHA-GL02	2.8	13.9	8.2	51.3	5.1	2.3	3.4	1.3	14.3	59.5	7.0
CHR-GL02	2.3	12.3	8.5	43.9	4.8	2.5	6.5	1.6	20.3	52.4	10.6
CHM-GL02	2.6	17.1	7.8	43.7	4.4	1.8	7.8	2.2	14.4	51.5	11.8
CHG-GL02	5.2	1.5	10.8	38.5	13.4	8.2	6.9	1.2	24.1	49.3	16.3
CHB-GL02	5.3	15.1	7.5	51.5	6.7	1.4	2.7	0.9	13.0	59.0	5.0
Гуминовые вещества природных вод											
AFA-SR	5.0	17.0	22.0	6.0		16.0		35.0	28.0		
ANA-SR	6.0	15.0	31.0	7.0		7.0		29.0	32.0		
ADOM-SR	8.0	20.0	23.0	7.0		15.0		27.0	30.0		
Модифицированные гуминовые вещества											
CHP-OFr	3.8	12.8	9.4	50.8			7.3		16.0	60.2	23.2
CHP-RFr	6.7	13.1	13.8	44.2			6.6		15.5	58.1	22.2
CHP-OEl	9.2	14.8	11.9	38.4			10.9		14.8	50.3	25.7
CHP-REl	8.4	14.5	12.7	40.7			8.5		15.2	53.4	23.7
CHP-OFe	6.0	16.1	10.0	45.3			6.2		16.5	55.3	22.7
CHP-RFe	6.7	16.1	11.0	42.3			11.8		12.1	53.3	23.9
CHP-HQ100	8.2	11.3	15.4	44.1			6.7		14.4	59.5	21.0
CHP-HQ250	6.1	8.1	15.2	41.4			14.1		15.2	56.6	29.3
CHP-HQ500	4.6	8.3	18.3	52.3			6.4		10.1	70.6	16.5

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CHO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	SC _{Ar}	SC _{Carb}
СНР-РС100	8.1	13.1	12.1	46.5			7.1		13.1	58.6	20.2
СНР-РС250	6.6	13.2	14.2	50.9			4.7		10.4	65.1	15.1
СНР-РС500	4.6	10.1	12.4	60.1			2.8		10.1	72.5	12.8
СНР-ВQ100	10.5	14.5	15.7	45.3			4.7		9.3	61.0	14.0
СНР-ВQ500	7.5	12.7	16.2	46.2			6.9		10.4	62.4	17.3
СНА-РН-N100	6	17	10	45			9		14	55	22
СНА-РН-N250	5	13	14	45			12		12	59	23
СНР-РН-NQ-250А	4	11	12	43			12		13	55	29
СНР-РН-NQ-250Р	4	11	10	43			20		12	53	32
СНР-СА250G	5	16	11	43			10		16	53	27
СНР-ДНВА250G	4	15	11	42			13		15	53	28

Как видно из приведенных в табл. 1.10 данных, наиболее сильно препараты ГВ различались по соотношению ароматических и углеводных фрагментов, входящих в состав углеродного скелета. Наиболее уникальный структурно-групповой состав характерен для ГК угля – максимальное содержание ароматического углерода (до 60%) при практически полном отсутствии углеводных фрагментов. Это позволяет предположить наличие поликонденсированных структур в составе данных соединений и их высокую гидрофобность. Высокое содержание ароматического углерода (иногда сопоставимое с ГК угля) характерно также для ГК черноземов. Однако, в отличие от угля, в них присутствуют углеводные фрагменты, в состав которых входит от 8 до 13% углерода. ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв существенно отличаются от черноземов. Содержание ароматического углерода в них не превышает 45%, тогда как содержание углерода углеводных фрагментов достигает 15-20%. Почвенным ГК весьма близки по распределению углерода ГК и ГВ торфа. ФК почв весьма отличны от ГК и характеризуются самым высоким содержанием углерода карбоксильных (сложноэфирных) групп – до 22%, содержание ароматического углерода не превышает 40%, а в состав углеводных фрагментов входит 20-25% углерода. Следовательно, можно сделать вывод о том, что ГК угля и

ФК природных вод представляют собой два граничных класса ГВ с максимальным содержанием ароматических и углеводных фрагментов, соответственно. Все остальные классы ГВ занимают по этим показателям промежуточное положение. Для ГВ вод наблюдали самое высокое содержание алкильного углерода (до 25%), довольно высокие значения этой величины (до 22%) характерны и для двух других низкомолекулярных, гидрофильных классов ГВ – для ФК почв и торфа. Описанные закономерности хорошо иллюстрируются диаграммой в координатах « ΣC_{Ar} – ΣC_{Carb} » (рис. 1.7).

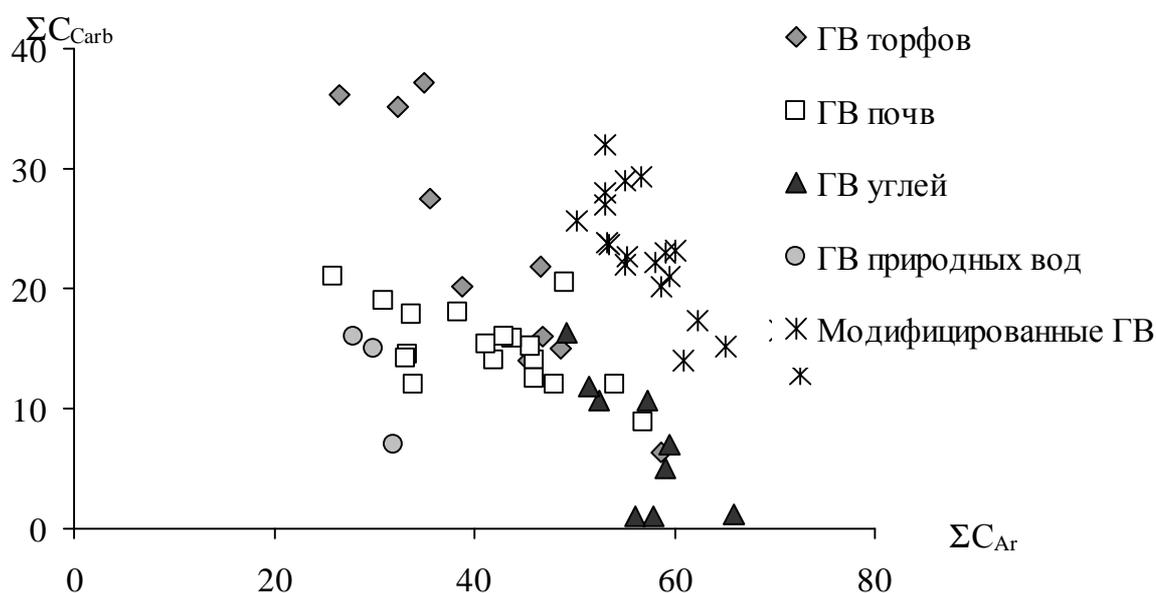


Рисунок 1.7. Диаграмма в координатах « ΣC_{Ar} – ΣC_{Carb} » для исследованных препаратов ГВ различного происхождения и фракционного состава.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в структуре ГК угля, почв и торфа преобладают каркасные (ароматические) фрагменты с относительно небольшим вкладом углеводной периферии (в ГК угля она отсутствует полностью). В тоже время вклад углеводной компоненты в структуру ФК почв значительно выше. По-видимому, именно с этим связана гораздо более высокая растворимость данных соединений, в частности, тот факт, что они остаются в растворе даже при протонировании ионогенных групп. Можно предположить, что аналогичным образом меняется и гидрофобность ГВ, достигая максимума для ГК угля и минимума – для ФК торфа.

Сравнительный анализ данных ^{13}C ЯМР, проведённых для исходного препарата ГК угля, использованного для модификации (СНА-Row), и полученных

гидроксированных производных, показал, что гидроксирование ГК способствует увеличению содержания в них кислородсодержащих функциональных групп, а в остальном незначительно изменяет структуру ГВ. Согласно приведенным данным ^{13}C ЯМР, наибольший прирост карбоксильных групп наблюдался для производных, гидроксированных по реакции Фентона. Кроме того, можно отметить тенденцию уменьшения содержания кислородзамещенного ароматического углерода в окисленных препаратах, что может быть связано с конверсией фенолов в хиноны. В восстановленных препаратах наблюдалось увеличение содержания Ag-O-фрагментов, что можно объяснить восстановлением хинонов в гидрохиноны. Полученные результаты свидетельствуют об успешности проведенной модификации ГВ.

Привитые гуминовые сополимеры, в свою очередь, также характеризовались повышенным содержанием кислородсодержащих функциональных групп. Так, количество карбоксильного углерода, нормированное на массу, уменьшалось с увеличением количества мономера, введенного в реакцию, а количество углерода в составе фенольных фрагментов было значительно выше у гуминовых сополимеров и слабо зависело от количества мономера, введенного в реакцию. Соплимеры ГК и п-бензохинона по распределению углерода были сходны с исходными ГК. Количество ароматического углерода в сополимерах, полученных по новолачному типу, монотонно возрастало с ростом количества мономера, введенного в реакцию, что свидетельствовало об увеличении доли новолачных фрагментов в сополимерах.

1.4.3. Исследование молекулярно-массового распределения ГВ методом эксклюзионной хроматографии

Для определения молекулярно-массового (ММ) состава ГВ был выбран метод эксклюзионной хроматографии, позволяющий получить информацию не только о средних ММ, но и о полной кривой молекулярно-массового распределения (ММР) ГВ. Наряду с несомненными достоинствами метода, подробно обсужденными в обзоре литературы, его применение к анализу любых полиэлектролитов и ГВ, в частности, сопряжено с опасностью появления артефактов, – так называемых, неэксклюзионных эффектов. Поэтому особое внимание в нашей работе было обращено на определение адекватных условий анализа ГВ, включая выбор образца сравнения для расчета ММР.

Хроматографический анализ проводили на колонке, заполненной гелем *Toyopearl-50HW(S)*, при элюировании 0.028 М фосфатным буфером (рН 6.8) со скоростью 1 мл/мин [Perminova et al., 2000]. Регистрацию ГВ на выходе из колонки проводили с помощью проточных детекторов УФ-поглощения. Для расчета характеристик молекулярно-массового распределения проводили калибровку колонки по полидекстранам с известными молекулярными массами.

Для обработки эксклюзионных хроматограмм гумусовых кислот использовали оригинальную программу «Geltreat», которая позволяет проводить как первичную обработку кривых элюирования – коррекцию нулевой линии, сглаживание, так и рассчитывать калибровочную зависимость, ММР и его численные дескрипторы. Изложению принятого в работе подхода к расчету дескрипторов ММР гумусовых кислот посвящена соответствующая публикация [Kudryavtsev et al., 2000].

Полученные результаты по характеристикам молекулярно-массового распределения исследованных ГВ приведены в табл. 1.11.

Таблица 1.11. Некоторые характеристики ММР исследованных препаратов ГВ

Препарат	M_n , кДа	M_w , кДа	Полидисперсность M_w/M_n
Гуминовые вещества торфа			
PHF-T10L94	4.7	19	4.0
PHF-T1H94	5.0	17.3	3.6
PHF-T4H94	5.6	22.2	4.0
PHF-T5H94	4.9	19	3.9
PHF-T6H94	4.6	17.1	3.8
PHF-T7H94	5.0	18	3.5
PHF-TНН	4.6	16.8	3.7
PHF-TTL	5.6	19	3.4
PDOM-TH	2.7	10.9	4.1
PDOM-TT	2.5	10.0	4.1
Гуминовые вещества почв			
SHF-Co94	5.5	19	3.6

Препарат	M_n, кДа	M_w, кДа	Полидисперсность M_w/M_n
SHA-Cm94	6	17	3.1
SHA-CtV94	5.9	15	2.6
SHA-Gp94	7	22	3.0
SHA-Gw94	6	21	4.0
SHA-Pg94	8	22	2.9
SHA-Pp94	8	21	2.7
SHA-Pw94	9	19	2.1
SFA-Am	8.1	20.1	2.5
SFA-CtV94	5.7	12.6	2.3
SFA-Cm94	4	11.4	2.5
SFA-Gw94	5.4	14	2.7
SFA-Pg94	5.4	12.6	2.3
SFA-Pp94	4	10	2.4
SFA-Pw94	4.7	10.2	2.2
Гуминовые вещества угля			
CHA-AGK	5.4	15.6	2.9
CHA-Pow	2.1	9.9	4.7
IHu-H80	2.5	10.5	4.2
CHA-ALD	4.6	9.6	2.1
CHA-RO	7.1	16.4	2.3
CHA-GL02	4.3	9.9	2.3
CFA-GL02	12.4	31.0	2.5
CHR-GL02	3.8	9.2	2.4
CHM-GL02	7.9	20.5	2.6
CHM-Pow	2.9	5.7	2.0
Гуминовые вещества природных вод			
AHF-RMX2	3.3	7.3	2.2
AFA-SR	6.1	12.9	2.1
AHA-SR	4.6	9.6	2.1
Модифицированные гуминовые вещества			

Препарат	M_n , кДа	M_w , кДа	Полидисперсность M_w/M_n
CHP-HQ100	5.6	16.5	2.8
CHP-HQ250	4.3	14.0	3.3
CHP-HQ500	5.9	14.7	2.3
CHP-PC100	8.8	18.5	2.1
CHP-PC250	7.8	19.3	2.5
CHP-PC500	9.5	21.1	2.2
CHP-BQ100	7.6	20.1	2.6
CHP-BQ250	7.8	20.6	2.7
CHP-BQ500	7.3	18.4	2.5
CHP-PH-N100	3.8	9.6	2.5
CHP-PH-N250	4.1	9.4	2.3
CHP-PH-HQ250	3.2	7.3	2.3
CHP-PH-PC250	3.3	8.2	2.5
CHP-HBQ250-5%	1.0	9.0	9.1
CHP-HBQ250-12%	0.9	7.8	8.5
CHP-SA250	1.6	10.1	6.3
CHP-SA250G	1.6	9.7	6.1
CHP-SA250A	1.6	9.6	6.5
CHP-DHBA250	1.8	9.8	5.4
CHP-DHBA250G	1.8	9.9	5.4
CHP-DHBA250A	1.8	10.1	5.6
CHP-APTS-5	4.1	8.7	2.1
CHP-APTS-10	3.1	8.8	2.8
CHP-APTS-20	3.4	8.6	2.5
CHP-APTS-50	3.7	11.6	3.1
CHP-APTS-100	5.3	12.7	2.4
CHP-APTS-200	3.9	15.7	4.0

Как видно из полученных данных, диапазон изменения M_w исследованных препаратов ГВ различного фракционного состава и происхождения составил от 7 до 32 кДа, а M_w/M_n – от 2.0 до 4.7. При этом по величине M_w препараты

располагались в следующий ряд: водные ГВ < почвенные ФК < почвенные ГК < ГВ торфа (рис. 1.8).

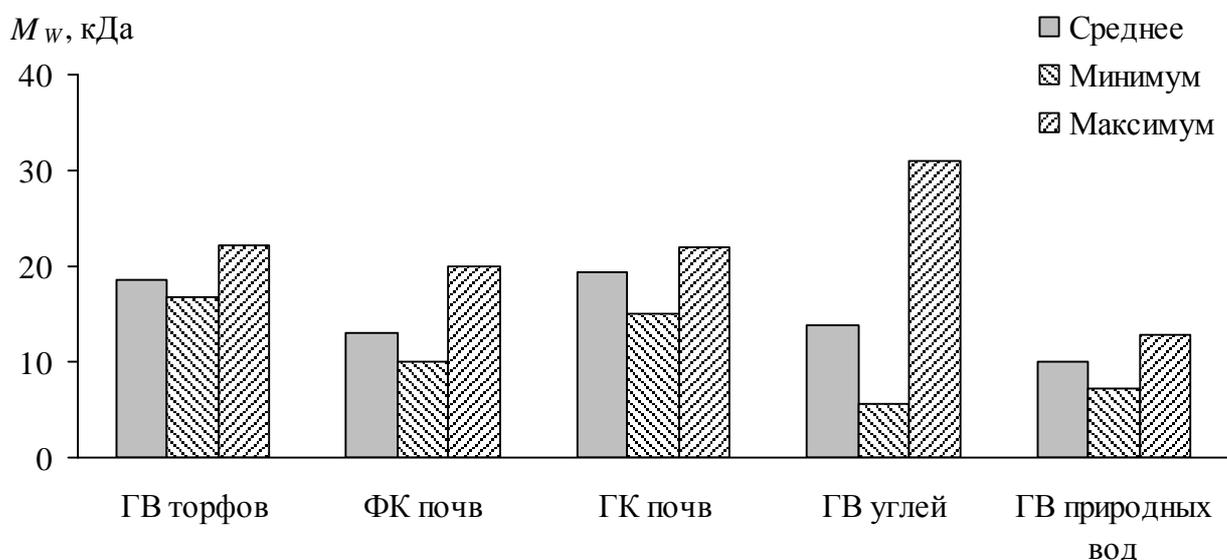


Рисунок 1.8. Средние, минимальные и максимальные значения M_w для исследованных препаратов ГВ различного происхождения и фракционного состава.

По полидисперсности ряд был несколько иной: почвенные ФК < почвенные ГК \cong водные ГВ < ГВ торфа. Легко заметить, что процедура фракционирования препаратов на ФК и ГК существенно снижает их полидисперсность, в то время как исходные экстракты характеризуются высокой полидисперсностью. Этот показатель существенно ниже для ГВ вод, макромолекулы которых практически не содержат включений полисахаридных фрагментов. Как следствие, их распределение по ММ гораздо уже, чем торфа – полидисперсность препаратов составляет в среднем 3.2.

Среди модифицированных ГВ наименьшей молекулярной массой обладали гидрохиноновые сополимеры (13.7-16.5 кДа). Пирокатехиновые сополимеры характеризовались большими молекулярными массами, которые варьировали в диапазоне 18.5-21.1 кДа, а бензохиноновые привитые полимеры имели промежуточные значения M_w , находящиеся в пределах от 18.4 до 20.6 кДа. В целом, значения M_w гуминовых сополимеров превышали таковые исходных ГК.

Для АПТС-модифицированных препаратов с увеличением степени модификации было отмечено возрастание молекулярной массы получаемых веществ.

1.4.4. Определение кислотных групп ГВ титриметрическими методами

Определение содержания карбоксильных групп в препаратах ГВ проводили Са-ацетатным методом [Данченко и др., 1998], а сумму карбоксильных групп и фенольных гидроксидов – баритовым [Danchenko at al., 1995]. Количество фенольных гидроксидов в препаратах определяли по разности общей и «карбоксильной» кислотности. Результаты приведены в табл. 1.12.

Таблица 1.12. Содержание кислотных групп в исследованных препаратах ГВ

Препарат	COOH	ArOH	Общая кислотность
	мг-экв/г		
Гуминовые вещества торфов			
РНА-Н8	2.5	0.6	3.1
РНА-НТО	1.6	1.1	2.5
РНФ-Т10Л94	3.1	5.9	9.0
РНФ-Т5Н94	3.1	6.9	10.0
РНФ-Т6Н94	3.1	3.9	7.0
РНФ-Т7Н94	2.9	5.3	8.2
РНФ-ТНН94	4.0	3.9	7.9
РНФ-ТТЛ94	4.0	5.4	9.4
Гуминовые вещества почв			
SFA-Pg96	3.3	1.1	4.3
SFA-Pw96	3.4	1.2	4.6
SHA-Cm94	3.3	0.2	3.6
SHA-CtV94	3.8	0.4	4.2
SHA-Pw94	3.4	0.2	3.6
SHA-Pw96	2.9	0.3	3.1
SHF-Co94	3.9	3.3	7.2
Гуминовые вещества углей			
CHA-RO	3.4	2.0	5.4
CHA-Pow	4.2	1.1	5.3
CHA-AGK	3.4	0.2	3.6

Гуминовые вещества природных вод			
ANA-sHO13	3.1	2.2	5.3
ANF-RMX2	7.6	3.3	10.9
Модифицированные гуминовые вещества			
CHP-OFr	4.5	1.3	5.8
CHP-RFr	4.8	1.0	5.8
CHP-OEl	5.2	0.8	6.0
CHP-REl	5.0	1.3	6.3
CHP-OFe	4.2	2.7	6.9
CHP-RFe	4.4	1.9	6.3
CHP-HQ100	4.3	4.0	8.2
CHP-HQ250	3.6	4.4	8.0
CHP-HQ500	3.1	4.3	7.3
CHP-PC100	4.0	3.5	7.5
CHP-PC250	3.7	4.1	7.8
CHP-PC500	3.6	4.6	8.0
CHP-BQ100	5.3	2.0	7.3
CHP-BQ250	5.4	3.1	8.5
CHP-BQ500	3.9	4.1	8.0
CHP-APTS-5	1.4	1.9	3.3
CHP-APTS-10	1.3	1.7	2.9
CHP-APTS-20	1.1	1.9	2.9
CHP-APTS-50	0.6	1.7	2.4
CHP-APTS-100	0.4	1.3	1.7
CHP-APTS-200	0	1.1	1.1

Как видно из табл. 1.12, общее содержание кислотных групп в исследованных препаратах ГВ торфа, почв, углей и природных вод и лежало в пределах 3.6-10.9 ммоль/г, содержание карбоксильных групп составляло 1.6-7.6 ммоль/г, что соответствует диапазонам величин, обычно приводимым в литературе. Среди исследованных природных препаратов ГВ минимальное содержание карбоксильных групп (1.6 и 2.5 мг-экв/г) было обнаружено в

препаратах ГК торфов, а максимальное – в ГВ природных вод (7.6 мг-экв/г). Остальные препараты характеризовались сходным содержанием COOH-групп (2.9-4.2 мг-экв/г). Максимальное содержание фенольных групп было зафиксировано в ГВ торфов, минимальное – в ГК почв и одном препарате ГК угля. Наибольшая общая кислотность была характерна для одного из препаратов ГВ торфов и одного – природных вод. Как следует из представленных данных, отчетливой взаимосвязи между общей кислотностью препаратов и источником их происхождения не наблюдалось.

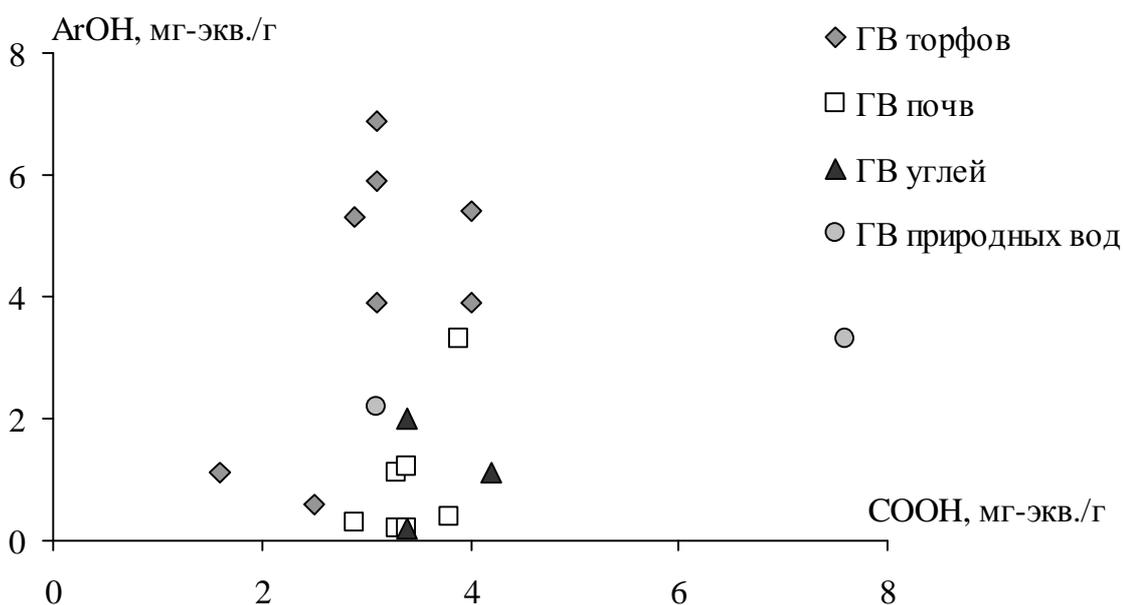


Рисунок 1.8. Содержание кислотных групп в исследованных препаратах ГВ различного происхождения и фракционного состава.

В то же время данные титриметрического анализа позволяют говорить о небольшом увеличении общей кислотности модифицированных гидроксированных препаратов по сравнению с исходным препаратом ГК, обусловленном, преимущественно, ростом «карбоксильной» кислотности. Это может свидетельствовать о наличии побочных окислительных процессов, приводящих к возникновению карбоксильных групп. Аналогичное возрастание содержания карбоксильных групп было отмечено и для производных ГК, полученных с помощью пирокатехина и п-бензохинона. Появление карбоксильных групп в составе указанных полимеров объясняется, по-видимому, протеканием в ходе полимеризации побочных окислительных процессов, сопровождающихся расщеплением бензольного кольца и образованием карбоксильных групп. В целом

следует отметить высокую степень модификации исходного препарата ГК – все привитые полимеры характеризовались величинами фенольной кислотности, превосходящими исходный препарат в 2-4 раза.

Титриметрические данные свидетельствуют также о том, что в АПТС-модифицированных препаратах наблюдалось уменьшение карбоксильной кислотности, что является доказательством протекания химической реакции между карбоксильными группами ГК и аминогруппой АПТС. С увеличением степени модификации от 5 до 200% наблюдали снижение количества свободных карбоксильных групп, а препарате СНР-АПТС-200 свободных карбоксильных групп обнаружено не было.

Глава 2. Исследование защитного действия ГВ методами биотестирования: метрологическая характеристика и количественное описание детоксифицирующих свойств

Несмотря на высокий уровень существующих в настоящее время инструментальных методов, при проведении исследований, связанных с биологическими объектами, неизбежно применение биотестирования, позволяющего получать интегральную оценку воздействия факторов окружающей среды на живые организмы. Так, даже при наличии полной характеристики объекта окружающей среды с точки зрения содержания в нём загрязняющих веществ, в большинстве случаев его токсичность невозможно предсказать, что связано, в первую очередь с недостаточной формализацией процессов синергетического или антагонистического действия совместно присутствующих в окружающей среде объектах. Поэтому при оценке состояния окружающей среды биотестирование играет особую роль.

При изучении взаимодействия с живыми организмами ГВ проблема усложняется, по крайней мере, вследствие двух дополнительных факторов, а именно небольшими эффектами ГВ и недостаточной изученностью механизма их действия. Поэтому при изучении действия ГВ на живые организмы нерешённой остаётся проблема получения количественных данных биотестирования, отвечающих современным требованиям надёжности и критической оценки собираемой информации. Следовательно, при использовании методов биотестирования необходимо принимать во внимание нерешенную проблему достоверности получаемых результатов, связанную, с одной стороны, с неизбежной погрешностью метода и, с другой стороны, с гетерогенностью свойств, характерных для биологических объектов. Для получения надёжных, научно обоснованных результатов при проведении научного исследования необходимо, прежде всего, правильное планирование структуры исследования. В частности, одним из обязательных шагов является проведение метрологической

характеристики используемых методов биотестирования, а также планирование объема выборки, позволяющего получать данные, отвечающие заданной точности.

2.1. Выбор тест-культуры

В качестве тест-объектов, пригодных для оценки действия токсикантов и других биологически активных веществ, обычно используют наиболее чувствительные к ним растения (их фрагменты, проростки или взрослые растения). Однако для ГВ, в связи с недостаточной изученностью их действия, классификации растений на среднечувствительные, малочувствительные и относительно устойчивые, как это обычно делается для токсикантов, например, гербицидов [Ларина и др., 2004], не существует. Поэтому нами были предварительно проведены эксперименты, направленные на выявление культуры, наиболее пригодной для биотестирования.

Для этой цели нами был выбран метод проростков в различных модификациях – широко распространенный способ оценки биологической активности различных препаратов, обладающих гербицидной или стимулирующей активностью [Гуминовые удобрения..., 1968; Минеев и др., 1991]. Основным достоинством данного метода является экспрессность: время проведения эксперимента составляет от 3 до 9 дней. Кроме того, одним из рекомендуемых способов обработки растений растворами ГВ является замачивание в них семян [Справочник пестицидов..., 2007], что позволяет регистрировать стимулирующее действие ГВ уже на начальных стадиях развития растений. Это явилось дополнительной причиной, обусловившей выбор данного метода биотестирования для предварительных экспериментов. Для биотестирования по методу проростков семена тест-культуры обрабатывают раствором исследуемого вещества, а затем помещают в термостат для прорастания. По окончании проведения эксперимента проводят учет выбранного тест-отклика. На основании сравнения величин тест-отклика в контрольном варианте (без обработки) и вариантах с обработкой делают вывод о положительном/негативном действии исследуемого вещества.

Нашей задачей на первом этапе проведения исследований являлся выбор условий биотестирования, позволяющих достоверно оценивать стимулирующее действие ГВ. Для исследования были выбраны 2 препарата ГВ, полученных из

торфа оз. Сахтыш (PFA-Sk00 и RHA-Sk00); препараты фульвокислот (ФК) и ГВ низинного торфа (PFA-T798 и RHF-T798, соответственно); 2 препарата ГК почв (SHA-Pw98 и SHA-Cm98) и 5 коммерческих препаратов гуматов угольного происхождения (IHuNa-GB, IHuK-Kat, IHuK-Ru, IHuK-Chi и IHuK-USA). Таким образом, в работе использовали 11 гуминовых препаратов различного происхождения и состава. Перечень и условные обозначения использованных при биотестировании ГВ приведены в табл. 2.1. Перечень условий, в которых проводили биотестирование (тест-культуры, тест-отклики, концентрации гумусовых кислот, и способы обработки семян ГВ), приведен в табл. 2.2.

Для выбора условий биотестирования было проведено 32 опыта, в большинстве случаев опыт состоял из 8-9 вариантов в 4-х кратной повторности.

Таблица 2.1. Условные обозначения и источники происхождения исследованных препаратов

№	Условное обозначение	Происхождение и состав препарата
1	PFA-Sk00	ФК торфа, озеро Сахтыш
2	RHA-Sk00	ГК сапропеля, озеро Сахтыш
3	PFA-T798	ФК низинного торфа
4	RHF-T798	ГВ низинного торфа
5	SHA-Cm98	ГК луговой черноземной почвы
6	SHA-Pw98	ГК дерново-подзолистой почвы
7	IHuNa-GB	Коммерческий препарат гумата Na (Green Belt, Россия)
8	IHuK-Kat	Коммерческий препарат гумата К (КатэкНИИУголь, Россия)
9	IHuK-Ru	Коммерческий препарат гумата К (Россия)
10	IHuK-USA	Коммерческий препарат гумата К (США)
11	IHuK-Chi	Коммерческий препарат гумата К (КНР)

Таблица 2.2. Условия проведения биотестирования по методу проростков

Тест-культура	Тест-отклик	Способ обработки	Концентрация ГВ, мг/л
Маш <i>Phaseolus aureus</i> сорт «ВИР-628»	Всхожесть и длина корней	Замачивание*, проращивание**	0.5 – 1000
Пшеница <i>Triticum aestivum</i> «Московская-35»	Всхожесть, длина корней и побегов	«—«	1 – 1000
Редис <i>Raphanus sativus</i> var. <i>radiculata</i> сорт «18 дней»	«—«	«—«	1 – 1000
Огурцы <i>Cucumis sativus</i> сорт «Изящный»	Всхожесть, длина корней и побегов, биомасса проростков	Проращивание	1 – 100

* - время замачивания 12 часов

** - проращивание в растворе ГВ

Как видно из табл. 2.2, исследование действия ГВ проводили на примере четырех тест-культур. Выбор тест-культур был обусловлен их принадлежностью к различным ботаническим семействам и группам, принятым в растениеводстве (табл. 2.3). Это позволило нам получать представительные результаты, пригодные для экстраполяции на практически все сельскохозяйственные культуры.

Таблица 2.3. Перечень и описание исследованных тест-культур

Тест-культура	Сорт	Группа	Семейство
Маш <i>Phaseolus aureus</i>	ВИР-628	Зернобобовые	Бобовые <i>Fabacea</i>
Пшеница <i>Triticum eastuvum</i>	Московская-35	Зерновые	Мятликовые <i>Poacea</i>
Редис <i>Raphanus sativus</i> var. <i>radiculata</i>	18 дней	Овощные корнеплоды	Капустные <i>Brassicacea</i>
Огурцы <i>Cucumis sativus</i>	Изящный	Плодовые овощи	Тыквенные <i>Cucurbitacea</i>

Перед началом экспериментов отбирали однородные по размеру семена без внешних признаков заболеваний и повреждений. Препараты ГВ растворяли в 0.1 М NaOH с последующим доведением рН раствора до рН дистиллированной воды (5.5-5.6). Все эксперименты проводили в чашках Петри с предварительно внесёнными туда дистиллированной водой (контрольные варианты) или раствором ГВ соответствующей концентрации. Объём жидкости зависел от используемой культуры и варьировался в пределах 5-10 мл. Далее в чашки Петри помещали по 10 предварительно замоченных в дистиллированной воде или растворе ГВ семян тест-культуры. Время замачивания составляло 12 часов. Затем чашки Петри помещали в термостат ($t = 25^{\circ}\text{C}$) на 72 ч. По окончании термостатирования проводили учет опыта: измеряли длину корня и побега каждого проростка и считали общее количество проросших семян, а в ряде экспериментов (на огурцах) сырую биомассу. При использовании в качестве тест-культуры огурцов семена не замачивали, термостатирование проводили в течение 72 ч при 30°C , а затем опыт продолжали еще в течение 6 дней при комнатной температуре.

Как показали результаты биотестирования, ГВ в концентрации 1-1000 мг/л не влияли на всхожесть семян (табл. 2.4).

Таблица 2.4. Влияние ГВ различного происхождения на всхожесть семян различных тест-культур (время замачивания 12 ч, концентрация ГВ 1-1000 мг/л)

Тест-культура	Всхожесть, %		Кол-во исследованных препаратов ГВ
	контроль	ГВ	
Маш <i>Phaseolus aureus</i>	94±2	91±2	6
Пшеница <i>Triticum aestivum</i>	82±3	85±2	6
Редис <i>Raphanus sativus</i> var. <i>radiculata</i>	61±5	66±5	4
Огурцы <i>Cucumis sativus</i>	81±3	82±3	8

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о нецелесообразности использования показателя всхожести семян для оценки действия ГВ. Длины корней и побегов проростков оказались более чувствительными показателями. Типичные концентрационные зависимости длины корней проростков в присутствии ГВт приведены на рис. 2.1.

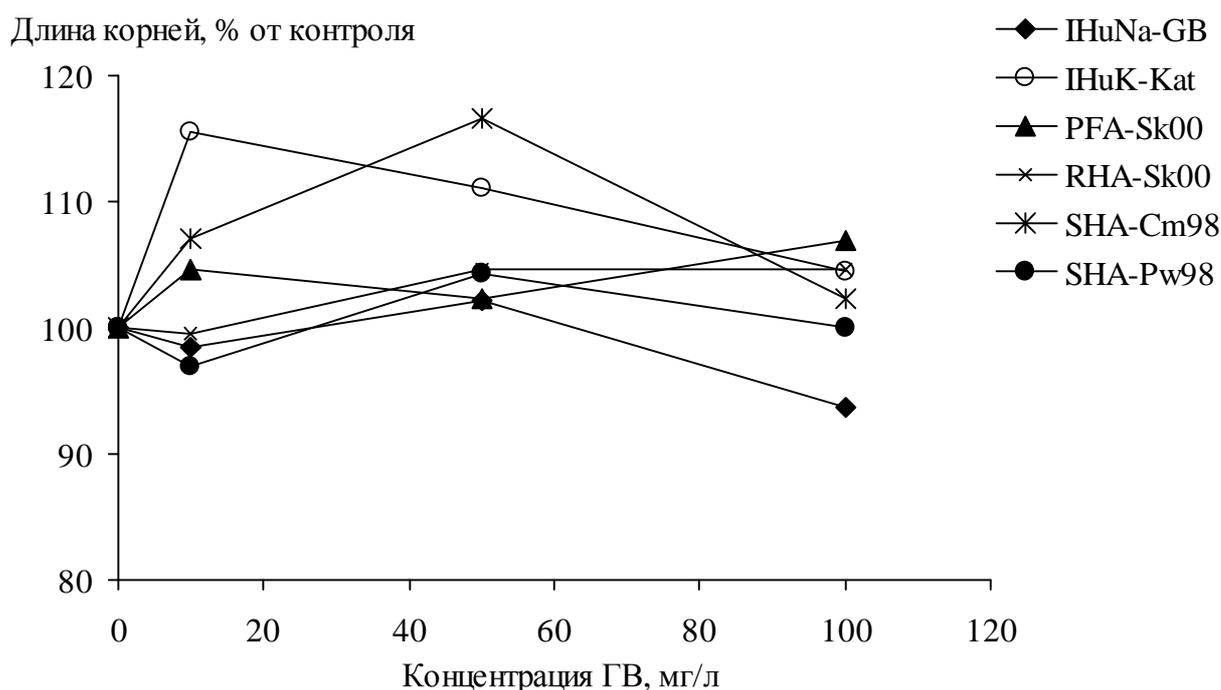


Рисунок 2.1. Длина корней проростков маша при предварительном замачивании семян в растворах ГВ различной концентрации.

Как видно из рис. 2.1, ни один из исследованных препаратов ГВ (включая продажные гуминовые препараты) не обладал выраженным стимулирующим действием по отношению к машу. Среди всего ряда изученных препаратов максимальный эффект ((116±7)% от контроля) наблюдали при обработке семян маша раствором ИнуК-Кат в концентрации 10 мг/л и SHA-Cm98 в концентрации 50 мг/л. Следует отметить, что и для остальных препаратов наибольший эффект наблюдали при концентрации ГВ 50 мг/л. Аналогичные результаты были получены и для других культур. Поэтому сравнения действия различных препаратов ГВ (табл. 2.5) приведено для концентрации 50 мг/л.

Таблица 2.5. Влияние ГВ различного происхождения на длину корней и побегов различных культур (концентрация ГВ 50 мг/л).

Тест-культура	Длина, % от контроля		Кол-во исследованных ГВ
	Корни	Побеги	
Маш <i>Phaseolus aureus</i>	110±8	–	6
Пшеница <i>Triticum aestivum</i>	106±8	108±8	6
Редис <i>Raphanus sativus</i> var. <i>radiculata</i>	120±13	109±15	4
Огурцы <i>Cucumis sativus</i>	110±10	108±10	8

Данные табл. 2.5 свидетельствуют, что корни и побеги проростков различных культур обладали сходной чувствительностью по отношению к ГВ. При этом необходимо подчеркнуть, что величина стимулирующего действия ГВ была крайне незначительна.

Концентрации ГВ, рекомендуемые для применения, составляют от 30 до 1000 мг/л [Справочник пестицидов..., 2007]. Однако в этом диапазоне концентраций стабильного и значительного стимулирующего действия ГВ нами обнаружено не было (рис. 2.1; табл. 2.5). Эффективность ГВ в среднем составляла 10%, достигая в отдельных случаях 20%. Подобные результаты были получены не только для самостоятельно выделенных, то также и для 5 испытанных нами

коммерческих препаратов. При этом ни одна из исследованных тест-культур не позволила выявить достоверного стимулирующего действия ГВ.

Особо следует подчеркнуть, что отсутствие выраженного стимулирующего действия ГВ не является следствием низкой чувствительности выбранных тест-объектов. Согласно литературным данным эти культуры обладают высокой отзывчивостью к внесению низких концентраций токсических веществ и положительно реагируют на обработку ГВ на фоне гербицидов [Христева, 1973; Genevini et al., 1994; Анисимова и др., 1998]. По всей видимости, полученные данные свидетельствуют о том, что ГВ не оказывают выраженного стимулирующего действия на выбранные культуры, по крайней мере, на начальных стадиях развития растений.

Для оценки действия ГВ на растения в более поздние стадии их развития нами дополнительно были проведены полевые эксперименты с использованием в качестве тест культуры редиса (сорт «18 дней»). Опыты проводили летом 2000 г в Московской области (среднее количество осадков 650-700 мм, средняя зимняя и летняя температуры -7 и $+19^{\circ}\text{C}$) на дерново-подзолистой почве (средний суглинок, рН 6.8; содержание гумуса 1.4%; в год проведения опыта была внесена нитрофоска из расчета по 60 кг азота, фосфора и калия). Схема опыта была следующая:

1. Контроль (дистиллированная вода)
2. IHuNa-GB
3. IHuK-Kat
4. IHuK-Ru
5. IHuK-USA

Концентрация гуматов была выбрана в соответствии с рекомендациями производителей этих препаратов и составила 1 г/л. Время замачивания 12 ч. Замоченные семена редиса высевали в рядки на глубину 3 см; расстояние между рядками составило 20 см; расстояние между растениями в рядке 2.5 см. Полив растений производили по мере необходимости. При уборке урожая учитывали общую массу растений и массу корнеплодов. Как показали результаты эксперимента, обработка семян редиса ГВ не привела к увеличению урожая по сравнению с контрольным вариантом (табл. 2.6).

Таблица 2.6. Действие коммерческих препаратов гуматов по результатам полевого опыта. Тест-культура редис сорта “18 дней”

Вариант	Общая биомасса 1 растения		Масса 1 корнеплода	
	грамм	% от контроля	грамм	% от контроля
Контроль	10.2±0.5	100±4	6.5±0.4	100±7
ИHuNa-GB	10.4±0.3	102±3	6.7±0.6	102±9
ИHuK-Kat	10.5±0.8	93±8	6.6±0.6	101±9
ИHuK-Ru	8.4±0.1	82±10	5.3±0.6	81±9
ИHuK-USA	10.0±0.5	98±5	6.3±0.5	97±8

Как видно из табл. 2.6, в вариантах с применением гуматов масса корнеплодов редиса составляла 81-102% от контроля. При обработке семян редиса препаратом ИHuK-Ru наблюдали значимое угнетение растений на 18-19%. В остальных вариантах общая биомасса и масса корнеплодов не отличалась от контрольной.

Результаты полевого эксперимента хорошо согласуются с результатами биотестирования по методу проростков (рис. 2.2).

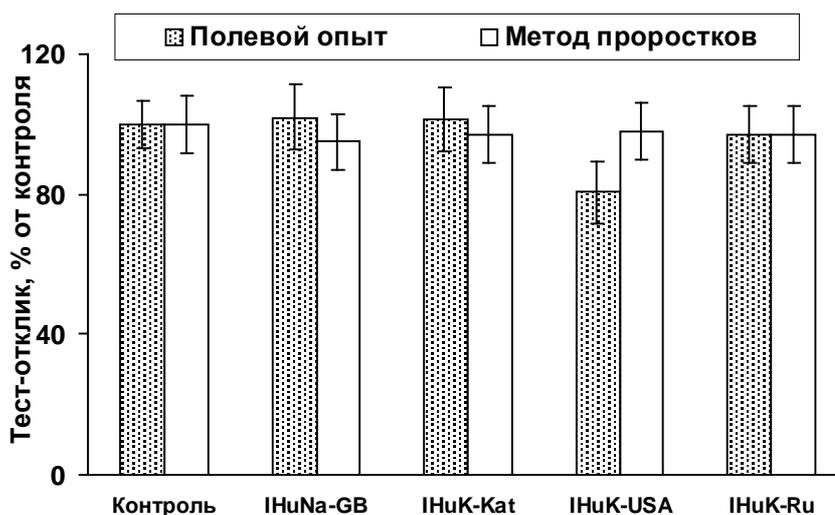


Рисунок 2.2. Сопоставление результатов полевого опыта (тест-отклик масса корнеплодов) и биотестирования по методу проростков (тест-отклик длина корней проростков). Тест-культура редис.

Как видно из данных рис. 2.2, оба способа биотестирования (полевой опыт и метод проростков) дали сходные результаты, а именно, отсутствие выраженного стимулирующего действия ГВ. Поэтому для исследования действия ГВ можно

рекомендовать использование метода проростков как более экспрессного и менее трудоёмкого.

Полученные результаты показали, что среди исследованных культур не представляется возможным выделить какую-нибудь, характеризующуюся повышенной отзывчивостью к внесению ГВ. Принимая во внимание также незначительную величину регистрируемого действия ГВ, в качестве тест-объекта следовало выбрать культуру, характеризующуюся наименьшей вариабельностью используемого тест-отклика. Для проведения сравнения культур по этому показателю были проведены эксперименты в 100-кратной повторности, на основании которых рассчитывали коэффициент вариации, показывающий относительную меру рассеивания признака и косвенно характеризующего воспроизводимость. Коэффициент вариации V рассчитывали согласно [Дмитриев, 1995] как

$$V = \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} 100\% \quad (2.1)$$

где \bar{x} – арифметическое среднее, а $s_{\bar{x}}$ – среднеквадратическое отклонение среднего.

Расчет арифметического среднего проводили по общепринятой формуле [Дмитриев, 1995]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.2)$$

где \bar{x} – среднее, n – количество измерений, а x_i – i -тое измерение.

Среднеквадратическое отклонение среднего рассчитывали как

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n n_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.3)$$

Кроме того, для рассчитывали относительную ошибку выборочного среднего, или «точность опыта», которую вычисляли на основании следующей формулы:

$$P = \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} 100\% \quad (2.4)$$

Сравнение использованных тест-культур по этим показателям приведено в табл. 2.7.

Таблица 2.7. Величины коэффициента корреляции и точность опыта метода проростков для исследованных тест-культур

Вариант	Длина корней		Длина побегов	
	Коэффициент вариации V , %	Точность опыта, %	Коэффициент вариации V , %	Точность опыта, %
Маш	27	3.0	34	3.5
Пшеница	27	2.5	23	3.1
Редис	45	4.5	46	4.7
Огурцы	39	4.7	33	4.0

Как видно из табл. 2.7, наихудшей воспроизводимостью (большие значения коэффициента вариации) и точностью опыта (высокие значения) характеризовались редис и огурцы; средними значениями – маш, а наилучшими – пшеница. Поэтому в большинстве случаев для проведения биотестирования в качестве тест-культуры использовали пшеницу.

Для проведения биотестирования, позволяющего получать результаты с требуемой точностью и надежностью, предварительно была проведена метрологическая характеристика методов, включающая в себя определение таких параметров как необходимый объем выборки, точность и принципиальные границы метода.

2.2. Метрологическая характеристика использованных методов биотестирования

Проведение метрологической характеристики использованных методов биотестирования включало в себя несколько этапов:

- проверка нормальности распределения получаемых результатов;
- стандартная статистическая обработка, на основании которой вычисляли «точность опыта» и принципиальные границы метода;
- планирование необходимого объема выборки.

Проверку нормальности распределения полученных тест-откликов проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова, обычно рекомендуемого как самого надёжного в случае с небольшими объёмами выборок [Дмитриев, 1995]. Соответствие получаемых данных нормальному распределению позволило нам дальше проводить обработку данных с использованием методов параметрической статистики.

Так как основной целью применения методов биотестирования в нашей работе было определение токсичности различных сред, нами были рассчитаны также принципиальные границы использованных методов. Для этого значения тест-откликов предварительно пересчитывали в относительные величины, т.е. проценты от контроля, а затем согласно [Doerffel, 1984] проводили определение верхнего предела обнаружения X_{max} как:

$$X_{max} = 100 - \frac{3s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad (2.5)$$

и нижнего X_{min} :

$$X_{min} = \frac{3s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad (2.6)$$

Так как важнейшим этапом в постановке любого эксперимента является оценка необходимого числа наблюдений, то нами было проведено планирование объема выборки согласно [Ашмарин и др., 1975].

Выбор необходимого размера выборки n проводили как:

$$n = \frac{s_{\bar{x}}^2 t_p^2 (1 + 1/2m)}{I_p^2} \quad (2.7)$$

где s – стандартное отклонение, t_p – коэффициент Стьюдента для вероятности P и объеме выборки в предварительных экспериментах m , I_p выбираемая экспериментатором максимальная разница между истинным и выборочным средним, выраженная в процентах. Для наших исследований необходимые объемы выборки рассчитывали для $I_p = 5$ и 10% и $P = 90, 95$ and 99% .

2.2.1. Метрологическая характеристика методов биотестирования в водной среде

2.2.1.1. Метрологическая характеристика метода проростков

Для определения таких основных метрологических характеристик метода проростков как точность и принципиальные границы метода были поставлены эксперименты по методу проростков с использованием мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. В 6 чашек Петри помещали по 10 семян пшеницы и вносили по 10 мл дистиллированной воды. Затем чашки помещали в термостат на 72 часа при температуре 24°C после чего проводили учет опыта, используя в качестве тест-отклика длину побегов и корней проростков. Всего было проведено 14 экспериментов.

Проверка нормальности распределения полученных значений длин побегов и корней показала, что они удовлетворяют критерию Колмогорова-Смирнова [Дмитриев, 1995], что позволило нам дальше проводить обработку данных с использованием методов параметрической статистики.

Результаты проведенной статистической обработки приведены в табл. 2.8.

Таблица 2.8. Точность и принципиальные границы метода проростков

Тест-отклик	Точность опыта, %	Верхняя граница, Нижняя граница, длина, % от контроля	
Побеги	2.5±0.5	93±2	7±2
Корни	3.1±0.2	93±1	7±1

Как видно из табл. 2.8, точность метода проростков, рассчитанная как отношение ошибки среднего к среднему и выраженная в процентах (2.4), для побегов и корней проростков значимо не различается.

Верхний предел обнаружения составил 93%, т.е. если присутствие токсиканта приводит к угнетению проростков такому, что длина проростков составляет более 93% от контрольного варианта, то такие концентрации токсиканта нельзя будет определять данным методом, так как длины проростков не будут значимо отличаться от контрольных. С другой стороны, рассчитанные значения нижнего предела обнаружения показывают, что при сильном угнетении

проростков, таком, что длина проростков составляет менее 7% от контрольных, концентрацию токсиканта также нельзя будет определить указанным методом.

Результаты расчёта необходимого объема выборки для $I_p = 5$ и 10% и $P = 90$, 95 and 99% для метода проростков приведены в табл. 2.9.

Таблица 2.9. Необходимые объемы выборки при проведении биотестирования по методу проростков при различных значениях максимально допустимого отклонения среднего значения от истинного I_p и вероятности P

Тест-отклик	$I_p = 5\%$			$I_p = 10\%$		
	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$
Побеги	104±58	62±34	44±25	26±14	15±9	11±6
Корни	143±31	85±19	61±13	36±8	21±5	15±3

Как видно из представленной в табл. 2.9 данных, при использовании в качестве тест-отклика длины корней эксперименты требуется проводить с большей повторностью, что связано, по-видимому, с более высокой вариабельностью этого показателя по сравнению с длинами побегов.

В дальнейшей работе при проведении биотестирования эксперименты проводили при объёме выборки 90, что позволяло получать отклонения среднего значения от истинного I_p не более 5% при вероятности $P = 95\%$.

Для оценки воспроизводимости метода проростков с октября 2005 г. по апрель 2006 г. было проведено 20 экспериментов, в ходе которых определяли длины корней и побегов проростков, выращенных как описано выше в дистиллированной воде. Полученные данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, указывая в качестве фактора день проведения эксперимента.

Результаты показали, что как для корней, так и для побегов проростков значимого различия между результатами опытов, проведенными в разные дни, нет: величины статистики Фишера в обоих случаях превышали критические значения (табл. 2.10).

Таблица 2.10. Результаты однофакторного дисперсионного анализа (фактор – день проведения анализа) биотестирования по методу проростков

Тест-отклик	<i>F</i> эсп.	<i>P</i>	<i>F</i> крит.
Побеги	2.91	1×10^{-4}	1.62
Корни	14.6	1×10^{-39}	1.62

*F*эсп. – рассчитанное значение коэффициента Фишера, *F*крит. – табличное значение коэффициента Фишера, *P* – рассчитанное значение вероятности

Таким образом, нами было показано, что получаемые результаты биотестирования по методу проростков не зависят от времени проведения анализа, либо эта зависимость мала по сравнению с разбросом данных. Это позволяет проводить сопоставление между собой данных, полученных этим методом в разные дни.

2.2.1.2. Метрологическая характеристика метода определения ауксиноподобной активности с использованием колеоптилей

Для оценки ауксиноподобной активности ГВ использовали метод с использованием колеоптилей. Сущность метода заключается в регистрации прироста колеоптилей в присутствии различных стимуляторов роста.

Для оценки метрологических характеристик этого метода было проведено 3 эксперимента в 6-ти кратной повторности. Полученные результаты приведены в табл. 2.11-2.12.

Таблица 2.11. Точность и принципиальные границы метода определения ауксиноподобной активности с использованием колеоптилей

Тест-отклик	Точность опыта, %	Верхняя граница,	Нижняя граница,
		% от контроля	
Прирост длины колеоптилей, % от контроля	7.5±0.5	96±2	4±2

Таблица 2.12. Необходимые объемы выборки при проведении биотестирования с использованием колеоптилей при различных значениях максимально допустимого отклонения среднего значения от истинного I_p и вероятности P

Тест-отклик	$I_p = 5\%$			$I_p = 10\%$		
	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$
Прирост длины колеоптилей, % от контроля	24±3	10±2	7±2	6±2	2±1	2±1

Как видно из табл. 2.11, по сравнению с методом проростков, биотестирование с использованием колеоптилей характеризуется худшей точностью (более высокие значения показателя «точность опыта»), но лучшей чувствительностью. Данные табл. 2.12 свидетельствуют о том, что для получения отклонения среднего значения от истинного I_p не более 5% при вероятности $P = 95\%$ можно использовать выборки с объёмом 10, с которыми и проводили дальнейшие эксперименты.

2.2.1.3. Метрологическая характеристика биотестирования с использованием одноклеточной водоросли *Chlorella pyrenoidosa*

При проведении ряда экспериментов в качестве тест-объекта использовали одноклеточную водоросль *Chlorella pyrenoidosa*. Тест-откликом служил показатель F_v/F_m кривой индукции флуоресценции, характеризующий фотосинтетическую активность водоросли (подробнее об этом см. в Главе 3).

Для проведения метрологической характеристики метода предварительно были проведены эксперименты в 10-ти кратной повторности, а полученные результаты подвергнуты статистической обработке (табл. 2.13 и 2.14).

Таблица 2.13. Точность и принципиальные границы метода определения ауксиноподобной активности с использованием колеоптилей

Тест-отклик	Точность опыта, %	Верхняя граница, Нижняя граница, % от контроля	
F_v/F_m	0.5±0.1	99.0±0.5	1.0±0.5

Таблица 2.14. Необходимые объемы выборки при проведении биотестирования с использованием хлореллы при различных значениях максимально допустимого отклонения среднего значения от истинного I_p и вероятности P

Тест-отклик	$I_p = 5\%$			$I_p = 10\%$		
	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$
F_v/F_m	12±3	8±2	5±2	2±1	2±1	2±1

Как видно из табл. 2.13, биотестирование с использованием хлореллы характеризовалось очень хорошей точностью, сопоставимой с точностью инструментальных методов. При этом наши результаты показали, что верхний предел обнаружения составил 99%, т.е. если присутствие токсиканта приводит к снижению показателя F_v/F_m всего на 1% от контрольного, то даже такие концентрации токсиканта можно будет достоверно определять данным методом, так как определяемые величины интенсивности фотосинтеза будут значимо отличаться от контрольных.

Рассчитанные необходимые объёмы выборки (табл. 2.14) показали, что для получения отклонения среднего значения от истинного I_p не более 5% при вероятности $P = 95\%$ можно использовать 8-и кратную повторность, с которой мы и проводили дальнейшие эксперименты.

2.2.2. Метрологическая характеристика методов биотестирования в почвенной среде

2.2.2.1. Метрологическая характеристика лабораторно-вегетационного метода

Для определения основных метрологических характеристик лабораторно-вегетационного метода были поставлены эксперименты с использованием мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Семена пшеницы замачивали в дистиллированной воде на 12 ч при температуре 25°C после чего помещали в вегетационные сосуды, содержащие 100 г почвы в количестве 10 шт. семян на один сосуд. Далее пшеницу выращивали в течение 20 дней при температуре 25°C с фотопериодом 12 ч и поливом по мере необходимости. По окончании эксперимента учитывали длину и сырую биомассу растений. Для определения метрологических характеристик лабораторно-вегетационного метода было проведено 3 эксперимента в 5-ти кратной повторности.

Результаты статистической обработки полученных данных показали нормальность распределения полученных значений длины и биомассы побегов, что позволило нам дальше проводить обработку данных с использованием методов параметрической статистики.

Результаты проведенной статистической обработки приведены в табл. 2.15.

Таблица 2.15. Точность и принципиальные границы лабораторно-вегетационного метода

Тест-отклик	Точность опыта, %	Верхняя граница, Нижняя граница, % от контроля	
Длина побегов	2.1±0.5	90±2	10±2
Масса побегов	6.2±0.5	92±2	8±2

Как видно из табл. 2.15, точность лабораторно-вегетационного метода, рассчитанная как отношение ошибки среднего к среднему и выраженная в процентах (2.4), в значительной мере определялась используемым тест-откликом. Так, при использовании в качестве тест-отклика длины побегов точность опыта не отличалась от таковой, рассчитанной для метода проростков. При использовании в качестве тест-отклика массы побегов, показатель точности опыта возрастал до 6.2, значимо превышая 5, что позволяет отнести данный метод к методам с удовлетворительной, но не хорошей точностью [Лакин, 1990].

Верхний и нижний пределы обнаружения составили 90-92% и 8-10% соответственно, что значимо не отличалось от метода проростков.

Результаты расчёта необходимого объема выборки для $I_p = 5$ и 10% и $P = 90$, 95 and 99% для лабораторно-вегетационного метода приведены в табл. 2.16.

Таблица 2.16. Необходимые объемы выборки для лабораторно-вегетационного метода при различных значениях максимально допустимого отклонения среднего значения от истинного I_p и вероятности P

Тест-отклик	$I_p = 5\%$			$I_p = 10\%$		
	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$
Длина побегов	88±18	54±15	39±10	50±10	20±3	14±3
Масса побегов	90±12	58±10	40±10	54±9	23±5	17±4

Как видно из представленной табл. 2.16, при проведении исследований лабораторно-вегетационным методом для получения отклонения среднего значения от истинного I_p не более 5% при вероятности $P = 99\%$ эксперименты следует с объемами выборки около 60.

2.2.2.2. Метрологическая характеристика полевого эксперимента

Для определения основных метрологических характеристик полевого эксперимента летом 2000 г был заложен опыт в Московской области (среднее количество осадков 650-700 мм, средняя зимняя и летняя температуры -7 и $+19^\circ\text{C}$) на дерново-подзолистой почве (средний суглинок, pH 5.6, содержание гумуса 3%) с использованием мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L сорта Московская-39. По окончании эксперимента учитывали длину и сырую биомассу растений, в предварительных экспериментах использовали 4-х кратную повторность. В качестве тест-отклика использовали сырую биомассу 10 растений. Результаты статистической обработки приведены в табл. 2.17 и 2.18.

Таблица 2.17. Точность и принципиальные границы лабораторно-вегетационного метода

Тест-отклик	Точность опыта, %	Верхняя граница, Нижняя граница, % от контроля	
Масса побегов	14	91	9

Таблица 2.18. Необходимые объемы выборки для лабораторно-вегетационного метода при различных значениях максимально допустимого отклонения среднего значения от истинного I_p и вероятности P

Тест-отклик	$I_p = 5\%$			$I_p = 10\%$		
	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$
Масса побегов	1646	994	713	900	370	251

Как видно из табл. 2.17 и 2.18, среди использованных методов полевой эксперимент характеризовался наихудшими показателями со статистической точки зрения. В частности, рассчитанный показатель точности опыта составил 14%, что свидетельствует о крайне высоком разбросе данных. При этом рассчитанные необходимые объемы выборки колебались в пределах от 251 до 900 даже при

желаемой относительной вероятной погрешности среднего 10% (в предыдущих экспериментах при определении необходимого объёма выборки использовали 5% относительную погрешность). Поэтому в дальнейшем при проведении полевых экспериментов при выборе повторностей руководствовались производственными возможностями.

2.3. Количественное описание защитного действия ГВ в присутствии токсикантов

Защитное действие ГВ по отношению к живым организмам в присутствии токсикантов различных классов, т.е. явление детоксификации, ранее отмечалась многочисленными исследователями. Тем не менее, большинство работ посвящено исключительно констатации наблюдаемого явления, в то время как исследование его взаимосвязи со структурными параметрами ГВ, их собственным действием на тест-организмы и связующей способностью по отношению токсикантам практически не проводились.

Для количественной оценки защитных свойств ГВ в присутствии токсикантов (обычно в данном случае используют термин «детоксифицирующих») нами был использован подход, подразумевающий использование коэффициента детоксификации D и константы детоксификации K_{oc}^D , определяемых из данных токсикологических экспериментов [Perminova et al., 2006]. Достоинством данного показателя является то, что он отражает изменение уровня токсичности T в присутствии ГВ ($T_{T+ГВ}$) по сравнению с токсичностью T в их отсутствие (T_T), учитывая при этом возможное изменение тест-отклика под влиянием собственного воздействия ГВ. Принимая, что:

$$T_T = \frac{R_0 - R_T}{R_0} \quad (2.8)$$

и

$$T_{T+ГВ} = \frac{R_{ГВ} - R_{T+ГВ}}{R_{ГВ}} \quad (2.9)$$

где R_0 – тест-отклик в контроле (без Т и ГВ); R_T – тест-отклик в присутствии Т; $R_{ГВ}$ тест-отклик в присутствии ГВ; $R_{Т+ГВ}$ тест-отклик в присутствии Т и ГВ, получаем:

$$D = \frac{T_T - T_{Т+ГВ}}{T_T} = 1 - \frac{T_{Т+ГВ}}{T_{ГВ}} \quad (2.10)$$

При условии, что чувствительность тест-организмов к собственному действию ГВ не изменяется в присутствии токсиканта, использование коэффициента D позволяет охарактеризовать детоксицирующий эффект ГВ, обусловленный только связыванием токсиканта в нетоксичные комплексы, на фоне их стимулирующего воздействия на тест-объект. Поэтому, зная зависимость коэффициента D от концентрации ГВ (т.н. кривую детоксификации), можно рассчитать константу детоксификации K_{OC}^D . Преимущество данного параметра при оценке детоксификации по сравнению с коэффициентом D состоит в том, что если последний позволяет получить точечную оценку детоксификации, то K_{OC}^D является характеристикой детоксицирующей способности ГВ во всем диапазоне концентраций. При этом его физический смысл аналогичен константам связывания, получаемым из химических экспериментов.

Для вывода уравнения данной константы запишем уравнение связывания токсиканта ГВ:



Тогда долю токсиканта, находящегося в свободном состоянии (α), можно выразить через соответствующую константу связывания:

$$\alpha = \frac{[T]}{[T] + [T - ГВ]} = \frac{1}{1 + C_{ГВ} \times K_{OC}} \quad (2.12)$$

В условиях, когда токсичность раствора прямо пропорциональна концентрации токсиканта, токсичность в его присутствии будет выражаться следующим образом:

$$T_T = k \times C_T \quad (2.13)$$

где k – коэффициент пропорциональности.

Токсичность токсиканта в присутствии ГВ аналогично можно записать как:

$$T_{T+ГВ} = k \times [T] \quad (2.14)$$

Подставляя (2.6) и (2.7) в уравнение (2.3), получаем:

$$D = 1 - \frac{[T]}{C_T} = 1 - \alpha \quad (2.15)$$

Выражая долю несвязанного токсиканта α через концентрацию ГВ на основании зависимости K_{OC} от a (2.12), получаем:

$$D = \frac{K_{OC}^D \times C_{ГВ}}{1 + K_{OC}^D \times C_{ГВ}} \quad (2.16)$$

Фигурирующую в данном уравнении константу, определяемую видом зависимости эффекта детоксификации от концентрации ГВ, мы назвали константой детоксификации – K_{OC}^D . Она будет эквивалентна константе химического связывания Т-ГВ только в том случае, если величина эффекта детоксификации D зависит от единственного фактора – концентрации свободной формы токсиканта. На практике K_{OC}^D можно рассчитать путем аппроксимации экспериментальных зависимостей D от концентрации ГВ уравнением (2.16). Поэтому результаты всех токсикологических экспериментов представляли в виде соответствующих кривых детоксификации.

Использование данного интерпретационного аппарата предъявляло вполне конкретные требования к постановке экспериментов по детоксификации. Так, для расчета каждой точки на кривой детоксификации необходимо было измерить тест-отклик в четырех тест-системах: (1) контроль, (2) токсикант при рабочей концентрации в отсутствие ГВ, (3) ГВ при тестируемой концентрации в отсутствие токсиканта, (4) токсикант в рабочей концентрации в присутствии тестируемой концентрации ГВ. В связи с изложенным, все дальнейшие эксперименты по детоксификации проводились в соответствии с описанными требованиями.

Глава 3. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса

В настоящее время хорошо известно, что ГВ влияют на поведение различных органических загрязняющих веществ в окружающей среде. В частности, ГВ способны связывать ксенобиотики в нетоксичные комплексы [McCarthy, Jimenez, 1985; Oris et al., 1990; Perminova et al., 1996, 2001; Misra et al. 2000] или способствовать их разложению [Gamble, Khan, 1988; Zeng et al., 2002; Klavins et al., 2001]. Так как и связывание токсикантов, и их разложение приводит к уменьшению концентрации свободного ксенобиотика, то в присутствии ГВ наблюдается снижение токсичности среды, а защитные свойства ГВ в присутствии токсикантов часто называют детоксифицирующими.

Работы, показывающие зависимость уровня токсичности гербицидов в почвенных и водных средах от содержания в ней органического вещества, проводятся начиная с конца прошлого века [Сосновая и др., 1983; Захаренко, 1990; Genevini et al., 1994; Anisimova et al., 1997; Anisimova et al., 1998; Silva et al., 2004]. Эффект снятия ингибирующего действия сим-триазинового гербицида симазина при непосредственном внесении гумата натрия в среду выращивания поврежденных гербицидом растений был отмечен Куликом и Горовой [Кулик, Горовая, 1980]. Сухой вес корней растений ячменя в варианте с совместным внесением гумата натрия и симазина составил 87% от контроля, тогда как внесение симазина без ГВ приводило к 50% угнетению растений. Теми же авторами было показано, что внесение гумата натрия в почвенную среду, загрязненную симазином, привело не только к полному снятию токсичности гербицида по отношению к растениям гороха, но и к значительной стимуляции роста культуры. Сухой вес корней растений гороха в варианте с внесением симазина составил 86%, а с внесением симазина и гумата натрия – 166% от контроля.

Рядом исследователей было установлено, что применение ГВ при выращивании поврежденных пестицидами растений положительно влияет на процессы митоза, угнетенные действием этих пестицидов, до определённых пределов. При больших дозах пестицида, вызывающих значительное повреждение процессов клеточного деления, ингибирование устраняется ГВ незначительно и,

как правило, не приводит к полному снятию токсичности [Горовая и Кулик, 1980]. Этими же авторами было показано, что под влиянием пестицидов в клетках происходит диссоциация полирибосом и увеличение фракции моносом, а в присутствии ГВ происходит прекращение диссоциации полирибосом, что приводит к нормализации рибосомального аппарата клетки [Горовая и Кулик, 1980].

Результаты цитологических исследований воздействия гербицида атразина на проростки ячменя [Кулик и Горовая, 1980; Кулик и Горовая, 1983; Горовая и др., 1985] показали снижение величины митотического индекса в корневой меристеме при одновременном увеличении метафазный индекс и частоты встречаемости патологических фаз митоза, что свидетельствовало о задержке процессов в метафазе в присутствии гербицида. По результатам этих авторов, внесение в среду гумата натрия через 7 суток полностью снимало и даже превышало величину митотического индекса в контроле. На основании этого исследователями был сделан вывод о том, что ГВ активизируют репарацию меристемы или регенерацию за счет оставшихся неповрежденных клеток, что способствует нормальному функционированию генетического аппарата [Кулик и Горовая, 1980; Кулик и Горовая, 1983].

В качестве непосредственной причины наблюдаемого снижения эффективности действия гербицидов и других органических токсикантов в присутствии ГВ большинством авторов высказывается гипотеза о связывании ксенобиотиков ГВ [Khan, 1978; Giesy et al., 1983; Vymazal, 1984; Landrum et al., 1985; McCarthy, Jiminez, 1985; Линник и Набиванец, 1986; Oris et al., 1990; Freidig et al., 1998; Haitzer et al., 1999; Verrengia Guerrero et al., 2001; Simpson et al., 2004]. Благодаря наличию в структуре ГВ ароматических структур и разнообразных функциональных групп, ГВ взаимодействуют с ксенобиотиками по всем возможным механизмам, включая водородное связывание, ван-дер-Ваальсово взаимодействие, лигандный обмен и образование комплексов с переносом заряда (КПЗ) [Gevao et al., 2000; Simpson et al., 2004]. Наряду со слабыми физико-химическими взаимодействиями, возможно также образование ковалентных связей между ГВ и ксенобиотиками по механизму окислительного связывания, когда токсикант необратимо включается в структуру ГВ [Bollag, 1992; Gjessing, Mayer, 2004].

С другой стороны, в ряде работ показано, что ГВ способствуют разложению ряда органических загрязняющих веществ, являясь катализаторами этих процессов (хорошо известные процессы косвенного влияния ГВ на разложение ксенобиотиков путём стимуляции различных микроорганизмов в нашей работе не рассматриваются). Так, химический гидролиз – первая стадия разложения большинства ксенобиотиков в окружающей среде – может ускоряться в присутствии ГВ [Gamble, Khan, 1988; Cole et al., 1995; Prosen, Zupancic-Kralj, 2005]. ГВ могут также увеличивать скорость протекания фотодеградационного процесса разложения полиядерных ароматических углеводородов (ПАУ), хлорированных ароматических углеводородов, фенолов и ряда других пестицидов [Fielding et al., 1992]. Недавние исследования показали, что ГВ играют также значительную роль в реакциях конденсации карбонильных веществ и алифатических кислот, выступая в роли катализаторов в реакции Кневегала и Кляйзена-Шмидта [Klavins et al., 2001].

В настоящее время общепринятым является положение о недоступности комплекса токсикант-ГВ, что объясняется невозможностью проникновения в живые организмы молекул столь большого размера. Данное предположение подтверждается работами по снижению биоаккумуляции ПАУ водными организмами в присутствии ГВ [Servos et al., 1989; Landrum et al., 1985; Perminova et al., 2001]. Авторами была продемонстрирована прямая взаимосвязь между реакционной способностью ГВ по отношению к исследованным ПАУ и их детоксицирующей способностью. В ряде работ, однако, положение о недоступности комплекса токсикант-ГВ подвергается сомнению. Было показано, что ГВ, по крайней мере их фракция с ММ меньше 500 Да, могут проникать через биологические мембраны [Логинов и Комиссаров, 1971; Dell’Agnola&Nardi, 1986]. Это свидетельствует о возможности поступления связанного с ГВ токсиканта в организмы. В частности, Сюняев [Сюняев, 1984] указывает на симазин в составе растительных остатков и гумуса как возможную причину последствия симазина, то есть связанный симазин сохраняет свою токсичность. Соколов и Галиулин [Соколов и Галиулин, 1987] также считают, что образование комплекса пестицид-гумус приводит к увеличению персистентности и сохранению токсических свойств препарата. Кузнецова с соавторами [Кузнецова и др., 1987] установили возможность трансформации гумат-симазинового комплекса в культуре почвенных

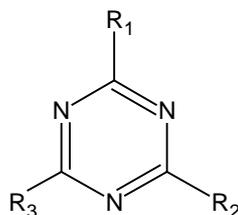
актиномицетов. Анализ ИК-спектров поглощения препаратов до и после взаимодействия с микроорганизмами показал, что ни симазин, ни ГК, ни гумат-симазиновый комплекс в первоначальном виде не обнаруживаются. Круглов [Круглов, 1991] также приводит данные о сохранении фитотоксичности некоторых гербицидов в составе ГВ. В работе Стюарта [Stewart, 1984] показано увеличение токсичности о-крезола, 2,4-динитрофенола и 2,3,6-тринитрофенола в присутствии низкомолекулярных водорастворимых ГВ (при этом использовались ФК из дерново-подзолистой почвы). Авторами работы [Balarezo et al., 2002] в ряде экспериментов было установлено увеличение токсичности 1-аминопирена для микроорганизмов. Однако в целом, несмотря на вышеприведенные данные, можно утверждать, что связывание ГВ с токсикантами обычно приводит к снижению эффективности последних.

Таким образом, анализ существующих в литературе данных показывает, что ГВ способствуют детоксификации загрязняющих веществ органической природы как в водных, так и в почвенных средах. При этом в качестве основного механизма защитного действия ГВ предполагают связывание ими ксенобиотиков в недоступные для растений комплексы. Однако ввиду сложности и неоднозначности взаимодействий, которые могут происходить в системе ГВ – гербицид – растение, подтверждение данного предположения требует постановки экспериментов, позволяющих оценить действие каждого из возможных факторов и их совокупности. Это определяет актуальность и важность проведения комплексных исследований, предусматривающих изучение собственного воздействия ГВ на растения, количественную оценку связывающей и детоксифицирующей способности ГВ в отношении ксенобиотиков и их последующее сопоставление. Так как среди разнообразных классов пестицидов, представляющих опасность с точки зрения окружающей среды, наиболее токсичными для растений являются гербициды (от лат. *herba* – трава, *caedo* – убиваю), разрабатываемые именно с целью контроля численности растительности, исследования проводили на примере гербицидов. При выборе конкретного гербицида руководствовались его опасностью для окружающей среды. Поэтому для проведения экспериментов был выбран атразин – особо опасный персистентный гербицид группы сим-триазинов [Захаренко, 1990].

3.1. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса в водной среде

В качестве модельного гербицида для создания гербицидного стресса использовали атразин – представитель класса сим-триазиновых гербицидов, ингибирующий фотосинтез. Выбор был обусловлен высокой устойчивостью этого гербицида в окружающей среде.

Атразин является типичным представителем класса триазиновых гербицидов, имеющих следующую структурную формулу:



Триазиновые гербициды различаются по своей фитотоксичности, персистентности и особенностями поведения в почве, что обусловлено, прежде всего, различиями в заместителях в положении 2 триазинового кольца. Так, сим-триазины, имеющие в положении 2 атом хлора (атразин: $R_1 = Cl$; $R_2 = NH(C_2H_5)$; $R_3 = NH(\text{изо-}C_3H_7)$), являются наиболее устойчивыми в почве: срок их последействия в зависимости от дозы и условий применения может колебаться от нескольких недель (8-10) до 4 лет, тогда как эта величина для метилтиотриазинов ($R_1 = SCH_3$) составляет всего 3-10 недель [Майер-Бодэ, 1972].

На первом этапе проводили количественную оценку связывающей способности ГВ по отношению к гербициду.

3.1.1. Связывающая способность ГВ по отношению к атразину в водной среде

Несмотря на значительное количество работ, посвященных данной проблеме, систематические исследования взаимодействия атразина с ГВ практически отсутствуют, и в литературе приводятся данные о величинах константах связывания лишь для очень ограниченного числа препаратов [Celis et al., 1998; Clapp et al., 1997; Devitt, Weisner, 1998; Gamble, Khan, 1988; Lesan, Bhandari, 2000; Martin-Neto et al., 2001; Prosen, Zupancic-Kralj, 2005]. Кроме того, не существует единого мнения о том, какие свойства ГВ определяют их связывающую

способность по отношению к атразину. Рядом исследователей были высказаны гипотезы о ведущей роли карбоксильных и/или фенольных групп [Gilmour, Coleman, 1971; Sullivan, Felbeck, 1968; Loiseau, Barriuso, 2002] и ароматических структур [Piccolo et al., 1992] ГВ. Однако результаты, на основании которых были сделаны эти выводы, были получены для выборок препаратов, имеющих весьма ограниченный объем (не более 3). Кроме того, исследованные ГВ имели преимущественно угольное происхождение, что привело к ограниченной применимости полученных данных к реальным условиям окружающей среды. При этом авторами не уделялось достаточного внимания детальному изучению строения использованных препаратов, что значительно затрудняло получение достоверных данных о характере взаимосвязи между строением и связывающими свойствами ГВ по отношению к атразину.

Таким образом, систематическое исследование связывающей способности ГВ различного происхождения является актуальной задачей, решение которой позволит найти новые подходы к регулированию токсичности гербицидов в условиях различных сред, а также использовать гуминовые препараты в качестве детоксикантов.

Связывание атразина ГВ в растворе можно условно описать уравнением:



Данной реакции соответствует следующая константа равновесия:

$$K_{oc} = \frac{[A-GB]}{[A] \times [GB]} \quad (3.2)$$

где K_{oc} – константа связывания ГВ с атразином в л/кг органического углерода ОС, $[A-GB]$ и $[A]$ – концентрация связанной и несвязанной форм атразина, соответственно; $[GB]$ – концентрация ГВ в кг ОС/л.

Ввиду того, что в условиях эксперимента общая концентрация ГВ (C_{GB}) намного больше таковой атразина (C_A), можно принять $[GB] = C_{GB}$. Учитывая, что $[A-GB] = C_A - [A]$, выражение (3.2) можно преобразовать в следующее:

$$\frac{C_A}{[A]} - 1 = K_{oc} \times C_{GB} \quad (3.3)$$

Согласно полученному уравнению K_{OC} можно рассчитать как тангенс угла наклона зависимости $(C_A/[A] + 1)$ от $C_{ГВ}$. Следовательно, для определения K_{OC} необходимо было определить концентрацию несвязанного атразина. Для этой цели проводили разделение свободного и связанного атразина методом ультрафильтрации, пропуская раствор атразина и ГВ через мембранный фильтр с диаметром пор 1000 Да. Для проведения экспериментов были выбраны следующие условия: $C_A = 1 \times 10^{-5}$ М; $C_{ГВ} = 1-100$ мг/л; рН 5.5; время взаимодействия 24 ч. Определение несвязанного атразина, прошедшего через мембранный фильтр, осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием УФ-детекции при 220 нм.

Диапазон изменения констант связывания атразина ГВ составил 110–575 л/кг С (табл. 3.1), что хорошо согласуется результатами предыдущих исследователей [Celis et al., 1998; Clapp et al., 1997; Gilmour, Coleman, 1971; Wang et al., 1990].

Таблица 3.1. Константы связывания K_{OC} атразина ГВ различного происхождения

Препарат	K_{OC} , л/кг ОС	Препарат	K_{OC} , л/кг ОС
ОВ водного экстракта торфа		ГК дерново-подзолистых почв	
PDOM-ТНН	87±5	SHA-Pw94	380±20
	ФК почв	SHA-Pp94	400±24
SFA-Pw96	192±12	SHA-Pw96	281±17
SFA-Pp96	110±10	SHA-Pp96	181±30
SFA-Pg96	275±17	SHA-Pg96	380±23
Сумма ГК и ФК торфов		ГК серых лесных почв и черноземов	
PНА-НТО	300±20	SHA-Gw94	575±34
PНF-T498	377±	SHA-Cm94	404±23
	ГК бурого угля	SHA-CtV94	501±31
СНА-AGK	575±35	SHA-PwN	444±25

Полученные величины K_{OC} свидетельствуют о незначительном взаимодействии атразина с ГВ. Так, константы связывания аналогичного набора

препаратов ГВ с ПАУ (пирен, флуорантен, антрацен) в сходных условиях составляли в среднем 10^5 л/кг ОС [Perminova et al., 1999], что на три порядка больше K_{OC} атразина.

Полученные значения K_{OC} использовали для выявления взаимосвязи между связывающей способностью и структурой ГВ (табл. 1.7; 1.10-1.12). Корреляционный анализ показал наличие связи между K_{OC} и двумя взаимозависимыми параметрами, характеризующими степень ароматичности ГВ. Коэффициенты корреляции r для пар переменных « $C_{Ar} - K_{OC}$ » и « $C_{Ar}/C_{Alk} - K_{OC}$ » составили 0.91 и 0.87 соответственно. Наличие данной взаимосвязи подтверждает важную роль ароматических фрагментов ГВ в процессе взаимодействия с атразином. Коэффициент корреляции между M_w препаратов ГВ и K_{OC} составил 0.73. Это может свидетельствовать о преимущественном связывании атразина с более высокомолекулярными фракциями ГВ. Отсутствие значимых корреляционных взаимосвязей между величинами констант связывания ГВ и такими характеристиками ГВ как содержание карбонильных и карбоксильных групп свидетельствует о том, что в выбранными нами условиях ионный обмен, который часто указывают в качестве основного механизма связывания атразина ГВ [Sullivan, Felbeck, 1968; Gilmour, Coleman, 1971], не являлся ведущим. По-видимому, наблюдаемое противоречие объясняется относительно высокими значениями pH, при которых проводили эксперименты, что способствовало преимущественному нахождению гербицида в непротонированной форме (pKa 1.7).

С другой стороны, полученные результаты хорошо согласуются с высказанными другими исследователями предположениями о ведущей роли высокомолекулярных фракций ГВ в связывании атразина [Wang et al., 1990; Stewart, 1984].

Принимая во внимание, что обогащённость ГВ ароматическими фрагментами определяет их гидрофобность, можно сделать вывод о ведущей роли гидрофобных взаимодействий в связывании атразина ГВ. Это предположение подтверждается так же и сопоставлением значений констант связывания атразина и ПАУ с гидрофобностью данных соединений. Так, величина октанольно-водного коэффициента ($lg K_{ow}$), который является общепринятой мерой гидрофобности

органических соединений, для атразина составляет 2.51, а для ПАУ варьируется от 4.45 (антрацен) до 4.88 (пирен) и 5.16 (флуорантен) [Hansch et al., 1995], что указывает на гораздо более высокую гидрофобность ПАУ по сравнению с атразином. При этом, как указывалось ранее, константы связывания ГВ с ПАУ на три порядка превосходят таковые с атразином, что свидетельствует о гораздо более высоком сродстве ГВ к более гидрофобным соединениям. Приведенные данные подтверждают высказанное предположение о ведущей роли гидрофобных взаимодействий в связывании атразина ГВ.

3.1.2. Детоксифицирующее действие ГВ по отношению к атразину в водной среде

3.1.2.1. Исследование детоксифицирующей способности ГВ по отношению к атразину с использованием пшеницы *Triticum aestivum* L.

Для исследования детоксифицирующей способности ГВ по отношению к атразину в водной среде использовали растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.; опыты проводили на примере препаратов ГВ торфов (РНФ-ТТЛ, РНФ-ТНН) и ОВ водных экстрактов этих же торфов (РДОМ-ТТЛ, РДОМ-ТНН). Выбор был обусловлен тем, что данные препараты характеризовались максимальными различиями в свойствах.

Так как атразин является гербицидом, ингибирующим фотосинтез, в качестве тест-отклика использовали интенсивность фотосинтеза растений, которую оценивали по параметрам замедленной флуоресценции (ЗФ), широко используемой для диагностики изменения состояния растений под действием сим-триазинов и биотестирования [Гольдфельд и Карапетян, 1989]. Индукционные кривые ЗФ получали путём облучения светом растений, находившихся в темноте. Для отдельной регистрации флуоресценции и ЗФ спектры последней снимали через определенный интервал времени, превышающий время жизни флуоресценции. Общий вид индукционной кривой ЗФ представлен на рис. 3.1.

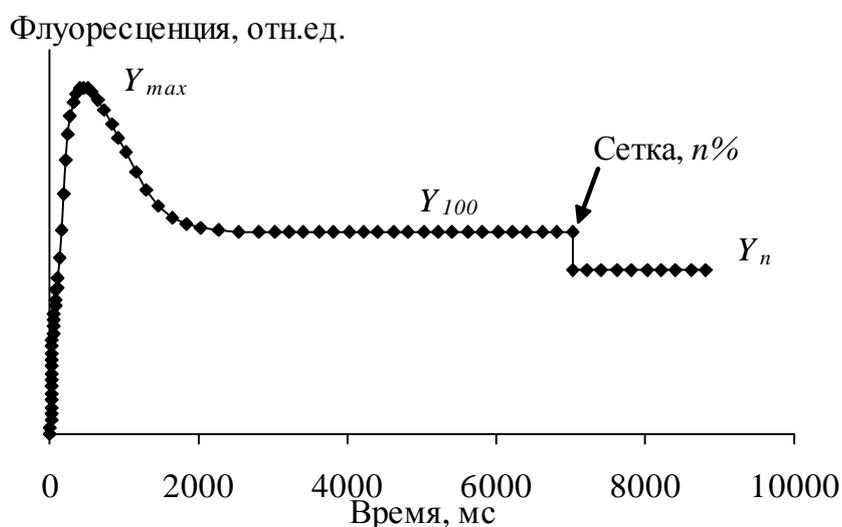


Рисунок 3.1. Кривая индукции флуоресценции.

Как видно из рис. 3.1, сначала происходит резкое возрастание ЗФ до начального пика интенсивности (Y_{max}), а затем она снижается до постоянной величины (Y_{100}). Начальный подъем интенсивности ЗФ обусловлен нарушением электронного транспорта вследствие временной блокировки оттока электронов от фотосистемы II (ФСII). В дальнейшем происходит активация акцепторной части ФСI и ферментов углеродного цикла фотосинтеза и интенсивность ЗФ снижается.

При установке сетки (рис. 3.1), ослабляющей интенсивность возбуждающего света, снижение интенсивности ЗФ происходит из-за уменьшения количества возбуждаемых светом электронов. Если ФС поражена и определенное количество переносчиков электронов заблокировано, то снижение, вызываемое установкой сетки, будет незначительным, т.к. в данном случае полное восстановление пула акцепторов электронов произойдет быстрее, а разница, возникающая при изменении интенсивности света, уменьшится. Поэтому форма световой зависимости (т.е. зависимость интенсивности ЗФ от интенсивности света) может служить характеристикой транспорта электронов в ЭТЦ до и после ФСII [Васильев и др., 1988].

Основными параметрами, используемыми для оценки состояния объектов являются: Y_{max} – интенсивность максимальной флуоресценции; Y_{max}/Y_{100} – отношение интенсивности максимальной флуоресценции к величине стационарной флуоресценции; $t_{1/2}$ – длительность индукционного спада и отношение Y_{100}/Y_n , где Y_{100} – интенсивность ЗФ при интенсивности возбуждающего света 100%, Y_n – интенсивность ЗФ при интенсивности возбуждающего света n% [Андреенко и др.,

1985]. Нами был использован показатель Y_{100}/Y_n , являющийся характеристикой скорости транспорта электронов.

В качестве тест-культуры использовали растения мягкой пшеницы сорта Краснозерная, выращенные на питательной среде Прянишникова [Прянишников, 1940] в вегетационной камере (22°C, фотопериод 14 ч, нормальная влажность). В возрасте 9-15 дней, когда фотосинтетический аппарат растений был полностью сформирован, проростки помещали на 48 ч в пробирки с растворами, содержащими атразин (0.9×10^{-4} М), ГВ (50-1000 мг/л) или их смесь. Концентрации атразина и ГВ выбирали на основании предварительно проведённых экспериментов (рис. 3.2). Контрольным вариантом служил вариант без внесения ГВ и атразина. По окончании экспонирования регистрировали спектр ЗФ (измерения проводили на кончиках 1-го и 2-го листьев растений) и рассчитывали показатель Y_{100}/Y_{34} , отражающий интенсивность фотосинтетического транспорта электронов.

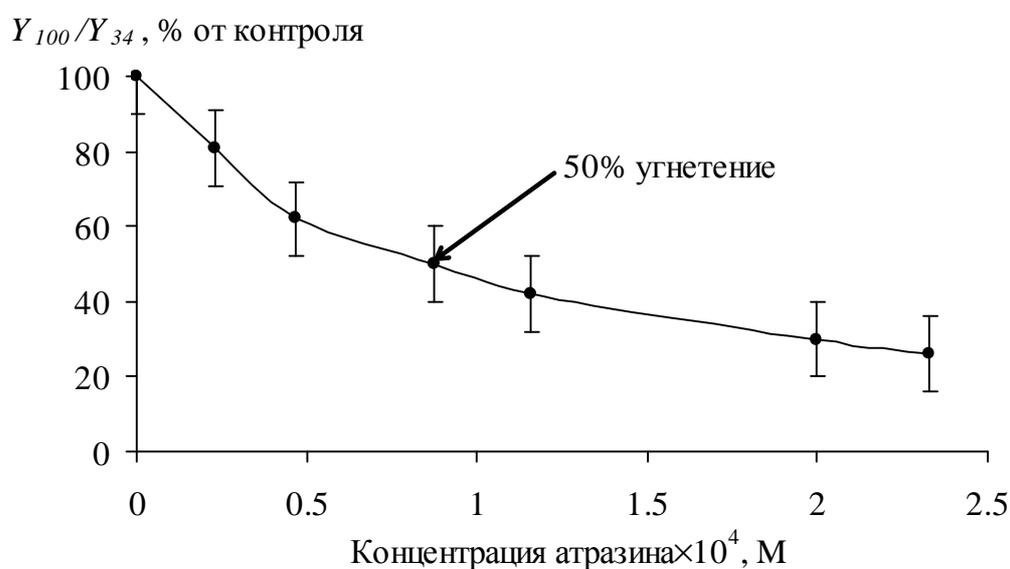


Рисунок 3.2. Диапазон токсичности атразина по данным замедленной флуоресценции.

Регистрацию спектров ЗФ проводили на установке, собранной на базе фосфороскопа, представляющего собой систему из трех коаксиальных цилиндров с зазором 0.5 мм между ними. В качестве детектора излучения использовали фотоумножитель ФЭУ-79, чувствительный в красной области спектра. Источником питания фотоумножителя служил высоковольтный стабилизированный выпрямитель ВС-23. Сигнал с фотоумножителя через усилитель постоянного тока (рН-метр 340) поступал на вход самопишущего потенциометра ЭПП-09.

Возбуждение свечения осуществляли сфокусированным интенсивным светом от йодно-кварцевой лампы (КГМ 24-150) в сочетании со стеклянным светофильтром КС-14.

Проведенные эксперименты показали, что внесение ГВ и РОВ водных экстрактов торфов способствовало снижению токсичности атразина во всех исследованных концентрациях. Кривые детоксификации атразина ГВ и РОВ водных экстрактов торфов (зависимости коэффициента D от концентрации РОВ) приведены на рис. 3.3.

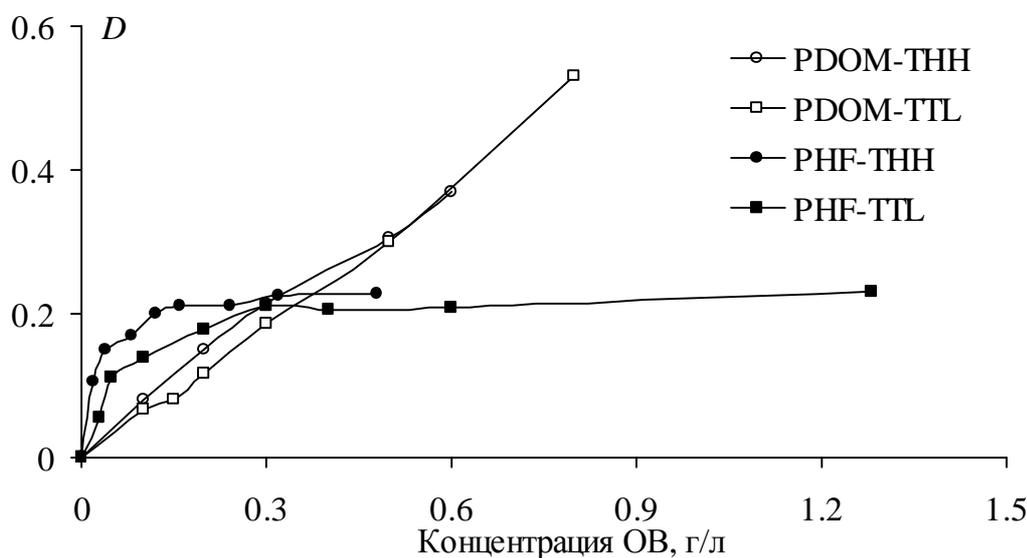


Рисунок 3.3. Кривые детоксификации атразина ГВ и РОВ водных экстрактов торфов в водной среде. Тест-культура *Triticum aestivum* L.

Как видно из рис. 3.3, кривые детоксификации атразина ГВ и ОВ водных экстрактов торфов имели принципиально различную форму. Так, кривые детоксификации ГВ PHF-TNH и PHF-TTL выходили на плато при концентрации больше 300 мг/л, в то время как зависимость D от концентрации препаратов PDOM-TNH и PDOM-TTL имела линейный характер. Следует отметить, что все исследованные препараты незначительно снижали уровень токсичности атразина: значение коэффициента D варьировалось в пределах 0.2-0.6, т.е. полного снятия токсичности не наблюдали. Значения констант связывания K_{OC}^D , рассчитанные на основании полученных кривых детоксификации согласно уравнению (2.16), приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2. Эффективные константы связывания K_{OC}^D атразина ГВ в водной среде

Препарат ГВ	K_{OC}^D , л/кг ОС
PDOM-ТНН	918±15
PDOM-ТТЛ	957±26
РНФ-ТНН	632±31
РНФ-ТТЛ	440±19

Как видно из табл. 3.2, значения K_{OC}^D в 2-10 раз превышали значения K_{OC} (табл. 3.1), причем для препаратов РОВ водного экстракта торфа это различие было более выражено, чем для препаратов ГВ. Кроме того, необходимо отметить, что значения K_{OC}^D возрастали при уменьшении M_w препаратов ГВ (рис. 3.4), в то время как для значений K_{OC} была отмечена обратная тенденция.

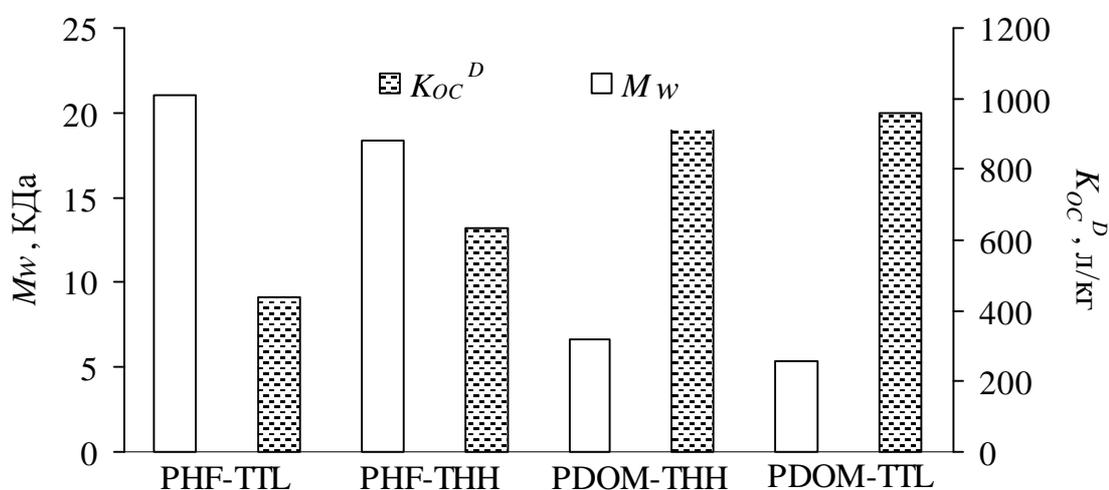


Рисунок 3.4. K_{OC}^D атразина и M_w ГВ и РОВ водных экстрактов торфов в водной среде. Тест-культура *Triticum aestivum* L.

Таким образом, несмотря на близкие значения, константы взаимодействия K_{OC} и K_{OC}^D по-разному зависели свойств ГВ, т. е. определялись различными процессами. Подтверждением этому является также установленная взаимосвязь для пар переменных « $O/C - K_{OC}^D$ » и « $H/C - K_{OC}^D$ », коэффициент корреляции для которых составил 0.94 и 0.96, соответственно, в то время как для K_{OC} подобной взаимосвязи отмечено не было.

На основании полученных данных можно высказать предположение, что связывание атразина ГВ не является основным фактором, определяющим величину коэффициента D . Для установления причины детоксификации атразина ГВ

необходимо было провести дополнительные эксперименты, при этом в качестве тест-объектов следовало выбрать более простую, чем целый организм, систему.

Для этого нами было проведено исследование защитного действия ГВ в водной среде с использованием в качестве тест-объекта одноклеточной водоросли *Chlorella pyrenoidosa*.

3.1.2.2. Исследование детоксифицирующей способности ГВ по отношению к атразину с использованием одноклеточной водоросли *Chlorella pyrenoidosa*

Культивирование интенсивной культуры хлореллы (термофильный штамм) осуществляли в 20%-ной среде Тамия [Tamiya et al., 1961] при pH 6.6-6.8 в термостатируемых культиваторах емкостью 100 мл, при температуре 35°C, с продувкой увлажненным воздухом, при освещенности 30 Вт/м² (люминесцентные лампы типа ЛДЦ-40). Перед тестированием водоросль разрачивали в течение суток. После разрачивания интенсивную культуру хлореллы освобождали от культуральной среды центрифугированием в течение 3 мин при скорости 5000 об/мин. Осажденную водоросль суспендировали в 20%-ной среде Тамия без фосфатов и ЭДТА. Полученную суспензию водоросли вносили в культиваторы с тестируемыми растворами ГВ и атразина, приготовленными на основе 20%-ной среды Тамия без фосфатов и ЭДТА. Регистрацию кривых индукции флуоресценции хлорофилла проводили через три часа экспозиции. Тест-откликом служил показатель F_v/F_m кривой индукции флуоресценции, характеризующий фотосинтетическую активность водоросли. Повторность восьмикратная.

В настоящее время опубликован ряд работ, использующих явление индукции флуоресценции (эффект Каутского) для диагностики изменения состояния фотосинтезирующих организмов под действием сим-триазинов и других токсикантов, ингибирующих процесс фотосинтеза, а также для биотестирования [Brack, Frank, 1998; Salvetat et al., 1998; Trapmann et al., 1998]. Индукция флуоресценции возникает при сильном освещении фотосинтезирующего объекта после его предварительного пребывания в темноте или на слабом свете. Общий вид индукционной кривой приведен на рис. 3.5.

Параметр F_o (минимальная флуоресценция) соответствует флуоресценции, когда все акцепторы (переносчики) электронов в электронтранспортной цепи (ЭТЦ) находятся в окисленном состоянии. В условиях насыщающего освещения

флуоресценция быстро возрастает и достигает своего максимального значения (F_m), когда все акцепторы в ЭТЦ восстановлены. Возрастание флуоресценции с F_o до F_m характеризует общее количество акцепторов, которые могут принимать электрон, то есть могут быть восстановлены. Интенсивность флуоресценции перегиба F_i определяется количеством акцепторов ЭТЦ, которые могут быть восстановлены, но не способны передавать электроны по цепи. Отношение F_i/F_m отражает количество таких центров от общего в долях единицы и варьируется от 0.17-0.21 в оптимальных условиях до 1 у поврежденных клеток. Относительный выход переменной флуоресценции, характеризующий квантовую эффективность первичной фотосинтетической реакции, рассчитывали как F_v/F_m , где $F_v = F_m - F_o$. У лабораторной культуры хлореллы в оптимальных условиях F_v/F_m обычно составляет 0.75-0.78. Мертвые клетки характеризуются отношением F_v/F_m , равным нулю.

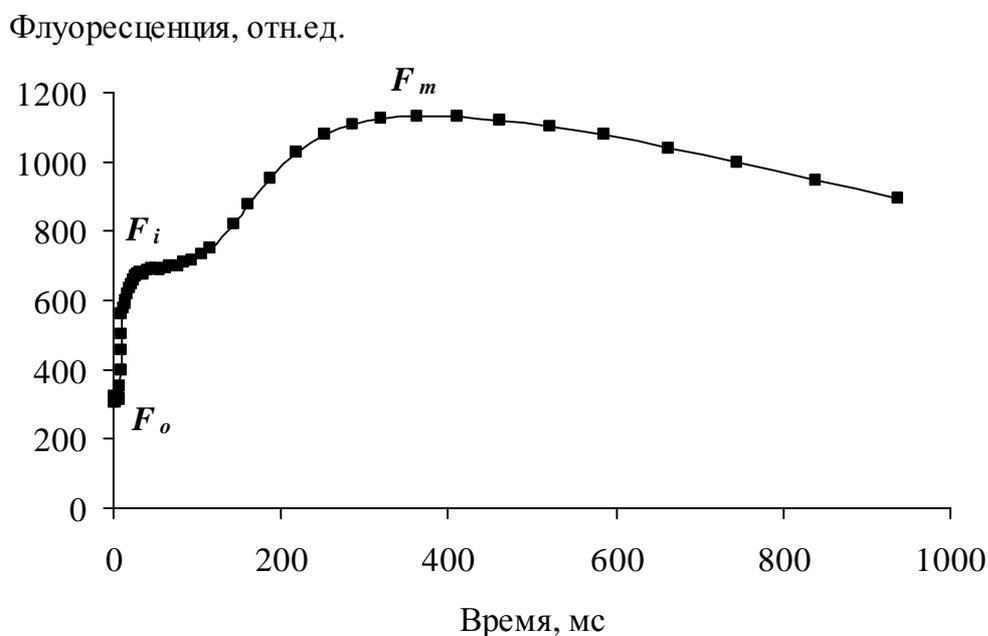


Рисунок 3.5. Кривая индукции флуоресценции (эффект Каутского). F_o минимальная флуоресценция, F_i флуоресценция перегиба, F_m максимальная флуоресценция.

При внесении в среду ингибиторов фотосинтеза, обладающих специфическим сайтом (для атразина специфическим сайтом является Q_B), происходит блокирование определенных переносчиков электронов в ЭТЦ, что приводит к мгновенному увеличению отношения F_i/F_m , т.е. возрастанию количества акцепторов, которые способны принимать электрон, но не способны его передавать по цепи. Таким образом, увеличение отношения F_i/F_m по сравнению

с контролем отражает концентрацию свободного токсиканта в среде. Поэтому данный показатель использовали при проведении токсикологических экспериментов с нулевым временем экспозиции. В отличие от F_v/F_m , снижение показателя F_v/F_m может происходить вследствие присутствия в среде как специфических ингибиторов фотосинтеза, так и токсикантов с другим механизмом действия. Уменьшение F_v/F_m характеризуется определенной временной задержкой и может быть обусловлено не только изменением состояния ЭТЦ (как в случае с F_v/F_m), но и нарушением других важнейших процессов жизнедеятельности, например, синтеза белка. В связи с этим данный показатель использовали при проведении токсикологических экспериментов с ненулевым временем экспозиции.

Регистрацию кривой индукции флуоресценции проводили при помощи 2-х лучевого импульсного флуориметра, соединенного с персональным компьютером. Возбуждение свечения осуществляли сфокусированным интенсивным светом 50 Вт/см^2 от иодно-кварцевой лампы (КГМ 24-150). Темновая пауза составляла 30 с.

При проведении экспериментов рабочая концентрация атразина составляла $6.7 \times 10^{-7} \text{ М}$; её выбор осуществляли на основании предварительно определяемого диапазона токсичности атразина в исследуемых условиях. Концентрация ГВ составляла 1-50 мг/л. Перед регистрацией кривой индукции флуоресценции культуру водоросли выдерживали в темноте в течение 1 мин. Так как ГВ обладают собственной флуоресценцией, то их присутствие в растворе может существенно сказываться на величинах получаемых показателей F_v/F_m . Поэтому нами была проведена серия экспериментов, в которых кривые индукции флуоресценции хлорофилла водоросли регистрировали непосредственно после добавления ГВ (нулевая экспозиция). При этом параллельно регистрировали также фоновую флуоресценцию ГВ. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что показатель F_v/F_m хлорофилла в клетках водоросли при внесении ГВ в концентрациях 1-50 мг/л существенно снижается, если его расчет производить непосредственно из регистрируемых кривых индукции флуоресценции (рис. 3.6).

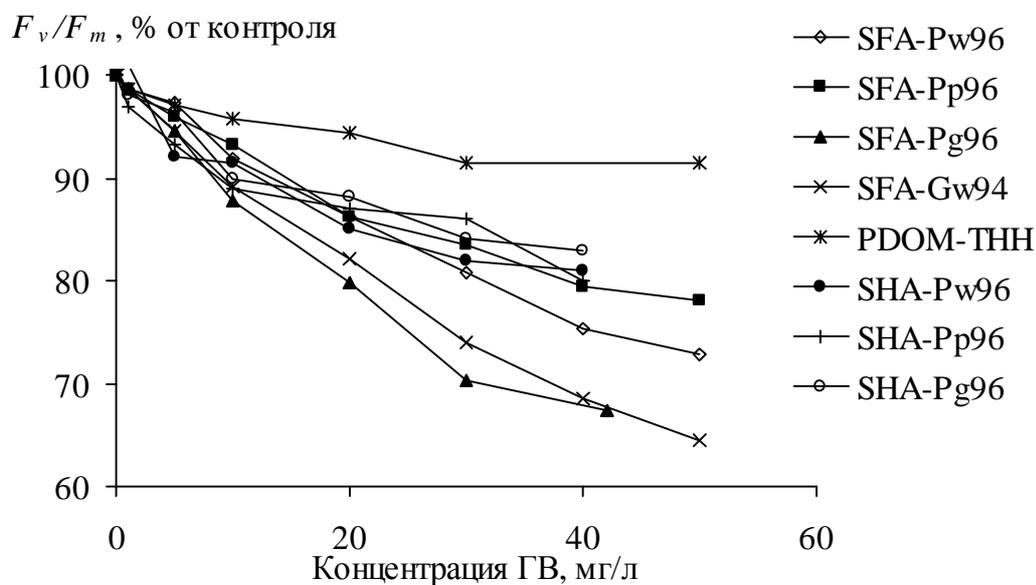


Рисунок 3.6. Снижение показателя F_v/F_m индукции флуоресценции хлореллы в присутствии ГВ при его расчете без учета собственной флуоресценции ГВ.

Однако, как видно из рис. 3.7, причиной наблюдаемого эффекта «токсичности» ГВ является их собственная флуоресценция.

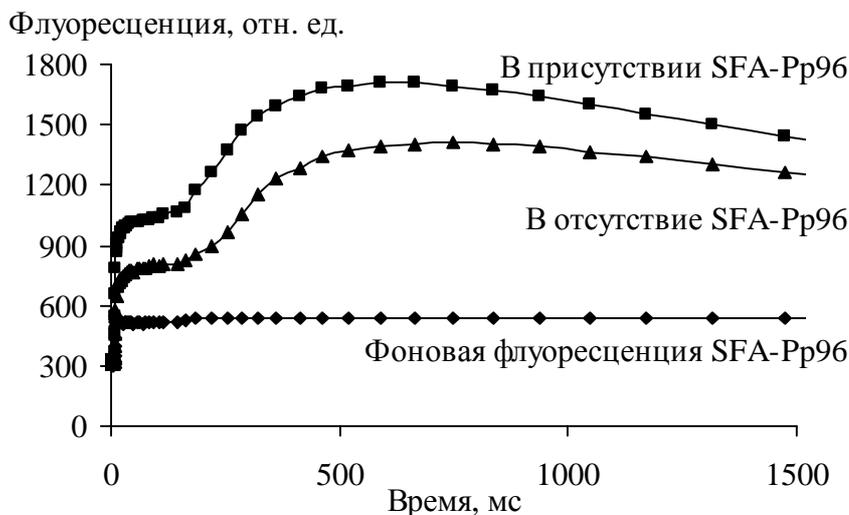


Рисунок 3.7. Фоновая кривая флуоресценции ГВ (на примере SFA-Pp96) и кривые индукции флуоресценции хлорофилла хлореллы в отсутствие и в присутствии ГВ.

Действительно, если ГВ обладают собственной флуоресценцией F , то отношение F_v/F_m будет рассчитываться как

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m + F - F_o - F}{F_m + F} = \frac{F_m - F_o}{F_m + F} = \frac{F_v}{F_m + F} \quad (3.4)$$

Так как при наличии собственной флуоресценции ГВ ($F_m + F$) всегда больше F_m , то значения рассчитываемого таким способом показателя F_v/F_m получаются заниженными. Поэтому для корректного расчета F_v/F_m было предложено из кривой

индукции флуоресценции хлорофилла предварительно вычитать кривую фоновой флуоресценции ГВ. Предлагаемый метод расчета позволял устранить мешающее влияние ГВ.

Согласно нашим первоначальным предположениям, связывание атразина ГВ должно было привести к снижению концентрации свободного гербицида и, как следствие, уменьшению наблюдаемой токсичности атразина. Поэтому при исследовании детоксифицирующей способности ГВ в первых сериях экспериментов регистрацию токсичности атразина для культуры водоросли проводили сразу после внесения в нее предварительно приготовленной смеси атразина с ГВ. Время взаимодействия ГВ и атразина составляло от 1 часа до 7 с. Результаты экспериментов на примере препарата РНА-Рw94 приведены на рис. 3.8. Аналогичные данные были получены и для других препаратов ГВ.

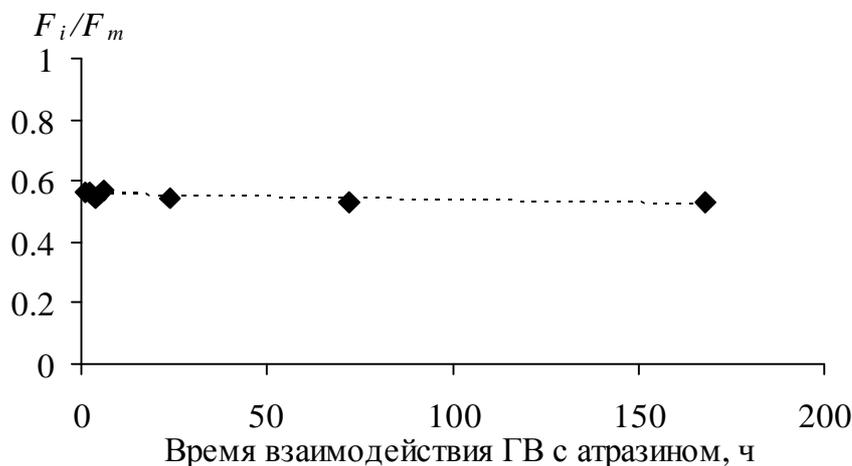


Рисунок 3.8. Влияние ГК почвы SHА-Рw94 (50 мг/л) на токсичность атразина в экспериментах с нулевой экспозицией хлореллы.

Как видно из рис. 3.8, присутствие ГВ не влияло на показатель F_i/F_m , характеризующий количество переносчиков электронов, не участвующих в процессах переноса электронов в ЭТЦ. Так как показатель F_i/F_m непосредственно зависит от концентрации атразина, установленные эффекты свидетельствуют о том, что взаимодействие атразина с ГВ в условиях эксперимента крайне незначительно или отсутствует.

Однако в связи с тем, что детоксификация в присутствии ГВ может быть обусловлена не только связыванием токсиканта, но также их собственным действием на тест-организмы, то необходимо было провести серию экспериментов с ненулевой экспозицией хлореллы. Проведение таких экспериментов, как уже

говорилось выше, позволило регистрировать «суммарную» детоксификацию атразина в присутствии ГВ, обусловленную вышеупомянутыми причинами. В качестве тест-функции использовали показатель F_v/F_m .

Как показали проведенные эксперименты, внесение ГВ приводило к снижению токсичности атразина. В большинстве случаев кривые детоксификации имели S-образную форму с выходом на плато при концентрации ГВ 30 мг/л (рис. 3.9). Исключение составили препараты водных экстрактов из торфа PDOM-TНН и PDOM-TTL, для которых наблюдали линейную зависимость D от концентрации ГВ.

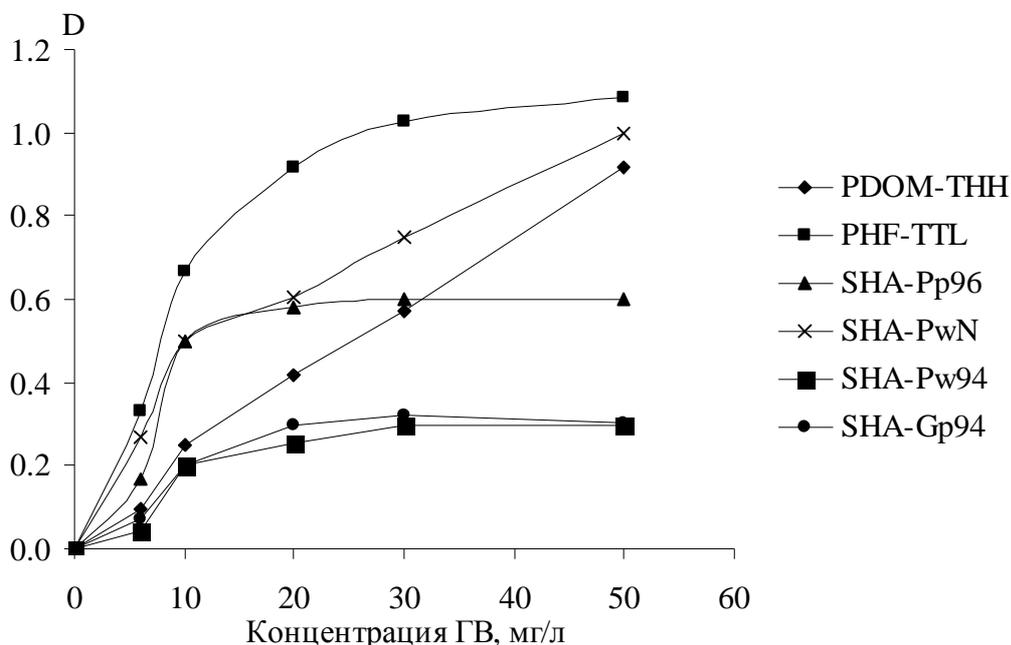


Рисунок 3.9. Кривые детоксификации атразина ГВ различного происхождения.

K_{OC}^D рассчитывали путем аппроксимации экспериментальных зависимостей D от концентрации ГВ уравнением (2.16). Полученные значения K_{OC}^D приведены в табл. 3.3.

Таблица 3.3. Эффективные константы связывания K_{OC}^D атразина ГВ в водной среде. Тест-культура *Chlorella pyrenoidosa*

Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС	Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС
Сумма ГК и ФК природных вод		ГК почв	
АНФ-RMX2	2.9×10^5	ГК дерново-подзолистых почв	
PDOM-TH	5.8×10^5	SHA-Pw94	1.2×10^5
PDOM-TL	4.5×10^5	SHA-Pp94	1.4×10^5
SDHF-Pw96	2.1×10^6	SHA-Pg94	1.0×10^4
SDHF-Pp96	1.8×10^6	SHA-Pw96	5.6×10^5
SDHF-Pg96	1.9×10^6	SHA-Pp96	5.5×10^5
	ФК почв	SHA-Pg96	5.6×10^5
SFA-Pg94	1.4×10^5	ГК серых лесных почв	
SFA-Gw94	5.3×10^5	SHA-Gw94	2.0×10^5
SFA-Pw96	5.0×10^4	SHA-Gp94	1.4×10^5
SFA-Pp96	5.0×10^4	ГК черноземов	
SFA-Pg96	6.0×10^4	SHA-Cm94	2.9×10^5
	Сумма ГК и ФК торфов	SHA-CtV94	3.7×10^5
PHF-THH	5.7×10^5	SHA-PwN	7.1×10^5
PHF-TTL	1.3×10^6	ГК бурого угля	
PHF-T498	8.9×10^5	CHA-AGK	7.4×10^5

Погрешность определения K_{OC}^D составила 15%

Как видно из табл. 3.3, K_{OC}^D атразина ГВ варьировались в пределах 5.0×10^4 – 1.9×10^6 л/кг ОС, превышая на 2 порядка аналогичные величины, полученные при экспериментах с растениями. ГВ водных вытяжек почв обладали наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину. Близкими к ним значениями K_{OC}^D характеризовались ГК угля, чернозема и части почв. ОВ водного экстракта торфов; препараты ФК почв практически не снижали токсичность атразина.

Сравнение K_{OC} и K_{OC}^D (табл. 3.1) показало, что K_{OC}^D в среднем на два-три порядка превышали K_{OC} , при этом коэффициент корреляции между ними составлял 0.12. Кроме того для K_{OC} наиболее тесную корреляцию наблюдали с содержанием C_{Ar} в ГВ, тогда как для K_{OC}^D такая взаимосвязь отсутствовала.

Найденная закономерность увеличения защитного действия ГВ при переходе от использования в качестве тест-культуры растений к водорослям позволяет предположить наличие взаимосвязи между защитными свойствами ГВ и их поглощением. Действительно, для K_{OC}^D нами была установлена значимая взаимосвязь с содержанием низкомолекулярной фракции <5 КДа – предела проницаемости клеточных мембран [Del Agnola et al., 1986] ($r = 0.93$).

Установленные закономерности свидетельствует о том, что связывание и детоксификация атразина ГВ в водной среде определяются различными процессами, а ведущую роль в проявлении защитных свойств ГВ по отношению к растениям в данном случае играет собственная физиологическая активность ГВ.

Однако, как показали проведенные эксперименты, в выбранных нами условиях ГВ в целом не обладали стимулирующим действием по отношению к культуре водоросли. Результаты для серии экспериментов с 3-часовой экспозицией приведены на рис. 3.10. Для экспериментов с нулевой экспозицией были получены аналогичные данные.

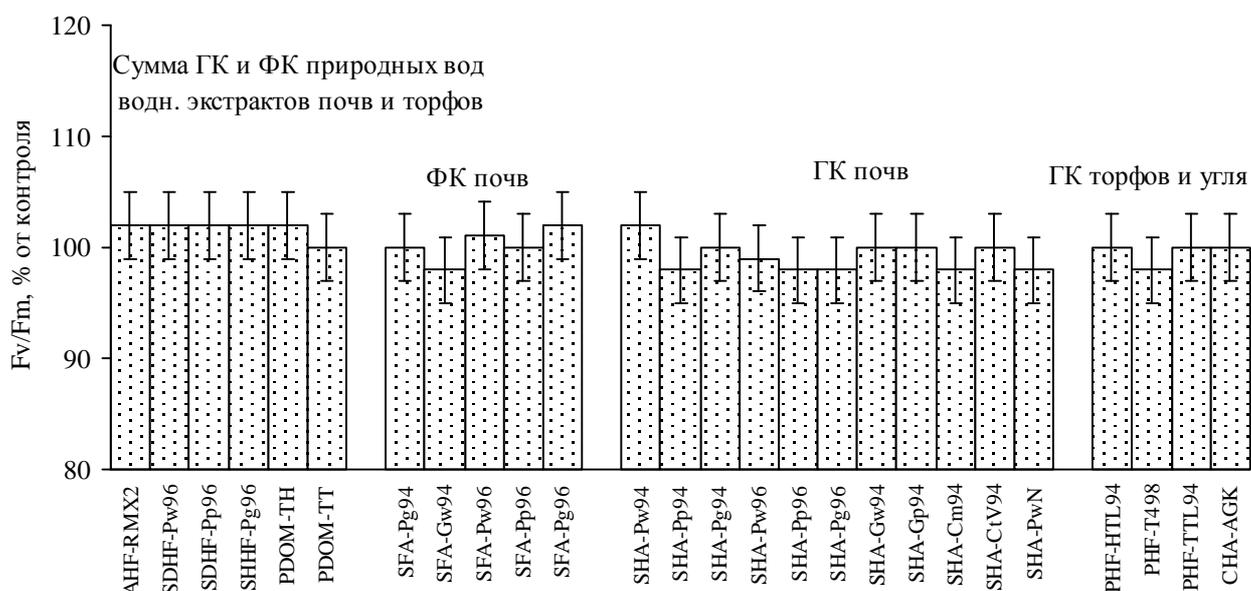


Рисунок 3.10. Влияние ГВ на фотосинтетическую активность одноклеточной водоросли *Chlorella pyrenoidosa*. Концентрация ГВ 50 мг/л. Время экспозиции 3 ч.

Можно предположить, что стимулирующая активность ГВ проявляется только в стрессовых для организмов условиях. Действительно, в ряде экспериментов нами было отмечено значительное увеличение фотосинтетической активности хлореллы при внесении ГВ. При этом обязательным условием

проявления стимулирующего действия ГВ являлось снижение показателя F_v/F_m контрольного варианта вследствие негативных изменений условий культивирования (например, снижения температуры) (рис. 3.11).

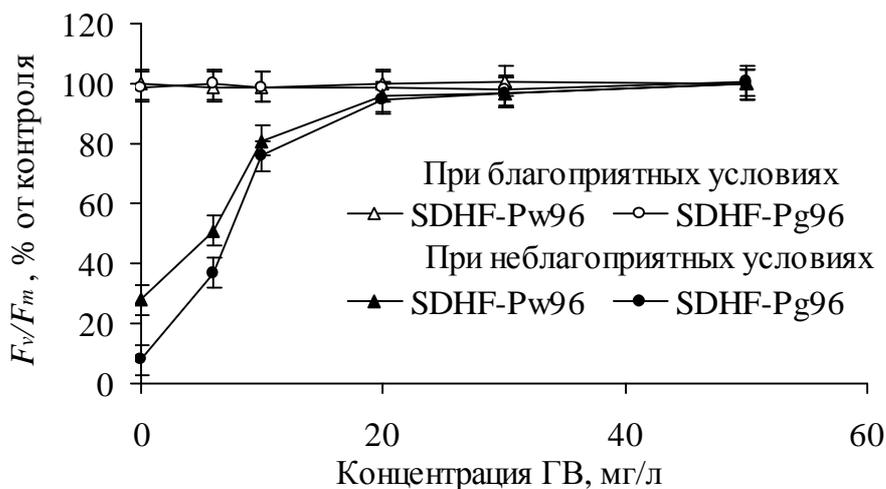


Рисунок 3.11. Изменение воздействия ГВ на фотосинтетическую активность *Chlorella pyrenoidosa* при снижении температуры культивирования с 37°C (благоприятные условия) до 25°C (неблагоприятные условия).

Подобные эффекты, свидетельствующие о зависимости проявляемой физиологической активности ГВ от условий, наблюдали и другие исследователи [Dunstone et al., 1988; David et al., 1994]. Это служит подтверждением известного тезиса о способности ГВ повышать общую неспецифическую сопротивляемость организмов, сформулированного Христовой с сотрудниками на основе многочисленных опытов с растениями [Христева и др., 1968].

Таким образом, наблюдаемую детоксификацию атразина ГВ в водной среде следует объяснять скорее повышением неспецифической сопротивляемости организмов в их присутствии, чем связыванием атразина в нетоксичные комплексы.

3.2. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса в почвенной среде

Несмотря на разнообразие возможных превращений, происходящими с атразином в почве, основными процессами, определяющими его поведение в почве, являются адсорбция, разложение и миграция, приводящие к детоксификации гербицида. В природных условиях указанные процессы протекают

одновременно, а их разделение возможно только при проведении лабораторных экспериментов. В зависимости от конкретных почвенно-климатических условий и свойств гербицида может наблюдаться преимущественное протекание адсорбции, разложения или миграции гербицида. Тем не менее, детоксификация гербицида всегда является суммарным результатом протекания всех указанных процессов.

При попадании в почву гербициды связываются с органическим веществом почвы или ее глинистой фракцией [Bailey, White, 1964]. Оценить отдельный вклад органической и минеральной фракций, образующих единый глино-гумусовый комплекс, чрезвычайно трудно. Кроме того, при содержании в почве нескольких процентов органического вещества органические коллоиды эффективно блокируют минеральные и последние не функционируют как адсорбенты [Келдербенк, 1993]. Так как адсорбция гербицида приводит к уменьшению его концентрации в почвенном растворе, то следствием адсорбции гербицида является снижение уровня его токсичности. С другой стороны, связывание гербицида почвенными коллоидами заметно снижает скорость его разложения. В экспериментах с меченым атразином через девять лет после внесения 83% метки ^{14}C все еще находилось в почве, а 50% этого остатка, включая исходное соединение, представляло собой связанное вещество [Capriel et al., 1985]. Показано, что сорбированный атразин становится менее доступным для микроорганизмов [Соколов, Галиулин, 1987].

В адсорбции гербицидов участвуют органическая и минеральная части почвы, однако в большинстве случаев основная роль принадлежит органическому веществу, содержащему большое количество компонентов, способных к различным химическим и физическим взаимодействиям с гербицидами. Следует отметить также, что адсорбция гербицидов может зависеть не только от общего содержания органического вещества, но и от доли ГК, ФК и гумина в составе гумуса, т.к. эти компоненты обладают различной адсорбционной способностью. К сожалению, роль отдельных компонентов гумуса в адсорбции и разложении гербицидов изучена недостаточно и данные различных авторов весьма противоречивы. По некоторым данным [Hayes, 1970; Орлов, 1990; Maqueta et al., 1990; Piccolo et al., 1992], наиболее реакционноспособную часть органического вещества почв во взаимодействии с веществами органической природы

представляют ГК. Уанг с соавт. [Wang et al., 1990] в своих исследованиях также пришли к выводу, ведущую роль в связывании гербицидов играет высокомолекулярная фракция ГК. С другой стороны, Сизов [Сизов и др., 1990] приводит данные о том, что гербициды сорбируются в первую очередь мобильными фульвокислотами и лишь затем – остальными фракциями органического вещества.

3.2.1. Связывающая способность ГВ по отношению к атразину в почвенной среде

3.2.1.1. Связывающая способность почв по отношению к атразину

Для изучения связывающей способности ГВ по отношению к атразину была создана выборка образцов из 3 почв различных почвенно-географических зон. Она включала в себя образцы дерново-подзолистой почвы (целинная дерново-подзолистая слабодерновая глубокоподзолистая среднесуглинистая на покровном суглинке, ДП) Московской области, серой лесной почвы (целинная серая лесная глубоковскипающая среднесуглинистая на покровном суглинке, СЛ) Тульской области и чернозёма (чернозём типичный глубоковскипающий среднесуглинистый целинный на лессовидном суглинке, Ч) Курской области (табл. 3.4).

Таблица 3.4. Содержание органического углерода, рН и гранулометрический состав исследованных почв

Показатели	Почвы		
	ДП	СЛ	Ч
ОС, %	3.77±0.02	2.01±0.02	5.79±0.02
$pH_{водн.}$	4.7±0.1	6.7±0.1	6.6±0.1
Гранулометрический состав (мм), %			
1-0.25	6.6±1.6	0.2±0.01	0.9±0.1
0.25-0.05	26.3±5.7	12.5±2.2	15.7±11.3
0.05-0.01	47.5±0.4	51.5±1.3	43.4±9.4
0.01-0.005	8.4±1.1	9.1±0.4	7.7±2.3
0.005-0.001	7.9±4.1	11.2±0.6	11.1±2.2
<0.001	3.3±2.8	15.5±1.5	21.2±1.4

Отбор проб производили из верхнего гумусоаккумулятивного горизонта в слое 0-5 см, образцы хранили при комнатной температуре. В связи с тем, что на адсорбционно-десорбционное поведение атразина могут оказывать влияние также и почвенные ферменты, часть экспериментов была проведена в присутствии лакказы – широко распространённой в почве оксидоредуктазы, уникальной

особенностью которой является широкая субстратная специфичность, высокая термо- и рН-стабильность и высокая активность в почве в течение круглого года [Mayer, Staples, 2002; Mougin et al., 2003].

Целью проведения экспериментов в присутствии лакказы являлась оценка возможности взаимодействия атразина с ГВ по механизму окислительного связывания, приводящего к необратимому включению гербицида в структуру ГВ с образованием ковалентных связей. Возможность детоксификации ксенобиотиков по указанному механизму в настоящее время показана для веществ фенольной и аминной природы [Bollag, 1992; Gianfreda, Bollag, 1994; Barriuso, Koskinen, 1996], но не изучена для атразина, в отношении которого существуют лишь отдельные противоречивые данные [Barriuso, Koskinen, 1996; Lesan, Bhandar, 2000].

Адсорбционные эксперименты проводили в 50 мМ калий-фосфатного буфере (рН 5.0) при 27°C. Начальные концентрации атразина в растворе были 1, 2, 3, 5, 8 и 10 мг/л, что составило 5, 9, 14, 23, 37 и 47 мкМ, соответственно. Время инкубирования, достаточное для достижения равновесия в системе, было определено нами в предварительных экспериментах и составило 24 ч. Для оценки прочности связывания атразина почвами дополнительно проводили десорбционные эксперименты. Определение атразина и его основных метаболитов (дезэтилатразин, дезизопропилатразин, 2-гидроксиатразин, дезэтил-2-гидроксиатразин, дезизопропил-2-гидроксиатразин) проводили методом ВЭЖХ по методике [Carabias-Martinez et al., 2002]. Для оценки влияния лакказы на адсорбционно-десорбционное поведение атразина использовали лакказу базидиомицетов *Coriolus hirsutus*. Данная часть работы была проведена совместно с научной группой д.б.н. О. В. Королёвой (институт биохимии им. А.Н. Баха РАН).

На основании полученных данных строили изотермы адсорбции и десорбции атразина (рис. 3.12).

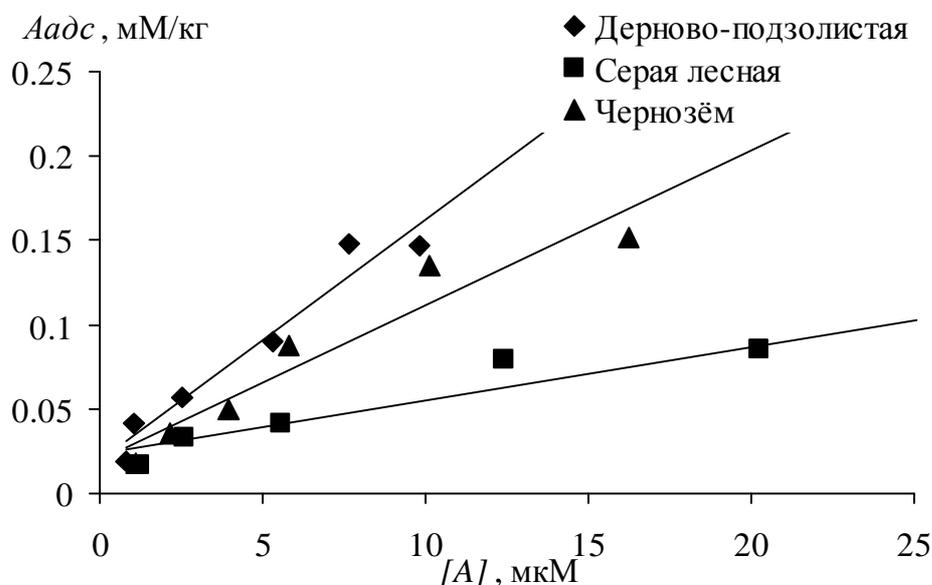


Рисунок 3.12. Изотермы сорбции атразина различными почвами.

Линейность полученных изотерм во всем диапазоне использованных концентраций атразина свидетельствует, что полученные зависимости принадлежат к начальному участку изотермы, где она может быть описана уравнением вида:

$$A_{адс} = K_d \times [A] \quad (3.5)$$

где $A_{адс}$ (моль/кг сорбента) и $[A]$ (моль/л) – количество адсорбированного атразина, нормированное на массу сорбента, и его равновесная концентрация, соответственно; K_d – коэффициент распределения, который в данных условиях эквивалентен константе адсорбции. K_d рассчитывали как тангенс угла наклона изотермы адсорбции атразина (табл. 3.5). При расчете константы связывания атразина с органическим веществом (табл. 3.5) проводили нормирование K_d на содержание OC в почве:

$$K_{OC} = \frac{K_d}{OC, \%} \times 100 \quad (3.6)$$

где K_{OC} – константа связывания атразина с органическим веществом, а $OC, \%$ – содержание органического углерода в почве (табл. 3.4).

Таблица 3.5. Коэффициенты распределения K_d и константы связывания K_{OC} атразина исследованными почвами

Почва	K_d	K_{OC} , л/кг ОС
Дерново-подзолистая	14.3±0.2	379
Серая лесная	3.2±0.1	159
Чернозём	9.2±0.2	159

Константы распределения атразина в исследованных почвах изменялись от 3.2 до 14.3, что хорошо согласуется с данными предыдущих исследователей. Максимальное значение этого показателя было зафиксировано для чернозёма, что связано, по-видимому, с самым высоким содержанием ОС в этой почве. Полученные значения констант связывания K_{OC} варьировались в пределах 159-379 и в целом были близки к ранее полученным константам связывания для ГВ в водной среде (табл. 3.1). Следует обратить внимание, однако, на существенную разницу величин K_{OC} для дерново-подзолистой и остальных почв. Это указывает на то, что связывание атразина определяется не только содержанием органического вещества в почве, но также и его характером. Для изучения этого вопроса нами было предпринято специальное исследование, результаты которого будут обсуждены ниже.

Анализ изотерм сорбции в присутствии лакказы (рис. 3.13) показал, что в присутствии фермента характер изотерм менялся: в начале наблюдали резкое увеличение количества адсорбированного атразина при росте его равновесной концентрации, который затем сменялся снижением интенсивности адсорбции. Сложный характер адсорбционных изотерм в данном случае свидетельствует, по-видимому, о наличии различных механизмов связывания гербицида почвами.

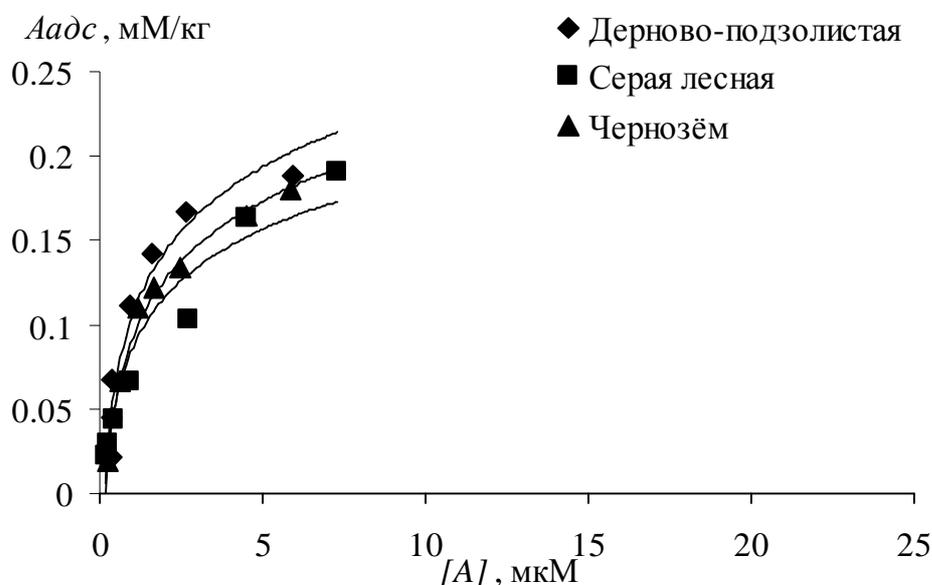


Рисунок 3.13. Изотермы сорбции атразина различными почвами в присутствии лакказы.

При этом наблюдали значимое увеличение параметров, характеризующих связывание гербицида почвой (табл. 3.6).

Таблица 3.6. Коэффициенты распределения K_d и константы связывания K_{OC} атразина исследованными почвами в присутствии лакказы

Почва	K_d , л/кг	K_{OC} , л/кг ОС
Дерново-подзолистая	25.9±0.3	687
Серая лесная	25.1±0.3	1249
Чернозём	23.8±0.2	411

Как видно из приведённых в табл. 3.6 данных, константы связывания атразина для исследованных почв возросли до 411-1249 л/кг, превышая аналогичные значения для адсорбции без лакказы в 1.8-8 раз. Проведённое дополнительное исследование, направленное на изучение взаимодействия атразина с лакказой показало, что сама лакказа не оказывала влияния на деградацию или сорбционное поведение атразина. Поэтому на основании полученных результатов можно сделать вывод об увеличении связывающей способности почвенного органического вещества в присутствии этого фермента. По аналогии с другими ксенобиотиками можно предположить дополнительное включение атразина по механизму окислительного связывания, являющееся каталитически инициированным ковалентным связыванием ксенобиотиков. Ранее этот процесс

был показан для целого ряда органических загрязняющих веществ различной природы, включая 2,4-дихлорофенол, пентохлорофенол, дифенилолпропан, нонилфенол, карбазол, N-этилкарбазол, флюорен, дибензотиофен и другие [Bollag, 1992; Ruttimann-Johnson et al., 1996; Tsutsumi et al., 2001; Bressler et al., 2000; Jolivalt et al., 1999; Gjessing, Mayer, 2004]. В связи с тем, что в результате протекания реакции окислительного связывания ксенобиотик должен включаться в структуру органического вещества необратимо, для проверки предположения о связывании атразина по указанному механизму нами были проведены эксперименты по десорбции атразина.

Для численной характеристики процессов адсорбции и десорбции полученные изотермы аппроксимировали уравнением Фрейндлиха, часто используемым при описании взаимодействий ксенобиотиков с почвой [Lu, Pignatello, 2002; Xia, Pignatello, 2001]:

$$A_{ads} = K_F \times [A]^{n_F} \quad (3.7)$$

где A_{ads} – количество адсорбированного гербицида при его равновесной концентрации $[A]$, K_F – константа адсорбции Фрейндлиха, n_F – показатель степени нелинейности изотермы. Рассчитанные коэффициенты уравнения Фрейндлиха изотерм десорбции атразина приведены в табл. 3.7.

Численное описание гистерезиса проводили с использованием коэффициента гистерезиса H [Celis et al., 1997]:

$$H = n_{Fa} / n_{Fd} \quad (3.8)$$

где n_{Fa} и n_{Fd} – степенные коэффициенты изотерм адсорбции и десорбции в уравнении Фрейндлиха соответственно.

Таблица 3.7. Параметры уравнения Фрейндлиха и коэффициенты гистерезиса адсорбционно-десорбционных изотерм атразина почвами различных типов в присутствии и отсутствии лакказы

Почва	Адсорбция		Десорбция		<i>H</i>
	K_F	n_F	K_F	n_{Fd}	
<i>В отсутствие лакказы</i>					
Дерново-подзолистая	4.50±0.20	0.72±0.03	0.57±0.03	0.27±0.02	2.7±0.1
Серая лесная	0.81±0.04	0.56±0.03	1.68±0.08	0.52±0.03	1.1±0.1
Чернозём	5.55±0.30	0.83±0.04	0.36±0.02	0.23±0.01	3.6±0.2
<i>В присутствии лакказы</i>					
Дерново-подзолистая	5.80±0.29	0.60±0.03	0.36±0.02	0.130±0.007	4.6±0.2
Серая лесная	3.13±0.15	0.56±0.03	0.20±0.01	0.029±0.001	19.3±0.9
Чернозём	6.79±0.34	0.66±0.03	0.22±0.01	0.060±0.003	11.0±0.5

Константы адсорбции Фрейндлиха K_F для изученных почв в вариантах без лакказы варьировались в диапазоне 0.81-5.55, что хорошо согласуется с данными других авторов [Lesan, Bhandari, 2000]. Как и при аппроксимации данных линейной зависимостью (расчёт Kd), внесение лакказы приводило к резкому увеличению показателей адсорбции атразина: константы адсорбции Фрейндлиха для исследованных почв возрастали до 3.13-6.79, значительно превышая аналогичные значения для адсорбции без лакказы. Максимальное увеличение константы Фрейндлиха (почти в 4 раза) было отмечено для серой лесной почвы, характеризующейся минимальным содержанием органического вещества, тогда как для чернозёма и дерново-подзолистой почвы увеличение K_F было менее выражено и составило около 1.2 раза. Следовательно, можно высказать предположение, что в качестве веществ, присутствующих в почве и инициирующих образование метаболитов атразина в присутствии лакказы являются почвенные минералы, поверхность которых недоступна при высоком содержании *OC* (чернозём и

дерново-подзолистая почва), но открыта при незначительном количестве органического вещества в почве [Келдербэнк, 1986].

Как свидетельствуют данные табл. 3.7, связывание атразина почвами характеризовалось значительным гистерезисом. Это свидетельствует о частичной обратимости адсорбции атразина как в вариантах без внесения лакказы, так и в присутствии фермента. Однако количество необратимо адсорбированного гербицида в вариантах с внесением фермента превышало таковое в вариантах без лакказы. Это указывает на увеличение необратимости связывания атразина при внесении лакказы.

Расчет коэффициентов гистерезиса для вариантов без внесения лакказы показал, что характер десорбции атразина был сходным для всех исследованных почв. Для дерново-подзолистой почвы и чернозёма было установлено, что значения H значительно превышали 1, что свидетельствует о частичной обратимости адсорбции и образовании необратимо связанного гербицида. Незначительный гистерезис ($H \approx 1.1$) наблюдали лишь на серой лесной почве. Близость величины гистерезиса к 1 указывает на то, что практически весь адсорбированный атразин легко десорбировался с серой лесной почвы

Внесение лакказы во всех случаях способствовало резкому снижению количества десорбированного атразина. Величины гистерезиса для исследованных почв составили 4.6-19.3, что превышало значения H для адсорбции-десорбции без фермента в 2-18 раз. Максимальное влияние на увеличение H наблюдали для серой лесной почвы. Это свидетельствует о необратимом выведении атразина из реакционной среды, т.е. наличии других механизмов связывания, чем физическая адсорбция в вариантах с лакказой. Наиболее вероятным способом необратимого связывания атразина почвами в присутствии лакказы нам представляется включение гербицида в структуру почвенного органического вещества по механизму окислительного связывания. Высказанную гипотезу подтверждает также тот факт, что в ходе проведения экспериментов нами не было установлено образование метаболитов атразина, т.е. отсутствовали процессы разложения гербицида, которые также могли привести к необратимому выведению атразина из среды. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности

необратимого связывания атразина с почвами различных типов при участии лакказы в качестве катализатора.

Основываясь на проведенных экспериментах можно сделать вывод, что внесение лакказы *Coriolus hirsutus* способствует увеличению связывающей способности почв по отношению к гербициду атразину. При этом в присутствии фермента связывание атразина почвами происходит, вероятно, по механизму окислительного связывания, о чём свидетельствует анализ характера изотерм адсорбции и десорбции, а также увеличение количества необратимо связанного гербицида. Таким образом, при взаимодействии атразина с почвами в присутствии лакказы происходит необратимое связывание гербицида. Принимая во внимание тот факт, что токсичностью обладает лишь т.н. «свободная», т.е. несвязанная форма гербицида, можно сделать вывод о том, что присутствие лакказы в почве способствует детоксификации атразина в окружающей среде. Полученные данные могут быть использованы для разработки биотехнологических подходов при детоксификации почв, загрязнённых атразином и другими гербицидами сим-триазинового ряда.

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что детоксификация атразина в почвенных условиях может быть обусловлена, по крайней мере, двумя процессами: адсорбцией и необратимым включением в структуру почвенного органического вещества.

3.2.1.2. Связывающая способность ГВ в составе органоминеральных комплексов по отношению к атразину

Как уже говорилось выше, связывающая способность почв по отношению к атразину определяется не только общим содержанием органического вещества, но также и структурными особенностями входящих в его состав ГВ [Hayes, 1970; Орлов, 1990; Maqueta et al., 1990; Piccolo et al., 1992; Wang et al., 1990; Сизов и др., 1990]. Для исследования зависимости связывания атразина почвами от свойств почвенных ГВ дополнительно были проведены эксперименты, направленные на решение этой проблемы. Для этого предварительно было получено 11 модельных комплексов ГВ с каолинитом, предварительно насыщенным Na [Kulikova, Perminova, 2007]. Выбор каолинита в качестве минеральной подложки был обусловлен тем, что данный представитель группы глинистых алюмосиликатов

широко представлен в илистых и коллоидных фракциях всех почв. Кроме того, каолинит представляет собой слоистый силикат с нерасширяющейся кристаллической решёткой (отсутствуют межпакетные пустоты), что позволило нам минимизировать влияние на процессы адсорбции свойств самого минерала.

Оценку связывающей способности полученных адсорбционных комплексов ГВ по отношению к атразину проводили по методу адсорбционных изотерм. Для этого к навеске адсорбционного комплекса приливали раствор атразина с концентрациями $(2 - 20) \times 10^{-6}$ М, полученную суспензию встряхивали в течение 12 ч и центрифугировали. В супернатанте методом обращенно-фазовой ВЭЖХ определяли равновесную концентрацию атразина. Количество адсорбированного атразина рассчитывали по разнице общей и равновесной концентраций. Типичные изотермы адсорбции атразина на каолините и адсорбционном комплексе каолинит-ГВ приведены на рис. 3.14.

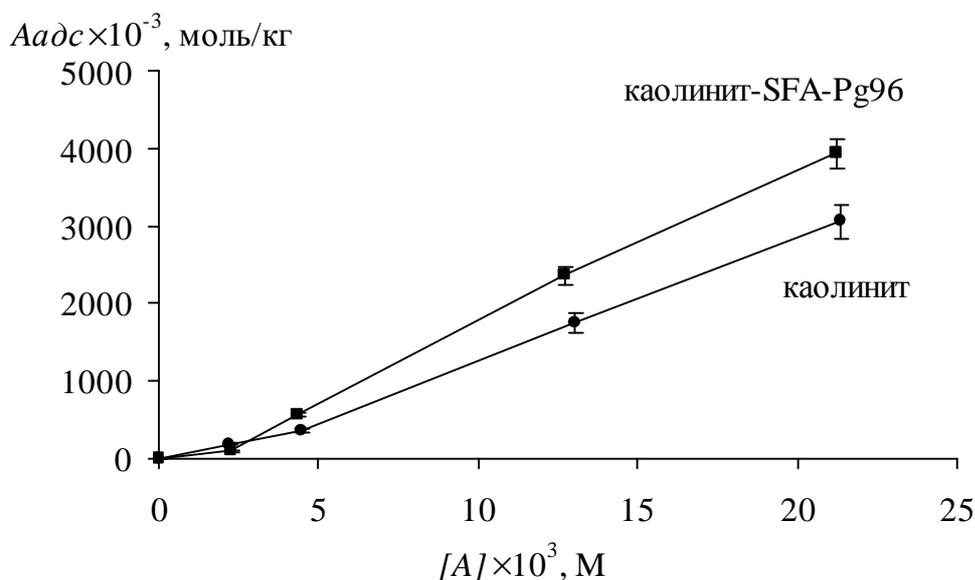


Рисунок 3.14. Типичные изотермы адсорбции атразина на каолините и адсорбционном комплексе каолинит-ГВ.

Линейность полученных изотерм во всем диапазоне использованных концентраций атразина свидетельствует, что полученные зависимости принадлежат к начальному участку изотермы, где она может быть описана уравнением вида (3.5), а количественную характеристику адсорбции можно проводить с использованием коэффициента распределения K_d .

В связи с низким содержанием ГВ (менее 1%) в полученных комплексах (табл. 3.8), при количественной оценке связывающей способности ГВ нельзя было

исключать роль минеральной подложки. Поэтому для расчёта константы связывания с ГВ использовали подход Каричкова [Karickhoff, 1984], позволяющий учитывать взаимодействие с минеральной фазой адсорбента. Для этого принимали, что наблюдаемый коэффициент распределения зависит от связывающей способности минерала, ГВ, а также их относительного содержания в комплексе:

$$K_d = f_m \cdot K_m + f_{OC} \cdot K_{OC} \quad (3.9)$$

Где K_m – константа связывания с минералом, f_{OC} – доля ГВ в составе комплекса каолинит-ГВ, f_m рассчитывали $1-f_{OC}$. При этом считали, что K_m равна величине K_d исходного каолинита, не модифицированного ГВ.

Характеристику обратимости адсорбции проводили аналогично экспериментам по изучению связывания атразина почвами.

Результаты проведённых экспериментов приведены в табл. 3.8. Там же для сравнения приведены значения констант связывания с ГВ в водной среде.

Как показывают данные табл. 3.8, несмотря на относительно невысокое содержание ГВ в модельных комплексах, величины коэффициентов распределения в присутствии ГВ возрастали с 1.72 до 1.93-2.48 л/кг. При этом сопоставление величин K_d с содержанием OC показало отсутствие статистически значимой взаимосвязи между этими показателями ($r = 0.48$). Наблюдаемое явление типично для сорбентов с низким содержанием органического вещества [Coquet, 2003] и объясняется значительным вкладом минеральной составляющей в процесс сорбции ксенобиотика.

На основании полученных констант связывания атразина K_{OC} ГВ в составе органоминеральных комплексов, исследованные ГВ можно расположить в следующий ряд: угольные ГК > ГК чернозёма > ГК дерново-подзолистых и торфяных ГК > ФК почв. Полученный ряд хорошо совпадает с лиофильно-лиофобным балансом (отношение $C_{ArC,H} / C_{AlkO}$) и указывает на ведущую роль гидрофобных ароматических фрагментов ГВ в связывании атразина.

Обращает на себя внимание также тот факт, что значения констант связывания атразина ГВ в составе органоминеральных комплексов были в среднем в полтора-два раза меньше, чем аналогичные величины ГВ в водной среде. Это может свидетельствовать о меньшей доступности мест связывания для атразина в ГВ, адсорбированных на каолините.

Таблица 3.8. Содержание OC и характеристика адсорбции-десорбции атразина модельными комплексами каолинит с ГВ различного происхождения

Сорбент	OC , кг/кг	K_d , л/кг	K_{OC} , л/кг ОС	$K_{OC}(\text{раствор})$, л/кг ОС	H
каолинит	–	1.72±0.09		–	1.21
АНА-SH ₀ 13	0.229±0.003	2.08±0.09	157	–	9.24
SFA-Pw96	0.165±0.008	1.93±0.09	128	192±12	5.90
SFA-Pg96	0.166±0.009	1.94±0.09	137	275±17	8.30
SHA-Pw94	0.249±0.008	2.20±0.09	194	380±12	7.17
SHA-Pw96	0.264±0.008	2.09±0.07	143	281±17	5.73
SHA-CtV94	0.245±0.009	2.17±0.08	184	501±31	5.93
SHA-Cm94	0.248±0.006	2.17±0.09	184	404±23	7.76
PНА-НТО	0.274±0.009	2.20±0.07	178	300±10	2.31
PНА-Н8	0.286±0.009	2.06±0.06	121	–	3.19
СНА-AGK	0.237±0.005	2.28±0.09	238	575±35	7.18
PНА-RНА	0.240±0.004	2.48±0.09	319	–	5.40

Величины коэффициента гистерезиса H (табл. 3.8) для исследованных сорбентов изменялись от 2.31 до 9.24, значительно превышая единицу, что свидетельствует о том, что лишь часть адсорбированного атразина была связана обратимо. Исключение составил каолинит, не модифицированный ГВ, для которого коэффициент гистерезиса был близок к единице (1.21).

Среди свойств ГВ, использованных для поиска взаимосвязи свойства ГВ – связывающая способность максимальное значение коэффициента корреляции ($r = 0.90$) было получено для параметра, характеризующего гидрофобность SC_{Ar}/C_{Alk-O} . Высокое значение коэффициента корреляции ($r = 0.76$) наблюдали также и для содержания ароматического углерода $C_{Ar-H,C}$ в ГВ. Аналогичная взаимосвязь ранее нами была отмечена для пары $K_{OC} - C_{Ar-H,C}$ ($r = 0.95$) при исследовании взаимодействия ГВ с атразином в водной среде. Полученные зависимости указывают на важную роль ароматических фрагментов ГВ в связывании атразина. Следовательно, можно сделать вывод, что гидрофобное

взаимодействие является ведущим механизмом связывания атразина ГВ как в водных, так и в почвенных средах.

Необратимость связывания атразина ГВ, в свою очередь, согласно полученным нами результатам определяется, главным образом, содержанием карбоксильных фрагментов: коэффициент корреляции между коэффициентом гистерезиса H и содержанием $COOH$ составил 0.76. Возможно, это указывает на различие в механизмах связывания атразина с кислородсодержащими функциональными группами, для которых в качестве наиболее вероятных указывают водородное связывание и образование комплексов с переносом заряда [Senesi et al., 1995; Martin-Neto et al., 2001].

Полученные нами результаты не подтверждают теорию о ведущей роли в связывании ксенобиотиков алифатических фрагментов ГВ, адсорбированных на минеральной подложке [Khalaf et al., 2003; Mao et al., 2002; Salloum et al., 2002; Gunasekara et al., 2003]. Напротив, наши данные указывают на то, что в случае атразина наблюдается связывание по нескольким механизмам, при этом в связывании принимают участие как гидрофобные фрагменты, так и функциональные группы ГВ. Такого взгляда придерживается ряд исследователей [Martin-Neto et al., 2001; Chefetz et al., 2004; Graber, Borisover, 1998]. Эта концепция основана на термодинамических расчётах и данных структурных исследований комплексов атразин-ГВ. Наши результаты подтверждают, что гидрофобное взаимодействие отвечает за быстрое, но обратимое связывание атразина с ГВ, которое затем сменяется медленным необратимым связыванием с функциональными группами ГВ.

3.2.2. Детоксифицирующее действие ГВ по отношению к атразину в почвенной среде

Исследование детоксифицирующей способности ГВ по отношению к атразину в почве проводили методом лабораторных вегетационных экспериментов на образцах дерново-подзолистых почв, которые ранее использовали для выделения препаратов ГВ (табл. 1.1). Тест-объектом служили растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., тест-откликом – сырая надземная биомасса. Расчет коэффициента D проводили аналогично экспериментам в водной среде.

3.2.2.1. Исследование детоксифицирующих свойств ГВ в нативных почвах

Для оценки детоксифицирующей способности ГВ были проведены вегетационные эксперименты на трёх выбранных почвах с внесением серий возрастающих доз СНА-АГК. Рабочая концентрация атразина составила 10^{-3} г/кг почвы. Доза внесения ГВ составила 30-100 мг/кг почвы. При выбранных дозах внесения СНА-АГК выраженного стимулирующего действия гуминового препарата на накопление биомассы растениями пшеницы установлено не было за исключением дерново-подзолистой почвы под пашней, где при внесении СНА-АГК в дозе 100 мг/кг биомасса пшеницы составила $118 \pm 15\%$ от контроля. Влияние препарата СНА-АГК на уровень токсичности атразина показано на рис. 3.15.

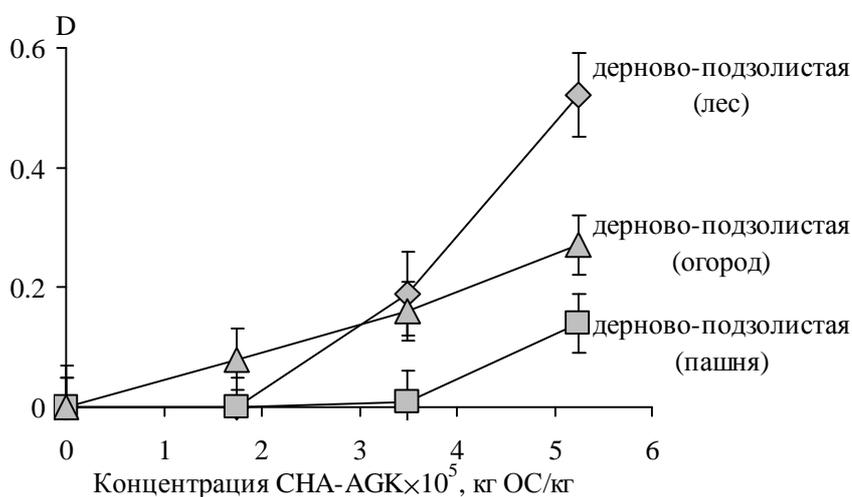


Рисунок 3.15. Детоксифицирующая способность препарата АГК по отношению к атразину в условиях вегетационного эксперимента на различных почвах.

Как видно из рис. 3.15, препарат СНА-АГК проявил различную детоксифицирующую способность по отношению к атразину на разных почвах. Наибольшее значение коэффициента D было зафиксировано в условиях дерново-подзолистой почвы под лесом (0.52), а наименьшее – на дерново-подзолистой пахотной почве (0.14). Вероятно, это связано с разной эффективностью действия гербицида на исследованных почвах. Так, внесение атразина в дозе 1 мг/кг почвы вызывало 25% снижение сырой надземной биомассы в варианте дерново-подзолистой почвы под лесом, 93% – под пашней и 80% – для огородной почвы. При этом на всех исследованных почвах сырая биомасса пшеницы в варианте с одновременным внесением атразина и СНА-АГК в максимальной исследованной

дозе (5.3×10^{-6} кг ОС/кг почвы) составляла $150 \pm 6\%$ от варианта с внесением атразина.

Допуская, что снижение токсичности атразина в присутствии препарата СНА-АГК обусловлено только взаимодействием препарата с гербицидом, можно рассчитать константу связывания K_{OC}^D атразина с СНА-АГК в соответствии с (2.16). Полученные значения составили 2.1×10^4 ; 0.3×10^4 и 0.7×10^4 л/кг ОС для дерново-подзолистой почвы под лесом, пашней и огородом соответственно.

Найденные значения констант связывания K_{OC}^D для препарата СНА-АГК оказались близки к полученным при изучении сорбции атразина ГВ, адсорбированными на каолините и почвами, незначительно превышая их лишь при проведении экспериментов на дерново-подзолистой почве под лесом (табл. 3.6 и 3.8). Это свидетельствует о том, что в почвенных средах основным фактором, определяющим детоксификацию атразина ГВ, является связывание гербицида, в то время как вклад собственного стимулирующего действия ГВ по отношению к растениям незначителен. Принимая во внимание близость констант связывания K_{OC} , найденных для ГВ в водных и почвенных средах, можно сделать вывод о том, что защитное действие ГВ в водных средах значительно превышает таковое в почвенных средах, что связано, по-видимому, с более низкой доступностью ГВ для растений.

3.2.2.2. Исследование детоксифицирующих свойств ГВ в перлите в присутствии оксидоредуктаз

Как было показано выше, взаимодействие ГВ с атразином в почвенных условиях в значительной степени определяется наличием оксидоредуктаз, катализирующих процесс окислительного связывания ксенобиотика. Для оценки влияния этого процесса на детоксификацию атразина нами были проведены лабораторно-вегетационные эксперименты, направленные на изучение детоксифицирующего действия ГВ в присутствии оксидоредуктазы лакказы.

На первом этапе эксперименты проводили в условиях инертного субстрата перлита, что позволило нам исключить влияние почвенных факторов на изучаемые процессы. В качестве тест-культуры использовали растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Московская-35», а в качестве тест-отклика – длину и сырую биомассу растений. Для проведения экспериментов был выбран препарат

ГК угля СНА-Pow, ранее использованный в химических экспериментах по изучению взаимодействий в системе ГК – атразин – лакказа.

Опыты проводили в вегетационных сосудах, в которые помещали по 10 г перлита, куда при тщательном перемешивании вносили 20 мл питательной среды Кноппа (г/л: KH_2PO_4 0.14, KCl 0.1, KNO_3 0.14, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.42, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 4.88, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05); pH 5.5. Затем в сосуды последовательно вносили водный раствор гербицида, препарата ГК и лакказы. В контрольные варианты, не содержащие одного из вышеперечисленных компонентов, вносили аналогичный объем дистиллированной воды. Концентрация атразина составила 0.2 мг/100 мл субстрата (20 мг/кг), препарата ГК угля 10 и 100 мг/кг, лакказы 0.38, 3.8 и 38 мг/кг перлита. Через сутки после внесения растворов в сосуды помещали пророщенные семена пшеницы в количестве 10 семян на сосуд. Продолжительность выращивания растений составляла 20 дней. Фотопериод 12 ч, полив по мере необходимости. По окончании выращивания растений проводили их учет, измеряя длину и массу. На основании сопоставления длины и массы растений с контрольными вариантами делали вывод об интенсивности процесса детоксификации в системе.

Проведенные эксперименты показали, что внесение атразина в дозе 20 мг/кг перлита приводило к выраженному угнетению растений пшеницы: их биомасса снижалась до $(45 \pm 8)\%$, а длина – до $(73 \pm 15)\%$ от контрольных значений. Полученные показатели токсичности атразина свидетельствуют о том, что биомасса растений угнеталась в большей, по сравнению с длиной, степени. Наблюдаемый факт объясняется особенностями механизма действия атразина. Известно, что этот гербицид является специфическим ингибитором фотосинтеза, блокируя отток электронов от акцепторной части фотосистемы II (ФС II), т.е. нарушает нециклический транспорт электронов. Являясь ингибиторами транспорта электронов, они действуют исключительно на мембранные стадии их переноса между двумя ФС при участии пластохинонного подвижного переносчика [Гольдфельд, 1989.].

Так как атразин угнетает световую стадию фотосинтеза, то для проявления его токсичности необходимо наличие у растений сформировавшегося фотосинтетического аппарата. В условиях лабораторно-вегетационного

эксперимента формирование фотосинтетического аппарата растений пшеницы завершается обычно к 2-х недельному возрасту растений. При этом максимальное увеличение длины растений также завершается к этому сроку, а в дальнейшем они преимущественно накапливают биомассу, незначительно изменяясь по длине. Поэтому из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что при биотестировании атразина в качестве тест-отклика следует использовать биомассу растений как более чувствительный показатель по сравнению с длиной растений.

Как показали проведенные эксперименты, внесение лакказы в перлит, загрязненный атразином, не приводило к значимому изменению токсичности гербицида (рис. 3.16).

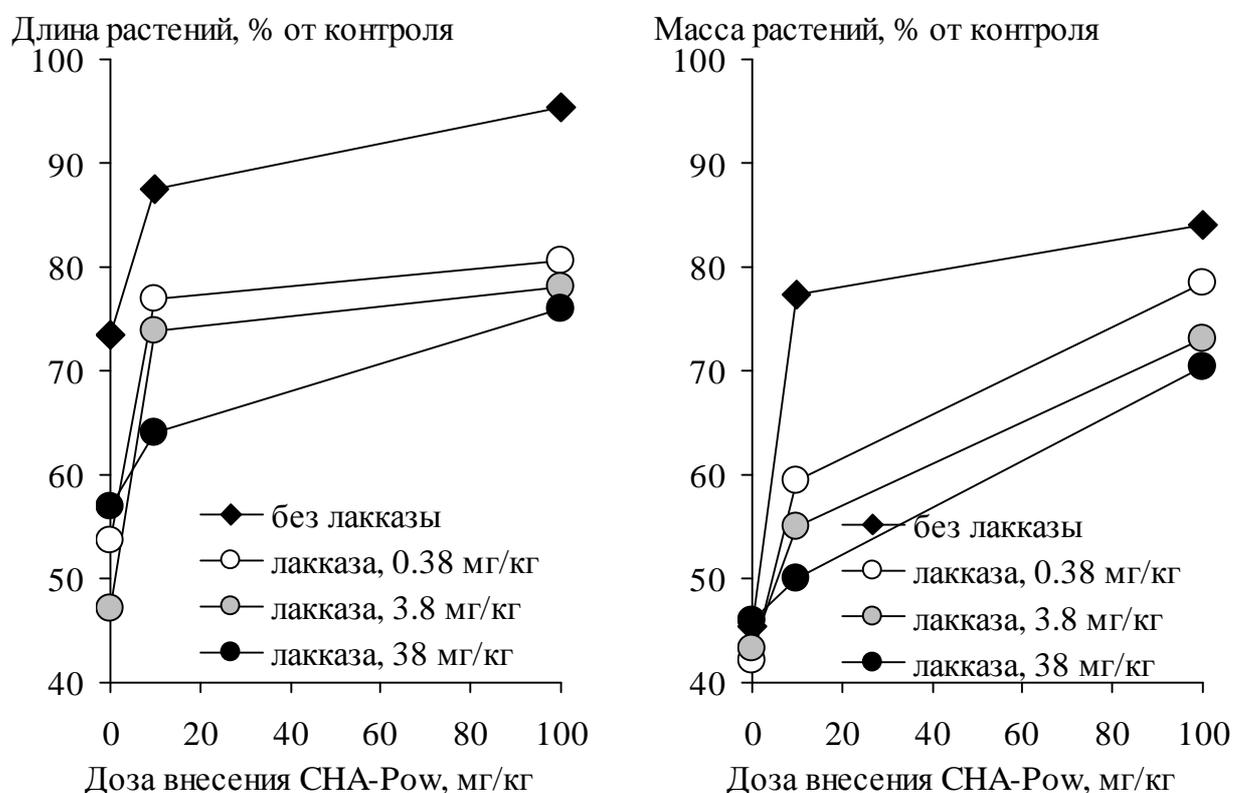


Рисунок 3.16. Влияние лакказы, ГК угля СНА-Ров и их совместного внесения на токсичность атразина для растений пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях модельного лабораторно-вегетационного эксперимента на перлите.

Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами ранее данными, свидетельствующими об отсутствии взаимодействия лакказы с атразином.

Внесение в перлит ГК угля СНА-Ров значимо снижало токсичность атразина уже в дозе 10 мг/кг; увеличение дозы внесения ГК приводило к

возрастанию наблюдаемого эффекта детоксификации атразина. Так, длина растений при дозе внесения ГК угля 100 мг/кг почвы составляла $(95\pm 7)\%$ от контроля и значимо не отличалась от варианта без внесения гербицида. Аналогичный показатель для биомассы растений составлял $(84\pm 10)\%$, что также было близко к контрольным значениям. Детоксифицирующую способность ГК угля СНА-Row по отношению к атразину хорошо объясняют полученные нами данные о возможности взаимодействия ГК с атразином.

Внесение лакказы во всех исследованных дозах приводило к снижению наблюдаемого эффекта детоксификации (рис. 3.16). Вероятно, наблюдаемый факт объясняется с образованием комплексов лакказы-ГК и изменениями свойств ГК в присутствии фермента, такими как полимеризация или частичный гидролиз. Эксперименты, проведённые нами совместно с научной группой д.б.н О.В. Королёвой (институт биохимии им. А.Н. Баха РАН), подтвердили высказанные предположения. В частности, исследование взаимодействия ГК с лакказой с использованием метода эксклюзионной гель-хроматографии показало образование ферментативно-активных комплексов ГК-фермент, а также частичную полимеризацию ГК в этих условиях. На рис. 3.17 представлены хроматограммы препарата лакказы и ГК угля СНА-Row, а на рис. 3.18 – гель-хроматограммы системы ГК-лакказы.

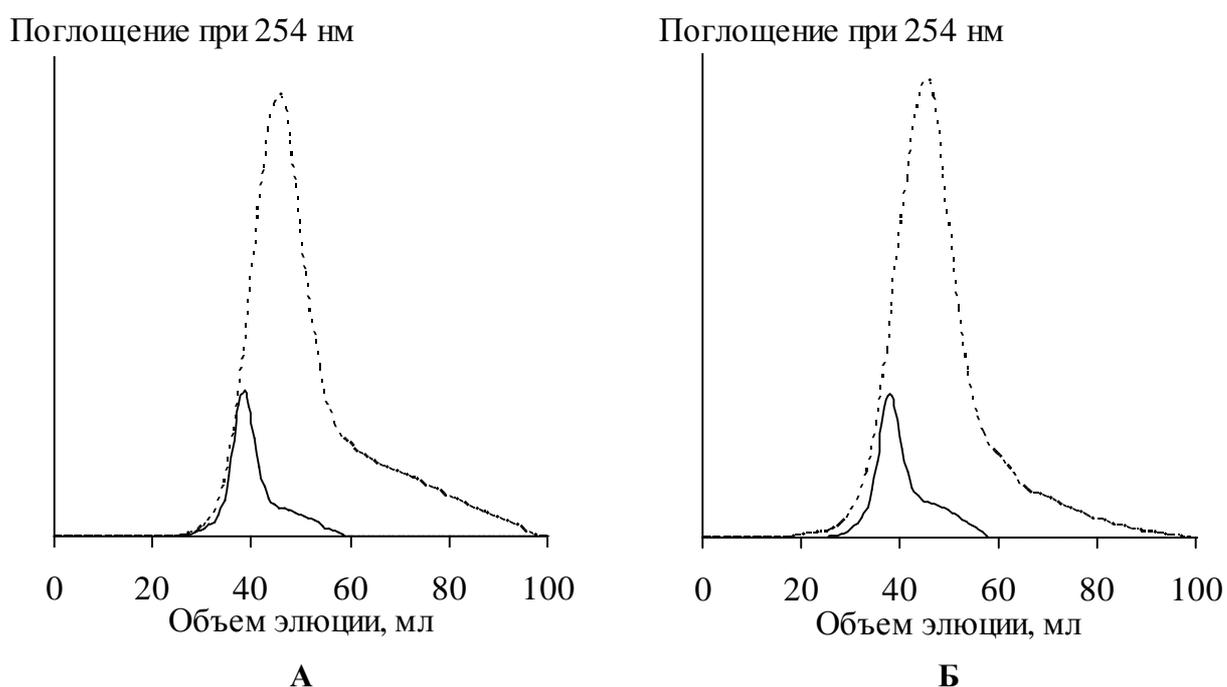


Рисунок 3.17. Гель-хроматограммы лакказы (сплошная линия) и ГК (пунктирная линия) после 0 ч (А) и 72 ч (Б) инкубирования.

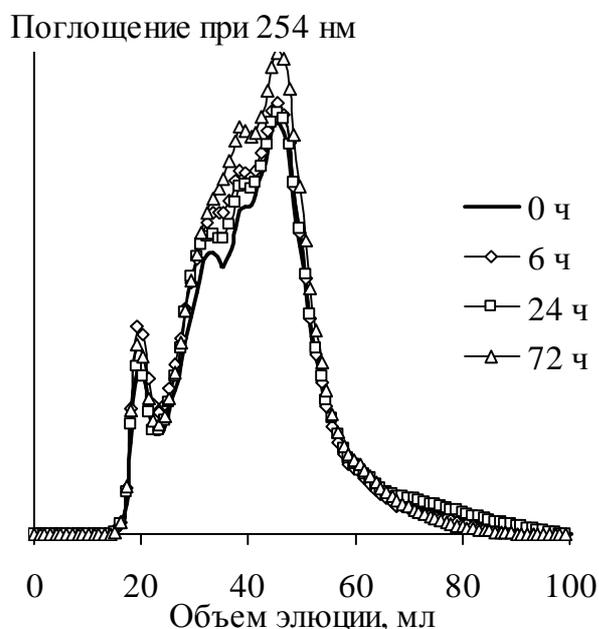


Рисунок 3.18. Гель-хроматограммы лакказы и ГК при совместном инкубировании. Условия инкубирования: 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 5.0, концентрация СНА-Row 40 мг/л, концентрация лакказы 100 мг/л, в качестве бактериостатического агента использовали 10% толуол.

Как видно из рис. 3.17, гель-хроматограммы ГК угля СНА-Row и лакказы представляли собой острые симметричные одиночные пики, при этом изменения элюционных профилей ГК и лакказы через 72 ч не наблюдали, что указывает на стабильность исследуемых веществ.

Гель-хроматограммы системы лакказа-ГК имели более сложный характер (рис. 3.18). На профиле элюции кроме первого острого пика наблюдали 2-3 дополнительных диффузных пика.

Как видно из графиков, представленных на рис. 3.17 и 3.18, эти профили не могут быть рассмотрены как суперпозиции профилей отдельных компонентов, т.е. ГК и лакказы (рис. 3.17). Кроме того, наряду с пиками, соответствующими ГК (45.4 мл) и лакказе (38.4 мл), было отмечено появление пика, элюировавшегося в объеме 19.7 мл (свободный объем колонки по голубому декстрану в данных экспериментальных условиях составлял 19.2 мл), который следует интерпретировать как образующееся высокомолекулярное соединение или комплекс фермента с ГК.

Кроме пика на 19.7 мл было показано также образование веществ с молекулярной массой 18.8 и 40.9 кД (объем элюента 39.6 и 32.3 мл). Наличие новых пиков на представленных хроматограммах позволяет предположить не

только формирование комплекса фермента с ГК, но и прямое взаимодействие лакказы с ними, которое приводит к полимеризации последних (лакказа-инициированная полимеризация).

Чтобы подтвердить высказанное предположение об образовании комплекса лакказа-ГК, нами была исследована ферментативная активность фракций, полученных при гель-хроматографическом анализе. Так как характер гель-хроматограмм по профилю ферментативной активности не изменялся, на рис. 3.19 приведена только типичная хроматограмма после 24 ч инкубирования.

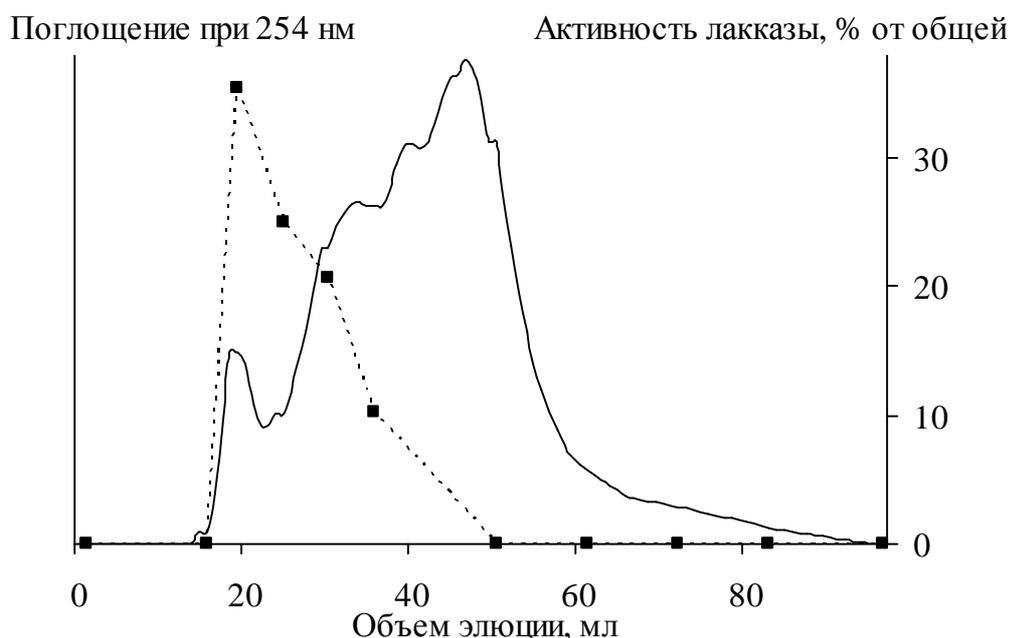


Рисунок 3.19. Гель-хроматограммы системы лакказа-ГК с УФ-детекцией (сплошная линия) и детекцией по активности лакказы (пунктирная линия) при совместной инкубации при рН 5.0 в течение 24 ч.

Полученные результаты показали, что наибольший пик ферментативной активности совпадал с пиком появившейся высокомолекулярной фракции. При этом данная фракция содержала более 80% общей лакказной активности фракционируемого образца. Это свидетельствует об образовании ферментативно активного комплекса лакказа-ГК в изучаемых условиях.

Таким образом, биотестирование с использованием инертного субстрата перлита указывают на то, что лакказа непосредственно не может инициировать процесс окислительного связывания атразина ГК, а, наоборот, приводит к снижению взаимодействия гербицида с ГК.

3.2.2.3. Исследование детоксифицирующих свойств ГВ в почве в присутствии оксидредуктаз

На следующем этапе проводили оценку детоксифицирующего действия ГВ в почвенных условиях в присутствии лакказы. Опыты проводили в вегетационных сосудах, в которые помещали по 100 г дерново-подзолистой почвы, куда при тщательном перемешивании последовательно вносили водный раствор гербицида, препарата ГК и лакказы. Концентрация атразина составила 1 мг/кг почвы, препарата ГК угля СНА-Pow 10 и 100 мг/кг, лакказы 0.076, 0.76 и 7.6 мг/кг почвы. Другие условия соответствовали экспериментам на перлите.

Проведенные эксперименты показали, что внесение атразина в дозе 2 мг/кг почвы приводило к выраженному угнетению растений. Биомасса пшеницы снижалась до $(64\pm 5)\%$, а длина – до $(80\pm 12)\%$ от контрольных значений. Полученные показатели токсичности атразина подтверждают полученные нами ранее в экспериментах на перлите закономерности: среди использованных тест-откликов биомасса растений была более чувствительна, чем длина.

В отличие от экспериментов на перлите, внесение лакказы в почву, загрязненную атразином, вызывало выраженное снижение токсичности гербицида (рис. 3.20). При этом наблюдаемое снижение токсичности гербицида имело явную зависимость от концентрации фермента в почве. При дозах внесения лакказы 0.076, и 7.6 мг/кг биомасса растений пшеницы возрастала с $(64\pm 5)\%$ до $(69\pm 6)\%$ и $(73\pm 5)\%$, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что в почвенных условиях лакказа способствует снижению токсичности атразина в присутствии ГК. Это хорошо согласуется с данными по положительному влиянию фермента на адсорбцию атразина, в том числе необратимую, почвами различных типов (табл. 3.7).

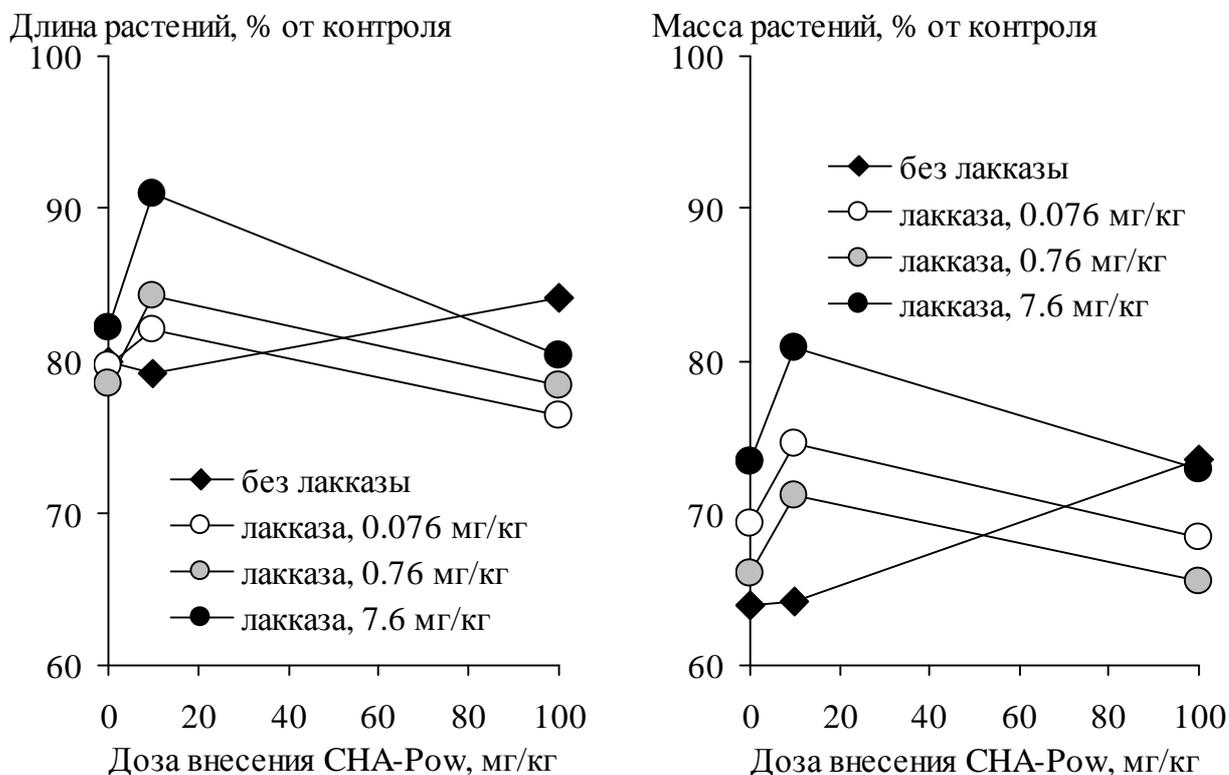


Рисунок 3.20. Влияние лакказы, ГК угля СНА-Pow и их совместного внесения на токсичность атразина для растений пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях модельного лабораторно-вегетационного эксперимента на почве.

При внесении ГК угля в почву в дозе 10 мг/кг детоксицирующий эффект был не выражен, что связано, вероятно, с небольшим увеличением общего содержания ГК на фоне почвенного органического вещества при выбранной дозе внесения. При увеличении дозы внесения ГК до 100 мг/кг, напротив, детоксицирующий эффект последних был ярко выражен и биомасса растений в этом варианте достигала $(74 \pm 6)\%$. Полученные результаты хорошо согласуются с приводимыми в литературе и объясняются связывающей способностью ГК по отношению к атразину [Perminova, 2006].

Влияние лакказы на детоксицирующий потенциал ГК угля по отношению к атразину также принципиально отличалось от результатов, полученных нами в ходе проведения экспериментов на перлите. Если при использовании в качестве субстрата перлита внесение фермента приводило к снижению детоксификации под действием ГК, то при проведении экспериментов на почве, напротив, наблюдали выраженное усиление этого процесса. Так, при внесении лакказы в небольших дозах (0.076 и 0.76 мг/кг) даже на фоне дозы внесения ГК 10 мг/кг наблюдали положительную зависимость детоксицирующего эффекта ГК при увеличении

дозы лакказы. При одновременном внесении ГК в дозе 10 мг/кг и лакказы в дозе 0.076 мг/кг биомасса растений возросла до 75% от контроля, а при 7.6 мг/кг – до 81%.

Следует отметить, что дальнейшее увеличение дозы внесения лакказы до 7.6 мг/кг на фоне высокой дозы внесения ГК (100 мг/кг) приводило к снижению детоксифицирующего эффекта и не превышало эффекта от внесения ГК угля без фермента, что обусловлено, по-видимому, процессами взаимодействия ГК с лакказой, описанными нами выше.

Таким образом, проведенные лабораторно-вегетационные эксперименты подтверждают полученные нами ранее результаты и свидетельствуют о возможности детоксификации атразина в почвенных условиях путем его связывания с ГК не только по механизмам физической адсорбции, но также и по механизму окислительного связывания при участии лакказы; при этом необходимые для протекания процесса редокс-медиаторы присутствуют, по-видимому, непосредственно в почве.

Глава 4. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами

4.1. Взаимодействие ГВ с тяжёлыми металлами: химические и токсикологические аспекты

Детоксицирующая способность ГВ по отношению к токсикантам различных классов, в том числе к тяжёлым металлам обусловлена их химической природой, которая позволяет характеризовать ГВ как нерегулярные полимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот [Clapp et al., 1993]. Особенностью структуры ГВ является одновременное присутствие в их структуре различных функциональных групп, полярных и неполярных фрагментов, что обуславливает способность ГВ взаимодействовать как с полярными и гидрофобными ксенобиотиками, так и с неорганическими ионами. Связывание токсикантов приводит к снижению их биодоступности и, как следствие, уменьшению биоаккумуляции.

4.1.1. Взаимодействие ГВ с тяжёлыми металлами

Тяжёлые металлы (ТМ) могут связываться ГВ через различные гетероатомы, такие как азот, кислород или сера. Несмотря на разнообразие предложенных в настоящее время моделей связывания металлов ГВ, включая электростатические модели [Tipping, 2002; Saito, 2005], модель нейтрализации заряда [Kim, Czerwinski, 1996], т.н. модели VI [Tipping, 1998; Tipping, 2002] и VI-S [Gustafsson, 2001] и модель NICA-Доннана [Коорал et al., 2005; Kinniburgh, 1999; Milne et al., 2003], показано, что большинстве случаев определяющую роль в процессе связывания играют карбоксильные и фенольные группы [Jonea, Bryan, 1998; Dudal, Gerard, 2004; Croué, et al., 2003; Merdy et al., 2006].

Следует отметить, что единого взгляда на природу взаимодействий в системе ГВ – ТМ до сих пор не существует. Приводимые в литературе данные часто весьма разноречивы. Так, автор [Орлов, 1992] сообщает, что согласно одним данным, полученным методом ЭПР, связывание ионов меди с ГВ происходит за счет донорного атома азота и двух карбоксилат-ионов. В то же время данные других

ЭПР-исследований [Линник и Набиванец, 1986] заставляют предполагать, что в комплексообразовании участвуют только карбоксилат-ионы, причем степень ковалентности образующихся с металлом связей незначительна, тогда как электростатические взаимодействия явно преобладают; более того, в ряде случаев наблюдают простые связи солевого типа. Для торфяных ГК, обычно содержащих значительные количества азота, имеются данные ЭПР-исследований о координации ионов меди азотом порфириновых группировок, что свидетельствует о том, что некоторое количество ТМ в торфе находится в сильно связанной форме комплексов порфиринового типа [Goodman & Cheshire, 1976; Premovic et al., 2000].

С другой стороны, результаты исследований, проведенных с использованием ИК-спектроскопии, показали, что карбоксильные группы (или, точнее, карбоксилат-ионы) играют определяющую роль в комплексообразовании ГК и ФК с ионами тяжелых металлов [Орлов, 1992]. Имеются также свидетельства, что ОН, С=О и аминные группы также принимают участие в связывании ТМ. Существуют также работы, указывающие на возможность взаимодействия ТМ с ГВ с образованием комплексов фталатного [Manning & Ramamoorthy, 1973] и салицилатного [Орлов, 1992] типа.

Рассмотренные выше типы связывания характерны для большинства ГВ наземного происхождения, т.е. угольных, торфяных, почвенных ГВ и ГВ пресных вод, которые характеризуются относительно высоким содержанием ароматических структур. В то же время для морских ГВ с преимущественно алифатической структурой механизмы взаимодействия ГВ-ТМ могут существенно отличаться. Так, в работе [Piotrowicz et al., 1984], показаны три основных типа связывания иона металла с ФК морского происхождения, которые включают в себя взаимодействие посредством внутрисферных кислородсодержащих групп, посредством карбоксилат-ионов и при помощи комбинации различных функциональных групп. При этом доля хелатных взаимодействий для данного типа ФК существенно ниже, что, возможно, и является причиной более низкой комплексообразующей способности морских ГВ.

Приведенное рассмотрение основных механизмов связывания ГВ различного происхождения с ионами тяжелых металлов наглядно демонстрирует невозможность применения хорошо разработанного математического аппарата

описания простого протонного замещения для столь сложной системы, как ГВ-ТМ. Это связано с полиэлектролитной природой ГВ, осложняющей картину взаимодействия. Для описания механизма комплексообразования необходимо использовать подход из химии полиэлектролитов, учитывающий такие эффекты, как изменение конформации и агрегации молекул ГК, влияние на эти процессы рН и ионной силы раствора [Линник и Набиванец, 1986; Merdy et al., 2006]. С другой стороны, необходимо также принимать во внимание тот факт, что на комплексообразование ионов ТМ с ГВ сильное влияние оказывают структурные особенности последних, которые могут достаточно широко варьироваться для различных препаратов, даже принадлежащих к одному структурному типу [Merdy et al., 2006].

В работе [Piotrowicz et al., 1984] при помощи вольтамперометрии и УФ-спектроскопии исследовали связь комплексообразующей способности морских ГВ с их структурными различиями, охарактеризованными методом ЯМР. Для различных препаратов морских ГК и ФК определяли степень ароматичности и показатель окисленности структуры, рассчитываемый как отношение ширины пика в области 3.0-4.0 м.д. ПМР-спектра на половине его высоты к доле протонов, проявляющихся в данной области. Обнаружена тесная связь этого параметра с комплексообразующей способностью ГК и ФК: препараты с высоким отношением показателя окисленности к средней молекулярной массе взаимодействовали с ионами металлов существенно активнее. Для ГК наблюдали также более сильное взаимодействие с ионами металлов для препаратов с повышенной степенью ароматичности.

4.1.2. Влияние ГВ на токсичность тяжёлых металлов

Таким образом, обзор существующих литературных данных показывает, что ГВ взаимодействуют с ТМ с образованием соединений различной природы, что в значительной степени может изменять их токсичность и биоусвояемость. Действительно, в настоящее время тот факт, что незакомплексованные ионы металлов обладают более высокой токсичностью для организмов, является общепризнанным. Этот вывод неоднократно подтвержден в опытах как с лабораторными культурами, так и с природными популяциями организмов [Филенко, 1988; Gardner, Al-Hamdani, 1997; Buchwalter et al., 1996; Tao et al., 1999;

Meinelt et al., 2001; Inaba & Takenaka, 2005]. Получены интересные данные по изучению влияния ГВ на токсичность кадмия (II) для рыб [Meinelt et al., 2001] и водорослей [Gjessing, 1981; Meinelt et al., 2001]. В отсутствие ГВ 50%-ное снижение количества клеток водоросли *S. capricornutum* наблюдали при концентрации ионов Cd(II) менее 10 мкг/л. В присутствии ГВ такой же эффект был обнаружен при концентрации Cd(II) 60-70 мкг/л. По другим данным, ГВ природных вод снижали биодоступность и, как следствие, токсичность ионов меди для обыкновенных неонов *Paracheirodon innesi* [Tao et al., 1999; Tao et al., 2000]. По данным [Inaba & Takenaka, 2005] растворённое органическое вещество почвы и ГК угля снижали токсичность меди для проростков салата *Lactuca sativa* L., способствуя росту корней.

Вопрос о токсичности различных форм металлов тесным образом связан с таким важным показателем, как доступность их для водных организмов. Многие исследователи полагают, что ТМ в виде высокомолекулярных комплексных соединений нетоксичны, т.к. становятся практически недоступными для гидробионтов [Bender et al., 1970; Gachrer et al., 1978; Tao et al., 2000]. Установлено [Gachrer et al., 1978], что медь, связанная с фракцией растворенных органических веществ озерных вод, обладающей молекулярной массой более 1000 Да, является почти полностью нетоксичной. Скорость фотосинтеза фитопланктона в присутствии достаточно высоких концентраций этой формы меди практически не изменяется, в то время как она значительно снижается под действием свободных ионов Cu(II) (50%-ное ингибирование отмечено при концентрации около 20 мкг/л). Аналогичные данные получены и для подавления фотосинтеза ионами железа [Bender et al., 1970].

Высказанное предположение о недоступности ТМ в составе комплексов с органическими комплексонами хорошо подтверждается экспериментами с синтетическими комплексонами. В работах [Biesinger et al., 1974; Borgmann, 1981] отмечалось, что введение в водную среду ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или НТА (нитрилуксусная кислота) приводит к существенному снижению биоаккумуляции ТМ в гидробионтах. Объясняется это тем, что для ТМ в виде комплексов с ЭДТА или НТА клеточные мембраны как водорослевых, так и животных организмов становятся труднопроницаемыми. Следует подчеркнуть,

однако, что данная закономерность не является общей и часто зависит от внешних условий (рН, ионная сила раствора, концентрация комплексона и его свойства). В частности, в опытах с *Daphnia magna* [Poldoski, 1979] обнаружено, что комплексы кадмия с ДЭДТК (диэтилдитиокарбоминовая кислота), в отличие от комплексов этого же металла с ЭДТА, НТА, ГК и другими комплексообразующими агентами, хорошо поглощаются *D. magna*. При этом скорость извлечения кадмия из воды дафниями в присутствии ДЭДТК значительно превосходила скорость ее аккумуляции в отсутствие комплексонов. Наблюдаемое явление объясняется высокой растворимостью в липидах комплекса кадмия с ДЭДТК. В ряде случаев исследователями были получены данные, свидетельствующие об увеличении токсичности ТМ в присутствии ГВ. Так, в работе [Buchwalter et al., 1996] приводятся результаты об увеличении смертности и замедлении роста яиц лягушек рода *Xenopus*, вызываемых ионами меди в присутствии ФК в высоких концентрациях при рН 6.5, в то время как при рН 5.0-5.5 авторами наблюдалось выраженное защитное действие ГВ.

Наконец, помимо самого фактора наличия органических макролигандов в водной среде, на детоксификацию ТМ определяющее влияние будет оказывать устойчивость образующихся комплексов. При этом чем выше значение константы устойчивости комплекса, тем ниже вызываемый ионами металла токсический эффект.

Таким образом, проведенный анализ литературного материала позволяет сделать вывод о существенном влиянии комплексообразователей природного происхождения – ГВ – на токсичность ТМ в природных экосистемах. ГВ вступают во взаимодействие с ТМ, изменяют формы их существования, воздействуя таким образом на процессы биоаккумуляции и токсические эффекты ТМ. Величина этого воздействия определяется структурными особенностями ГВ, которые могут достаточно сильно отличаться для ГК и ФК различного происхождения. В частности, можно ожидать, что ГВ, содержащие большее количество функциональных групп, ответственных за связывание ТМ, будут характеризоваться более выраженным защитным действием по отношению к живым организмам в присутствии ТМ. Поэтому целью данного этапа нашей работы было изучение защитных свойств ГВ, искусственно обогащенных

функциональными группами в присутствии ТМ. В качестве модельного ТМ использовали медь.

Несмотря на то, что естественное загрязнение медью почв и природных вод встречается крайне редко и обусловлено наличием медьсодержащих пород, медь часто аккумулируется в почве вследствие орошения сточными водами, внесения навоза, а также при применении ряда удобрений и пестицидов. Особенности поведения меди в окружающей среде является её высокая токсичность и выраженная миграционная способность, что обуславливает её быстрое попадание из почвы в подземные и поверхностные воды.

4.2. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами, в водной среде

В связи с тем, что в настоящее время хорошо известно, что связывание меди ГВ происходит через кислородсодержащие функциональные группы [Орлов 1992, Merdy et al., 2005], для проведения исследований использовали не только природные ГВ, но также препараты модифицированных ГВ с искусственно введенными бензохиноновыми, пирокатехиновыми, гидрохиноновыми и фенольными фрагментами (табл. 1.3-1.5). Степень модификации полученных производных оценивали на основании содержания карбоксильных (COOH) и фенольных (Ar-OH) групп, определяемых титрованием. Всего был исследован 31 препарат.

4.2.1. Защитное действие природных ГВ

Исследование защитного действия ГВ проводили с помощью биотестирования по методу проростков. Медь вносили в растворы в виде соли $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Продолжительность эксперимента составляла 72 ч, температура проращивания семян 25°C , pH растворов 6.4. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Тест-культурой служила мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. (сорт Московская-39). Рабочую концентрацию Cu^{2+} выбирали на основании предварительно проведенных экспериментов по установлению диапазонов токсичности меди (рис. 4.1).

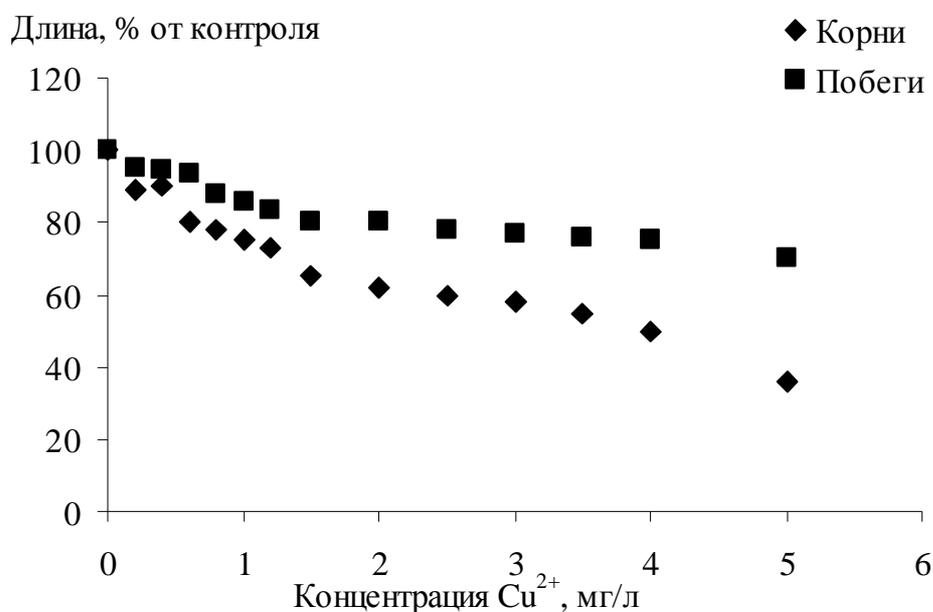


Рисунок 4.1. Влияние Cu(II) на длину корней и побегов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Как показали полученные результаты, среди использованных нами показателей длина корней проростков оказалась более чувствительна к действию меди, чем длина побегов. Так, при максимальной исследованной концентрации меди 5 мг/л угнетение побегов составило 30%, а угнетение корней – 65%. Поэтому во всех дальнейших экспериментах в качестве тест-отклика использовали длину корней проростков. В связи с тем, что линейный диапазон зависимости длины корней проростков от концентрации меди наблюдали только в диапазоне до 1.5 мг/л, в качестве рабочей концентрации меди была выбрана концентрация 1 мг/л, вызывающая 25% снижение величины тест-отклика.

Для оценки детоксифицирующей способности ГВ проводили исследование токсичности растворов, содержащих постоянную концентрацию Cu(II) (1 мг/л) и различные концентрации ГВ в диапазоне 5-100 мг/л. Для оценки собственной физиологической активности гуминовых препаратов параллельно проводили также тестирование ГВ в тех же концентрациях, но без добавления меди.

Как уже было показано ранее в присутствии меди происходило ингибирование роста корней проростков пшеницы и величина тест-отклика снижалась на 25% по сравнению с контролем (рис. 4.1). Результаты токсикологических экспериментов показали, что внесение гуминовых препаратов приводило к снижению токсичности меди уже при концентрации 5 мг/л, а при

концентрациях 30 мг/л и выше наблюдали полное снятие негативного действия меди (рис. 4.2).

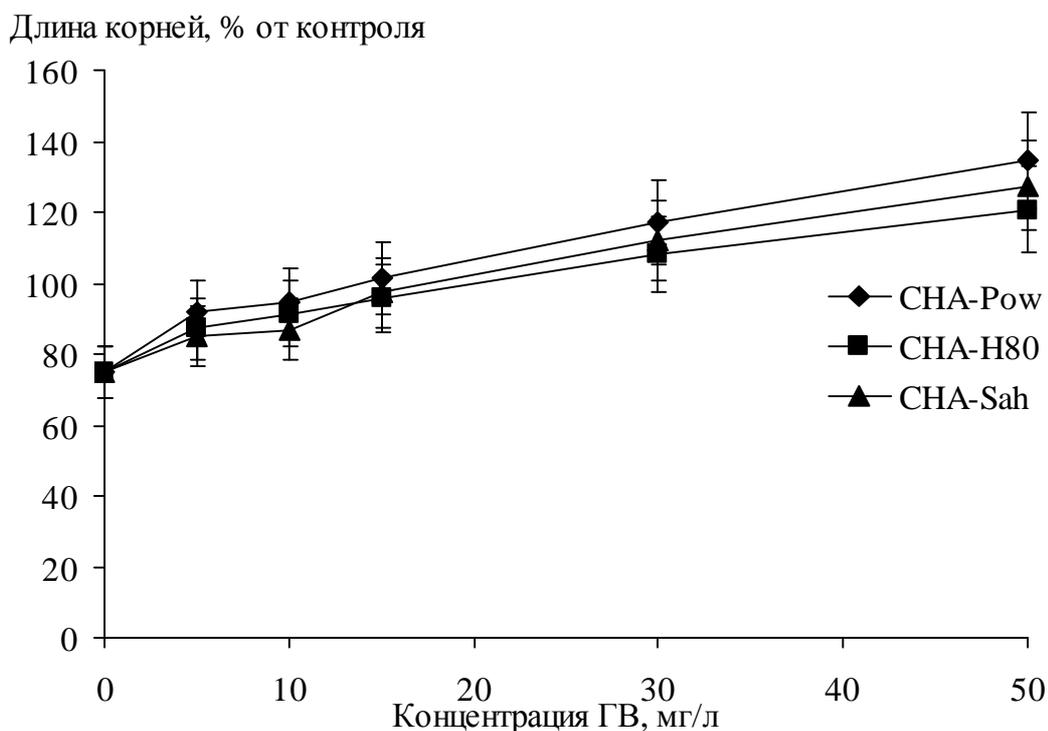


Рисунок 4.2. Влияние ГК угля на длину корней проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии Cu(II).

Особо следует подчеркнуть, что при концентрациях ГВ 30 мг/л и выше длина корней в присутствии ГВ превышала даже контрольные значения для проростков, проращиваемых на дистиллированной воде без внесения меди.

4.2.2. Защитное действие модифицированных ГВ

Защитное действие ГВ, искусственно обогащённых кислородсодержащими функциональными группами, практически во всех случаях было более ярко выражено, чем для исходного препарата ГК (рис. 4.3). Это свидетельствует о роли введённых функциональных групп в определении детоксифицирующей способности ГВ по отношению к меди.

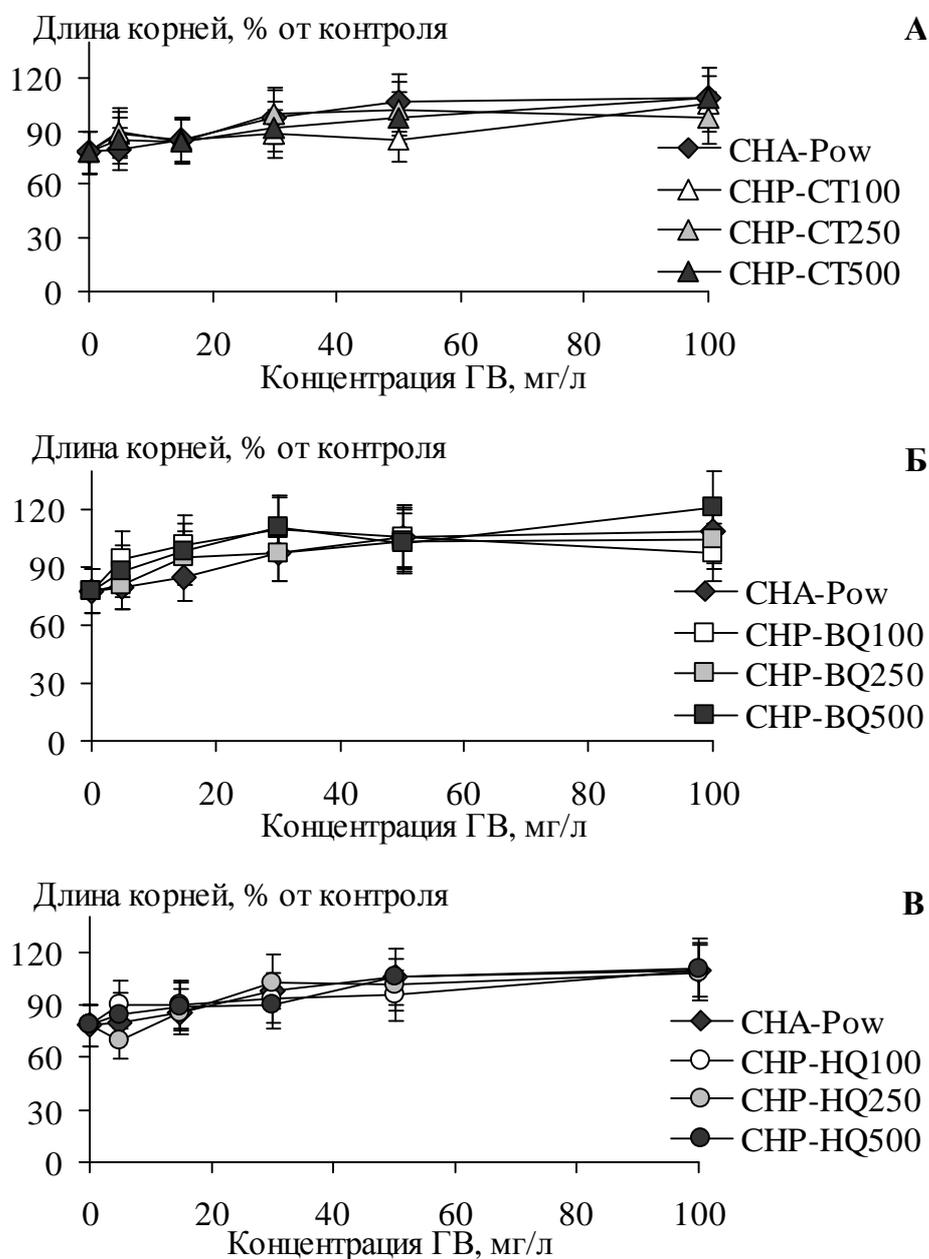


Рисунок. 4.3. Влияние ГК угля и его различных производных на примере приокатехин-формальдегидных сополимеров (А), сополимеров с р-бензохиноном (Б) и сополимеров с гидрохиноном (В) на длину корней проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии Cu(II).

На основании полученных данных были построены кривые детоксификации (рис. 4.4) и рассчитаны константы связывания меди исследованными природными и модифицированными препаратами ГВ K_{oc}^D (табл. 4.1).

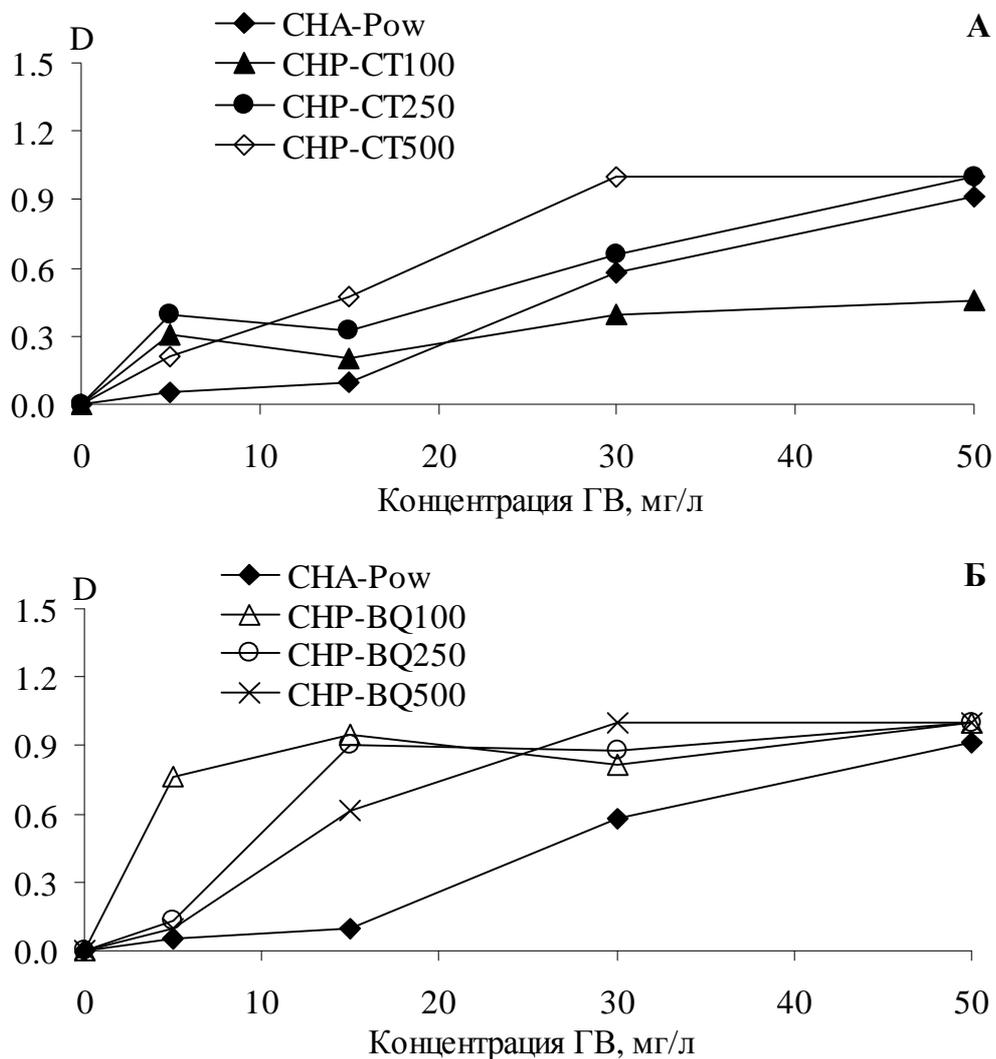


Рисунок 4.4. Кривые детоксификации меди ГВ и их производных на примере приокатехин-формальдегидных сополимеров (А) и сополимеров с р-бензохиноном (Б).

Таблица 4.1. Эффективные константы связывания K_{OC}^D меди ГК угля и их производными

Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС	Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС
Нативные ГВ		Пирокатехиновые сополимеры ГВ	
CHA-Pow	5.2×10^4	CHP-CT100	4.0×10^4
CHA-H80	1.5×10^5	CHP-CT250	6.5×10^5
CHA-Sah	6.0×10^4	CHP-CT500	7.0×10^4
Гидроксилированные ГВ		Сополимеры ГВ с фенолом	
CHP-OFr	3.5×10^5	CHP-PH-N100	1.0×10^5
CHP-OEl	2.1×10^5	CHP-PH-N250	1.2×10^5
CHP-OFe	2.5×10^5	CHP-PH-HQ250	3.5×10^5
CHP-RFr	1.5×10^5	CHP-PH-HQ250A	4.1×10^5
CHP-REl	2.0×10^5	CHP-PH-PC250	5.1×10^5
CHP-RFe	3.0×10^5	CHP-PH-PC250A	6.8×10^5
Сополимеры с салициловой кислотой		п-бензохиноновые сополимеры ГВ	
CHP-SA250	6.6×10^5	CHP-BQ100	7.0×10^5
CHP-SA250G	1.9×10^5	CHP-BQ250	2.0×10^5
CHP-SA250A	1.1×10^6	CHP-BQ500	2.5×10^5
Сополимеры с 2,3-дигидроксибензойной кислотой		Гидрохиноновые сополимеры ГВ	
CHP-DHBA250	1.4×10^5	CHP-HQ100	1.6×10^4
CHP-DHBA250G	1.4×10^5	CHP-HQ250	9.5×10^4
CHP-DHBA250A	4.3×10^5	CHP-HQ500	5.9×10^4
		CHP-HVQ250-5%	8.0×10^5
		CHP-HVQ250-12%	10.0×10^5

Погрешность определения K_{OC}^D составила 15%

Как видно из табл. 4.1, значения K_{OC}^D для нативных ГВ варьировались в диапазоне $6.0 \times 10^4 - 1.5 \times 10^5$ ($\lg K_{OC}^D = 4.8-5.2$), что не превышает обычно приводимых в литературе данных по константам связывания меди ГВ различного происхождения ($\lg K_{OC} = 3.0-7.4$) [Lorenzo et al., 2002; Di Toro et al., 2005; Brooks et al., 2006; Cabaniss et al., 2007]. Это позволяет утверждать, что в водной среде

защитные свойства ГВ по отношению к растениям в присутствии меди обусловлены, главным образом, связыванием металла в недоступные комплексы.

Искусственное обогащение ГВ кислородсодержащими функциональными группами во всех случаях привело к увеличению защитных свойств ГВ (рис. 4.5).

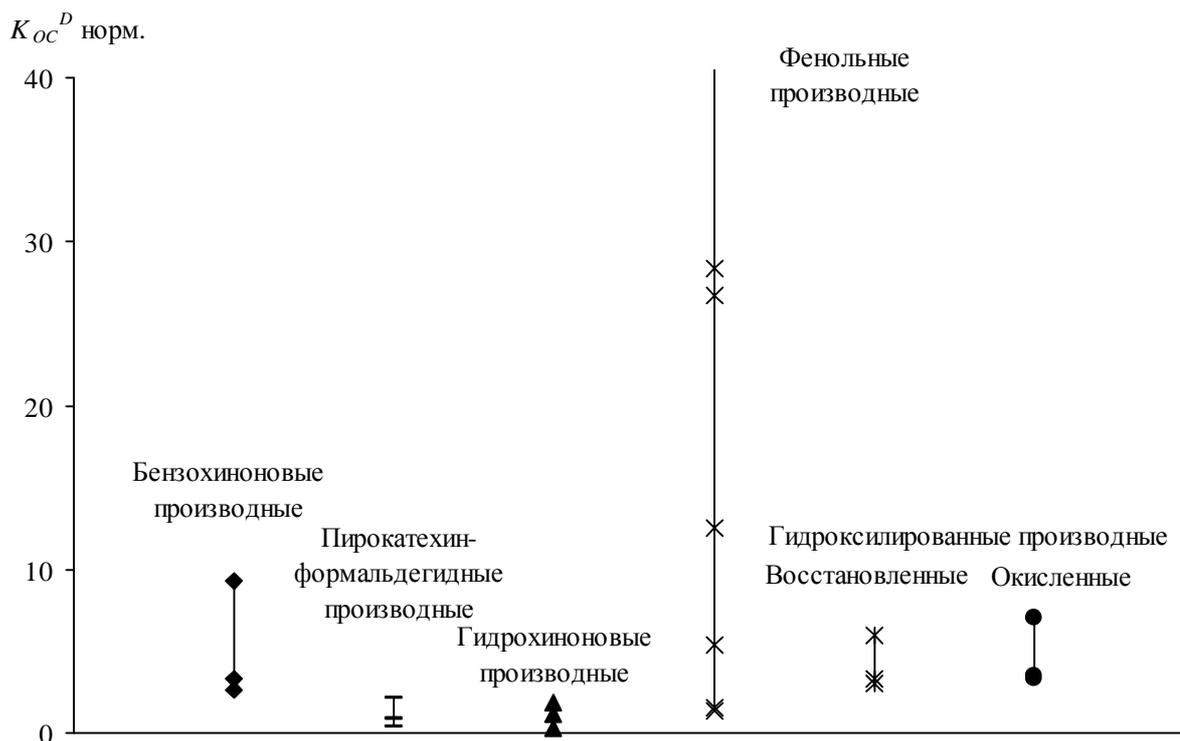


Рисунок 4.5. Эффективные константы связывания K_{OC}^D меди различными производными ГК угля США-Row, нормированные на константу связывания K_{OC}^D исходного препарата ГК.

Полученные результаты являются прямым доказательством участия кислородсодержащих функциональных групп в определении защитных свойств ГВ по отношению к растениям в присутствии меди.

Как видно из данных, представленных на рис. 4.5, все исследованные производные ГК можно расположить в следующий ряд согласно их детоксицирующей способности по отношению к меди:

Гидрохиноновые производные < пирокатехин-формальдегидные производные < гидроксилированные восстановленные производные < гидроксилированные окисленные производные < бензохиноновые производные. Так как исследованные фенольные производные характеризовались очень высоким разбросом полученных значений K_{OC}^D , превышающим величину K_{OC}^D исходного препарата в 1.3-45 раз, полученные результаты трудно охарактеризовать каким-либо средним значением.

4.2.3. Взаимосвязь структурных характеристик и детоксифицирующих свойств ГВ по отношению к тяжёлым металлам

Блок данных по защитному действию ГВ и их производных и их физико-химических свойств был подвергнут корреляционному анализу. Результаты приведены в табл. 4.2.

Таблица 4.2. Значения коэффициентов корреляции между детоксифицирующей способностью ГВ и их производных и их физико-химическими характеристиками

Параметры	Коэффициент корреляции
Элементный состав	
С, %	0.08
Н, %	-0.14
О, %	-0.10
О/С	-0.09
Н/С	-0.46
С/Н	0.06
Зольность, %	0.22
Кислотность	
Общая кислотность	-0.35
Содержание СООН групп	0.53*
Содержание Ar-ОН групп	-0.58
Содержание структурных фрагментов	
СНn, %	-0.21
СAlkO, %	0.15
СAr, %	0.01
СArO, %	-0.37
СОО, %	0.12
С=О, %	-0.05
ΣAr	-0.01
ΣAlk	-0.02
ΣAr/ΣAlk	-0.04
Молекулярно-массовое распределение	
Mw, кД	-0.54
Mw/Mn	-0.45

* – значимые коэффициенты корреляции при $P = 0.95$ выделены жирным

Как видно из табл. 4.2, среди исследованных физико-химических характеристик ГВ можно выделить только две группы параметров, влияющих на величину защитного действия ГВ в присутствии меди: кислотность и молекулярная масса. Так, наблюдали положительную линейную взаимосвязь между

нормированными значениями K_{OC}^D и содержанием карбоксильных групп в препаратах ГВ (рис. 4.6).

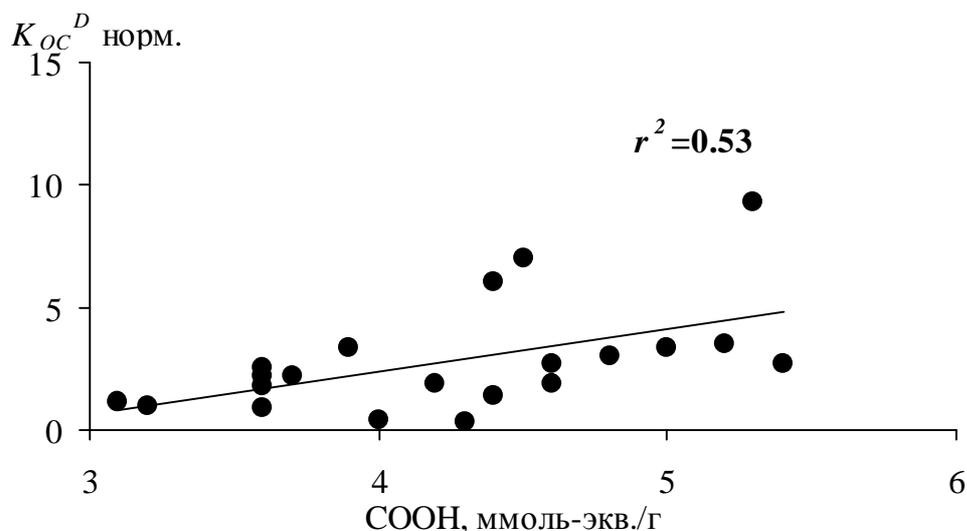


Рисунок 4.6. Корреляционное поле для пары «нормированная K_{OC}^D » – «содержание COOH групп».

Наблюдаемая положительная взаимосвязь между нормированными значениями K_{OC}^D и содержанием карбоксильных групп в препаратах ГВ позволяет рекомендовать подход, основанный на обогащении ГВ карбоксильными группами, для получения на основе ГВ детоксикантов направленного действия, предназначенных для снижения токсичности сред, загрязнённых медью. Следует подчеркнуть также, что среди кислотных групп ГВ только увеличение содержания карбоксильных групп в ГВ приводило к возрастанию их детоксицирующей способности, тогда как возрастание количества фенольных групп, напротив, снижало защитные свойства ГВ ($r = -0.58$).

Полученные результаты свидетельствуют также о том, что при предварительной оценке детоксицирующей способности ГВ по отношению к ТМ нецелесообразно использовать такую характеристику препаратов как суммарное содержание фенольных и карбоксильных групп.

Статистически значимый отрицательный коэффициент корреляции был обнаружен для пары «нормированная K_{OC}^D » – «молекулярная масса ГВ» ($r = -0.54$). Корреляционное поле для этой пары представлено на рис. 4.7.

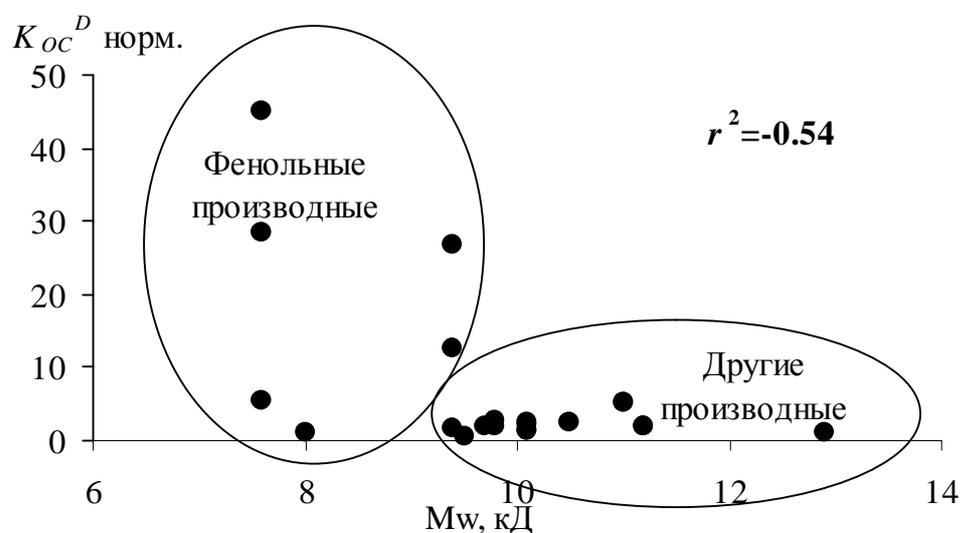


Рисунок 4.7. Корреляционное поле для пары «нормированная K_{oc}^D » – «молекулярная масса ГВ».

Детальное рассмотрение полученного корреляционного поля позволяет сделать заключение, что наблюдаемая корреляция является ложной, так как исследованные препараты, удовлетворительно разбиваются на две группы, а именно, фенольные производные и другие. Это означает невозможность применения линейного корреляционного подхода для анализа получаемых зависимостей.

Таким образом, можно сделать вывод о ведущей роли связывающей способности ГВ в определении их защитного действия в водных средах в присутствии ТМ. Однако тот факт, что в ряде случаев при высоких концентрациях ГВ в присутствии меди наблюдали значения тест-отклика, превышающие контрольные (до $(120 \pm 7)\%$), свидетельствует о том, что связывание ТМ может быть не единственным механизмом наблюдаемого защитного действия ГВ. Об этом же свидетельствуют данные [Inaba & Takenaka], которые продемонстрировали, что токсичность меди для проростков салата в присутствии ГК угля не была напрямую связана с доступностью меди для растений. Так, в контрольном варианте (без внесения ГК) содержание меди в проростках составляло 459 мкг/мг, а в присутствии ГК – 457 мкг/кг, т.е. значимо не отличалось. Тем не менее, результаты биотестирования показали выраженное снижение токсичности меди в присутствии ГК. На основании полученных данных авторы высказали гипотезу о роли физиологической активности самих ГК в процессах детоксикации меди в растениях.

4.2.4. Физиологическая активность природных и модифицированных ГВ

Проведённая оценка собственной физиологической активности ГВ показала однако, что внесение ГВ и их производных не вызывало выраженного стимулирующего эффекта по отношению к проросткам пшеницы (рис. 4.8), а длина корней проростков пшеницы в присутствии ГВ и их производных не превышала (116 ± 7)% от контроля.

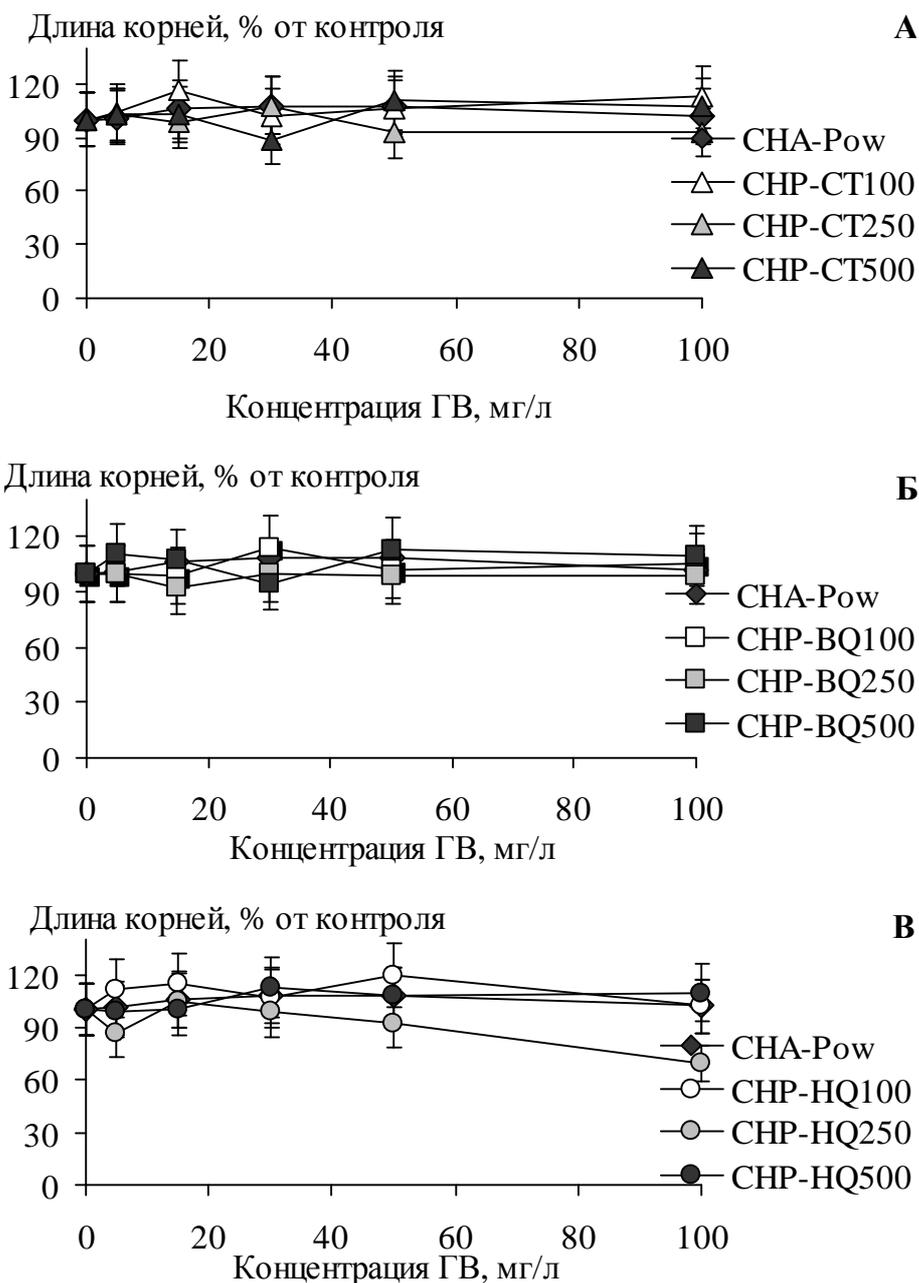


Рисунок 4.8. Влияние ГК угля и его различных производных на примере приокатехин-формальдегидных сополимеров (А), сополимеров с р-бензохиноном (Б) и сополимеров с гидрохиноном (В) на длину корней проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

По всей видимости, это свидетельствует о том, что физиологическая активность ГВ напрямую зависит от внешних условий и повышается в присутствии стрессовых факторов. Ранее подобные предположения были высказаны предыдущими исследователями. В частности, в работе [Dunstone et al., 1988] было показано, что стимулирующее действие ФК по отношению к пшенице проявляется только в условиях засухи, тогда как при оптимальных условиях роста эффекты незначительны.

Для сравнения физиологической активности производных ГК угля с его различными производными было проведено нормирование максимально наблюдаемого положительного эффекта в присутствии ГВ на аналогичный показатель, зарегистрированный для исходного препарата. Результаты приведены на рис. 4.9.

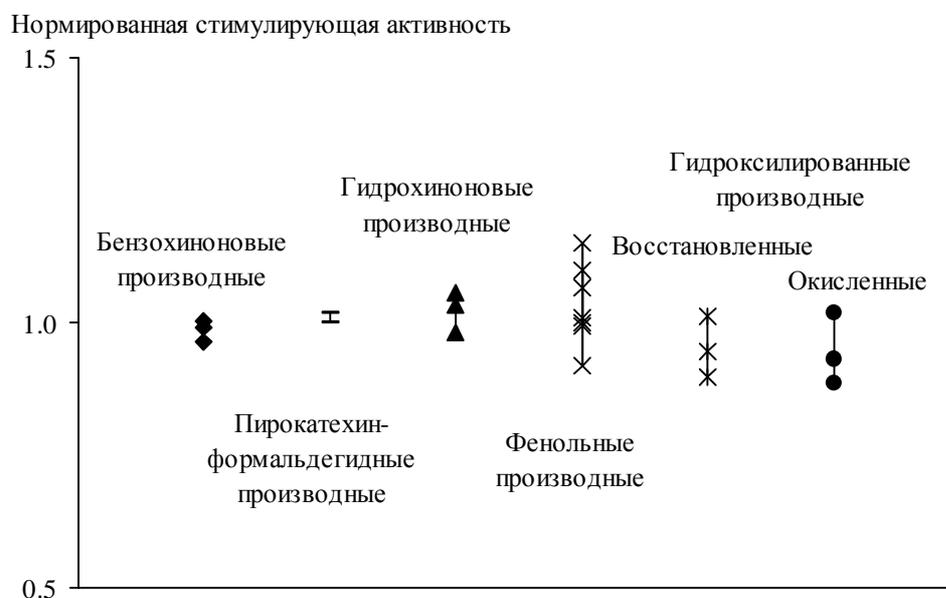


Рисунок 4.9. Максимальная стимулирующая активность различных производных ГК угля СНА-Pow, нормированная на максимальную стимулирующую активность исходного препарата ГК.

Как видно из представленного рисунка, в отличие от детоксицирующей способности, стимулирующая активность производных ГВ незначительно отличалась от таковой исходного препарата, варьируя в пределах от 0.9 до 1.2. Как и в случае с защитными свойствами, наибольшим разбросом этого показателя характеризовались фенольные производные.

4.2.5. Взаимосвязь структурных характеристик и физиологической активности ГВ

Результаты проведённого корреляционного анализа, направленные на выявление взаимосвязи между физико-химическими характеристиками ГВ и проявляемой ими стимулирующей активностью, приведены в табл. 4.3.

Таблица 4.3. Значения коэффициентов корреляции между стимулирующей активностью ГВ и их производных и их физико-химическими характеристиками

Параметры	Коэффициент корреляции
Элементный состав	
С, %	0.26
Н, %	0.10
О, %	-0.17
О/С	0.29
Н/С	-0.18
С/Н	0.03
Зольность, %	-0.24
Кислотность	
Общая кислотность	-0.03
Содержание СООН групп	-0.11
Содержание Ar-OH групп	0.41
Содержание структурных фрагментов	
СНn, %	-0.12
СAlkO, %	0.09
СAr, %	0.21
СArO, %	-0.09
СОО, %	-0.27
С=О, %	0.11
ΣAr	0.14
ΣAlk	-0.02
ΣAr/ΣAlk	0.09
Молекулярно-массовое распределение	
Mw, кД	-0.41
Mw/Mn	-0.55
Редокс активность	
Окислительно-восстановительная ёмкость, моль/г	0.34
Парамагнитная активность	
Содержание свободных радикалов, спин/г×10 ⁻¹⁶	0.12

Как видно из табл. 4.3., среди изученных параметров нами не было обнаружено значимых значений коэффициентов корреляции со стимулирующей

активностью ГВ. По-видимому, это связано со слабовыраженным стимулирующим действием ГВ в выбранных условиях.

Следует подчеркнуть, что в ряде работ, посвящённых поиску взаимосвязи между физиологической активностью ГВ и их физико-химической характеристикой, полученные авторами результаты свидетельствуют о ведущей роли кислородсодержащих функциональных групп. Так, по мнению Христовой [Христева, 1949] ведущим началом физиологической активности ГВ являются фенольные и хинонные фрагменты. Ею была высказана гипотеза ассимиляции растениями ГК. Эта гипотеза заключается в том, что ГК, попадая в растение, окисляются полифенолоксидазой. В дальнейшем при участии фермента пероксидазы у них отщепляется атомарный кислород, который каталитически переносится на субстрат, а пероксидная форма полифенола переходит в хинон. Хиноны, в свою очередь, обладают очень высоким окислительным потенциалом, в силу чего отнимают активированный водород из органических веществ. При этом происходит превращение хинона в исходную форму, т.е. полифенол, а вещество, отдавшее водород, окисляется. Для подтверждения высказанной Христовой гипотезы Фляйгом в 50-е года прошлого века были проведены опыты по оценке действия ортохинонов на рост пшеницы, ржи и кресс-салата [Фляйг, 1958]. Эксперименты продемонстрировали выраженное стимулирующее влияние ортохинонов на растения и позволили высказать предположение об участии хинонов в качестве переносчиков водорода в окислительном дезаминировании и декарбоксилировании аминокислот. На основании исследований, проведенных в этом направлении, была сформулирована теория, объясняющая стимулирующее действие ГВ присутствием в их молекулах группировок полифенольного и хиноидного характера, которые используются растением для усиления фенолазной окислительной системы, следствием чего является активизация дыхания и обмена веществ в целом [Христева, 1953, Зединг, 1955, Фляйг и Заальбах, 1957]. Рядом исследователей было также высказано предположение о том, что определяющую роль в физиологической активности ГВ играют карбоксильные и фенольные группы [Malcom and Vaughan, 1979; Pflug and Ziechmann, 1981; Новикова и др., 2001]. Тем не менее, проведённые эксперименты по оценке физиологической активности препаратов ГВ, искусственно обогащённых кислородсодержащими

функциональными группами, не подтверждают высказанные предположения. По-видимому, для проявления физиологической активности необходимо сочетание высокого содержания кислородсодержащих функциональных групп с каким-то ещё свойством ГВ. Например, Пикколо и Нарди [Piccolo et al., 1992; Nardi et al., 2002] высказали гипотезу, что для проявления высокой физиологической активности необходима одновременная комбинация небольшого молекулярного веса и содержания ароматических, карбоксильных и фенольных групп. Гипотеза была разработана для объяснения феномена, что наибольшей активностью обладают низкомолекулярные фракции ГВ [Vaughan, Malcom, 1985; Vaughan et al., 1985; Cacco et al., 2000], хотя и высокомолекулярные компоненты также обладали определенной активностью [Malcom and Vaughan, 1979].

По мнению Виссера [Visser, 1986], относительно высокое содержание карбоксильных и фенольных групп в ФК, обеспечивающее высокую связывающую способность ФК по отношению к металлам, объясняет их влияние на метаболизм и усиление поступления элементов минерального питания в их присутствии. Кроме того, по мнению ряда авторов [Visser, 1986; Nardi et al., 1988; Nardi et al., 2002] более низкомолекулярные фракции ГВ легче, чем их высокомолекулярные аналоги, могут поступать в клетки растений. Высокомолекулярные фракции, в свою очередь, могут необратимо сорбироваться на внешней стороне клеточных поверхностей [Vaughan et al., 1985, Vaughan, 1986]. Аналогичные результаты были получены Алиевым [Алиев, 1987] и Наумовой [Наумова и др., 2001], которые пришел к выводу о том, что наиболее активными являются самые низкомолекулярные фракции ГВ, характеризующиеся наибольшим содержанием функциональных групп и свободных радикалов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии ГВ на токсичность ТМ в водной среде. При этом ключевую роль в комплексообразовании играют, по-видимому, карбоксильные группы ГВ. При этом связывание меди может быть не единственным механизмом наблюдаемого защитного действия ГВ.

4.3. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами, в почвенной среде

4.3.1. Защитное действие природных и модифицированных ГВ в почве

Защитное действие ГВ в присутствии ТМ в почвенной среде изучали в условиях полевых мелкоделяночных экспериментов с использованием в качестве модельного токсиканта меди, вносимой в виде соли $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Тест-культурой служила мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. (сорт Московская-39), тест откликом – сырая биомасса растений. Исследованные препараты включали в себя ГК угля СНА-Ров и их гидрохиноновые сополимеры СНР-НВQ250-5%, и СНР-НВQ250-12%, характеризовавшиеся наибольшей величиной защитного действия в водной среде.

Эксперименты проводили в мае-сентябре 2006 г. в Московской области (среднее количество осадков 650-700 мм, средняя зимняя и летняя температуры –7 и +19°C) на дерново-подзолистой почве (средний суглинок, рН 5.6, содержание гумуса 3%). Схема эксперимента включала в себя варианты обработки почвы ГВ, медью и совместного внесения меди и ГВ, повторность трехкратная. Размер делянки составлял 3 м², доза внесения меди составила 3 т/га по медному купоросу (750 кг/га по меди), ГВ – 100 кг/га (рис. 4.10). Растворы гуминовых препаратов готовили путём растворения необходимого количества препарата в небольшом количестве 1М NaOH с последующим разведением в водопроводной воде и установлением рН раствора 5.5-5.9 с помощью 0.1М HCl. Растворы меди, гуминовых препаратов и воды вносили в почву путём опрыскивания в количестве 0.5 л на делянку. На последнем этапе в подготовленные делянки вносили предварительно откалиброванные семена пшеницы в количестве 120 шт. на делянку; глубина заделывания составляла 3 см.

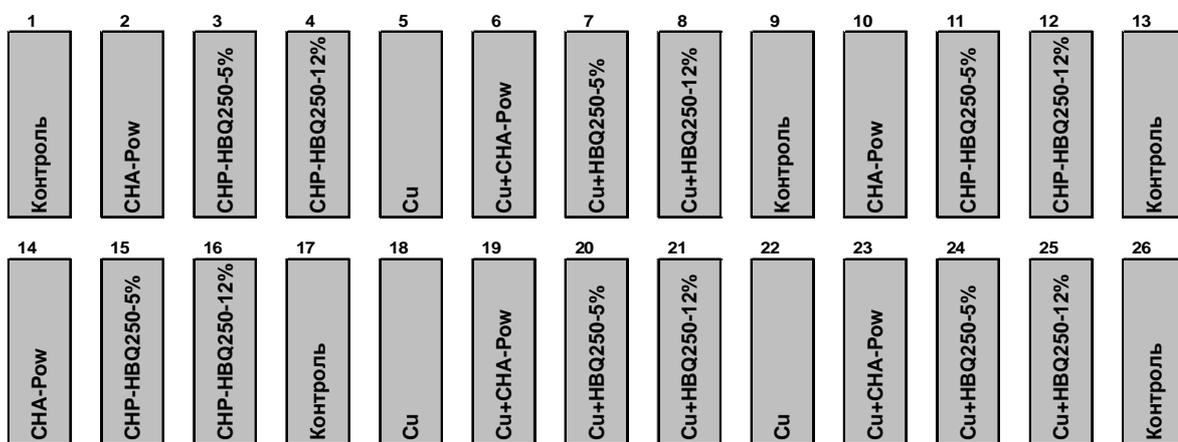


Рисунок 4.10. Схема полевого опыта по оценке защитного действия ГК угля CHA-Pow и их гидрохиноновых производных SHP-HBQ250-5% и SHP-HBQ250-12% по отношению к растениям пшеницы в почвенных условиях в присутствии меди.

Уход за опытом включал в себя ежедневный осмотр посевов, ручную прополку и полив по мере необходимости. Продолжительность опыта составляла 20-30 дней. Всего за полевой сезон было проведено три опыта.

Проведенные эксперименты показали, что, как и в случае экспериментов в водной среде, в отсутствие стресса, вызываемого токсикантом, ГВ и их производные не обладали выраженной стимулирующей активностью (рис. 4.11).

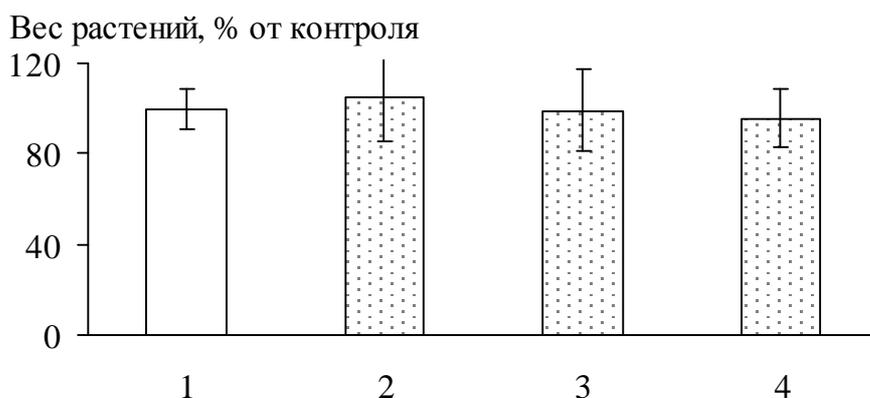


Рисунок 4.11. Влияние ГК угля и их производных на рост растений пшеницы в отсутствие меди в условиях полевого эксперимента. 1 – контроль; 2– CHA-Pow, 3 – SHP-HBQ250-5%, 4 – SHP-HBQ250-12%.

В присутствии меди было отмечено выраженное защитное действие (рис. 4.12).

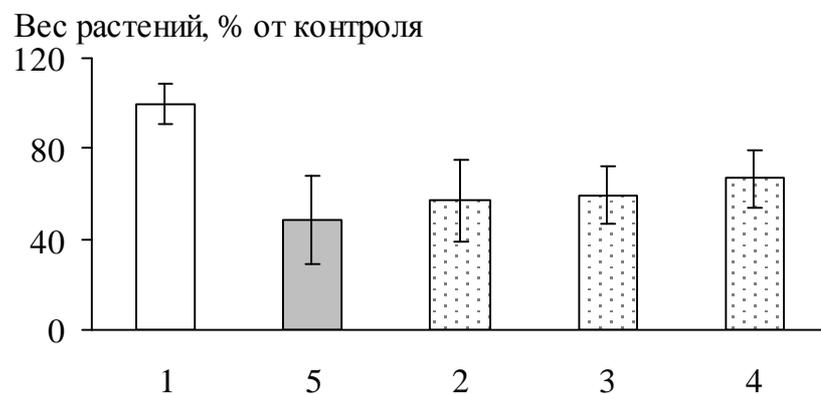


Рисунок 4.12. Влияние ГК угля и их производных на рост растений пшеницы в присутствии меди в условиях полевого эксперимента. 1 – контроль; 2– СНА-Pow, 3 – СНР-НВQ250-5%, 4 – СНР-НВQ250-12%, 5 – CuSO₄×5H₂O.

Рассчитанные константы связывания меди составили 9.9×10^2 , 2.7×10^3 , 2.0×10^4 для препаратов СНА-Pow, СНР-НВQ250-5% и СНР-НВQ250-12%, что соответствует приводимым в литературе химическим константам связывания, которые варьируются в пределах от 2.0×10^2 до 1.4×10^4 л/кг [Yu et al., 2002]. Таким образом, защитное действие ГВ по отношению к растениям в присутствии ТМ в почвенной среде, как и в водной, обусловлено связыванием токсиканта.

Среди исследованных препаратов ГВ наибольшее защитное действие было отмечено для препарата СНР-НВQ250-12%, что свидетельствует о возможности усиления детоксицирующей способности природных гуминовых препаратов путём их искусственного обогащения гидрохиноновыми фрагментами. С другой стороны, даже при использовании наиболее эффективного гуминового препарата в наших опытах биомасса растений пшеницы не достигала контрольных значений и составляла $(67 \pm 13)\%$. Это свидетельствует о том, что для детоксификации почв, загрязнённых медью, следует вносить препараты ГВ в соотношении ГВ : медь, превышающем 1:7.5.

По окончании проведения полевых экспериментов было определено содержание подвижной меди на делянках различных вариантов. Для этого с глубины 0-5 см отбирали почвенные образцы, высушивали до воздушно-сухого состояния и пропускали через сито с диаметром ячеек 1 мм. Из полученных таким образом образцов согласно [Воробьёва, 1998] проводили экстракцию подвижной меди ацетатно-аммонийным буфером (рН 4.7) при соотношении почва : раствор

1 : 10 с последующим определением на атомно-адсорбционном спектрометре в пламени пропан-воздух. Результаты представлены в табл. 4.4.

Таблица 4.4. Содержание подвижной меди в дерново-подзолистой почве, искусственно загрязнённой медью, после обработки почвы ГК угля и их гидрохиноновыми производными и проведения мелкоделяночных экспериментов с выращиванием пшеницы

Вариант	Содержание подвижной меди, мг/кг почвы
Контроль	10±4
Медь, 3 т CuSO ₄ ×5H ₂ O/га	600±5
СНА-Pow, 100 кг/га	2±4
НВQ250-5%, 100 кг/га	2±4
НВQ250-12%, 100 кг/га	7±4
Медь, 3 т CuSO ₄ ×5H ₂ O/га + СНА-Pow, 100 кг/га	580±5
Медь, 3 т CuSO ₄ ×5H ₂ O/га + НВQ250-5%, 100 кг/га	590±5
Медь, 3 т CuSO ₄ ×5H ₂ O/га + НВQ250-12%, 100 кг/га	406±10

Как показывают данные табл. 4.4, почва, использованная для проведения экспериментов, характеризовалась содержанием подвижной меди, типичным для аналогичных почв. Внесение ГК угля и их гидрохиноновых производных не влияло на этот показатель.

При внесении медного купороса было отмечено возрастание содержания подвижной меди до 600 мг/кг почвы. Использование ГВ и их производных приводило к значимому снижению содержания подвижной меди; наиболее выраженное уменьшение наблюдали для препарата СНР-НВQ250-12%, который, как было показано выше, проявил наибольшее защитное действие по отношению к растениям пшеницы. Это также является подтверждением высказанного ранее положения о ведущей роли связывания меди ГВ в определении их детоксицирующей способности в присутствии ТМ.

4.3.2. Последствие природных и модифицированных ГВ в почве

Для изучения длительности защитного действия ГВ по отношению к растениям в присутствии меди, через год после проведения первой серии экспериментов в мае-июле 2007 г нами был заложен аналогичный эксперимент на тех же делянках, но без дополнительного внесения меди и препаратов ГВ. Тест-культурой служила мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. (сорт Московская-39), тест

откликом – сырая биомасса растений. Во время проведения эксперимента количество осадков слегка превышало характерное для этого сезона в данной местности, но отрицательного влияния на развитие растений нами отмечено не было.

Результаты показали, что как и в первый год, ГВ не проявили выраженного стимулирующего действия по отношению к растениям пшеницы (рис. 4.13).

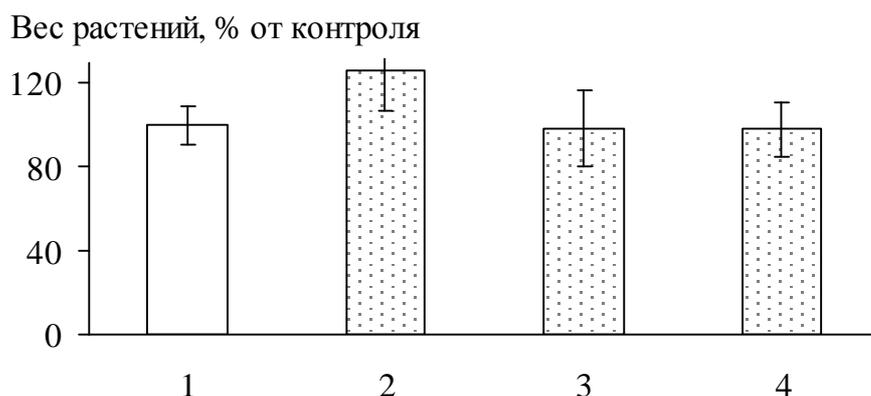


Рисунок 4.13. Влияние ГК угля и их производных на рост растений пшеницы в отсутствие меди в условиях полевого эксперимента. 1 – контроль; 2– CHA-Pow, 3 – CHP-NBQ250-5%, 4 – CHP-NBQ250-12%. 1-ый год последействия.

Как видно из рис. 4.13, среди исследованных ГВ, только внесение ГК угля CHA-Pow привело к увеличению биомассы до (126±13)% от контроля.

Влияние ГВ на биомассу растений пшеницы в присутствии меди приведено на рис. 4.14.

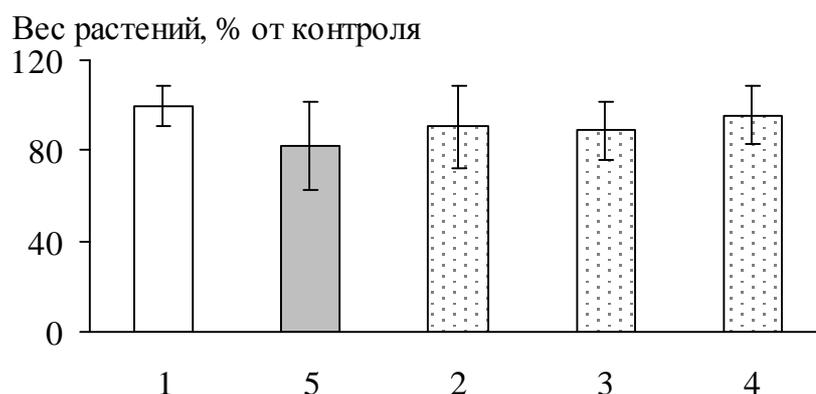


Рисунок 4.14. Влияние ГК угля и их производных на рост растений пшеницы в присутствии меди в условиях полевого эксперимента. 1 – контроль; 2– CHA-Pow, 3 – CHP-NBQ250-5%, 4 – CHP-NBQ250-12%, 5 – CuSO₄×5H₂O. 1-ый год последействия.

Полученные результаты свидетельствуют, что через год после внесения в почву медь оказывала выраженное угнетающее действие на растения пшеницы, что

привело к снижению биомассы до $(82\pm 9)\%$ от контроля. По сравнению с годом внесения, когда биомасса уменьшалась в среднем на 50%, токсичность меди была менее выражена, что связано, по-видимому, с миграцией металла по почвенному профилю.

В вариантах с одновременным внесением меди и ГВ было отмечено выраженное защитное действие всех исследованных ГВ: в зависимости от препарата биомасса растений пшеницы составляла от $(91\pm 5)\%$ до $(97\pm 6)\%$ от контроля. В последнем случае (вариант одновременного внесения меди и СНР-НВQ250-12%) значение биомассы статистически значимо не отличалось от контрольных значений. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными в предыдущий год, когда было продемонстрировано самое высокое защитное действие препарата СНР-НВQ250-12%. Кроме того, на основании проведённых экспериментов можно сделать вывод о наличии пролонгированного защитного действия ГВ по отношению к растениям пшеницы в почвенных условиях при загрязнении почвы ТМ.

Результаты определения содержания подвижной меди в почве приведены в табл. 4.5.

Таблица 4.5. Содержание подвижной меди в дерново-подзолистой почве, искусственно загрязнённой медью, после обработки почвы ГК угля и их гидрохиноновыми производными и проведения мелкоделяночных экспериментов с выращиванием пшеницы. 1 год последействия

Вариант	Содержание подвижной меди, мг/кг почвы
Контроль	8 ± 3
Медь, 3 т $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /га	75 ± 10
СНА-Pow, 100 кг/га	3 ± 1
НВQ250-5%, 100 кг/га	2 ± 1
НВQ250-12%, 100 кг/га	5 ± 2
Медь, 3 т $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /га + СНА-Pow, 100 кг/га	79 ± 10
Медь, 3 т $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /га + НВQ250-5%, 100 кг/га	76 ± 15
Медь, 3 т $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /га + НВQ250-12%, 100 кг/га	73 ± 11

Определение содержания в почве подвижной меди показало, что по сравнению с годом внесения медного купороса произошло существенное снижение

этого показателя: содержание подвижной меди снизилось с 600 ± 5 до 75 ± 10 мг/кг почвы, т.е. на 525 мг/кг почвы.

В вариантах с внесением ГВ также наблюдали уменьшения содержания подвижной меди до сходных величин. Принимая во внимание, однако, что в год внесения медного купороса в присутствии ГВ было определено меньшее количество подвижной меди, можно сделать вывод о том, что приведённые в табл. 4.5 величины содержания подвижной меди обусловлены количеством ТМ, связанного не с вносимыми гуминовыми препаратами, а эндогенным органическим веществом.

Результаты табл. 4.5 показывают одинаковое определяемое содержание подвижной меди в почве. Однако в вариантах с внесением меди нами была показана большая токсичность почвы, чем в вариантах с одновременным внесением меди и ГВ. Различия в токсичности почвы в этих вариантах при равном содержании подвижной меди свидетельствуют о том, что растения, наблюдаемое защитное действие ГВ по отношению к растениям в присутствии ТМ обусловлено не только их связывающей способностью, но также и собственной физиологической активностью, наиболее выражено проявляющейся в стрессовых условиях.

Таким образом, защитное действие ГВ по отношению к растениям в присутствии ТМ в почвенной среде, как и в водной, обусловлено связыванием токсиканта. При этом, как и в случае гербицидного стресса, наблюдается выраженное снижение защитного действия ГВ при переходе от водных сред к почвенным.

Проведенные эксперименты в условиях стрессов, вызываемых токсикантами, показали, что защитное действие ГВ в почвенных средах обусловлено, прежде всего, связывающей способностью ГВ по отношению к токсикантам. В водной среде, напротив, защитное действие ГВ обусловлено не только их взаимодействием с токсикантами, но также и собственной биологической активностью. В случае высоких констант связывания (ТМ), ведущую роль играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как при слабом химическом взаимодействии (гербициды) на первое место выходит собственная физиологическая активность ГВ. Наблюдаемое выраженное уменьшение защитных

свойств ГВ при переходе от водных сред к почвенным связано, по-видимому, со снижением их доступности для растений. Целью следующего этапа работы было изучение защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов, когда образование нетоксичных комплексов не может объяснить защитное действие ГВ. В качестве таких стрессовых факторов нами были использованы: недостаток элементов питания (на примере железодефицитного хлороза), повышенная и пониженная температуры, солевой стресс и водный дефицит.

Глава 5. Защитное действие ГВ в условиях железodefицитного хлороза

5.1. Влияние ГВ на поступление микроэлементов в растения

В настоящее время хорошо известно, что ГВ способствуют росту и развитию растений путём облегчения поступления в них различных микроэлементов, недостаток которых вызывает заболевания, известные под названием хлороз [Nardi et al., 2000; Fortun et al., 1985; Malcom & Vaughan, 1979; Xu et al., 1986; Chen et al., 1999; Gu et al., 2001; Zachariakis et al., 2001; Nikolic et al., 2003; Yamada et al., 2002; Pinto et al., 2004; Vocanegra et al., 2004; Tuerkmen et al., 2004; Neilsen et al., 2005]. Несмотря на то, что существует ряд исследований, демонстрирующих отсутствие положительного влияния ГВ на накопление растениями биомассы [Maskowiak et al., 2001; Cooper et al., 1998], наблюдаемые противоречия обусловлены, по-видимому, проведением экспериментов в последнем случае в оптимальных для растений условиях, тогда как положительное влияние ГВ наиболее выражено при недостатке какого-либо из питательных элементов [David et al., 1994]. Например, железodefицитный хлороз – симптом недостатка железа в растениях – может быть скорректирован с помощью ГВ, которые способствуют поступлению железа в растения [Sánchez-Sánchez et al., 2002; Pinton et al., 1998; Santi et al., 1999; Singh et al., 1998; Chen et al., 1999; Hamman et al., 1999; Pinton et al., 1999]. Способность ГВ облегчать поступление железа в растения обычно объясняется их хелатирующей активностью по отношению к железу, что обеспечивает присутствие железа в среде в доступной для растений форме [Stevenson, 1991; Vocanegra et al., 2004]. Существуют также гипотезы о способности ГВ участвовать непосредственно в ионном транспорте [Maggioni et al., 1987] и стимулировать связанные с мембраной протонные переносчики [Pinton et al., 1992; Varanini et al., 1993; Pinton et al., 1999]. Так, в работе Пинтона с сотр. [Pinton et al., 1999] приводятся данные о том, что обработка корней проростков кукурузы в концентрации 5 мг/л приводила к увеличению активности мембранного протонного насоса, о чём свидетельствовало возрастание активности H^+ АТФазы.

С другой стороны, известно, что ГВ благодаря наличию в них одновременно гидрофильных и гидрофобных структур обладают амфифильным характером и проявляют поверхностно-активные свойства [Vigneault et al., 2000; Visser, 1982], что способствует их высокому сродству к биологическим мембранам [Campbell et al., 1997, Gerritsen and Bradley, 1987; Parent et al., 1996; Vigneault et al., 2000; Campbell et al., 1997; Visser, 1985; Fein et al., 1999; Frost et al., 2003; Maurice et al., 2004; Zhou and Banks, 1993; Samson and Visser, 1989; Ermakov et al., 2000; Nardi et al., 2002]. Показано, что ГВ могут влиять на структуру и текучесть мембран, изменяя таким образом их проницаемость [Ermakov et al., 2000]. Изменение в мембранной проницаемости, в свою очередь, может способствовать увеличению поглощения элементов питания живыми организмами [Visser, 1985; Samson, Visser, 1989].

Однако защитное действие самих ГВ в этих условиях изучено недостаточно. Существуют единичные работы Фокина [Фокин, 1975; Ибрагимов, Фокин, 1985], разработавшего концепцию, что в естественных условиях растения могут поглощать и эффективно использовать многие зольные элементы не только в минеральной форме, но и виде минерально-гумусовых соединений. С использованием меченных по Fe гуминоподобных веществ автором экспериментально было показано их поступление в семенные растения, на основании чего был сделан вывод о наличии у растений особого механизма, позволяющего селективно поглощать из растворов сложные соединения, насыщенные элементами минерального питания.

Железо выполняет в растениях целый ряд важнейших функций, таких как участие в синтезе хлорофилла и ауксинов (железо входит в состав ферментов, катализирующих эти процессы). Благодаря способности железа легко переходить из двух- в трёхвалентное состояние и обратно не только в ионной форме, но и в составе различных комплексов с лигандами, многие комплексные соединения железа выступают в растениях в качестве переносчиков электрона при различных окислительно-восстановительных процессах (цитохромы, ферредоксины) и ферментов (пероксидазы, каталаза, аканитаза, липоксигеназы, ксантинооксидаза, железосодержащая супероксиддисмутаза), что делает железо ключевым элементом

для энергетических процессов организма – фотосинтеза, дыхания, усвоения азота [Островская, 1993].

В почве содержание железа больше, чем любого другого элемента: даже бедные почвы обычно содержат его не менее 2-3%. В кислых почвах, где растворимость железа повышается, растения в ряде случаев могут испытывать угнетение от его солей – хлорида или сульфата – находящихся в растворе [Агрохимия, 1964]. Однако в нейтральных и слабощелочных почвах подвижность железа резко падает, и многие растения, в частности плодовые, ягодные и овощные часто страдают от его недостатка (хлороз). По сравнению с другими металлами, существенными для жизнедеятельности растений, железо является наиболее зависимым от изменения кислотности и окислительно-восстановительного потенциала среды. В диапазоне pH от 7 до 9 минеральные формы железа в почве представлены, главным образом, в форме $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ и $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$. Их концентрация в почвенном растворе составляет около 10^{-10} М. Концентрация растворимого железа, необходимого для нормального роста растений, должна быть на несколько порядков выше: 10^{-6} - 10^{-5} М [Битюцкий, 2005]. В кислых, особенно гидроморфных почвах, создаются благоприятные условия для восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} , что способствует повышению растворимости соединений железа. На почвах, обогащённых карбонатом кальция, при высоких значениях pH и хорошей аэрации, когда железо преимущественно находится в форме Fe^{3+} , оно является труднодоступным для растений. Поэтому важный резерв доступных соединений этого металла для растений представляют собой его комплексы с органическим веществом почвы, особенно с ГВ.

При недостаточном поступлении железа в растения происходит нарушение фотосинтеза и, как следствие, снижение общей продуктивности. При этом нарушение фотосинтеза обусловлено целым рядом причин, таких как снижение содержания хлорофилла и каротиноидов, угнетение электронного транспорта в хлоропластах. Кроме того, в хлоропластах при дефиците железа отмечается повышенное образование активных форм кислорода (АФК), в частности, супероксид анион радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$ вследствие активирования реакции Меллера, т.е. транспорта электронов на кислород. Поэтому у железodefицитных растений

возникает необходимость повышения уровня защиты мембранных структур хлоропластов, в первую очередь – их липидных компонентов [Островская, 1993].

У растений существует два основных способа поглощения железа, обычно называемые стратегиями I и II. Растения со стратегией I (двудольные и однодольные, кроме мятликовых) способны снижать значение рН в области ризосферы с помощью выделяемых ферментов Fe-редуктаз, что способствует восстановлению железа из формы Fe(III) в Fe(II). Поступление в клетку осуществляется путём связывания с железовосстанавливающими белками, ассоциированными с клеточными мембранами. Растения со стратегией II (мятликовые) выделяют так называемые фитосидерофоры, которые хелатируют Fe(III).

При недостатке железа растения как стратегии I, так и II выделяют корневые слизи, представляющие собой полисахариды, включающие в себя от 20 до 50% полиуроновых кислот, а также низкомолекулярные органические соединения, такие как сахара, кислоты, аминокислоты и фенолы. Низкомолекулярные органические кислоты, аминокислоты и фенолы увеличивают доступность железа, образуя с ним хелатные комплексы, которые в настоящее время рассматривают как основную форму содержания железа и других микроэлементов в ризосфере [Битюцкий, 2005]. В качестве природных хелатов в почвенных и водных средах могут вступать ГВ, у которых в реакциях комплексообразования принимают участие карбоксильные и карбонильные функциональные группы, а также фенольные и спиртовые карбоксилы. В практике растениеводства при возделывании растений на карбонатных почвах широкое применение нашли синтетические хелаты (Fe-ЭДТА, Fe-ДТПА, Fe-ЭДДГА и др.), позволяющие удерживать железо в растворённом состоянии при высоких значениях рН среды. Несмотря на высокую эффективность указанных хелатов железа, следует, однако, подчеркнуть, что в последнее время всё большее внимание уделяется токсичности синтетических органических комплексонов типа ЭТДА, ДТПА, ЭДДГА и др. [Inaba & Takenaka, 2005], что привело к необходимости поиска альтернативных комплексонов органической природы. В настоящее время на сельскохозяйственном рынке представлен целый ряд продуктов гуминовой природы, содержащих смесь железа (и других микроэлементов) с ГВ: DIEHARD™ HUMATE SP (Sarasota

International Trade Center, США), ГУМИСОЛ (Биоком плюс, РФ), Гумат+7 (АгроТех ГУМАТ, РФ), Wuxal Microplant (Aglukon, ФРГ) и др.

Несмотря на общепризнанное положительное влияние хелатов железа на рост и развитие растений в условиях железодефицитного хлороза, растения стратегии I и II характеризуются различными особенностями усвоения этого микроэлемента. У растений стратегии I функционирование Fe-редуктаз оптимально при pH 5 и подавляется в щелочной среде. Фитосидерофорный механизм адаптации (стратегия II) в меньшей степени подвержен негативному действию высоких значений pH среды, что позволяет мятликовым эффективно усваивать железо, даже если в растворе практически нет его подвижных форм.

В связи с тем, что способ поглощения железа в условиях его недостатка в щелочной среде мог сказаться на величине защитного действия ГВ, нами были проведены эксперименты с растениями, обладающими как стратегий I, так и II.

5.2. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в водной среде

Для исследования защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях железодефицитного хлороза в качестве растений со стратегией I использовали томаты *Lycopersicon esculentum* Mill. сорта Баллада, а в качестве растений со стратегией II – пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта Московская-39. Семена растений проращивали в дистиллированной воде в течение 3 (пшеница) или 10 (томаты) дней, после чего проростки переносили на питательную среду Хогланда (г/л: KH_2PO_4 0.14; KNO_3 0.51; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 1.18; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49; мг/л: $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.18; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.07; $\text{NH}_4\text{MoO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03; H_3BO_3 2.9) без железа при pH 8 (значение pH устанавливали с помощью CaCO_3). В вариантах с железом, железо вводили в концентрации 24 мкМ в виде сульфата железа FeSO_4 , продажного хелата железа Fe(III)-ДТПА (комплекс железа с диэтилентриаминопентауксусной кислотой) или в виде совместного раствора ГК угля США-Pow с FeSO_4 . Выбор концентрации железа был основан на концентрациях, рекомендуемых для приготовления питательных сред, а соотношение ГК : железо рассчитывали исходя из содержания фенольных групп в ГК, т.к. при выбранных нами значениях pH эти группы (а не сумма карбоксильных

и фенольных групп) предположительно были доступны для связывания железа. Поэтому для исследования защитного действия самих ГВ в схему эксперимента также вводили вариант с СНА-Pow в концентрации 60 мг/л. Продолжительность эксперимента составляла 40 дней.

После 20 дней выращивания оценивали эффективность исследованных веществ путём определения эффективности фотосинтеза с использованием импульсного флуориметра PAM-2000 (Walz, ФРГ). По окончании эксперимента проводили учет длины и биомассы растений, а также содержания хлорофилла.

Результаты экспериментов показали, что в условиях недостатка железа как томаты, так и пшеница оказались подвержены хлорозу, о чём свидетельствовало пожелтение листьев и снижение отношения содержания хлорофилла a/b, которое часто используется для характеристики светособирающего комплекса растений в стрессовых условиях [Ramalho et al., 2000]. Для контрольных растений томатов и пшеницы этот показатель составил 0.59 и 0.29 соответственно.

Внесение железосодержащих препаратов и ГК угля оказало положительное действие на фотосинтез как томатов, так и пшеницы (рис. 5.1).

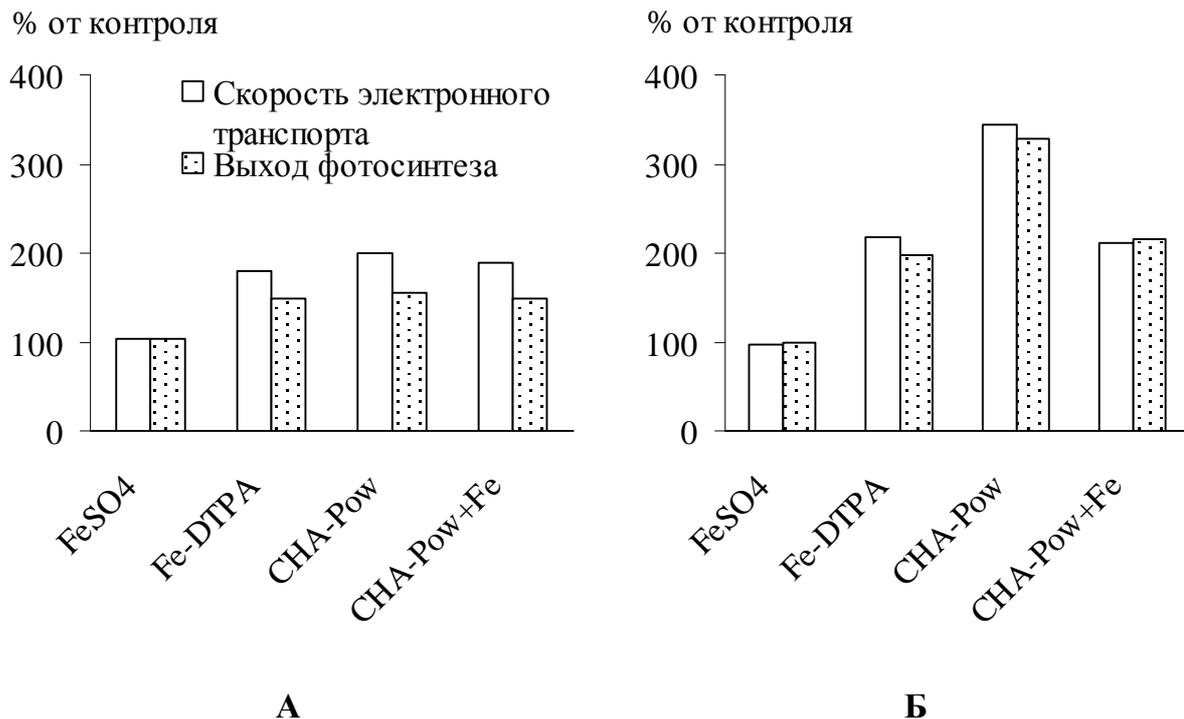


Рисунок 5.1. Влияние ГК угля СНА-Pow и железосодержащих препаратов на фотосинтез растений томатов (А) и пшеницы (Б) в условиях железодефицитного хлороза.

Как видно из результатов экспериментов, представленных на рис. 5.1, в выбранных условиях (высокое значение рН) внесение железа в виде простой соли не влияло на состояние растений, так как в данном случае происходило окисление железа и его переход из формы Fe(II) в Fe(III). Внесение железосодержащих препаратов в виде хелатов и смеси с ГК вызывало значимое увеличение интенсивности фотосинтеза растений. При этом в вариантах с внесением ГК угля наблюдали сравнимую, а в случае с растениями пшеницы – большую эффективность самих ГВ.

Исследованные препараты оказали также положительное влияние на длину и биомассу растений (табл. 5.1).

Таблица 5.1. Длина, вес и содержание хлорофилла в растениях томатов и пшеницы присутствии различных источников железа и ГК угля в условиях железодефицитного хлороза

Вариант	Вес	Длина	Содержание хлорофилла
	% от контроля (среда Хогланда без железа)		
Томаты (стратегия I)			
FeSO ₄	90±12	97±12	142±15
Fe(III)-ДТПА	4649±35	282±18	856±29
CHA-Pow	110±11	105±10	107±11
FeSO ₄ +CHA-Pow	4382±56	265±19	819±31
Пшеница (стратегия II)			
FeSO ₄	101±5	105±12	101±11
Fe(III)-ДТПА	172±12	146±12	200±11
CHA-Pow	121±15	138±12	154±12
FeSO ₄ +CHA-Pow	123±15	125±11	179±11

± – стандартное отклонение

При этом томаты оказались более чувствительными к внесению железосодержащих препаратов, чем пшеница: в присутствии продажного хелата Fe-ДТПА наблюдали увеличение биомассы томатов до более чем 4000% по сравнению с контролем, тогда как для пшеницы аналогичный показатель составлял около 170%. По-видимому, отмеченная различная эффективность препаратов в

отношении томатов и пшеницы обусловлена, в первую очередь, различной чувствительностью использованных культур к железodefицитному хлорозу. Полученные результаты хорошо согласуются с данными других исследователей [Vosanegra et al., 2004], которые также отмечали бóльшую отзывчивость растений со стратегией I, чем II, к внесению хелатов железа Fe-ЭДТА и Fe-ДТПА в условиях железodefицитного хлороза. Авторы объясняют установленную зависимость лучшей способностью растений со стратегией II транспортировать железо от источника к корневой поверхности.

Как и в случае использования в качестве тест-отклика параметров эффективности фотосинтеза, биомасса и длина растений, выращиваемых в присутствии FeSO₄, значимо не отличалась от контрольных растений, что связано с отсутствием доступного железа, окисляемого при высоких значениях pH до Fe(III).

Внесение в питательную среду ГК угля в концентрации 60 мг/л совместно с Fe в концентрации 24 мкМ в форме FeSO₄ также оказало значимое положительное влияние на длину, биомассу и содержание хлорофилла. При этом величина положительного эффекта была сопоставима с таковой, наблюдаемой в присутствии хелата Fe-ДТПА. Полученные результаты полностью соответствуют многочисленным работам, описывающим возможность усиленного поступления железа в растения в виде комплекса с ГВ [Chen et al., 1999; Nikolic et al., 2003; Vosanegra et al., 2004].

Интересно отметить, что внесение ГК без железа также оказало положительное влияние на накопление растениями биомассы, которая в случае с томатами составила (110±11)%, а в случае с пшеницей – (121±15)% от контроля. Принимая во внимание, что использованный в работе препарат ГК подвергали предварительному обессоливанию, обеспечивающему удаление обменного железа, можно предположить, что в случае железodefицитного хлороза растения были способны использовать эндогенное железо, входящее в состав ГК, что подтверждает гипотезу Фокина [Фокин, 1975] о наличии у растений механизмов получения железа из его органоминеральных комплексов с ГВ.

Полученные данные о влиянии ГВ на влияние растений в условиях железodefицитного стресса хорошо согласуется с известной повышенной способностью растений стратегии II (пшеница) по сравнению с растениями

стратегии I (томаты) поглощать железо из щелочных растворов [Битюцкий, 2005]. В пользу этого предположения свидетельствует также повышенное содержание хлорофилла в присутствии ГК в томатах и пшенице: $(107 \pm 11)\%$ и $(154 \pm 12)\%$ соответственно, что хорошо согласуется с данными, приводимыми в литературе [Visser, 1986; Rea & Pierandrei, 1994].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГК обладают защитным действием в условиях железодефицитного хлороза как по отношению к растениям стратегии I, так и II. При этом защитное действие ГК в условиях железодефицитного хлороза было более выражено по отношению к растениям со стратегией II (пшеница), чем I (томаты). По-видимому, это связано с тем, что в ГК железо содержится преимущественно в форме Fe(III), т.е. в форме, в которой происходит его усвоение растениями со стратегией II, но не I, в которые железо должно поступать в двухвалентной форме. Таким образом, полученные данные хорошо согласуются с концепцией Фокина, описанной выше.

Наконец, как видно из данных табл. 5.1, проведенные эксперименты позволили установить также положительное влияние ГК на фотосинтез растений: скорость электронного транспорта в присутствии ГК для растений томатов и пшеницы составляла $(200 \pm 11)\%$ и $(344 \pm 11)\%$, а выход фотосинтеза до $(154 \pm 12)\%$ и $(329 \pm 13)\%$, что значительно превышало наблюдаемый положительный эффект от внесения железосодержащих препаратов. Это позволяет сделать вывод о наличии другого механизма защитного действия ГК по отношению к растениям в условиях железодефицитного хлороза, чем поглощение растениями эндогенного железа из ГК.

Таким образом, нами было показано, что ГК оказывают защитное действие в условиях железодефицитного хлороза по отношению к растениям как со стратегией I, так и II; при этом последние, по-видимому, являются более отзывчивыми на внесение ГК. Полученные эксперименты позволяют высказать предположение о наличии другого, чем поглощение эндогенного железа, механизма защитного действия ГК.

5.3. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почвенной среде

5.3.1. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в перлите

Для изучения защитного действия ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почвенных условиях на первом этапе проводили эксперименты с использованием в качестве модельного инертного субстрата перлита. Это позволило исключить влияние других почвенных факторов, в частности, присутствующих в почве ГВ, на изучаемые процессы.

Так как эксперименты с водными культурами показали большую чувствительность растений со стратегией II, предварительные опыты по защитному действию ГВ в условиях железодефицитного хлороза проводили с растениями пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Лютесценс-33. Семена растений проращивали в дистиллированной воде в течение 3 дней, после чего проростки переносили в вегетационные сосуды с перлитом с предварительно внесённой питательной средой Хогланда без железа при pH 8. В вариантах с железом, железо вводили в концентрации 24 мкМ в виде сульфата железа FeSO₄, продажного хелата железа Fe(III)-ДТПА (комплекс железа с диэтилентриаминопентауксусной кислотой) или в виде совместного раствора ГВ с FeSO₄. Для исследования защитного действия самих ГВ в схему эксперимента также вводили вариант с ГВ в концентрации 60 мг/л. Продолжительность эксперимента составляла 30 дней.

Как показали проведённые эксперименты (табл. 5.2), в целом внесение исследуемых препаратов оказало положительное влияние на растения.

Таблица 5.2. Длина и вес и растений пшеницы присутствии различных источников железа и ГВ торфа и угля в условиях железodefицитного хлороза

Вариант	Вес	Длина
	% от контроля (среда Хогланда без железа)	
FeSO ₄	106±16	98±2
Fe(III)-ДТПА	126±8	99±4
PHF-Sk300	125±8	99±3
FeSO ₄ +PHF-Sk300	115±9	93±7
CHA-Pow	116±8	103±4
FeSO ₄ +CHA-Pow	119±8	102±3

± – стандартное отклонение

Как и в случае с водными культурами, положительного влияния сульфата железа(II) на растения не наблюдали. Однако, в отличие от предыдущих опытов, положительное влияние других препаратов было менее выражено. Так, длина растений для всех исследованных вариантов не отличалась от контроля, тогда как ранее наблюдали возрастание этого показателя до 125-136% по сравнению с контрольными значениями. Менее заметно было положительно действие и в отношении биомассы: для Fe-ДТПА этот показатель снизился со 172% до 126%. Для CHA-Pow снижение эффективности действия было менее заметно и составило около 10%. Поэтому для проведения дальнейших экспериментов концентрацию вводимого в питательную среду железа увеличили до 100 и 200 мкМ, а ГВ – до 120 мг/л. Остальная техника проведения экспериментов была аналогичной описанной выше. В качестве растений со стратегией I использовали томаты *Lycopersicon esculentum* Mill. сорта Баллада.

Результаты проведённых экспериментов показали, что более выраженные эффекты железосодержащих препаратов были отмечены только при концентрации железа 200 мкМ. Поэтому далее в работе обсуждаются данные, полученные при указанной концентрации (табл. 5.3).

Таблица 5.3. Длина, вес и содержание хлорофилла в растениях томатов и пшеницы присутствии различных источников железа и ГК угля в условиях железodefицитного хлороза на перлите

Вариант	Вес	Длина	Содержание хлорофилла
	% от контроля (среда Хогланда без железа)		
Томаты (стратегия I)			
FeSO ₄	111±6	103±2	113±9
Fe(III)-ДТПА	92±5	104±4	79±15
CHA-Pow	104±3	107±3	106±2
FeSO ₄ +CHA-Pow	114±3	110±3	102±4
Пшеница (стратегия II)			
FeSO ₄	101±2	101±2	–
Fe(III)-ДТПА	117±7	113±4	–
CHA-Pow	109±7	106±3	–
FeSO ₄ +CHA-Pow	110±4	108±4	–

± – стандартное отклонение

Эксперименты на перлите показали, что повышение концентрации железа в среде не привело к возрастанию положительного эффекта вносимых препаратов. Это свидетельствует о том, что процессы поглощения железа в виде хелатов из твёрдого субстрата в значительной степени затруднены по сравнению с растворами.

Как и в случае проведения экспериментов с водными культурами, растения пшеницы оказались более отзывчивыми к внесению исследованных препаратов, однако их эффективность на перлите была значительно ниже. Так, положительный эффект от хелата железа Fe-ДТПА на накопление растениями биомассы в условиях водных культур составил (172±12)%, а на перлите – (117±7)% от контроля. В случае ГК аналогичный показатель снизился с (121±15)% до (110±4)%. Для растений томатов снижение эффективности использованных препаратов было ещё более ярко выражено.

Таким образом, на основании проведённых экспериментов можно сделать вывод о том, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях железодефицитного хлороза на водных культурах значительно более выражено, чем на перлите. Наблюдаемые эффекты объясняются, по-видимому, меньшим поглощением ГВ и исследованных железосодержащих препаратов в условиях твёрдого субстрата. Особо следует подчеркнуть, что в экспериментах в качестве субстрата использовали инертный наполнитель, не обладающий какой-либо специфической связывающей способностью по отношению к исследованным препаратам. Поэтому можно предположить, что в почвенных условиях защитное действие ГВ и железосодержащих препаратов будет ещё менее выражено.

5.3.2. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почве

Для оценки защитного действия ГВ в условиях железодефицитного хлороза нами были проведены почвенные лабораторно-вегетационные эксперименты на серозёме – почве, характеризующейся высоким значением рН и, вследствие этого, незначительным содержанием доступного для растений железа. В качестве тест-растений использовали томаты сорта Баллада. Доза внесения железосодержащих препаратов составляла 20 мМ железа на 1 кг почвы.

Семена томатов проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение 10 дней, после чего проростки высаживали в пластиковые вегетационные сосуды, заполненные серозёмом (рН 7.6, содержание органического углерода 26 г/гк почвы, средний суглинок) с предварительно внесённым в него CaCO_3 для создания условий карбонатного хлороза в дозе 160 г/кг и железосодержащими препаратами (20 мМ Fe/кг почвы) и ГК угля СНА-Pow (40 мг/кг почвы). Выбор концентрации вносимого железа был основан на концентрациях, рекомендуемых для синтетических хелатов, а соотношение ГК : железо рассчитывали исходя из содержания фенольных групп в ГК, т.к. при выбранных нами значениях рН эти группы (а не сумма карбоксильных и фенольных групп) предположительно были доступны для связывания железа. Продолжительность эксперимента составляла 40 дней.

Полученные результаты (табл. 5.4) продемонстрировали отсутствие статистически значимого защитного действия использованных препаратов в выбранных условиях.

Таблица 5.4. Длина, вес и содержание хлорофилла в растениях томатов в присутствии различных источников железа и ГК угля в условиях железодефицитного хлороза на почве

Вариант	Вес	Длина	Содержание хлорофилла
Томаты (стратегия I)			
FeSO ₄	89±12	100±3	103±2
Fe(III)-ДТПА	104±4	103±5	116±3
СНА-Pow	105±5	101±4	109±5
FeSO ₄ +СНА-Pow	101±4	105±4	102±2

± – стандартное отклонение

Из всех исследованных препаратов только синтетический хелат железа обладал выраженным положительным действием по отношению к томатам: в его присутствии было зафиксировано значимое увеличение содержания хлорофилла на 16% по сравнению с контрольными растениями. При этом положительного влияния Fe-ДТПА на накопление растениями биомассы или рост отмечено не было. По-видимому, это связано с тем, что в выбранных условиях явление хлороза было слабо выражено. Так, отношение хлорофиллов *a/b* было достаточно высоким и составило 1.32, тогда как в условиях водных культур, когда наблюдали выраженный хлороз, этот показатель был равен 0.59.

С другой стороны, отсутствие выраженного положительного влияния вносимых ГВ по отношению к растениям в почвенных условиях можно объяснить присутствием в самой почве их значительного количества. Содержание органического углерода в использованной почве составляло 2.6%, что в пересчёте на содержание гумуса путём умножения на коэффициент 1.724 [Орлов, Гришина, 1981] составит 4.5%. При внесении ГК в дозе 40 мг/кг почвы увеличение содержания ГВ в почве составило менее 0.1%. Это свидетельствует о том, что

возможный положительный эффект ГК нивелировался на фоне действия ГВ, изначально присутствовавших в почве.

Таким образом, эксперименты показали выраженное защитное действие ГВ и их комплексов с железом в условиях железодефицитного хлороза в водных средах. В почвенных средах величина положительного действия ГВ снижается, что связано, по-видимому, с меньшим поглощением ГВ в условиях твёрдого субстрата.

Глава 6. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита, солевого стресса и неблагоприятных температур

6.1. ГВ как универсальные адаптогены в условиях физико-химических стрессов

В настоящее время существует огромное количество экспериментального материала, свидетельствующего о проявлении гуминовыми веществами адаптогенных свойств по отношению к растениям, находящимся в условиях разнообразных абиотических физико-химических стрессов: неблагоприятных значениях кислотности среды, повышенных и пониженных температурах, засухе, переувлажнении, избыточном или недостаточном минеральном питании и др. [Горовая и др., 1995; Kulikova et al., 2005; Попов, 2004; Wu, 2004; Vocanegra et al., 2006; Zhang, 2006].

Показано, что при повышенном содержании в почве минеральных удобрений NPK гуминовые препараты положительно влияют на адаптацию растений к сложившейся ситуации. ГВ нивелируют токсическое действие удобрений, нормализуя поступления азота и магния, при этом практически не влияя на поступление фосфора [Христева, 1973]. Установлено также, что при токсическом загрязнении почвы азотом натриевые соли ГК улучшают поглощение минеральных элементов питания, чем способствуют повышению устойчивости растений к отравлению [Христева, 1962].

Козюкиной [1983] было показано, что при загрязнении атмосферы соединениями серы и фенола, ГК оказывают положительное действие на состояние фотосинтетического аппарата растений и предотвращают поглощение из атмосферы этих токсикантов. При этом наблюдается снижение повреждения листьев, нормализуется соотношение пигментов, интенсифицируется рост побегов [Козюкина, 1983].

Адаптационное действие ГВ в случае неблагоприятных значений pH также было продемонстрировано в ряде работ [Петербургский, 1981; Христева, 1962].

Авторами было установлено, что ГК значительно стимулировали рост растений как при низких (4), так и при высоких (7.5) значениях рН. При этом стимулирующая активность ГК при оптимальной кислотности среды было выражено очень слабо.

Влияние ГВ на способность растений противостоять пониженным или повышенным температурам было отмечено рядом исследователей. Жанг с соавторами [Zhang et al., 2003] показали, что растения мятлика *Poa pratensis* L., подвергавшиеся высокотемпературному (37°C) шоку в течение 72 или 96 ч, быстрее восстанавливали свою фотосинтетическую активность и корневую активность, если их обрабатывали раствором ГК. Аналогичные результаты были получены [Dunstone et al., 1988], продемонстрировавшим положительное действие растворов ГК на растения пшеницы в условиях повышенных температур и засухи.

Повышение устойчивости растений в присутствии ГВ в условиях осмотического и солевого стрессов, создаваемых присутствием солей в высоких концентрациях (CaCl_2 , NaCl и MgSO_4) и гиперосмотических растворов (полиэтиленгликоли, сорбит и др.) также привлекает все большее внимание ученых. Установлено, что ГК при определенных концентрациях снимают токсическое действие засоления, задерживающего нормальный рост и развитие растений [Hernando, 1968]. При этом существующие данные указывают на то, что обнаруженные адаптогенные свойства ГВ проявляются не только в лабораторных, но и в полевых условиях. Так, Жангом [Zhang, 1993; Zhang, 2006] было показано, что внекорневые подкормки овсяницы *Festuca arundinaceae* Schreb., мятлика *Poa pratensis* L. и полевицы *Agrostis palustris* Huds. 25% растворами ГК в концентрациях 16-48 л/га способны восстанавливать водный статус, нормальный рост и развитие корней и побегов растений, находящихся в условиях недостаточной (-0.5 МПа) или избыточной (-0.03 МПа) влажности. В работе [Zhang & Ervin, 2004] приводятся данные о повышении засухоустойчивости полевицы *A. palustris* в присутствии ГВ. Авторами было зафиксировано положительное действие ГВ в условиях засухи на накопление растениями подземной и наземной биомассы и содержание в листьях антиоксиданта α -токоферола.

В полевых опытах с кукурузой [Li et al., 2003] было установлено, что внекорневые подкормки кукурузы в условиях засухи раствором ГК в концентрации 1.5 г/л способствуют увеличению скорости фотосинтеза и снижению

транспирации и повышению нитрат редуктазной активности растений, что, в свою очередь, приводит к росту урожайности на 30%.

Таким образом, в настоящее время общепризнано, что ГВ проявляют адаптогенные свойства по отношению к растениям. Однако, в отличие от детоксифицирующих свойств ГВ, обусловленных их связыванием с токсикантами, до сих пор остается нерешенным вопрос о природе действия ГВ в случаях, когда химического взаимодействия с токсикантом не происходит, т.е. при абиотических физико-химических стрессах, вызываемых неблагоприятными для жизнедеятельности растений условиями кислотности, температуры, освещения и т.п.

6.2. Природа защитного действия ГВ в условиях физико-химических стрессов

Христовой (1973) была высказана гипотеза, что «физиологически активные гуминовые вещества повышают сопротивляемость растений не к каким-то определенным факторам внешней среды, а поднимают их общую резистентность. Или другими словами – физиологически активные гуминовые вещества повышают общую неспецифическую сопротивляемость организма». Основой такого представления послужили экспериментальные данные о том, что стимулирующее действие гуминовых веществ на жизнедеятельность растений эффективнее проявляется в экстремальных условиях. В дальнейшем были опубликованы многочисленные работы, подтверждающие эту гипотезу [Христева и др., 1974; Христева, 1977; Ткаченко и др., 1977, Dunstone et al., 1988; David et al., 1994]. Разрабатывая свою гипотезу, Христева (1973) отмечает, что действие ГВ должно быть направлено на нормализацию и стимуляцию тех же ведущих процессов метаболизма, которые тормозятся или блокируются ингибирующими факторами среды. На основании многочисленных экспериментов Христева приходит к выводу, что под воздействием ГВ растительный организм приобретает повышенную способность к репарационным процессам на уровне клетки, чем и объясняется повышение неспецифической резистентности растений в целом. Известно, что угнетение роста растений в целом (торможение белкового синтеза, увеличение концентрации фитогормонов ингибирующего характера, подавление

деления и растяжения клеток) является следствием первичных нарушений при стрессе, среди которых одним из важнейших является изменения в биоэнергетических процессах [Удовенко, 1979]. Основываясь на способности ГВ участвовать в окислительно-восстановительных реакциях [Бобырь и Епишина, 1975; Епишина и Бобырь, 1979], Бобырь (1980) высказал предположение, что ГВ, «шунтируя» различные участки цепи переноса электронов в электрон-транспортных цепях хлоропластов или митохондрий, могут оказывать влияние на биоэнергетические процессы. Так как окислительно-восстановительный потенциал ГВ изменяется при изменении рН среды, они могут включаться в транспорт электронов на различных участках цепи. При блокировании (в условиях экстремальных воздействий) различных участков электрон-транспортной цепи ГВ их шунтируют и в какой-то мере снимают вызванное экстремальным воздействием ингибирование энергетических процессов.

Несмотря на кажущуюся перспективность высказанной гипотезы, её экспериментальных подтверждений на настоящий момент не существует. Кроме того, следует принимать во внимание, что регистрируемые в присутствии биологически активных веществ изменения параметров основных окислительно-восстановительных процессов растительного организма – фотосинтеза и дыхания – часто отражают вторичные процессы, а не первичный сайт действия вещества. Именно поэтому столь широкое распространение получили методы биотестирования, основанные на мониторинге фотосинтеза и дыхания растений. Наконец, данная гипотеза подразумевает поступление ГВ в растения в целом и в клетки в частности в неизменном виде, с одной стороны, и наличие в ГВ высокоспецифичных веществ, способных встраиваться в специализированные электрон-транспортные цепи растений – с другой.

Таким образом, в настоящее время отсутствует гипотеза о механизме защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов. Для её разработки необходимо проведение комплексных исследований, направленных на выявление общих черт защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов различной природы. Поэтому следующим этапом нашей работы стало изучение в условиях температурного, солевого и водного стрессов.

Для проведения экспериментов по изучению защитных свойств ГВ в условиях температурного, солевого и водного стрессов в нашей работе были использованы препараты природных ГК, ГМК и ФК, выделенных из почв, торфов и углей. Биотестирование по методу проростков проводили с использованием в качестве тест-организмов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

6.3. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита

6.3.1. Природа водного дефицита у растений

Растения испытывают водный дефицит, когда скорость транспирации превосходит скорость поглощения воды корневой системой. Снижение содержания воды в клетках при водном дефиците и сопутствующее обезвоживанию увеличение концентрации ионов в цитоплазме вызывают различного рода нарушения в структуре и функциях биополимеров: происходит денатурация белков и подавляется их ферментативная активность, изменяется структура липидного бислоя мембран и нарушается их целостность. На клеточном уровне водный дефицит выражается в потере тургора, а на уровне целого растения – в обращении градиента водного потенциала в системе почва – корень – побег и ингибировании роста [Физиология растений, 2005].

Водный дефицит, как и другие стрессы, приводит также к сверхпродукции активных форм кислорода (АФК) [Полеская, 2007]. В частности, в условиях водного стресса происходит закрытие устьиц и ограничение фиксации CO₂. Это способствует генерации ¹O₂ в антенных фотосинтетических комплексах и генерации O₂^{•-} в электрон-транспортной цепи. Вследствие обусловленных АФК повреждений нарушается работа фотосинтетического аппарата, разрушается хлорофилл. Развитие окислительного стресса сопровождается накоплением перекиси в хлоропластах, пероксисомах, митохондриях, а затем в целом по клетке [Alonso et al., 2001; Fu & Huang, 2001].

6.3.2. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита

Для создания водного стресса использовали раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 Д (ПЭГ 6000), являющегося гиперосмотическим раствором. Маточный раствор имел концентрацию 200 г/л, рН раствора 5.5. Выбор рабочей концентрации ПЭГ 6000 проводили на основании предварительно

проведенных экспериментов по установлению диапазонов его токсичности (рис. 6.1).

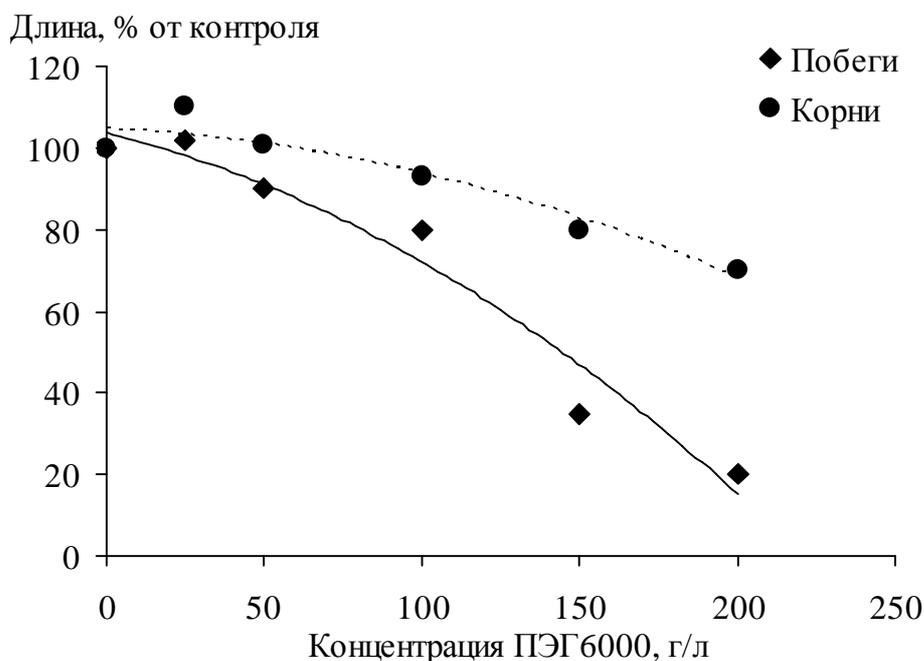


Рисунок 6.1. Влияние ПЭГ 6000 на длину корней и побегов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Как показали результаты, среди использованных показателей более чувствительной оказалась длина корней проростков, которую в дальнейшем использовали в качестве тест-отклика. В качестве рабочей была выбрана концентрация ПЭГ 6000 100 г/л, вызывающая 20% снижение величины тест-отклика. Значительного снижения длины корней побегов отмечено не было (93% от контроля).

Далее оценку защитного действия ГВ проводили при постоянной концентрации ПЭГ 6000 (100 г/л) и различных концентрациях ГВ в диапазоне 5-100 мг/л. Для оценки собственной физиологической активности гуминовых препаратов параллельно проводили также тестирование ГВ в тех же концентрациях, но без добавления ПЭГ 6000.

Результаты проведенных экспериментов приведены на рис. 6.2.

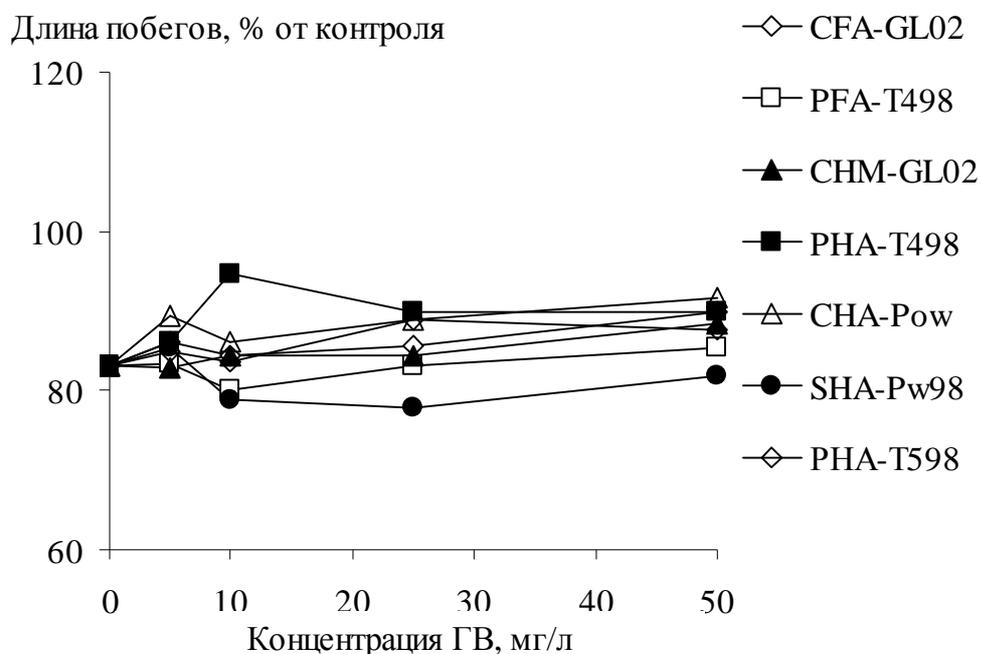


Рисунок 6.2. Влияние ГВ на длину побегов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии ПЭГ 6000 в концентрации 100 г/л.

Как видно из рис. 6.2, внесение препаратов ГВ способствовало адаптации растений к недостатку воды. При концентрациях 5-10 мг/л было отмечено значимое увеличение длины побегов проростков, которое затем снижалось до контрольных величин.

Величина наблюдаемого эффекта значительно зависела от использованного препарата ГВ. Максимальное благоприятное действие было отмечено для торфяных препаратов ГК и ФК торфа, которые характеризовались минимальными молекулярными массами и содержанием карбоксильных и сложноэфирных групп. Наименьшие эффекты были зарегистрированы для ГК угля. При этом следует отметить, что ни для одного из исследованных препаратов не было отмечено полное снятие негативного действия ПЭГ 6000 на растения.

В ходе проведения экспериментов нами был отмечен интересный факт: несмотря на относительно небольшое влияние ГВ на длину побегов проростков в присутствии ПЭГ 6000, было зафиксировано выраженное стимулирующее действие гуминовых препаратов на корни растений пшеницы в этих условиях (рис. 6.3).

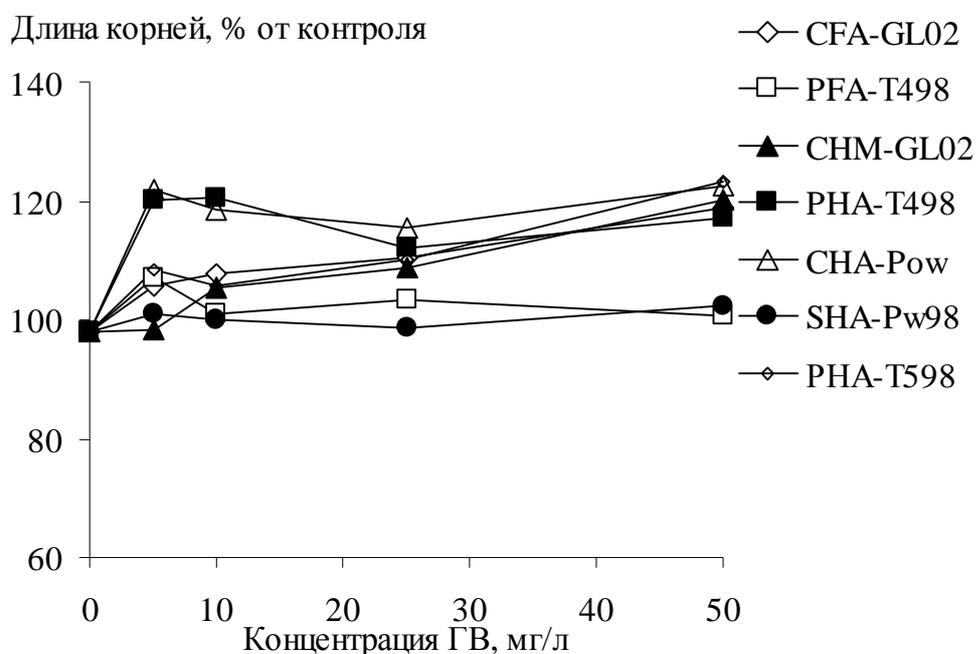


Рисунок 6.3. Влияние ГВ на длину корней проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии ПЭГ 6000 в концентрации 100 г/л.

Как видно из представленного рисунка, положительное действие гуминовых препаратов было отмечено уже при их концентрации 5-10 мг/л. При дальнейшем увеличении концентрации ГВ почти во всех случаях наблюдали либо рост, либо стабилизацию наблюдаемого положительного действия гуминовых препаратов. Исключение составили препараты ГК торфа и ГК угля, для которых не было зарегистрировано значительного положительного эффекта на рост корней в присутствии ПЭГ 6000 во всем диапазоне исследованных концентраций. Величины максимального наблюдаемого эффекта для всех исследованных препаратов приведены в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Влияние ГВ различного происхождения на длину корней проростков пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. в присутствии ПЭГ 6000 в концентрации 100 мг/л

Препарат	Максимальный наблюдаемый эффект, % от контроля
РНА-Т598	102±3
СНМ-GL02	120±4
РНА-Т498	122±3
СНА-Pow	107±4
ША-Pw98	123±3
СФА-GL02	119±4
РФА-Т498	120±3

± – стандартное отклонение

Как показывают данные, приведенные в табл. 6.1, способность ГВ стимулировать рост корней проростков пшеницы значительно возросла в условиях, когда растения находились в условиях водного стресса, вызванного присутствием ПЭГ 6000. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами других исследователей, также отмечавших увеличение физиологической активности ГВ в стрессовых условиях [Христева и др., 1974; Христева, 1977; Ткаченко и др., 1977, Dunstone et al., 1988, David et al., 1994, Горовая и др., 1995, Zhang et al., 2003].

6.3.3. Сопоставление физико-химических характеристик и проявляемого защитного действия ГВ в условиях водного дефицита

Сопоставлением максимальных наблюдаемых эффектов от внесения ГВ (табл. 6.1) и их физико-химических характеристик показало, что существует положительная корреляционная взаимосвязь между защитным действием ГВ и содержанием в них ацетальных фрагментов ОСО (рис. 6.4).

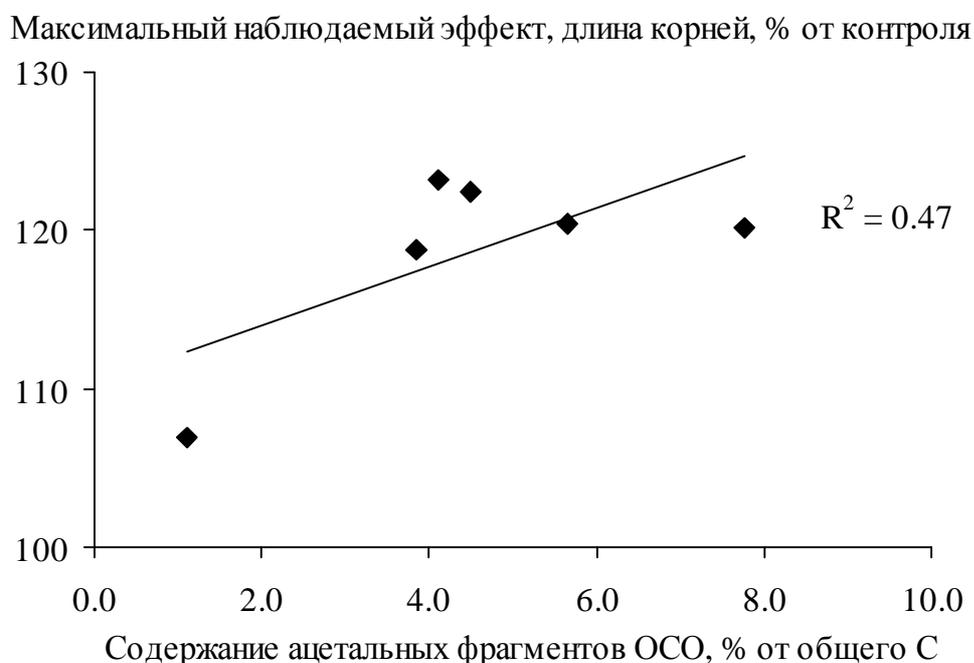


Рисунок 6.4. Зависимость максимальных наблюдаемых эффектов препаратов ГВ в присутствии ПЭГ 6000 от содержания ацетальных фрагментов ОСО.

Как видно из рис. 6.4, несмотря на рост физиологической активности ГВ с увеличением содержания в них ацетальных фрагментов, линейной зависимости в данном случае не наблюдается. Напротив, исследованные препараты можно разделить на две группы: препараты с содержанием ОСО-фрагментов менее 3%, характеризующиеся небольшой физиологической активностью, и препараты с содержанием ОСО-фрагментов более 3%, обладающие высоким стимулирующим действием на корни проростков пшеницы.

Поэтому нами также была исследована взаимосвязь между наблюдаемым положительным действием ГВ и параметром *FI*, предложенным Бутаевым с сотр. [Бутаев и др., 2005] и характеризующим в ГВ отношение количества активных функциональных групп и $S_{\text{АКГО}}$ фрагментов к общей ароматической составляющей. Согласно результатам, полученным этими авторами, именно этот показатель определяет физиологическую активность ГВ.

Результаты проведенного анализа представлены на рис. 6.5.

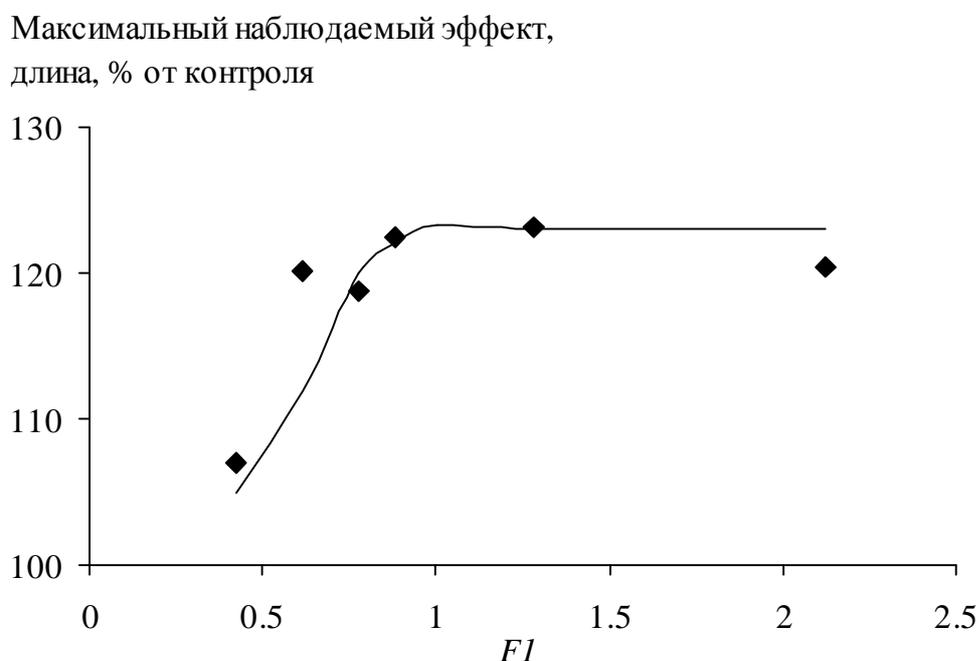


Рисунок 6.5. Зависимость максимальных наблюдаемых эффектов препаратов ГВ в присутствии ПЭГ 6000 от параметра $F1$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что с увеличением $F1$ возрастает также физиологическая активность исследованных препаратов ГВ. Таким образом, то на основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что адаптогенная активность ГВ в условиях водного стресса в значительной степени определяется относительным содержанием кислородсодержащих функциональных групп в ароматической составляющей ГВ. Следует подчеркнуть, что наблюдаемая зависимость не является линейной (рис. 6.5). При увеличении этого показателя до 1 наблюдается рост адаптогенной активности ГВ, который затем сменяется ее стабилизацией.

Принимая во внимание тот факт, что наблюдаемый положительный эффект от внесения ГВ не может быть обусловлен связыванием препаратов с ПЭГ (все эти вещества представляют собой отрицательно заряженные полиэлектролиты), можно предположить, что ГВ обладают способностью снижать осмотический стресс благодаря непосредственному влиянию на растения.

В настоящее время известно, что снижение содержания воды в клетках при водном дефиците вызывает различного рода нарушения в структуре и функциях биополимеров, в частности, происходит денатурация белков и подавляется их ферментативная активность, изменяется структура липидного бислоя мембран и нарушается их целостность [Физиология растений, 2005]. Для поддержания

необходимого тургора растениями выработано несколько механизмов защиты, включая синтез осмолитов (пролина, глицин-бетаина, маннитола, пиннитола, полиаминов спермидина и спермина), Lea-белков, шаперонов, протеаз и убиквитинов. Однако индукция синтеза этих веществ является высокоспецифичным процессом, а прямых доказательств влияния ГВ на белоксинтезирующую систему растений в настоящее время не существует [Горовая и др. 1995]. Поэтому мы полагаем, что природа защитного действия ГВ в условиях водного дефицита определяется, скорее всего, их влиянием на целостность мембранных структур. Однако для подтверждения высказанного предположения необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на изучение мембранотропных свойств ГВ.

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что ГВ способны частично снижать осмотический стресс проростков пшеницы, вызываемый внесением ПЭГ6000; при этом величина наблюдаемого защитного действия зависит от содержания в ГВ кислородсодержащих функциональных групп.

6.4. Защитное действие ГВ в условиях солевого стресса

6.4.1. Природа солевого стресса у растений

Согласно современным оценкам, одна пятнадцатая часть земной суши, включая территории, используемые в сельскохозяйственном производстве, занята засоленными почвами. Приблизительно 5% земель мировых сельскохозяйственных угодий и почти 20% орошаемых земель в той или иной степени засолены [Физиология растений, 2005]. Подавляющее большинство сельскохозяйственных культур относится к гликофитам, т.е. растениям, сформировавшимся и растущим на незасоленных почвах. При повышенном содержании солей в почве у них нарушается водный и ионный гомеостаз как на клеточном уровне, так и на уровне целого растения. Это ведёт к различным токсическим эффектам, которые выражаются в повреждении биополимеров цитоплазмы, что, в свою очередь, приводит к затормаживанию роста и может вызвать гибель растений.

Главными повреждающими факторами при солевом стрессе в настоящее время считаются осмотическое и токсическое действие солей [Физиология растений, 2005; Chinnusamy et al., 2005]. При этом природа токсического действия

ионов, особенно первичных молекулярных повреждений, изучена мало. Известно, что ионы в высоких концентрациях могут дезинтегрировать клеточные мембраны, подавлять активность ферментов и приводить к нарушениям таких функций как клеточное деление, ассимиляция углерода, поглощение элементов минерального питания и др. [Физиология растений, 2005; Tunçturk et al., 2008]. Так, повышенная концентрация NaCl (более 0.1 М для гликофитов) приводит к угнетению в растениях протеинфосфатазы Hal2 (отвечает за превращение 3'-фосфоаденозин-5'-фосфата ФАФ в аденозинмонофосфат АМФ) и рибонуклеазы MRP (катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей между нуклеозидами в одноцепочечных РНК). Кроме того, при засолении, как и про остальных абиотических стрессах, в клетках растений возрастает концентрация активных форм кислорода (АФК): синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, супероксид анион радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$, перекиси водорода H_2O_2 и гидроксилрадикала HO^\bullet [Tester & Davenport, 2003].

6.4.2. Защитное действие природных и модифицированных ГВ в условиях солевого стресса

Изучение защитного действия ГВ в условиях солевого стресса проводили методом биотестирования с использованием проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. Семена проращивали в растворах испытуемых ГВ с концентрацией 5, 10, 25 и 50 мг/л в течение 72 ч при температуре 24°C, после чего измеряли длину корней и побегов, а проростки помещали в вегетационные сосуды со средой Кноппа (контроль) или средой Кноппа в 0.15 М NaCl (солевой стресс) на 96 ч. По окончании эксперимента проводили учёт длин корней и побегов и рассчитывали их прирост. В качестве дополнительного тест-отклика использовали сырую биомассу проростков.

Результаты экспериментов показали, что в присутствии хлорида натрия наблюдается выраженное угнетение роста проростков пшеницы: длина корней и побегов проростков составляла $(35\pm 5)\%$ и $(86\pm 7)\%$ от контрольных значений соответственно. Внесение в среду ГВ приводило к частичному снятию солевого стресса у проростков пшеницы: длины корней и побегов возрастали до $(40\pm 4)\%$ и $(90\pm 6)\%$. Полученные результаты согласуются с данными [Demir et al., 1999;

Zhang, 2006; Ervin & Zhang, 2007], также наблюдавшими положительное действие ГВ на растения в условиях солевого стресса.

Для усиления защитных свойств ГВ по отношению к растениям в условиях солевого стресса нами были получены модифицированные кремнием ГК на основе ГК угля СНА-Pow (см. п. 1.3.5 и табл. 1.6). Выбор кремния в качестве модифицирующего агента был обусловлен тем, что по современным представлениям кремний способствует адаптации растений как к абиотическим, так и биотическим стрессам, что привело к введению силикатов в качестве добавок к ряду удобрений [Currie, Perry, 2007; Liang et al., 2007]. В частности, показано, что поглощение натрия по апопластному пути в значительной степени определяется отложениями кремния в клеточных стенках [Yeo et al., 1999; Tester & Davenport, 2003; Zhu, 2003; Wang & Han, 2007]. Можно предположить, что обогащение ГВ кремнием должно привести к усилению их защитных свойств.

Силилированные производные были Л.А. Карпюком – аспирантом лаборатории ФОХ химического факультета МГУ. Производные синтезировали согласно [Karpouk et al., 2007] путём обработки гуминовых кислот леонардита, выделенных из гумата калия Powhumus (Humintech, ФРГ), 3-аминопропилтриметоксисиланом (АПТС). Всего было получено 5 производных с содержанием кремния 2.6-11.3%.

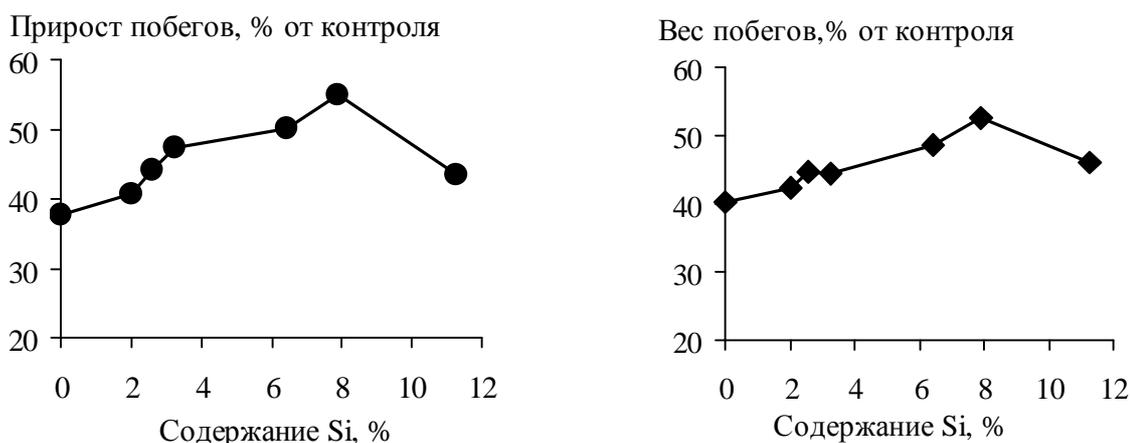


Рисунок 6.6. Влияние ГВ и их силилированных производных с различным содержанием кремния на прирост корней и сырую биомассу побегов пшеницы.

Результаты биотестирования показали, что растения пшеницы, пророщенные в растворах испытуемых ГВ, обладали большей устойчивостью к солевому стрессу, чем контрольные. При этом было установлено, что защитное действие ГВ

возрастает с увеличением содержания в них кремния до 8%, а затем – снижается (рис. 6.6).

Таким образом, проведённые эксперименты показали перспективность дальнейшего исследования силилированных препаратов ГВ в качестве биоактиваторов в условиях солевого стресса.

6.5. Защитное действие ГВ в условиях температурного стресса

6.5.1. Природа температурного стресса у растений

Температурные сдвиги вызывают изменения структуры биополимеров, а, следовательно, и скоростей биохимических реакций и физиологических процессов [Физиология растений, 2005]. Кроме того, при неблагоприятных температурах, как и при других стрессовых состояниях, у растений наблюдается повышение содержания АФК [Полесская, 2007]. Например, при понижении температуры до +4...+5°C наблюдается накопление перекиси в митохондриях и хлоропластах [Aroca et al., 2001].

Компенсация температурных эффектов в растении может происходить несколькими путями [Физиология растений, 2005]:

- за счёт изменения свойств ферментов или их концентрации;
- путём синтеза белков теплового шока (БТШ), способствующих восстановлению нарушенной при тепловом воздействии структуры белков;
- модификацией липидного слоя мембран.

6.5.2. Защитное действие природных и модифицированных ГВ в условиях температурного стресса

Исследование защитного действия ГВ в условиях температурного стресса проводили с биотестированием по методу проростков. В качестве тест-культуры использовали проростки пшеницы *Triticum aestivum* L. Для создания температурного стресса чашки Петри с испытуемыми растворами помещали для прорастания в термостат при температуре 30°C (высокотемпературный стресс) или в холодильник при температуре 4°C (низкотемпературный стресс) на 72 ч. В качестве контрольных использовали проростки, выращенные в течение 72 ч в

термостате при 24°C. Было установлено, что как при высоко-, так и при низкотемпературном стрессе величины длин побегов и корней проростков снижаются по сравнению с контрольным вариантом (рис. 6.7).

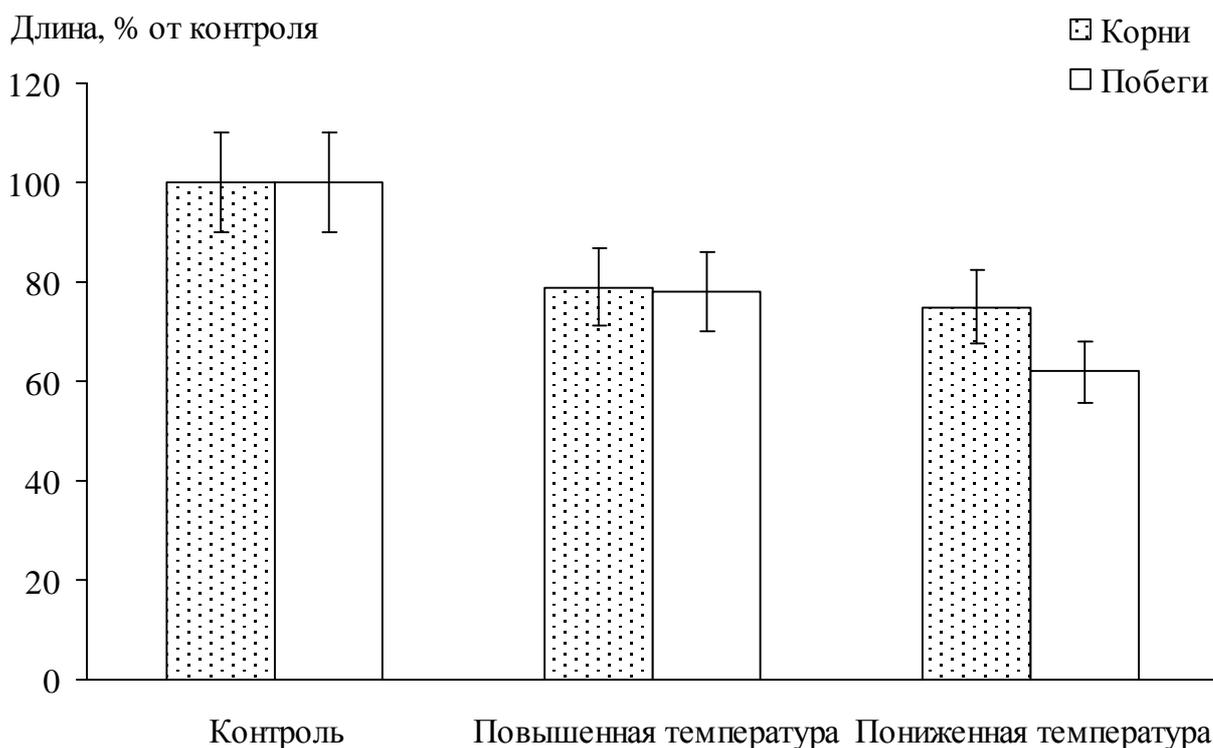


Рисунок 6.7. Влияние высоко- и низкотемпературного стрессов на длину корней и побегов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

При этом побеги оказались более чувствительны к температурному стрессу: при пониженной температуре наблюдали снижение их длины на 22%, а при повышенной – на 38% по сравнению с контрольными проростками. В случае корней влияние температуры было менее выражено: при её повышении величины длин корней снижались на 25%, а при понижении – на 20% по сравнению с контролем.

Исследование защитного действия ГВ в условиях повышенной и пониженной температуры проводили с использованием препаратов ГК угля СНА-Row и ИнуК-USA и ФК торфа PFA-T798 и сапротеля BFA-Sk01. Концентрацию ГВ варьировали от 5 до 200 мг/л. Зависимость адаптогенного действия ГВ от их концентрации приведена на рис. 6.8.

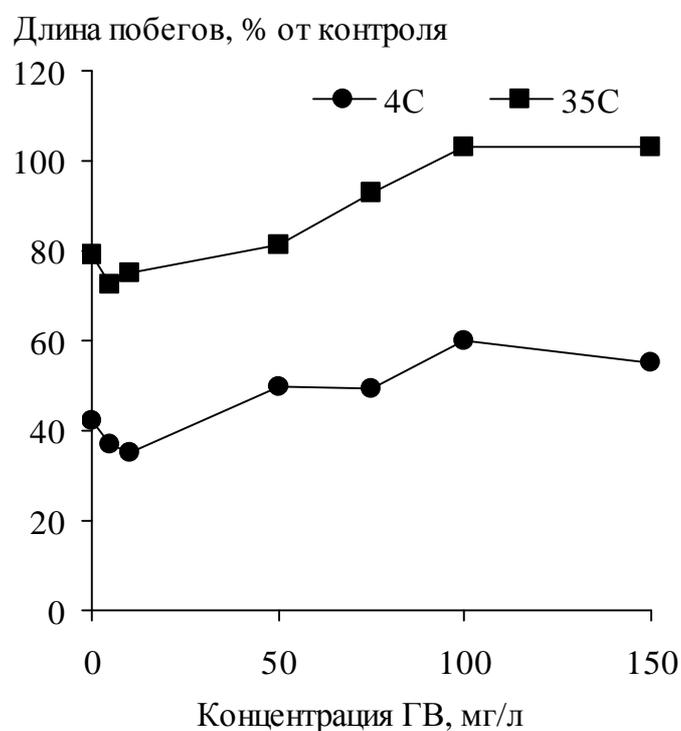
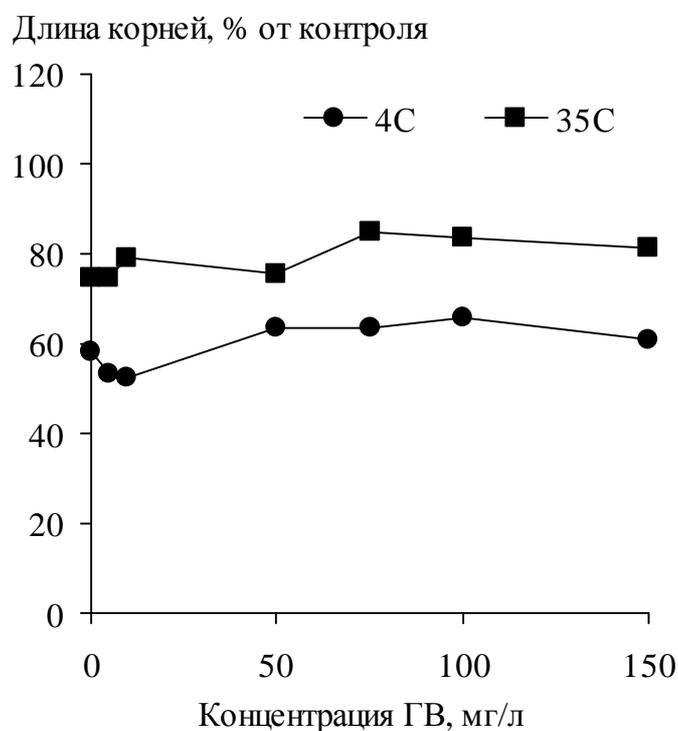


Рисунок 6.8. Влияние ГК угля СНА-Pow в условиях высоко- и низкотемпературного стрессов на длину корней и побегов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Как видно из рис. 6.8, наиболее выраженное действие ГВ в условиях температурного стресса наблюдали при концентрации 100 мг/л. Поэтому сравнение защитного действия всех исследованных препаратов проводили при указанной концентрации (рис. 6.9).

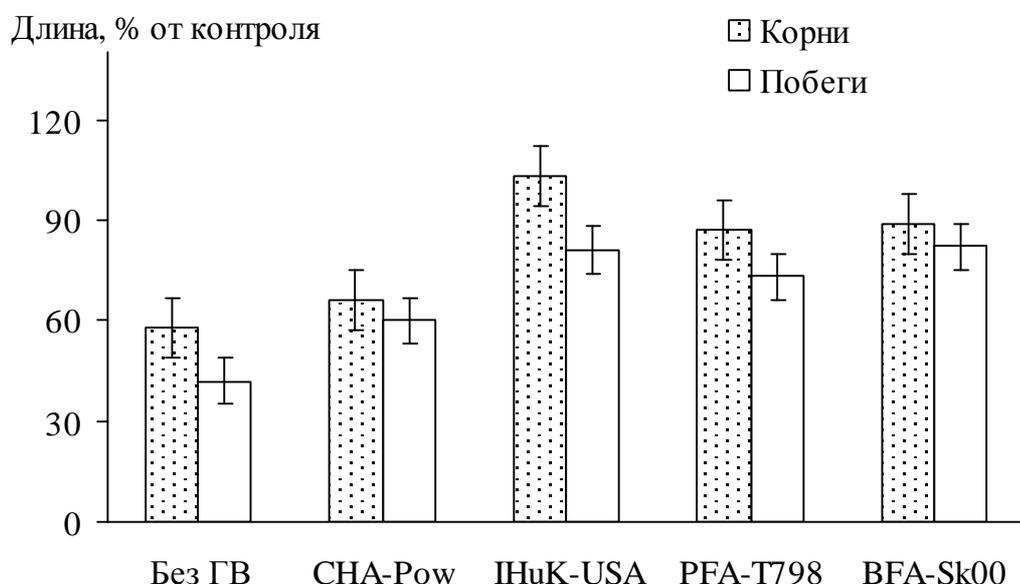
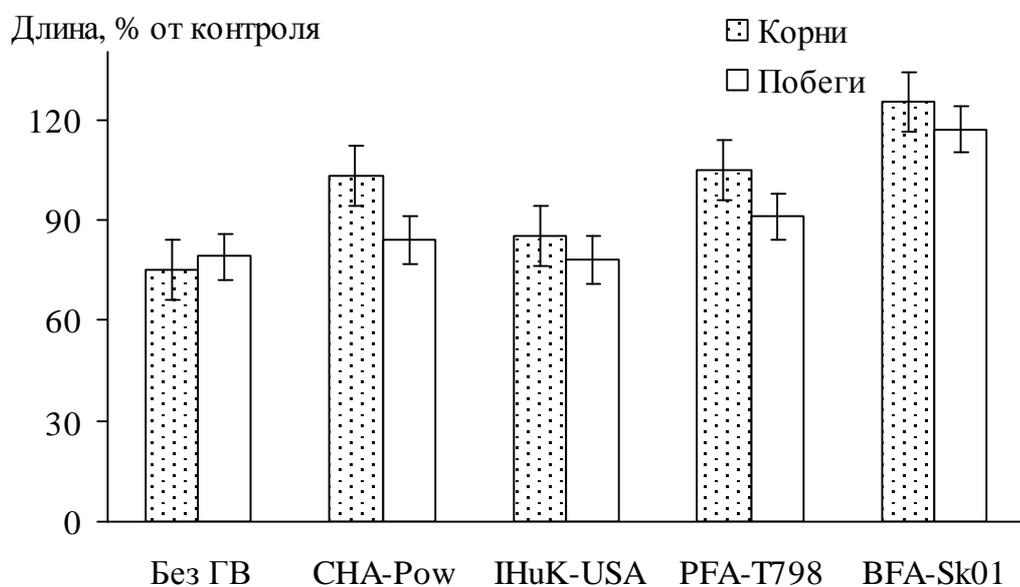


Рисунок 6.9. Защитное действие ГВ различного происхождения по отношению к проросткам мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях высоко-(вверху) и низкотемпературного (внизу) стрессов.

Как видно из представленного рис. 6.8, при повышении температуры до +35°C внесение ГВ приводило к частичному или полному снятию стресса у проростков пшеницы: в случае с ФК сапропеля наблюдали увеличение длины побегов до 125% от контроля. При этом в целом можно сказать, что ФК оказались более эффективны, чем ГК, а корни – более чувствительны, чем побеги. Полученные данные хорошо согласуются с результатами других исследователей. Так, в опытах Жанга [Zhang et al., 2003], было отмечено положительное влияние ГК

угля на растения мятлика *Poa pratensis* L., подвергавшиеся высокотемпературному (37°C) стрессу в течение 72 или 96 часов.

В условиях пониженных температур, напротив, защитное действие ГВ было менее выражено, а полное снятие угнетающего действия было отмечено только в одном случае – при использовании ГК угля ИНуК-USA. Пониженная температура, по-видимому, является чрезвычайно сильным стрессором для прорастающих семян. Согласно [Lafond et al, 1999] время прорастания семян при температурах ниже 5°C может значительно превышать 72 часа и увеличиваться до 7 дней.

В наших экспериментах величина стресса, вызываемая пониженной температурой, значительно превышала величину стресса при повышенной температуре (рис. 6.1), что затрудняет сравнительный анализ полученных результатов. Поэтому нами дополнительно были приведены эксперименты при температуре 38°C, когда мы ожидали более выраженного высокотемпературного стресса. Результаты приведены на рис. 6.10.

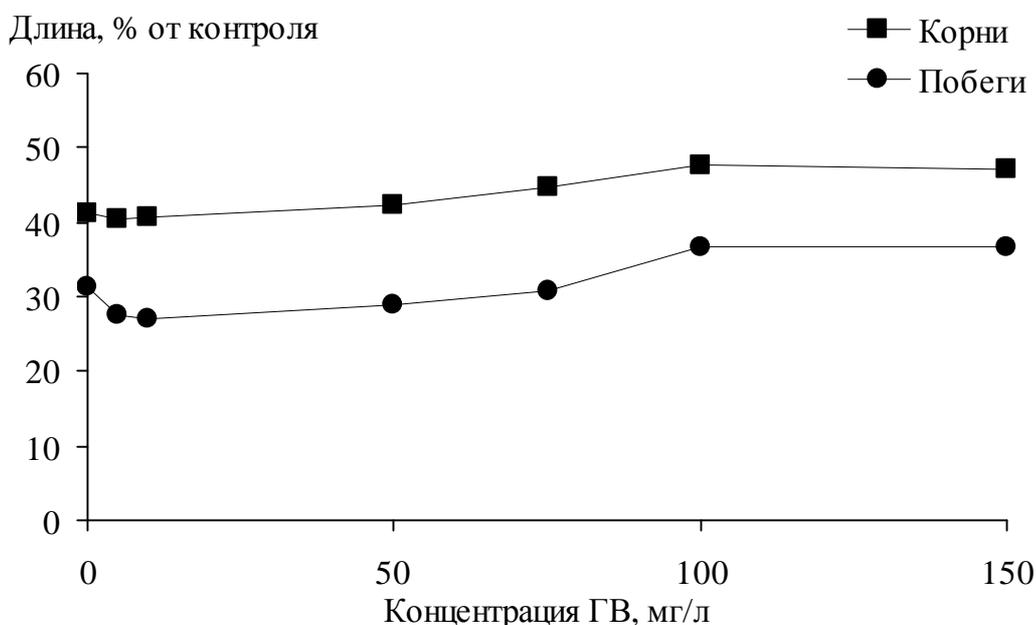


Рисунок 6.10. Влияние ГК угля США-Pow в условиях высокотемпературного стресса (38°C) на длину корней и побегов проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Как видно из рис. 6.10, при повышении температуры с 30°C до 38°C, наблюдали усиление угнетения развития как корней, так и побегов проростков пшеницы: при температуре 38°C длина корней снизилась почти на 60% от контрольной, а длина побегов – почти на 70%. Аналогичные величины при

температуре 30°C составили 25% и 21% соответственно. При этом защитное действие ГВ при температуре 38°C было очень слабо выражено: наблюдаемое максимальное увеличение длин корней и побегов проростков составило всего (6±4)% и (7±4)%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГВ способны частично или полностью нивелировать высоко- и низкотемпературный температурный стресс, а величина наблюдаемого действия зависит от величины вызываемого стресса. Следует особо подчеркнуть, что в проведенных нами исследованиях ГВ способствовали адаптации растений к стрессовым факторам, вызывающим разнонаправленные ответные реакции в организмах. Так, для выживания клеток при высокой температуре требуется наличие липидов в жидком состоянии и требуются соответствующие изменения в структуре и стабильности мембранных белков. При этом белки и липиды, адаптированные к высокой температуре, находятся соответственно в денатурированном состоянии и в состоянии твёрдого геля, т.е. в неадаптированном состоянии по отношению к низким температурам [Ипатова, 2005]. Это явление так называемой отрицательной сопряженной устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды, когда организм, приспособившись к одному фактору, становится менее устойчивым к другим стрессовым факторам. Поэтому полученные результаты о защитном действии ГВ в этих условиях свидетельствуют об их участии не в специфических реакциях, характерных для того или иного вида стрессового воздействия, а в общих защитно-приспособительных реакциях растительного организма.

Глава 7. Природа защитного действия ГВ по отношению к растениям

7.1. Возможные механизмы защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов

Результаты проведенных экспериментов, направленных на изучение защитного действия ГВ в условиях различных физико-химических стрессов указывают на то, ГВ обладают способностью снижать негативное воздействие различных стрессоров на живые организмы как в водных, так и в почвенных средах. При этом защитное действие ГВ может быть обусловлено как непосредственно связыванием токсикантов, так и действием на растительный организм. На основании существующих данных, а также собственных экспериментов, можно предложить следующую общую схему возможных путей защитного действия ГВ в при различных неблагоприятных условиях (рис. 7.1).

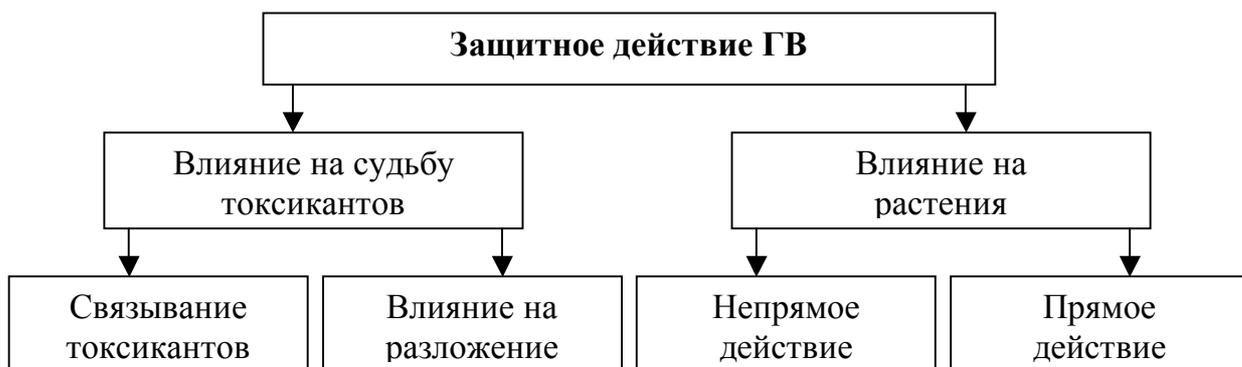


Рисунок 7.1. Природа защитного действия ГВ при различных неблагоприятных факторах.

Влияние ГВ на судьбу токсикантов обусловлено химической природой ГВ, которые представляют собой нерегулярные оксиполикарбоновые кислоты, содержащие ароматические структуры и различные функциональные группы [Clarr et al., 1993; Leenheer, 2007]. Особенностью структурного строения ГВ является также одновременное присутствие полярных и неполярных структур, что позволяет им вступать во взаимодействие с токсикантами различной химической природы [Орлов, 1993; Abelmann et al., 2005; Gu et al., 2006; Skyllberg et al., 2006]. Связывание токсикантов, в свою очередь, приводит к снижению их токсичности и бионакопления [Landrum et al, 1987; Black and McCarthy, 1988; Gu et al., 2001;

Bollag and Mayers, 1992; Baraud et al., 2005; Verrengia Guerrero et al., 2001; Simpson et al., 2004]. Поэтому в настоящее время разработан ряд технологических приёмов рекультивации загрязнённых сред, основанных на связывающей способности ГВ по отношению к токсикантам [Fukushima & Tatsumi, 2001; Lesage et al., 2001].

ГВ также способны в ряде случаев способствовать ускоренному разложению токсикантов или их необратимому включению в свою структуру. Например, катализируемый ГВ гидролиз атразина – первая стадия разложения этого гербицида – основной механизм его разложения в почвенных средах [Gamble, Khan, 1988; Cole et al., 1995; Prosen, Zupancic-Kralj, 2005]. ГВ способны ускорять фотодеградацию таких ксенобиотиков как полиядерные ароматические углеводороды, хлорированные ароматические углеводороды, хлорированные фенолы [Fielding et al., 1992]. Нами была продемонстрирована возможность ГВ необратимо включать атразин в свою структуру по механизму окислительного связывания, катализируемого лакказой (см. Главу 3).

Непрямое действие ГВ на растения, т.е. их способность улучшать физико-химические свойства почвы и способствовать таким образом росту и развитию растений, в настоящее время также хорошо изучена [Martin, Waksman, 1941; Chaney, Swift, 1984; Piccolo & Mbagwu, 1999; Imbufe et al., 2005; John et al., 2005; Tate & Theng, 1980; Devevre & Horwath, 2001; Chen et al., 2004; Garcia-Mina et al., 2004; Линник и Набиванец, 1986; Орлов, 1993; Agebenin & Olojo, 2004; Khwaja et al., 2006; Pegoraro, 2005]. Нерешённым остаётся вопрос о прямом действии ГВ в условиях различных физико-химических стрессов.

Проведённые исследования показали, в условиях стрессов, вызываемых токсикантами, защитное действие ГВ в почвенных средах обусловлено, прежде всего, связывающей способностью ГВ по отношению к токсикантам. В водной среде, напротив, защитное действие ГВ обусловлено не только их взаимодействием с токсикантами, но также и собственной биологической активностью. В случае высоких констант связывания (ТМ), ведущую роль играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как при слабом химическом взаимодействии (гербициды) на первое место выходит собственная физиологическая активность ГВ. Другой важной установленной особенностью защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных

абиотических стрессов является его большая выраженность в водных, чем в почвенных средах, что обусловлено, по-видимому, снижением доступности ГВ для живых организмов. Наконец, полученные результаты показали, что величина наблюдаемого защитного действия ГВ напрямую зависит от величины вызываемого стресса.

7.2. Особенности защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов

На рис. 7.2. представлен график, иллюстрирующий полученные результаты по защитному действию ГВ в различных стрессовых условиях в водных средах и показывающий его зависимость от уровня стресса. Силу воздействия стрессового фактора рассчитывали как разницу между контрольным значением тест-отклика ($R_0 = 100\%$) и значением тест-отклика в стрессовых условиях R_T . При таком способе расчета 100% стресс означает гибель организма, а нулевой – состояние контроля. Так как действующее начало ГВ неизвестно, для обобщения данных использовали результаты по максимальному наблюдавшемуся эффекту ГВ вне зависимости от концентрации.

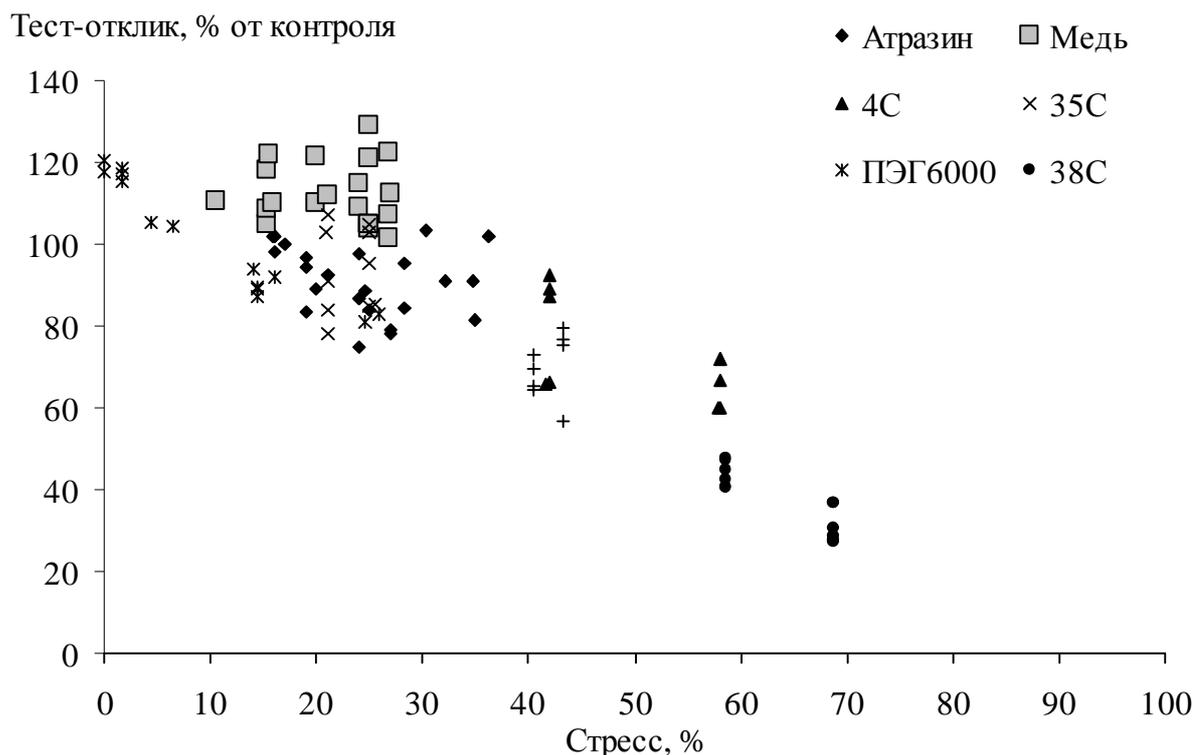


Рисунок 7.2. Зависимость защитного действия ГВ от уровня стресса.

Как видно из рис. 7.2, с увеличением величины стресса защитное действие ГВ также снижается. Исключение составили результаты с медью, которые образуют отдельную группу на представленном графике. Это наблюдение подтверждается результатами статистического анализа: двухфакторный бесповторностный дисперсионный анализ показал, что полученные данные следует относить к разным генеральным совокупностям ($P > 95\%$).

Поэтому в дальнейшем из рассмотрения были исключены результаты экспериментов с медью, где, как было показано выше, ведущую роль играет именно связывающая способность ГВ, а все результаты по защитному действию ГВ были объединены в одну выборку. Полученная зависимость представлена на рис. 7.3.

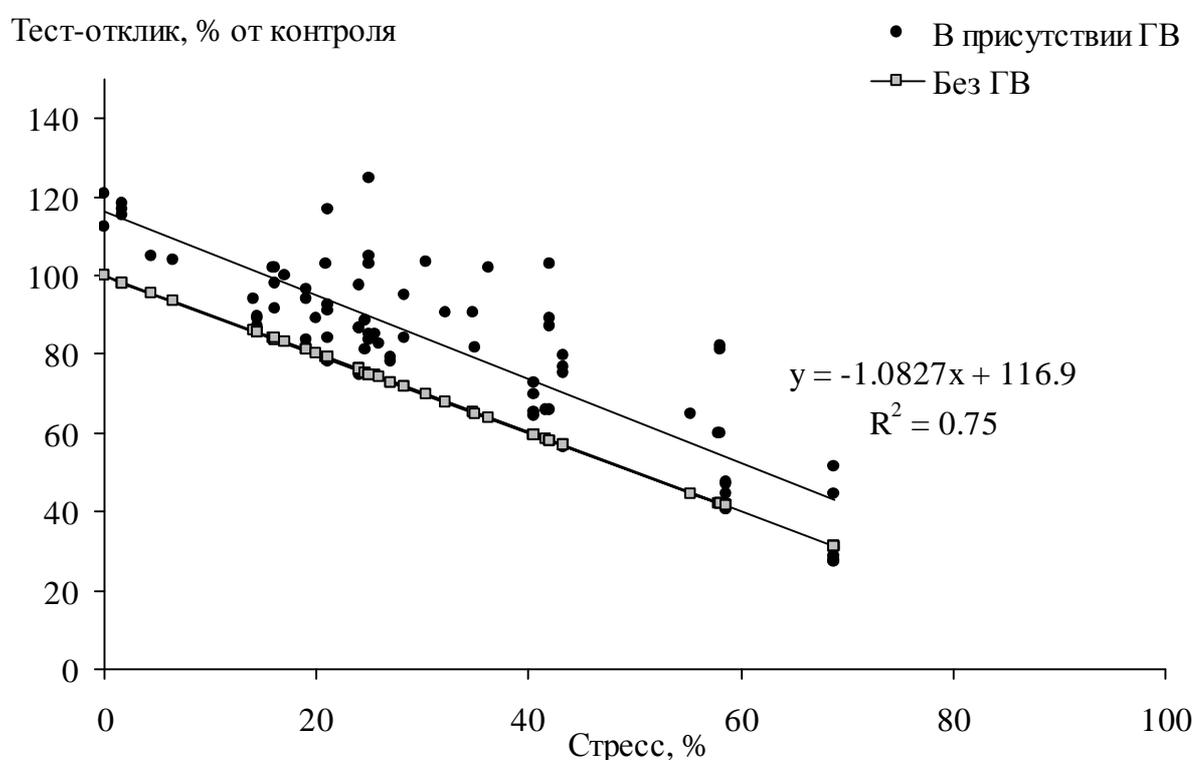


Рисунок 7.3. Зависимость защитного действия ГВ от уровня стресса.

Как видно из рис. 7.3, величина защитного действия ГВ практически не зависела от вида стресса, а определялась, главным образом, его уровнем. При этом разница между вариантами без внесения ГВ и в их присутствии была практически постоянной величиной и составила $(17 \pm 4)\%$ при $P = 95\%$.

Разнообразие стрессовых факторов, при которых регистрируется положительное действие ГВ, а также независимость величины защитного действия ГВ от вида стресса свидетельствует о неспецифической природе защитного

действия ГВ. В случае ТМ (или других токсикантов, с которыми возможно интенсивное связывание) указанная закономерность не соблюдается так как эффект неспецифического защитного действия ГВ гораздо меньше, чем эффект химического связывания токсикантов.

Таким образом, при обсуждении возможных механизмов защитного действия ГВ необходимо учитывать такие важные особенности их активности как неспецифичность действия и выраженность в стрессовых условиях. Кроме того, не следует также забывать, что ГВ обладают биологической активностью по отношению не только к растениям, но также животным [Carlberg et al., 1986; Горовая и др., 1995; Day, 1991; Zhorina & Stepchenko, 1991; Lange et al., 1987; Sato et al., 1986; Sato et al., 1987; Cozzi et al., 1993; Ribas et al., 1997; Gau et al., 2000; Steinberg et al., 2007; Stepchenko & Mihailenko, 2008] и микроорганизмам [Masciandaro & Ceccanti, 1999; Blondeau, 1989; Frimmel et al., 1994; Kirschner et al., 1999; Dehorter & Blondeau, 1999; Hofrichter et al., 1999; Steinberg et al., 2007]. Поэтому при обсуждении действующего начала следует искать наиболее общие процессы жизнедеятельности живых организмов. В этом отношении особый интерес представляет собой рассмотрение реакций организмов на стрессовые условия, когда действие ГВ, как мы уже отмечали выше, наиболее выражено.

В настоящее время при исследовании реакций организмов на стресс (ответная реакция на действие эколого-климатических, антропогенных и биогенных неблагоприятных факторов) принято выделять несколько обязательных стадий, таких как первичная неспецифическая реакция и собственно адаптация (акклимация) [Ипатова, 2005]. В стрессовых условиях наиболее чувствительным компонентом клеточных структур, выполняющим роль пускового механизма, вызывающего последующие изменения в обмене веществ, в большинстве случаев выполняют мембранные системы. Следовательно, можно предположить, что защитное действие ГВ обусловлено их непосредственным взаимодействием с мембранами и зависит от биодоступности ГВ. Поэтому далее нами было проведено исследование, направленное на изучение поступления ГВ в клетки и растения и распределения в них в оптимальных и стрессовых условиях. Эксперименты проводили с использованием меченных тритием ГВ.

7.3. Поступление ГВ в растения в оптимальных и стрессовых условиях

7.3.1. Использование радиоактивных препаратов для количественной оценки поступления ГВ в растения

Впервые предположение о возможности поступления ГВ в растения было высказано ещё Христовой в 1951 г [Христева, 1951], а принципиальная возможность этого процесса была продемонстрирована на примере синтетических аналогов ГВ Пратом [Prat, 1963; Prat and Pospisil, 1959] и Фокиным с сотр. [Фокин и др., 1975; Ибрагимов, Фокин, 1985]. Несмотря на многочисленные попытки, предпринятые исследователями для решения этого вопроса, проблема до сих пор не решена. Основным препятствием, возникающим на пути исследователей, было отсутствие способов определения ГВ на фоне органических веществ самих живых организмов. В большинстве случаев получение меченых ГВ основано на предварительном внесении меченых компонентов в почвенные образцы [Haider, Martin, 1988] или каталитической полимеризации из веществ, традиционно считающихся предшественниками ГВ в природе. В последнем случае синтез осуществляется из фенольных соединений в присутствии ферментов, таких как пероксидаза хрена, путём инициации с помощью H_2O_2 [Kappler, Brune, 2000] или полимеризацию фенольных соединений проводят при щелочных значениях pH в присутствии кислорода или окислителей [Steffen et al., 2002]. В ряде случаев в реакционную смесь вводят также вещества неароматической природы (белки, аминокислоты, углеводы, аминсахара и др.), получая при этом схожие с природными ГВ [Dec et al., 2003; Ji et al., 2000; Steffen et al., 2002]. Основным недостатком указанных способов получения меченых ГВ является, во-первых, несоответствие получаемых препаратов природным ГВ и, во-вторых, отсутствие возможности получения меченых ГВ, экстрагируемых из природных сред. Для решения указанной проблемы был разработан ряд способов прямого мечения ГВ, позволяющих вводить изотопы в предварительно извлеченные ГВ. В настоящее время опубликованы данные о прямом введении в гуминовые материалы таких изотопов как ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In [Franke, Kupsch, 2002; Rossler et al., 2000; Warwick et al.,

1993]. Обобщённые данные о существующих способах получения меченых ГВ приведены в табл. 7.1.

Таблица 7.1. Основные методы получения и активность меченых ГВ

Метод	ГВ	Активность, кБк/мг	Источник
<i>Получение меченых аналогов ГВ</i>			
Спонтанная окислительная полимеризация [^{14}C] пирокатехина	ГК	–	Hoffrichter et al., 1998
Радикальная (пероксидаза- H_2O_2) полимеризация предшественников	ГК	5.3-38.5	Kappler, Brune, 2000
Спонтанная окислительная полимеризация [^{14}C] пирокатехина	ГК	1.1	Steffen et al., 2002
Реакция Милларда из ксилозы и аминокислот	ГК	35.5-102	Bubner et al., 1999
<i>Прямое введение изотопов</i>			
^{14}C метиламинирование	ГК	70-1400	Dierckx et al., 1982; Warwick et al., 1993; Carlsen et al., 1992
Галогенирование после окисления [^{131}I]Г Йодогеном	ГВ	Ок. 10 000	Lippold et al., 1994; Lippold et al., 2005
^{125}I йодирование с использованием хлорамина-Т в качестве окислительного агента	ГК, ФК	34-71	Carlsen et al., 1992; Higgs et al., 1993; Warwick et al., 1993a
^{125}I йодирование реагентом Болтона-Хунтера	ГВ	–	Carlsen et al., 1992
Энзиматическое галогенирование [^{131}I] и [^{36}Cl]	ГК	–	Carlsen et al., 1992; Wolf et al., 1997
Ковалентное связывание с [^{18}F] фторбензолдиазониумхлоридом	ГК	–	Franke et al., 2004
Введение восстановленного [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] пертехнеата	ГК	–	Rößler et al., 2000
Тритирование по методу Вильцбаха	ГК	10-26 700	Wang et al., 1984; Scharpenseel, 1960
Восстановление [^3H]NaBH ₄	ФК	70	Tinnacher, Honeyman, 2007

Основными недостатками методов прямого введения изотопов является изменение реакционной способности ГВ вследствие изменения функциональных групп в процессе реакции с мечеными агентами. Например, при тритировании с помощью [^3H]NaBH₄ [Tinnacher, Honeyman, 2007] происходит восстановление карбониллов в составе кетонов и хинонов. Кроме того, нерешённым остаётся вопрос о выборе вводимого в ГВ изотопа. Так, введение йода позволяет получать только препараты ГВ, нестабильные на свету; введение галогенов приводит к снижению устойчивости меченых ГВ при высоких значениях рН (хлор) или восстановительных условиях (фтор). Поэтому наиболее перспективным вводимым изотопом, на наш взгляд, является тритий, обладающий временем полураспада $T_{1/2} = 12.3$ г. При этом ещё одним достоинством трития является его относительно невысокая энергия бета-излучения, составляющая $E_{\text{max}} = 18.6$ кэВ [Evans, 1966], что позволяет использовать метод автордиографии для исследования распределения метки в образцах даже при её невысокой концентрации.

7.3.2. Исследование взаимодействия ГВ с живыми организмами с использованием меченных тритием препаратов

В нашей работе использовали образцы меченных тритием ГВ (образцы были любезно предоставлены группой Г.А. Бадуна, кафедра радиохимии, химический факультет МГУ), полученные методом термической активации трития – единственным методом, позволяющим вводить тритий в любые макромолекулы вне зависимости от их свойств [Myasoedov, 1993]. Метод основан на бомбардировке поверхности мишени (в нашем случае ГВ) при температуре жидкого азота (77 К) атомами трития, образующимися из газообразного трития на нагретой до 1500-2000 К вольфрамовой спирали.

7.3.2.1. Оценка идентичности меченных тритием ГВ исходным препаратам

Для проведения экспериментов использовали меченные тритием ГВ (^3H -ГВ), полученные методом бомбардировки атомарным тритием с последующим диализом, направленным на удаление трития из лабильных положений OH^- , COOH^- , and NH_n . Список использованных в работе меченных препаратов ГВ и их удельная радиоактивность приведены в табл. 7.2.

Таблица 7.2. Список использованных в работе меченых препаратов ГВ и их удельная радиоактивность

Препарат ГВ	Удельная радиоактивность, кБк/мг
Гуминовые вещества вод	
AFA-SR	190
Гуминовые вещества почв	
SFA-CtL00	140
SFA-Pg96	350
Гуминовые вещества торфов	
PFA-Sk300	170
PFA-T5H98	180
PNA-Sk300	630
PNA-T5H98	280
Гуминовые вещества угля	
CHA-Pow	190
CHM-Pow	280
CHM-GL02	290

Как видно из данных, приведённых в табл. 7.2, полученные ^3H -ГВ обладали высокими удельными радиоактивностями, что позволяло их использовать для проведения биологических экспериментов. Следует подчеркнуть, что при сопоставлении физико-химических свойств ГВ с полученными значениями удельной радиоактивности ^3H -ГВ между этими характеристиками не было установлено взаимосвязи. Это свидетельствует о неспецифическом введении трития в ГВ.

Идентичность меченных тритием препаратов исходным проверяли методом эксклюзионной гель-хроматографии с одновременной детекцией по радиоактивности и УФ-поглощению при 254 нм (рис. 7.4).

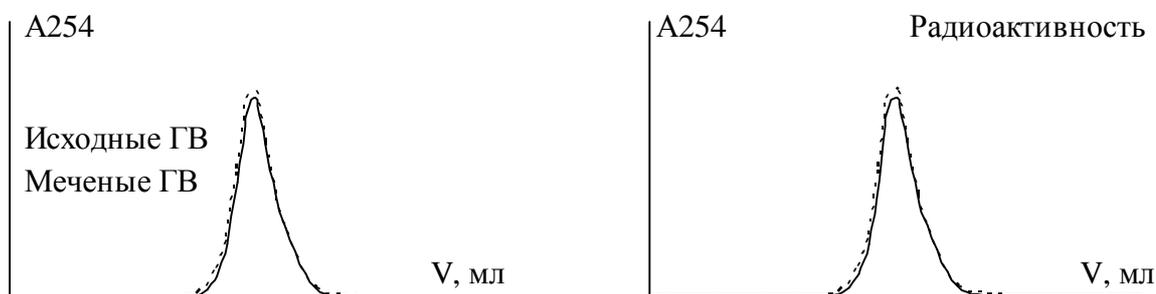


Рисунок 7.4. Гель-хроматограммы исходных и меченных тритием ГВ (на примере СНА-Pow).

Как видно из рис. 7.4, гель-хроматограммы ^3H -ГВ и ГВ, использованных для получения меченого препарата, совпадают между собой. Это свидетельствует о том, что введение метки не приводило к полной или частичной деструкции ГВ или их значимому изменению. С другой стороны, нами была также продемонстрирована идентичность гель-хроматограмм меченных тритием ГВ при детекции по радиоактивности и УФ-поглощению. На основании этого нами был сделан вывод о равномерном введении метки во все структурные фрагменты. Таким образом, проведенный анализ показал возможность использования полученных меченых препаратов для исследования взаимодействия ГВ с живыми организмами.

7.3.2.2. Характеристика меченных тритием ГВ

Так как гидрофобность может играть определяющую роль во взаимодействии с живыми организмами, дополнительно была проведена характеристика гидрофобно-гидрофильных и поверхностно-активных свойств полученных препаратов ГВ. Эксперименты были поставлены группой д.х.н. Г.А. Бадуна (кафедра радиохимии химического факультета МГУ).

Для характеристики гидрофобности использовали логарифм октанольно-водного коэффициента $\lg K_{ow}$, а для характеристики поверхностно-активных свойств – параметр, отражающий максимальную адсорбцию ГВ на границе раздела фаз толуол-вода G_{max} [Badun et al., 2005]. Полученные характеристики использованных в работе ГВ приведены в табл. 7.3.

Таблица 7.3. Логарифмы октанольно-водного коэффициента lgK_{OW} и максимальная адсорбция ГВ на границе раздела фаз толуол-вода G_{max} для ГВ, использованных в работе

ГВ	lgK_{OW}	G_{max} , мг/м ²
СНА-Pow	-2.26	0.71
PFA-Sk300	-1.95	0.90
PNA-Sk300	-2.42	1.30
SFA-CtL00	-2.97	0.15
SFA-Pg96	-2.98	0.08
SHA-CtL00	-2.81	0.30

Как видно из приведённой таблицы, ГВ характеризовались невысокой гидрофобностью: величины логарифмов октанольно-водного коэффициента lgK_{OW} не превышали значений -1.95 . Максимально выраженными гидрофобными свойствами обладали препараты ГВ угля и торфа, наименьшая гидрофобность была определена для ФК почв.

По значению поверхностной активности исследованные препараты ГВ образовывали аналогичный ряд:

ГВ торфа > ГК угля > ГВ почв.

Так как поверхностная активность и гидрофобность являются основными свойствами, определяющими способность ГВ взаимодействовать с биологическими мембранами [Vigneault et al., 2000; Visser, 1982], можно ожидать, что среди изученных препаратов ГВ именно ГВ угля и торфа будут характеризоваться наибольшим сродством к живым клеткам.

7.3.3. Исследование взаимодействия ГВ с живыми клетками в оптимальных и стрессовых условиях

Наличие в ГВ как гидрофобных, так и гидрофильных фрагментов [Vigneault et al., 2000; Visser, 1982] обуславливает их поверхностно-активные свойства и

способность вступать во взаимодействие с биологическими мембранами. Действительно, в настоящее время многочисленными исследованиями установлена мембранотропная активность ГВ [Samson and Visser, 1989; Ermakov et al., 2000; Vigneault et al., 2000]. Способность ГВ вступать во взаимодействие с биологическими мембранами установлена для фитопланктона [Campbell et al., 1997, Gerritsen and Bradley, 1987; Parent et al., 1996; Vigneault et al., 2000], жаберных клеток рыб [Campbell et al., 1997], бактерий [Visser, 1985; Fein et al., 1999; Frost et al., 2003; Maurice et al., 2004], грибов [Zhou and Banks, 1993] и растений [Samson and Visser, 1989; Ermakov et al., 2000; Nardi et al., 2002]. Разнообразие использованных авторами объектов позволяет сделать вывод, что сорбция ГВ на биологических мембранах – широко распространённый процесс. Тем не менее, существуют только единичные работы, посвящённые его количественному описанию [Parent et al., 1996; Fein et al., 1999]. Работы, посвящённые оценке поступления ГВ в клетки, также практически отсутствуют [Doblin et al., 2000]. Поэтому нами было проведено исследование, направленное на количественную оценку взаимодействия ГВ с живыми клетками.

7.3.3.1. Количественная оценка взаимодействия ГВ с живыми клетками

Для проведения исследований в качестве модели использовали грамм-отрицательные бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* XL1 с тетрациклиновой устойчивостью. Эксперименты проводили в оптимальных и стрессовых условиях; последние создавали путём внесения в питательную среду хлорида натрия, получая таким образом гиперосмотический раствор. Использование стрессовых условий было необходимо для проверки гипотезы о нарушении мембранной проводимости в условиях стресса. Указанная гипотеза достаточно часто встречается в литературе [Lieber, Steck, 1982], однако экспериментальных доказательств этого явления в условиях гиперосмотического стресса практически не существует [Maheswari et al., 1999; van der Weerd et al., 2001]. В случае, если гипотеза верна, в условиях гиперосмотического стресса будет наблюдаться усиленное поступление ГВ в клетки.

Предварительное наращивание кишечной палочки проводили при pH 7.5 в среде 2YT (г/л: дрожжевой экстракт 10; триптон 16; NaCl 5) с последующим пересевом на питательную среду M9 (г/л: Na₂HPO₄×12H₂O 15.1; KH₂PO₄ 3.0; NaCl

0.5; NH_4Cl 1.0, $\text{MgSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5; CaCl_2 0.0056; глюкоза 0.25). Стерилизацию питательных сред проводили путём автоклавирования при 120°C в течение 30 мин. Растворы глюкозы, кальция, магния и ГВ стерилизовали путём пропускания через мембранный фильтр с размером пор 20 мкм и добавляли в питательные среды отдельно. В качестве бактериостатика использовали раствор тетрациклина, который добавляли в питательные среды непосредственно перед инокуляцией в количестве, необходимом для создания конечной концентрации 30 мг/л.

Для предварительного инкубирования использовали 200-мл колбы Эрленмейера с 200 мл среды 2YT, куда помещали скол замороженной культуры бактерии (хранение проводили при 77К с добавлением глицерина в качестве криопротектора). Нарращивание проводили на орбитальном шейкере при температуре 37°C в течение 10 ч, что было достаточно для достижения бактериальной культурой лаг-фазы.

Эксперименты по взаимодействию ГВ с кишечной палочкой проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл питательной среды M9 и меченые ГВ. В колбы помещали 0.5 мл культуры в среде 2YT и оставляли для культивирования на орбитальном шейкере на 12 ч при температуре 37°C . Стрессовые условия создавали путём внесения в среду M9 хлорида натрия в концентрации 18 г/л, что соответствовало осмотическому потенциалу -1.2 МПа [Sosa et al., 2005].

Рост бактерий контролировали по оптической плотности при 600 нм. Для определения веса бактерий 10 мл питательной среды с бактериями центрифугировали при 5000 об./мин в течение 30 мин, осадок промывали, взвешивали, и строили калибровочную зависимость веса бактерий от оптической плотности.

Эксперименты по взаимодействию бактерий с ГВ проводили при концентрациях ГВ 5, 10, 15, 25 и 50 мг/л. Раствор тритированных ГВ (100 мкл) добавляли для создания радиоактивности раствора 1.7кБк/мл. После наращивания *E. coli* в течение 12 ч проводили осаждение клеток путём центрифугирования (5000 об./мин, 30 мин), и измеряли радиоактивность супернатанта, которая соответствовала равновесной концентрации ГВ, т.е. концентрации ГВ, не сорбированных бактериями. После этого осадок промывали, ресуспендировали и измеряли радиоактивность суспензии, что соответствовало количеству ГВ,

сорбированных клетками бактерий, т.е. ГВ, адсорбированных на поверхности мембраны и поступивших во внутриклеточное пространство. Для определения количества ГВ во внутриклеточном пространстве клетки разрушали с помощью хлороформа (2-3 капли на 10 мл суспензии) и проводили центрифугирование (5000 об./мин, 30 мин) для осаждения дебриса. Далее измеряли радиоактивность супернатанта, что соответствовало количеству ГВ, поступивших во внутриклеточное пространство.

На основании полученных данных рассчитывали фактор бионакопления как тангенс угла наклона зависимости количества поглощенных клетками бактерий ГВ от их равновесной концентрации [ЕРА, 2000]:

$$ГВ_{\text{поглощённые}} = \text{Фактор бионакопления} \cdot [ГВ] \quad (7.1)$$

Где $ГВ_{\text{поглощённые}}$ – количество ГВ, поглощённых бактериями и $[ГВ]$ – равновесная концентрация ГВ.

Количество ГВ, поступивших во внутриклеточное пространство, рассчитывали при начальной концентрации ГВ 50 мг/л. Для сравнения с данными других исследователей нами также дополнительно было рассчитано количество ГВ, сорбированных клеточной поверхностью. При этом форму бактерий аппроксимировали сферой с радиусом 0.6 мкм [McClaine and Ford, 2002] и полагали, что все поглощённые ГВ адсорбированы поверхностной мембраной, т.к. в работах предыдущих исследователей не учитывали проникновение ГВ во внутриклеточное пространство.

Полученные результаты (рис. 7.5) показали значительное взаимодействие ГВ с бактериями, при этом интенсивность взаимодействия в значительной степени зависела от использованных ГВ. Максимально поглощение ГВ кишечной палочкой наблюдали в случае с торфяными ГК, в случае с ФК оно снижалось до незначительных величин. Во всех случаях в выбранном диапазоне концентраций наблюдали линейную зависимость количества поглощённых ГВ от их равновесной концентрации.

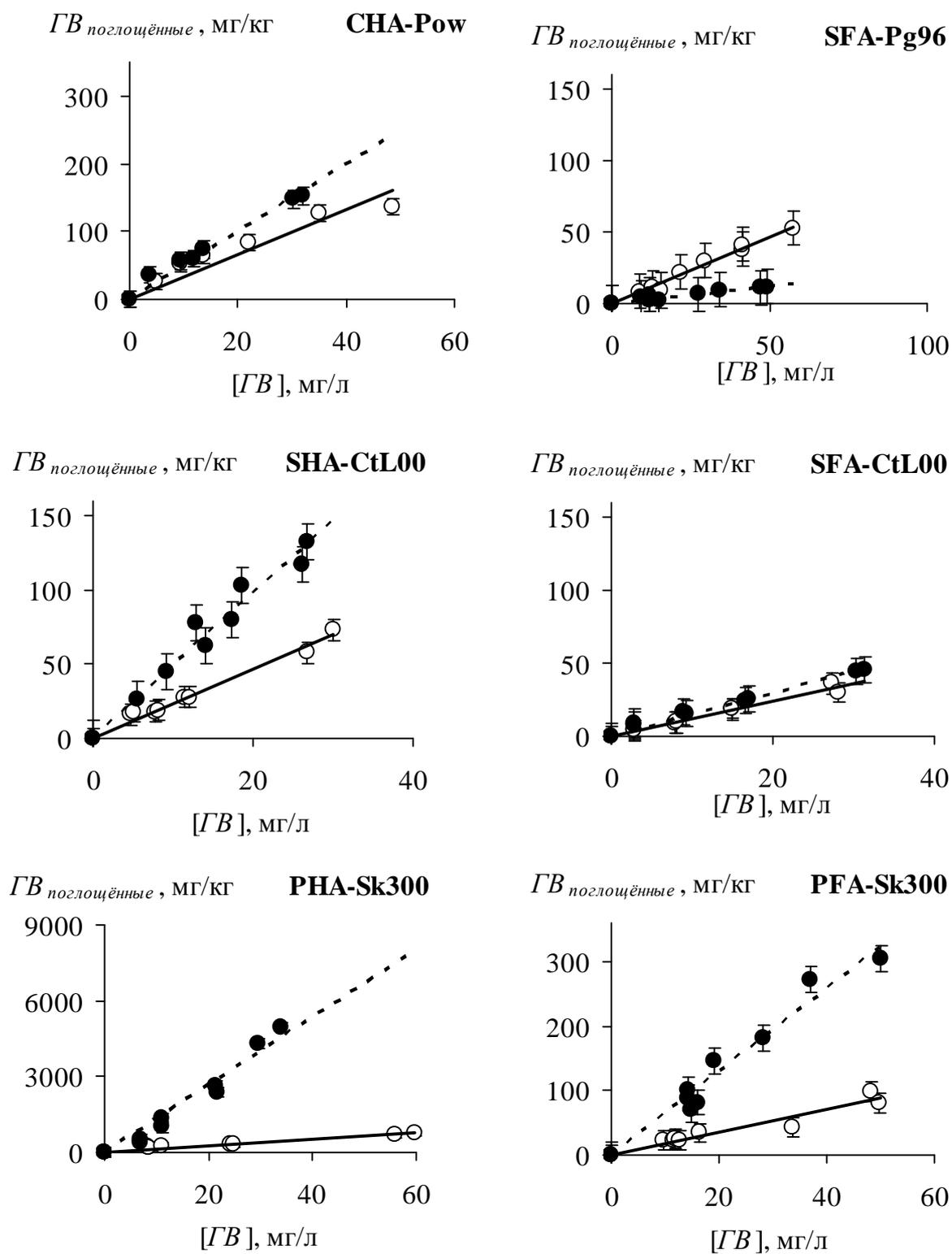


Рисунок 7.5. Поглощение ГВ клетками бактерий *Escherichia coli* в оптимальных условиях (сплошная линия) и условиях солевого стресса (пунктирная линия).

Рассчитанные значения факторов бионакопления и количество ГВ, поступивших в клетку, приведены в табл. 7.4.

Таблица 7.4. Поглощение ГВ клетками бактерий *Escherichia coli* в оптимальных и стрессовых условиях

ГВ	Фактор		ГВ, поступившие в		ГВ, сорбированные	
	бионакопления,		клетку при конц.		клетками при	
	л/кг		50 мг/л, мг/кг	клеток	конц. 50 мг/л,	мг/м ²
	Оптимум	Стресс	Оптимум	Стресс	Оптимум	Стресс
CHA-Pow	3.2±0.9	5.0±0.6	14±3	17±4	63±12	102±11
PFA-Sk300	1.8±0.7	6.9±0.8	8±1	32±5	93±12	256±18
PHA-Sk300	13.1±0.5	130±15	62±12	546±40	167±21	465±25
SFA-CtL00	0.9±0.5	1.5±0.5	1±1	3±1	27±15	34±9
SFA-Pg96	0.9±0.5	0.2±0.5	4±1	1±1	23±8	25±9
SHA-CtL00	2.3±0.6	5.3±0.3	6±1	11±2	65±14	82±16

Как видно из табл. 7.4, полученные значения факторов бионакопления варьировались от 0.9 до 13.1 л/кг. Наименьшие значения этого показателя были отмечены для ФК, а наибольшие – для ГК торфа. Полученные данные хорошо согласуются с результатами [Vigneault et al., 2000]. При изучении адсорбции ГК и ФК вод на зелёных водорослях *Selenastrum capricornutum* ими также была обнаружена более высокая адсорбция ГК по сравнению с ФК.

Рассчитанные значения количества ГВ, сорбированных клетками в оптимальных условиях при начальной концентрации ГВ 50 мг/л варьировались от 1 до 61 мг/м², что соответствует опубликованным значениям аналогичных величин. Согласно данным Парента с сотрудниками [Parent et al., 1996], количество ФК, адсорбированных клеточной поверхностью хлореллы при pH 5, составляет 17 мг/м². Заметная разница в сорбции ФК обусловлена, по-видимому, более высокими значениями актуальной кислотности, использованными в нашей работе (7.5). Установлено, что повышение значений pH способствует снижению сорбции ГВ на клеточных поверхностях [Vigneault et al., 2000]. Согласно данным, полученным Фейном [Fein et al., 1999], изучавшим сорбцию ГК на поверхности бактерий *Bacillus subtilis*, взаимодействие между ГК и бактериями было более выражено при низких значениях pH, когда как клеточная поверхность, так и ГК

несут меньший отрицательный заряд. При увеличении рН функциональные группы на поверхности клеток и ГК депротонируются, что приводит к увеличению их отрицательного заряда и, как следствие, к снижению взаимодействия, что особенно выражено при рН больше 7.

Как доказали наши эксперименты, значительное количество ГВ может поступать во внутриклеточное пространство. Измеренные количества ГВ, проникнувших через мембрану, лежало в диапазоне 23-167 мг/кг клеток, что составляло от 20% от общего количества поглощённых ГВ в случае ГК и достигало 100% для ФК. Полученные данные согласуются с единственным примером, обнаруженным нами в литературе [Doblin et al., 2000]. При исследовании взаимодействия меченных тритием морских ГВ с динофлагеллятами *Alexandrium catenella* методом микроавтордиографии авторами было показано, что метка обнаруживалась преимущественно не на поверхности, а внутри клеток водорослей.

Ванг с соавторами [Wang et al., 1999] на примере своих исследований с ^{14}C -ГВ и культурой клеток риса также продемонстрировали способность ГВ поступать в клетки и даже включаться в структуру ДНК. Доказательства поступления ГВ – в частности фракции с молекулярной массой менее 3.5 кД – в клетки высших растений приводятся также в работе Нарди [Nardi et al., 2002]; а в клетки водных макрофитов *Ceratophyllum demersum* L. и беспозвоночных *Gammarus pulex* L. – в обзоре Штайнберга [Steinberg et al., 2006]. Следует отметить, однако, что упомянутые выше исследования были проведены с ^{14}C аналогами ГВ, что затрудняет сопоставление этих данных с нашими.

Особый интерес представляют результаты, свидетельствующие о усиленном поглощении ГВ клетками бактерий в условиях солевого стресса (табл. 7.4). Этот эффект был отмечен для всех препаратов за исключением ФК почв, где не наблюдали значимого усиления поглощения в условиях солевого стресса. По всей видимости, установленное отличие в поведении SFA-Pg96 и SFA-CtL00 обусловлено низким уровнем взаимодействия этих ГВ с бактериями, что привело к высокой ошибке получаемых результатов: как видно из табл. 7.4, различия между показателями взаимодействия ФК с кишечной палочкой статистически недостоверны.

Усиленное взаимодействие ГВ с бактериями в условиях солевого стресса может быть объяснено, прежде всего, изменениями поведения ГВ в этих условиях. В частности, при повышении ионной силы раствора возможна усиленная сорбция ГВ на всех отрицательно заряженных поверхностях, включая гели, почвенные минералы и клеточную поверхность вследствие частичной компенсации отрицательного заряда ГВ, что, в свою очередь, приводит к снижению электростатического отталкивания. С другой стороны, под действием осмотического шока возможна пермеабиллизация мембран за счет образования так называемых «дыр», т.е. отверстий большого диаметра, в которые могут поступать высокомолекулярные соединения, не проникающие в клетку в обычном состоянии [Taupin et al., 1975; Hallett et al., 1993]. Недавние результаты, полученные с помощью ЯМР-спектроскопии, показали, что в условиях гиперосмотического стресса -0.35 МПа происходит увеличение проницаемости апикальных клеток проростков проса *Pennisetum americanum* L. [van der Weerd et al., 2001]. Таким образом, наблюдаемое усиление взаимодействия ГВ с клетками бактерий может являться результатом как изменения состояния ГВ, так и нарушения целостности мембран в этих условиях.

7.3.3.2. Взаимосвязь между структурными характеристиками ГВ и их взаимодействием с живыми клетками

Сопоставление свойств ГВ с параметрами их взаимодействия показало наличие значимой корреляционной взаимосвязи между количеством ГВ, поступивших в клетку, и поверхностной активностью ГВ (рис. 7.6). При этом наличие взаимосвязи наблюдали как для оптимальных, так и для стрессовых условий.

Количество ГВ, поступивших в клетку, мг/кг

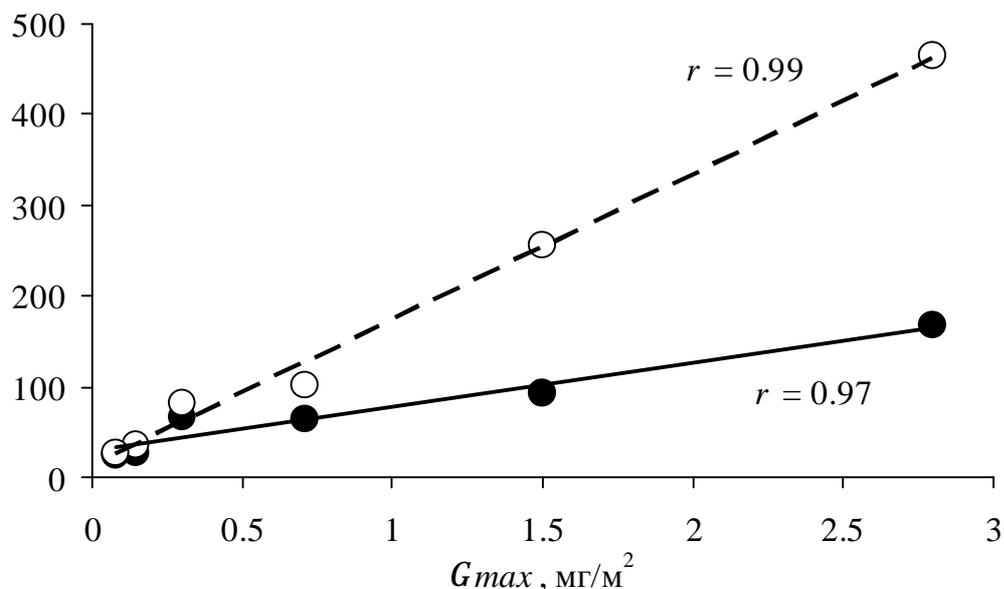


Рисунок 7.6. Зависимость поглощения ГВ клетками бактерий *Escherichia coli* от поверхностной активности ГВ в оптимальных условиях (сплошная линия) и условиях солевого стресса (пунктирная линия).

Таким образом, полученные результаты доказывают возможность поступления ГВ в живые клетки и свидетельствуют о ведущей роли поверхностной активности ГВ в определении их взаимодействия с живыми клетками.

7.3.4. Исследование поступления ГВ в растения в оптимальных и стрессовых условиях

Для проведения экспериментов в качестве тест-объектов использовали проростки мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Семена пшеницы проращивали в дистиллированной воде в темноте в течение 72 ч при температуре 24°C. Трёхдневные проростки пшеницы переносили в пол-литровые пластиковые вегетационные сосуды, содержащую питательную среду Кноппа с pH 5.5 (г/л: KH_2PO_4 0.14, KCl 0.1, KNO_3 0.14, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.42, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 4.88, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05), и помещали для дальнейшего роста в климатическую камеру (температура 24°C, фотопериод 12 ч). Через 5 дней выращивания восьмидневные проростки пшеницы вынимали из вегетационных сосудов, ополаскивали корни дистиллированной водой и переносили в пластиковые пробирки, содержащие меченные тритием ГВ в концентрации 10-50 мг/л. Удельная радиоактивность и время экспонирования зависели от вида эксперимента.

По окончании экспонирования растения вынимали из пробирок и проводили учёт биомассы. В растворах проводили определение равновесной концентрации ГВ по радиоактивности, и на основании полученных данных определяли количество ГВ, поглощённых растениями.

В ряде экспериментов после экспонирования растения подвергали автордиографии. Для этого растения помещали в дистиллированную воду на 15 мин для десорбции непрочносвязанных ГВ, после чего удаляли излишек влаги с корней с помощью фильтровальной бумаги. Далее проростки пшеницы разделяли на корни и побеги и помещали в сушильный шкаф для подсушивания при температуре 60°C: корни на 40 мин, а побеги на 2 ч. После этого проводили окончательное досушивание образцов с помощью утюга при температуре 200°C.

Полученные сухие образцы растений помещали на рентгеновскую плёнку Retina XBM (Fotochemische Werke GmbH, ФРГ); время экспонирования подбирали экспериментально, в зависимости от начальной радиоактивности раствора, образца и время эксперимента оно варьировалось от 3 ч до 97 сут. После этого проводили обработку плёнки согласно рекомендациям производителя.

Полученные автордиограммы сканировали на сканере AGFA-T1200 и определяли оптическую плотность различных участков автордиограмм, на основании чего судили о концентрации ГВ в различных частях растений. Для этого проводили предварительную калибровку сканера, определяя зависимость оптической плотности D от светлоты L (luminosity). Калибровка использованного в работе сканера приведена на рис. 7.7. В качестве градуировочной плёнки использовали сертифицированную плёнку IT8 (SilverFast, США), произведенную в соответствии со стандартом ANSI IT8.7/1-1993. Плёнка содержит 24 прямоугольника с различными калиброванными оптическими плотностями серого цвета, включая максимально прозрачный и максимально чёрный фон. Светлота L прямоугольника градуировочной шкалы связана с отношением интенсивности падающего света I_0 к интенсивности прошедшего I следующей формулой:

$$L = \begin{cases} 116 \cdot \left(\frac{I}{I_0} \right)^{1/3} - 16 & \frac{I}{I_0} > 0.008856 \\ 903.3 \cdot \frac{I}{I_0} & \frac{I}{I_0} \leq 0.008856 \end{cases} \quad (7.2)$$

Зная светлоту данного прямоугольника, можно вычислить оптическую плотность D для него по формуле:

$$D = \begin{cases} \lg \cdot \left(\frac{116}{L+16} \right)^3 - 16 & \frac{I}{I_0} > 0.008856 \\ \lg \cdot \frac{903.3}{L} & \frac{I}{I_0} \leq 0.008856 \end{cases} \quad (7.3)$$

Согласно [Андриянов, 2004] полученную зависимость аппроксимировали уравнением:

$$D = dx \cdot \ln \left(\frac{A1 - A2}{L - A2} - 1 \right) + x0 \quad (7.4)$$

где $A1$, $A2$, dx и $x0$ – параметры аппроксимации.

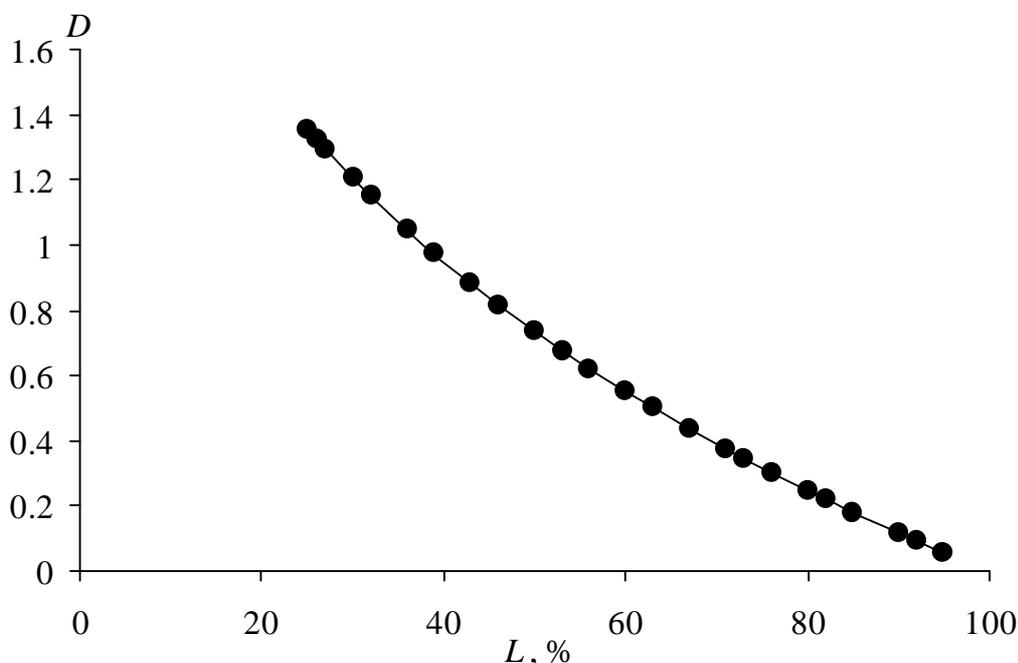


Рисунок 7.7. Зависимость оптической плотности D от светлоты L для сканера AGFA-T1200.

При расчете оптической плотности D , получаемой при автордиографировании растительных образцов, учитывали также плотность вуали, которая в наших экспериментах изменялась от 0.04 до 0.07.

7.3.4.1. Выбор времени взаимодействия ГВ с растениями

На первом этапе проводили изучение зависимости поглощения ГВ проростками пшеницы от времени экспонирования. Эксперименты проводили на

примере препарата ГК угля СНА-Pow. Концентрация ГВ составила 50 мг/л с начальной удельной радиоактивностью 0.3 мКи/л; время взаимодействия варьировали от 5 мин до 48 ч. Результаты проведённых экспериментов приведены на рис. 7.8.

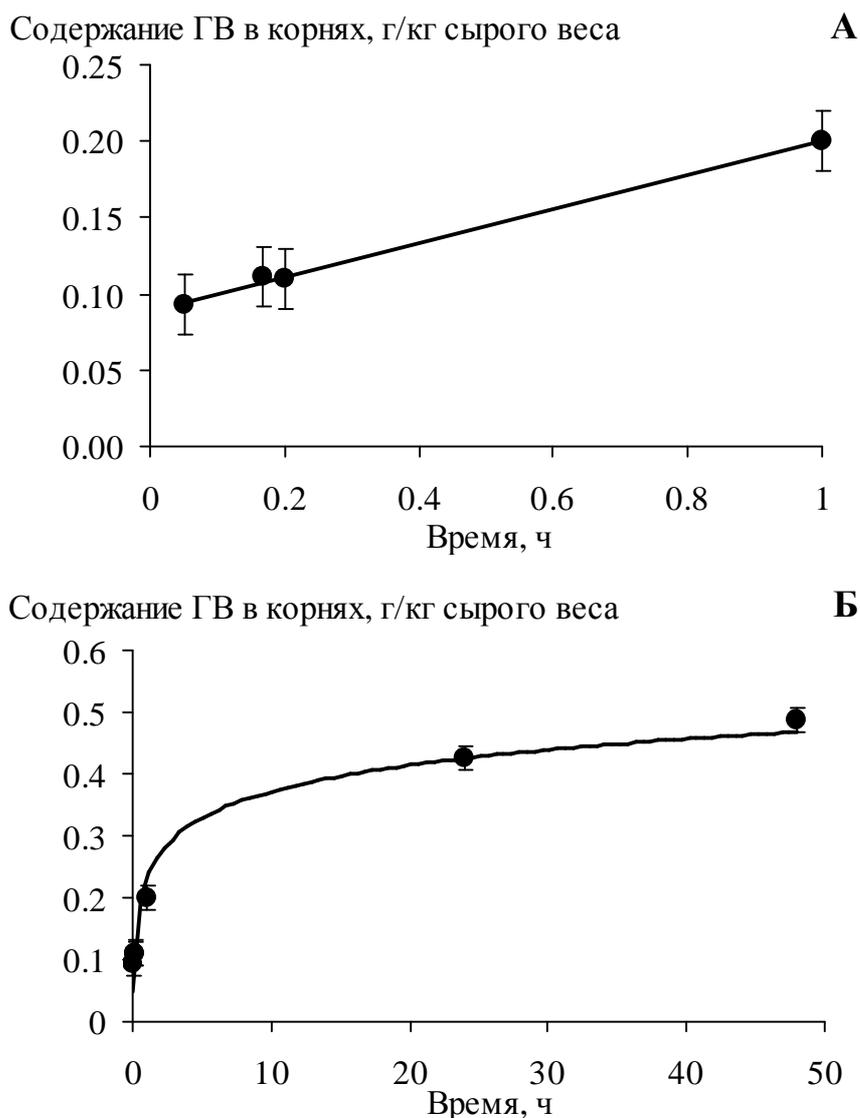


Рисунок 7.8. Зависимость поглощения меченных тритием ГК угля ЗН-СНА-Pow растениями пшеницы от времени экспозиции. А – в течение 1 ч., Б – в течение 48 ч.

Как видно из рис. 7.8А, исчезновение ГК из раствора наблюдали уже после первых минут их взаимодействия с растениями. При этом форма кривой зависимости поглощения ГК растениями от продолжительности экспозиции в целом совпадает с таковыми, наблюдаемыми для ионов и индивидуальных веществ, поступающих в растения. Так, поглощение растениями обычно характеризуется двумя основными стадиями. На первой стадии наблюдается обратимое малоизбирательное поглощение, при котором вещества адсорбируются

поверхностью корня и могут быть легко десорбированы обратно. Затем наступает стадия стационарного поглощения – стадия II – , в ходе которой наблюдается поступление веществ в сосудистую систему растений [Физиология растений, 2005].

Установленная нами закономерность поглощения ГВ ранее была показана для большинства поглощаемых растениями ионов и ряда органических веществ, таких как полиамины путресцин [DiTomase et al., 1992] и сапонарин [Frangne et al., 2002]. Обнаруженное сходство представляет особый интерес в связи с тем, что упомянутые полиамины участвуют в регулировании клеточного деления и дифференциации у растений и могут накапливаться в тканях в высоких концентрациях в стрессовых условиях [Galston, Sawhney, 1990], играя важную роль в предотвращении старения [Galston & Kaur-Sawhney, 1987], регулировании ионного состава в симплазме [Young and Galston, 1983] и стимулируя синтез протеинов [Kaur-Sawhney et al., 1980] и защитных алкалоидов [Hartmann et al., 1988]. Линейная фаза поглощения I отражает транспорт вещества через плазмалемму; на этой стадии наблюдается обратимое малоизбирательное поглощение, при котором вещества адсорбируются поверхностью корня и могут быть легко десорбированы обратно. Снижение скорости поступления на второй фазе соответствует началу перемещения вещества в побеги.

Как видно из рис. 7.8А, при экстраполяции зависимости количества поглощённых ГВ от времени экспозиции в течение линейной фазы (фаза I) получаемая прямая пересекает ось ординат не в 0, а при около 0.09 г/кг. Это свидетельствует о том, что часть ГВ, определяемая как поглощённые, представляет собой адсорбированные на поверхности корня вещества. Поэтому нами также была проведена оценка вклада адсорбированных ГВ в общее количество поглощённых ГВ. Для этого измеряли количество ГВ, десорбируемых с корней после их взаимодействия с растениями в течение 5, 10, 20, 60 мин и 24 и 48 ч. В качестве начальной концентрации ГВ использовали 50 мг/л; время десорбции составляло 15 мин. Результаты приведены на рис. 7.9.

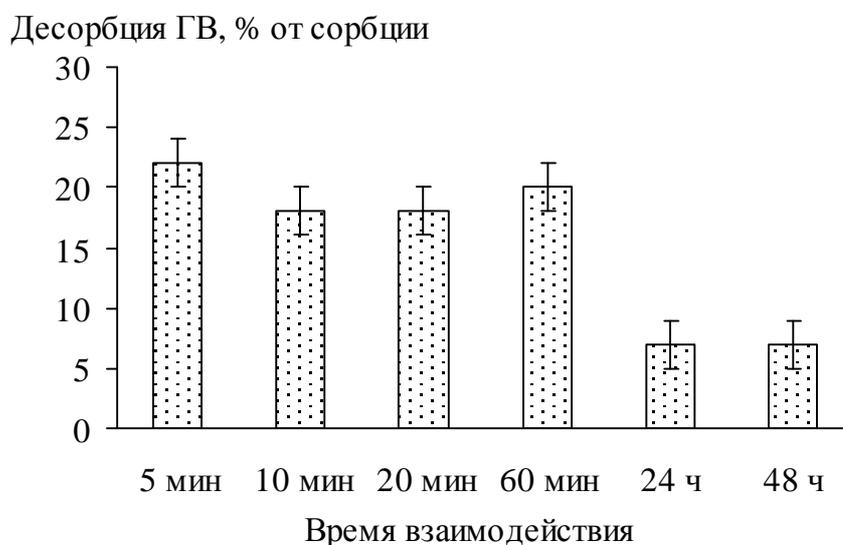


Рисунок 7.9. Зависимость десорбции поглощённых меченных тритием ГК угля ^3H -СНА-Row растениями пшеницы от времени экспозиции.

Данные, представленные на рис. 7.9, подтверждают высказанные предположения о двухстадийном механизме поглощения ГВ растениями. В течение 1-го часа десорбируется около 20-25% от поглощенных ГВ, а в дальнейшем эта величина снижается до 5-7%. Дополнительным доказательством обнаруженного 2-х стадийного поглощения ГВ растениями являются полученные автордиограммы корней и побегов пшеницы (рис. 7.10)

Как видно из полученных автордиограмм, значимые количества ГВ обнаруживаются через 24 и более часов после взаимодействия ГВ с растениями. Это свидетельствует, во-первых, о способности ГВ передвигаться по растениям с ксилемным током, а, во-вторых, что в течение первого часа поступления ГВ в сосудистую систему растений не происходит.

Обработки полученных автордиограмм (табл. 7.5) подтверждают выводы, сделанные на основе визуального анализа.



Рисунок 7.10. Авторадиограммы корней (вверху) и побегов (внизу) растений пшеницы, полученные после различного времени взаимодействия с ГК угля ^3H -СНА-Ров. Продолжительность экспозиции для корней составила 5 сут. 10 мин, для побегов – 97 сут 22 ч.

Таблица 7.5. Оптические плотности D корней и побегов растений пшеницы после различного времени взаимодействия с ГК угля ^3H -СНА-Ров. Продолжительность экспозиции для корней составила 5 сут. 10 мин, для побегов – 97 сут 22 ч.

	Время взаимодействия					
	5 мин	10 мин	20 мин	60 мин	24 ч	48 ч
Корни	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.33 ± 0.06	0.35 ± 0.08
Побеги	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.05	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.03

\pm – стандартное отклонение

Как видно из приведенных в табл. 7.5 результатов, значимое содержание ГК в побегах пшеницы было обнаружено только после 24 ч взаимодействия, т.е. передвижения ГК по растениям в течение первого часа, по-видимому, не происходит.

7.3.4.2. Оценка возможности перемещения ГВ в растениях с ксилемным и флоэмным токами

Как следует из наших экспериментов, стадия I для ГВ длится, по крайней мере, 1 ч, сменяясь затем стадией «стационарного» поглощения. В тоже время обычно продолжительность стадии обратимого поглощения для ионов составляет не более 15 мин. По-видимому, можно предположить, что непосредственно перед поглощением ГВ растениями происходит их предварительная трансформация на поверхности корней или в непосредственной близости от них. После поглощения ГВ поступают в ксилему, о чём свидетельствует обнаружение метки в надземных частях растений.

Для проверки возможности поступления ГВ во флоэму, нами дополнительно были проведены эксперименты, подразумевающие помещение в раствор ФК вод и ^3H -АНА-SR и ГК угля ^3H -СНА-Pow не корней, а листьев растений. В остальном постановка экспериментов, получение и обработка автордиограмм были аналогичны описанным выше способам.

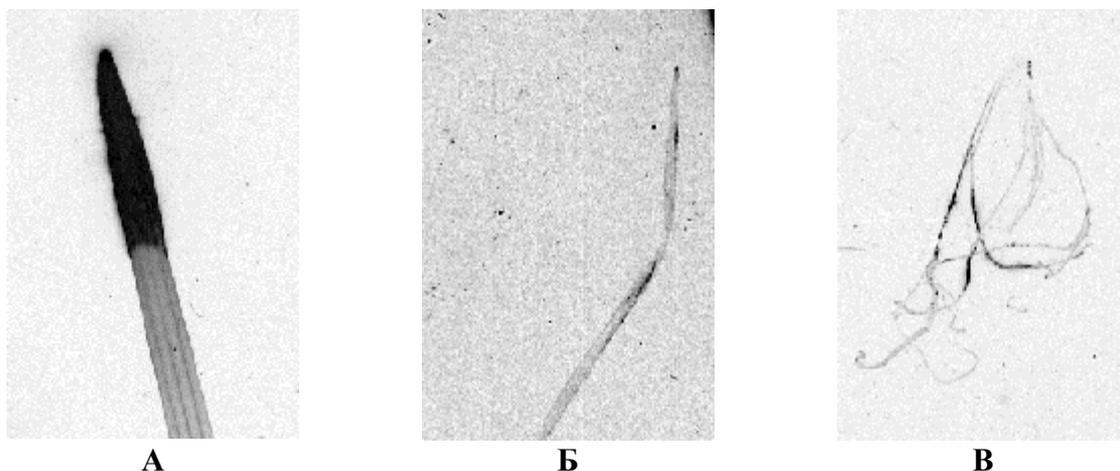


Рисунок 7.11. Автордиограммы 1-го (А) и 2-го (Б) листьев пшеницы и корней (В), полученные после взаимодействия с ФК ^3H -FHA-SR. Экспозиция: А – 13 ч 20 мин; Б – 7 сут 2 ч 30 мин; В – 66 сут 20 ч.

Полученные автордиограммы (рис. 7.11) показали возможность поступления ГВ во флоэму. При этом метка была обнаружена не только

непосредственно в листе, находившимся в контакте с раствором с мечеными ГВ, но также во втором листе (рис. 7.11Б) и корнях (рис. 7.11В). Это свидетельствует о способности ГВ поступать в растения через листья и перемещаться с флоэмным током.

Таким образом, нами было показано, ГВ поглощаются растениями как через корни, так и через листья; перемещение ГВ в растениях может осуществляться как с ксилемным, так и флоэмным током. При этом при поступлении ГВ в растения через корни их поглощение, как и поглощение индивидуальных веществ и ионов, подчиняется двухстадийному закону; тем не менее, важным обнаруженным отличием является большая продолжительность первой обратимой стадии. Следующим этапом нашей работы было изучение кинетики поглощения ГВ растениями.

7.3.4.3. Кинетика поглощения ГВ с растениями

Изучение кинетики поглощения ГВ растениями проводили с использованием шести препаратов ГВ различного происхождения и фракционного состава: в выборку были включены ГК угля, ГК и ФК торфа, ФК вод и два препарата ГМК угля. Выбор препаратов был обусловлен тем, они характеризуются максимальным разнообразием свойств в классе ГВ (табл. 1.7). Так, ГК угля обладают наибольшим содержанием ароматических структур и наименьшим содержанием кислородсодержащих функциональных групп. С другой стороны, ФК вод характеризуются наименьшим содержанием ароматических структур и наибольшим – функциональных групп. Время взаимодействия было выбрано на основании проведенных экспериментов по зависимости поглощения ГВ от времени экспонирования и составило 24 ч.

Результаты проведенных экспериментов приведены на рис. 7.12.

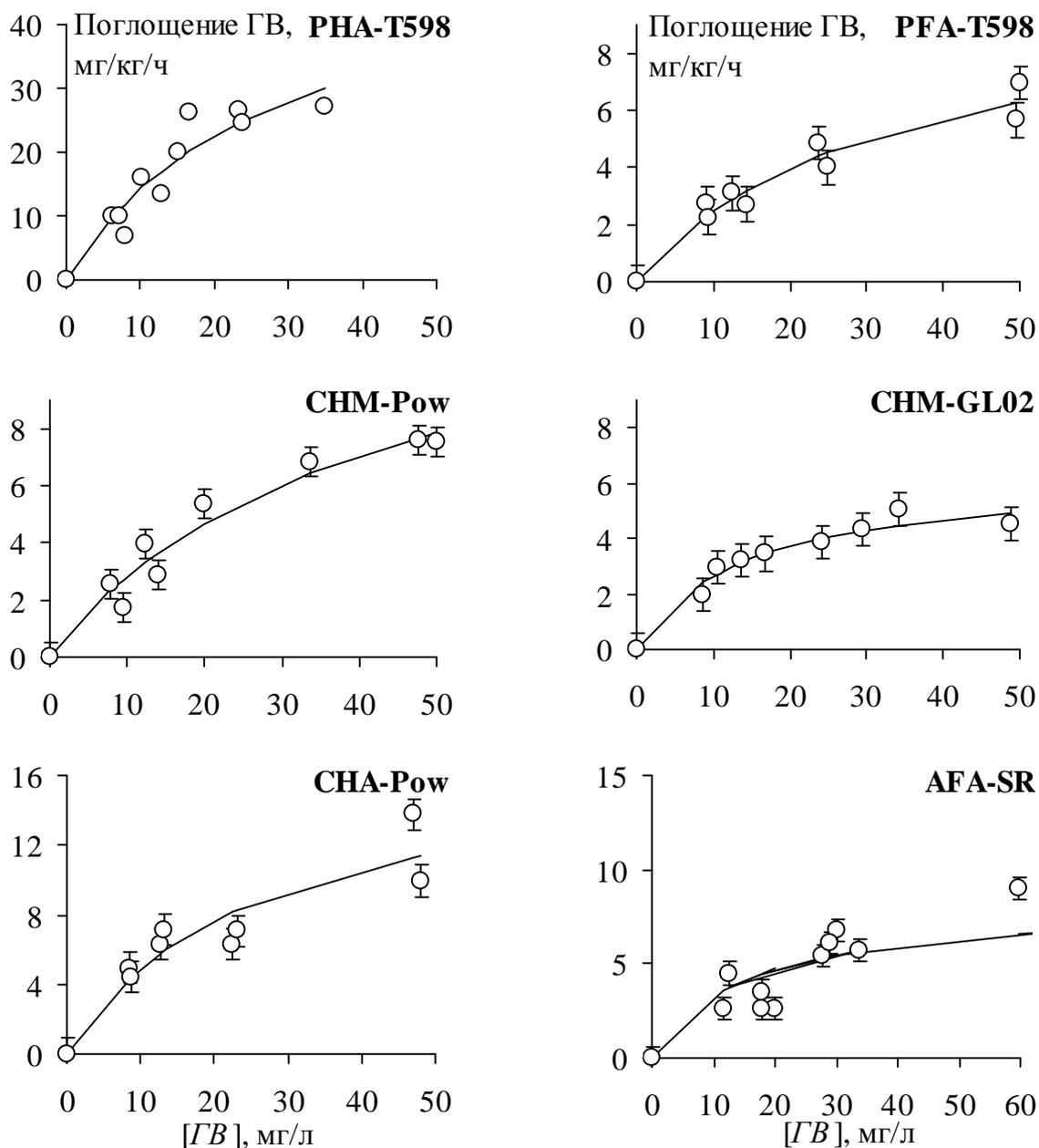


Рисунок 7.12. Кинетика поглощения ГВ различного происхождения растениями пшеницы.

Полученные кинетические зависимости поглощения ГВ аппроксимировали уравнением Михаэлиса-Ментен, обычно используемым для этих целей:

$$V = \frac{V_{\max} [C]}{K_m + [C]} \quad (7.5)$$

где V – скорость поглощения вещества; $[C]$ – концентрация вещества в растворе; V_{\max} – максимальная скорость поглощения; K_m – константа Михаэлиса, отражающая концентрацию вещества, при которой наблюдается половинная от максимальной скорость поглощения. Значения параметров уравнения Махаэлиса-Ментен для использованных ГВ приведены в табл. 7.6. Высокие значения

коэффициентов детерминации (табл. 7.6) свидетельствуют о том, что наблюдаемая кинетика поглощения ГВ удовлетворительно описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, что позволяет высказать предположение об активном поглощении ГВ растениями.

Таблица 7.6. Кинетика поглощения ГВ различного происхождения растениями пшеницы

Препарат ГВ	Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен		R^2
	K_m , мг/л	V_{max} , мг/кг/ч	
СНА-Pow	25±5	17±3	0.96
PFA-T5H98	32±6	10±3	0.98
PНА-T5H98	28±7	54±8	0.91
СНМ-Pow	40±9	14±5	0.96
СНМ-GL02	14±5	6±2	0.97
AFA-SR	15±4	8±2	0.90

± – стандартное отклонение.

Полученные численные характеристики поглощения ГВ растениями пшеницы показали невысокую скорость их поступления. Так, если принять за молекулярную массу средневесовую молекулярную массу, определяемую методом эксклюзионной хроматографии (табл. 1.11), то диапазон значений константы Михаэлиса K_m (концентрация ГВ, при которой наблюдается половинная от максимальной скорости поглощения) составит 2.1-7.0 мкмоль/л, что сопоставимо со значениями этой константы для других веществ, которая варьируется в пределах от 0.02 до 120 мкмоль/л. С другой стороны, максимальная скорость поглощения ГВ была значительно меньше таковой, наблюдаемой для других веществ: диапазон для ГВ составил 0.9-4.2 нмоль/г/ч, тогда как обычно аналогичные величины составляют обычно десятки-сотни нмоль/г/ч (рис. 7.13).

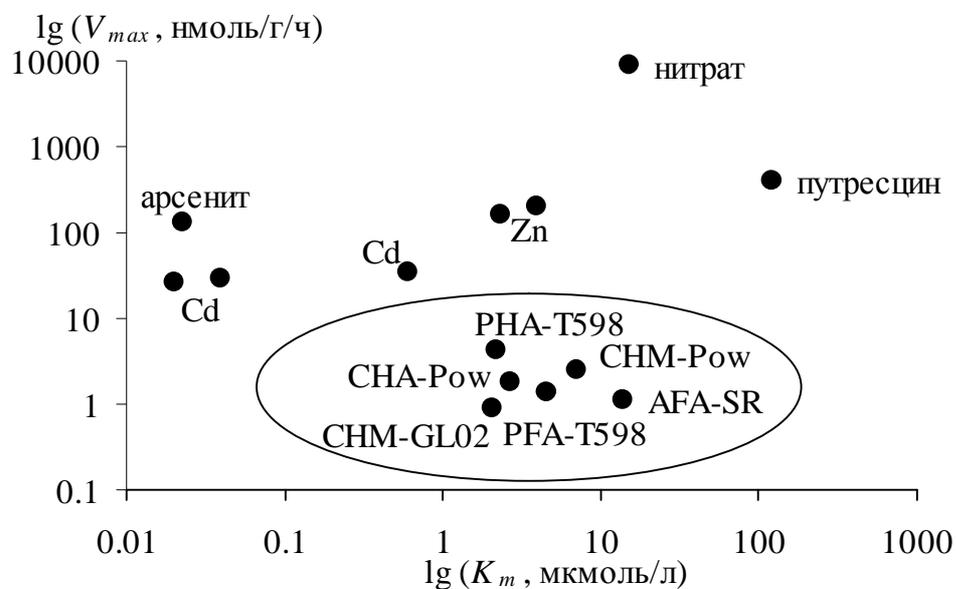


Рисунок 7.13. Параметры кинетики поглощения ГВ различного происхождения и других веществ.

Можно высказать два основных предположения о причинах наблюдаемой низкой скорости поглощения ГВ. Прежде всего, низкая скорость поглощения ГВ может быть обусловлена большими молекулярными размерами ГВ, что затрудняет их передвижение по растению. Однако данные, свидетельствующие о том, что скорость поглощения ФК меньше, чем ГК противоречат этому предположению, так как размер ФК меньше, чем ГК. Другое возможное объяснение – это то, что ГВ могут поступать не в неизменном в виде, а лишь после предварительной частичной трансформации на поверхности корней растений или непосредственно в растворе под действием выделяемых корнями экссудатов. Несмотря на непротиворечивость высказанного предположения, его проверка требует проведения дополнительных экспериментов.

Для контроля за изменениями, происходящими в процессе поглощения растениями с ГВ, проводили гель-хроматографический анализ растворов ГВ до и после взаимодействия с растениями. Результаты приведены на рис. 7.14.

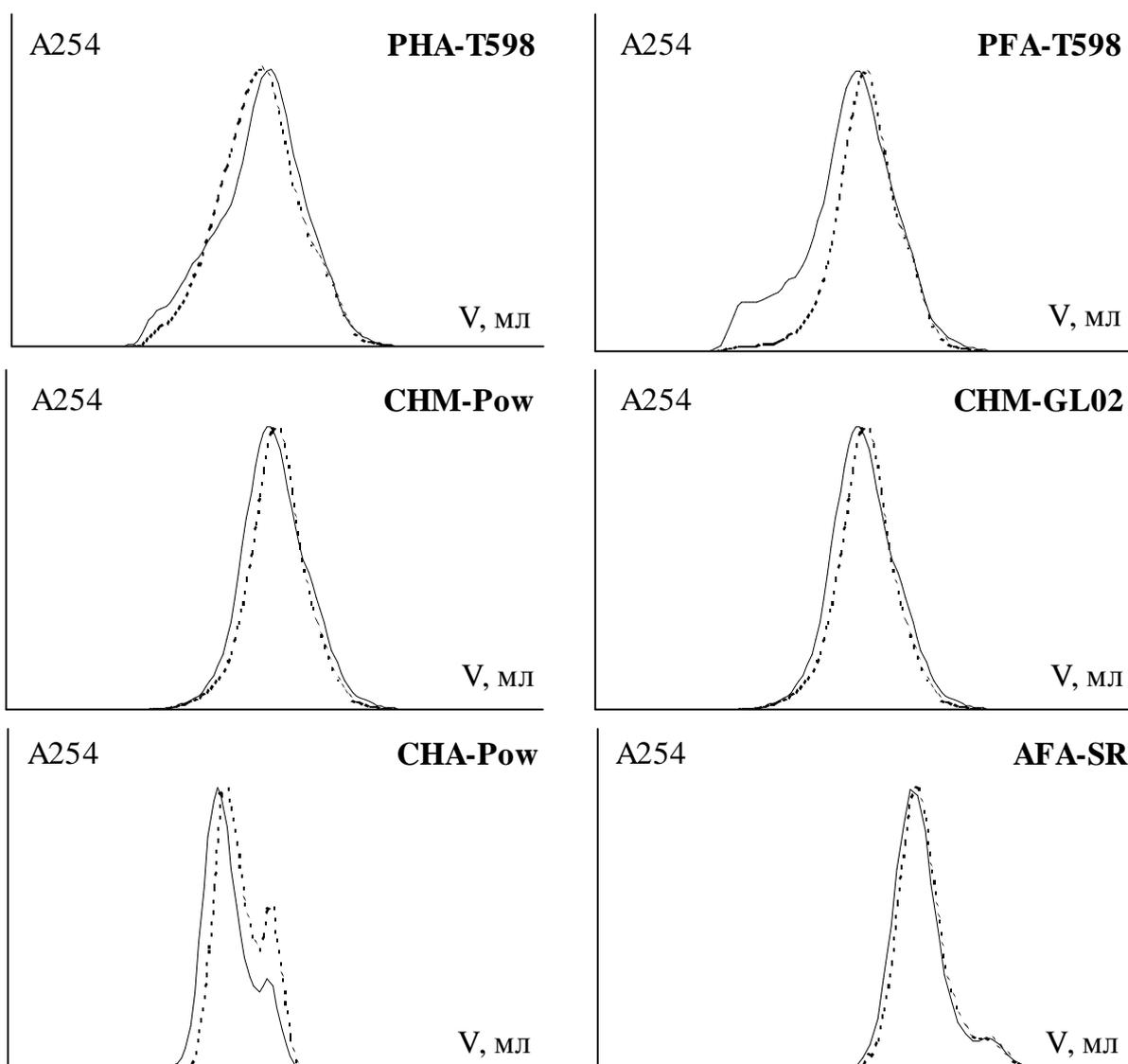


Рисунок 7.14. Гель-хроматограммы растворов ГВ различного происхождения до и после взаимодействия с растениями; детекция по УФ поглощению при 254 нм.

Полученные результаты проведённого гель-хроматографического анализа (рис. 7.14) показали, что видимого снижения концентрации ГВ в растворах после их взаимодействия с растениями не происходит. По-видимому, это связано с тем, что при проведении экспериментов растения выделяют экссудаты – органические соединения со сходным ГВ гель-хроматографическим поведением. Высказанное предположение было подтверждено исследованием контрольных растворов, представлявших собой дистиллированную воду после нахождения в ней растений в течение 24 ч (рис. 7.15).

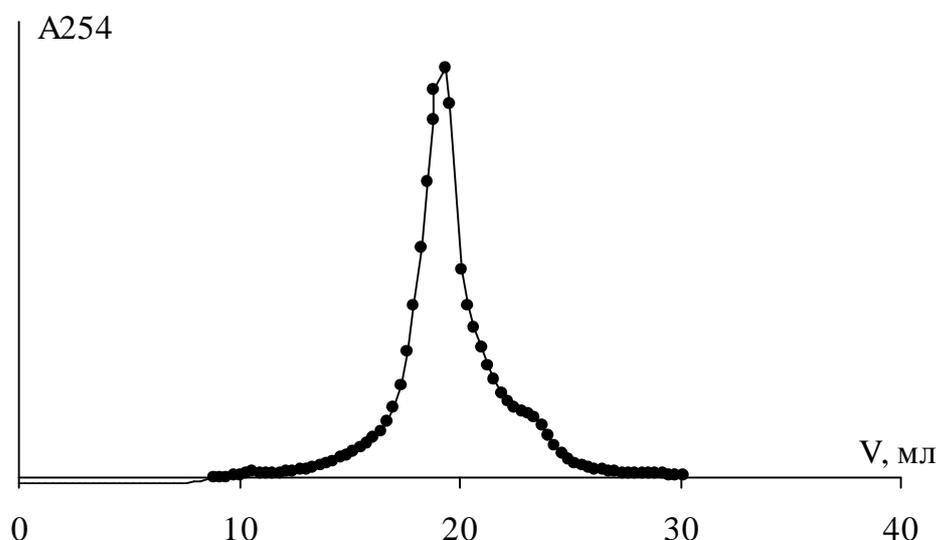


Рисунок 7.15. Гель-хроматограмма экссудатов, выделяемых растениями пшеницы, детекция по УФ поглощению при 254 нм.

Как видно из представленного рис. 7.15, при нахождении корней растений пшеницы в воде в течение 24 ч появляются органические соединения, гель-хроматографическое поведение которых сходно с поведением ГВ. Это в значительной степени затрудняет интерпретацию данных гель-хроматографии, получаемых при детекции по УФ-поглощению.

Известно, что корневые экссудаты растений представляют собой сложную смесь органических кислот, фитосидерофоров, сахаров, витаминов, аминокислот, пуринов, нуклеозидов, неорганических ионов (HCO_3^- , OH^- , H^+) и ферментов, оказывающих значительное влияние на поступление элементов питания в растения [Dakkora, Phillips, 2002]. Среди ферментов, обнаруженных в корневых экссудатах обнаружены кислые и щелочные фосфатазы, инвертазы, амилазы и протеазы [Dakora, 2003; Dakora, Phillips, 2002; Bais et al., 2004]. Можно предположить, что под действием ферментов происходит частичная деградация ГВ. Поэтому для образцов ФК вод и ^3H -АНА-SR и ГК угля ^3H -СНА-Pow нами также был проведён гель-хроматографический анализ растворов с детекцией по радиоактивности (рис. 7.16).

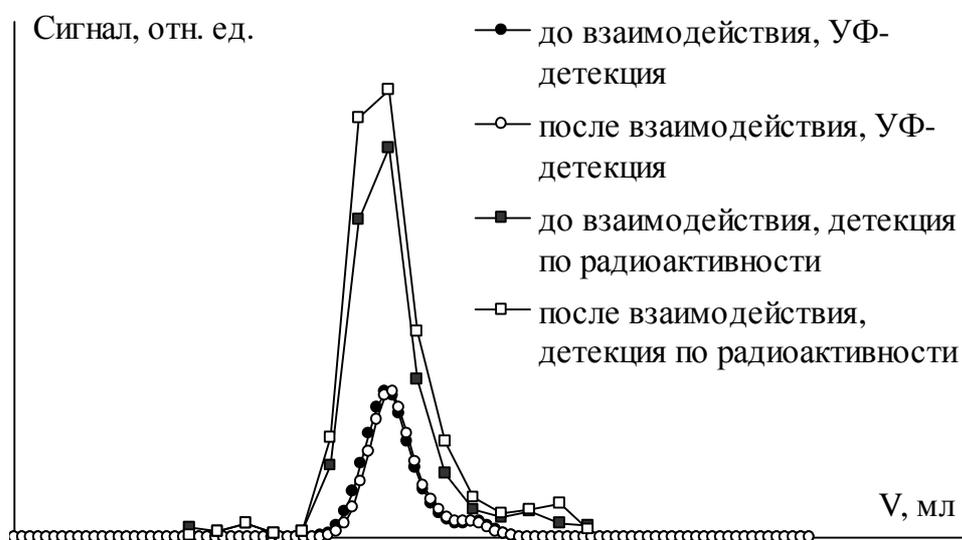


Рисунок 7.16. Гель-хроматограммы ФК вод AFA-SR до и после взаимодействия с растениями пшеницы с детекцией по УФ-поглощению при 254 нм и радиоактивности.

Как видно из рис. 7.16, при детекции элюата как по УФ-поглощению при 254 нм, так и по радиоактивности, значимых изменений в хроматограммах ФК до и после взаимодействия не происходит. Таким образом, выявить специфическое поглощение какой-либо фракции ГВ корнями растений пшеницы на основании гель-хроматографического анализа не удалось.

7.3.4.4. Взаимосвязь структурных характеристик ГВ с кинетикой их поглощения растениями

Сопоставление кинетики поглощения ГВ с их свойствами показало, что скорость поступления ГВ в значительной степени определяется гидрофобностью (рис. 7.17) и молекулярной массой ГВ (рис. 7.18).

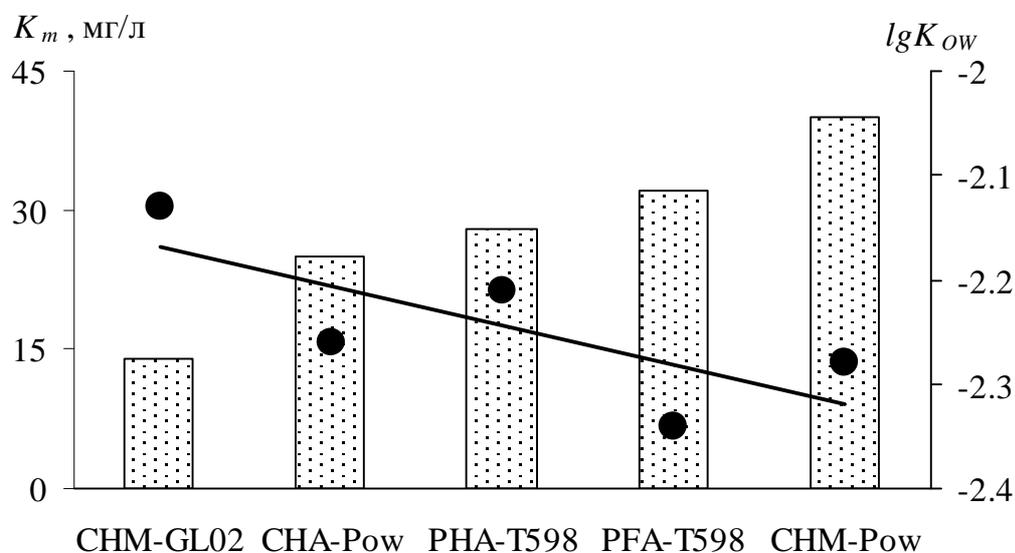


Рисунок 7.17. Зависимость константы Михаэлиса K_m поглощения растениями пшеницы ГВ различного происхождения от их гидрофобности.

Как видно из представленной на рис. 7.17 зависимости, K_m находилась в обратной зависимости от гидрофобности ГВ, т.е. при увеличении гидрофобности ГВ концентрация, при которой наблюдали половинную от максимальной скорость поглощения ГВ наступала раньше.

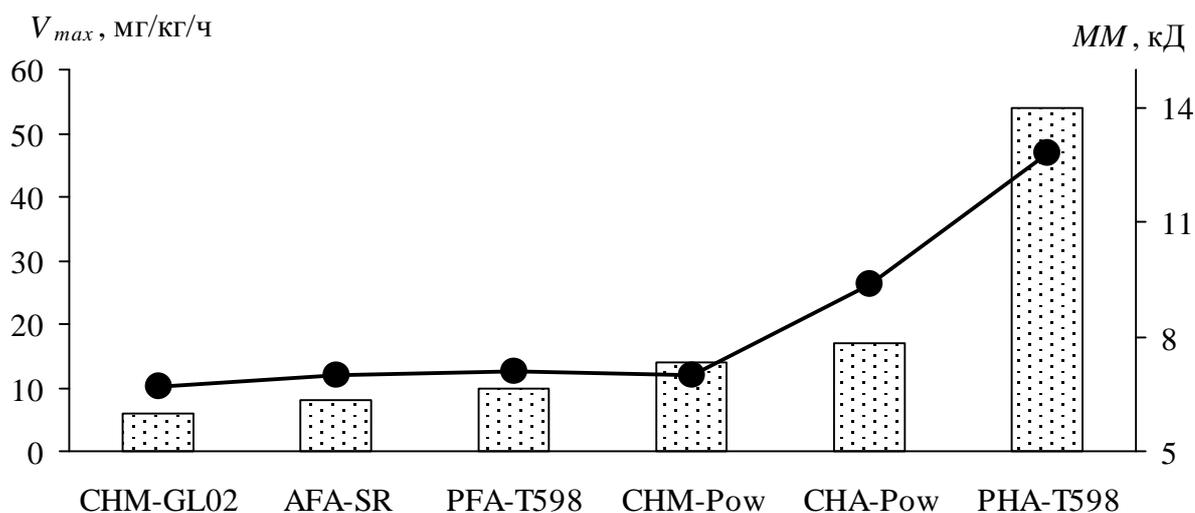


Рисунок 7.18. Зависимость константы максимальной скорости V_{max} поглощения растениями пшеницы ГВ различного происхождения от их молекулярной массы.

С увеличением молекулярной массы ГВ наблюдали рост V_{max} (рис. 7.18). Это на первый взгляд кажущееся противоречие мы объясняем тем, что, как было показано нами выше, поглощение ГВ в значительной степени обусловлено их адсорбцией на поверхности корней, которое увеличивается с возрастанием молекулярной массы ГВ. Следует, однако, подчеркнуть, что обнаруженная

зависимость не получила прямого подтверждения при изучении поглощения высокомолекулярных фракций ГВ. Для проведения экспериментов использовали высокомолекулярные (больше 12 кД) фракции ГК и ФК торфа РНА-Т598 и РФА-Т598, получаемые путём диализа препаратов через мембраны с размером пор 12 кД.

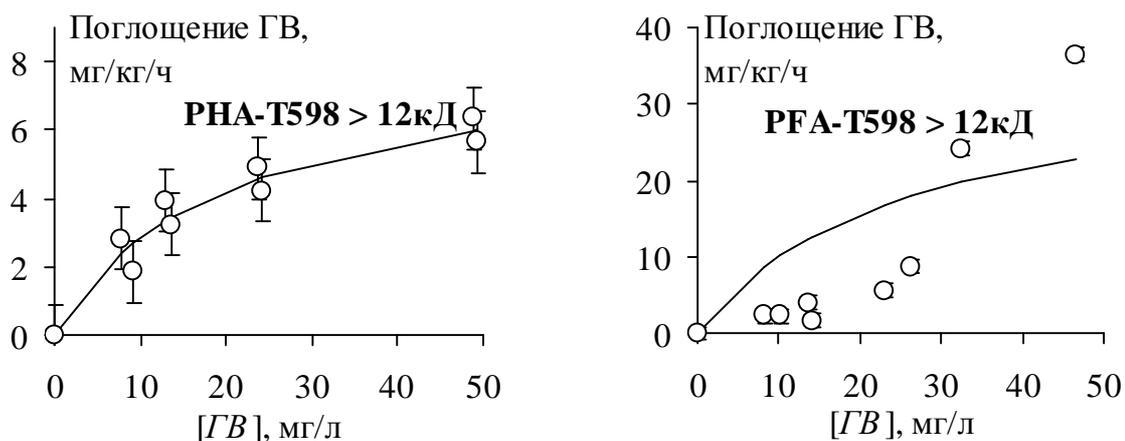


Рисунок 7.19. Кинетика поглощения высокомолекулярных фракций ГК и ФК торфа РНА-Т598 и РФА-Т598 растениями пшеницы.

Рассчитанные значения параметров уравнения Михаэлиса-Ментен для высокомолекулярных фракций приведены в табл. 7.7.

Таблица 7.7. Кинетика поглощения высокомолекулярных фракций (ВМФ) ГК и ФК торфа РНА-Т598 и РФА-Т598 растениями пшеницы

Препарат ГВ	Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен		R^2
	K_m , мг/л	V_{max} , мг/кг/ч	
ВМФ РНА-Т5Н98	20 ± 3	8 ± 2	0.97
ВМФ РФА-Т5Н98	25 ± 6	35 ± 3	0.55

\pm – стандартное отклонение.

Как видно из рис. 7.19 и табл. 7.7, для высокомолекулярной фракции ГК торфа наблюдали снижение максимальной скорости поглощения V_{max} с 54 до 8 мг/кг/ч, тогда как для высокомолекулярной фракции ФК торфа – повышение этого показателя с 10 до 35 мг/кг/ч. Это свидетельствует о том, что в определении поглощения ГВ растениями важную роль играет не просто молекулярная масса ГВ, но также и структурные особенности препаратов. Так, при диализе ФК торфа можно было ожидать, что происходит относительное обогащение препарата ароматическими структурами за счёт снижения количества углеводных

фрагментов, входящих в периферическую часть. Это, в свою очередь приводило к повышению гидрофобности препарата и усилению его поверхностно-активных свойств, о чём свидетельствует возрастание логарифма октанольно-водного коэффициента до -1.5 параметра G_{max} до 1.3 (табл. 7.8). С другой стороны, при диализе ГК торфа происходило, по-видимому, уменьшение количества низкомолекулярных ароматических фрагментов ГВ, что вызвало уменьшение поверхностно-активных свойств: параметра G_{max} уменьшился до 1.2 мг/м² (табл. 7.8).

Таблица 7.8. Логарифмы октанольно-водного коэффициента lgK_{ow} и максимальная адсорбция ГВ на границе раздела фаз толуол-вода G_{max} для высокомолекулярных фракций (ВМФ) ГК и ФК торфа РНА-Т598 и РФА-Т598

ГВ	lgK_{ow}	G_{max} , мг/м ²
ВМФ РФА-Sk300	-1.50	1.30
ВМФ РНА-Sk300	-2.42	1.20

При этом следует подчеркнуть, что в случае с высокомолекулярной фракцией ФК полученная кинетическая зависимость поглощения растениями пшеницы неудовлетворительно описывалась уравнением Михаэлиса-Ментен – коэффициент детерминации составил 0.55 , что свидетельствует, по-видимому, о другом механизме поглощения, чем наблюдали для остальных препаратов ГВ.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что характер поглощения ГВ в целом сходен с поглощением ионов. При этом среди особенностей поглощения ГВ следует выделить их низкую максимальную скорость поступления в растения и зависимость от гидрофобности. Следующим этапом работы стало изучение распределения ГВ в растениях.

7.3.5. Исследование распределения ГВ в растениях

7.3.5.1. Изучение распределения ГВ в растениях методом автордиографии

Изучение распределения ГВ в растениях проводили на примере препаратов ФК почв АНА-SR и ГК угля СНА-Pow с использованием метода автордиографии.

Эксперименты проводили при начальной концентрации ГВ 50 мг/л с удельной радиоактивностью 0.54 мКи/мл.

Результаты автордиографии (рис. 7.20) показали неравномерность распределения ГВ в растениях: ГВ преимущественно находились в корнях, тогда как в побеги поступало значительно меньшее количество.



Рисунок 7.20. Распределение ГК угля ^3H -СНА-Ров (слева) и ФК вод ^3H -АНА-SR (справа) в растениях пшеницы по результатам тритиевой автордиографии. Время экспонирования 1 с 20 ч 30 мин.

Считая, что оптическая плотность D на автордиограммах прямо пропорциональна концентрации метки и времени экспонирования, можно рассчитать отношение концентраций ГВ в корнях к концентрации ГВ в побегах как отношение оптических плотностей в этих частях растений, нормированное на время экспонирования. В исследованных нами условиях указанное отношение

составило 40.7 ± 0.3 для ГК угля и 10 ± 2 для ФК вод, т.е. концентрация ГК в побегах в среднем превышала таковую в корнях в 40, а ФК – в 10 раз. С учётом массы корней и побегов растений можно рассчитать, что для ГК угля в корнях аккумулируется в 22 раза больше вещества, чем в побегах; для ФК аналогичный показатель составляет 5. Это свидетельствует о том, что ФК способны поступать из корней в надземные органы растений в большей степени, чем ГК.

Нами было установлено, что распределение ГК по корням и побегам также неоднородно. В апикальных частях как корней, так и побегов наблюдали локальное увеличение концентрации ГВ (рис. 7.21).

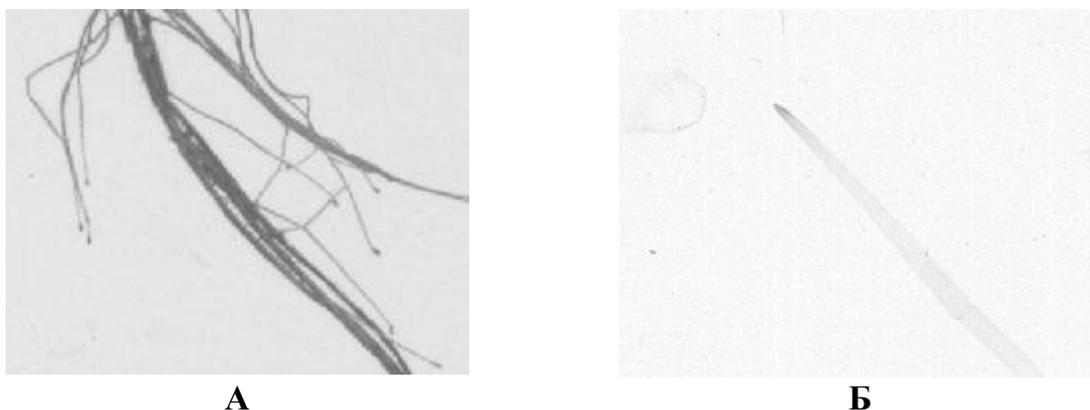


Рисунок 7.21. Преимущественное накопление ГК угля ^3H -СНА-Ров в апикальных частях корней (А) и побегов (Б) растений пшеницы по результатам тритиевой автордиографии. Время экспонирования: корни 4 с 21 ч 45 мин; побеги 1 с 20 ч 30 мин.

Обработка автордиограмм показала, что оптическая плотность в кончиках корней в среднем превышала таковую в среднем по корню в 2 раза; аналогичное отношение для побегов составило 8 (табл. 7.9).

Таблица 7.9. Оптические плотности D различных частей корней и побегов растений пшеницы после взаимодействия с ГК угля ^3H -СНА-Ров и ФК вод ^3H -АНА-SR. Экспозиция: корни 5 сут. 10 мин, побеги 1 сут 20 ч 30 мин.

ГВ	Корни			Побеги		
	Корни	Апексы	$\frac{D_{\text{апексы}}}{D_{\text{корни}}}$	Побеги	Апексы	$\frac{D_{\text{апексы}}}{D_{\text{побеги}}}$
СНА-Ров	0.38 ± 0.02	1.06 ± 0.03	2.8	0.02 ± 0.01	0.14 ± 0.01	9.7
АНА-SR	0.43 ± 0.02	0.52 ± 0.02	1.2	0.05 ± 0.01	0.33 ± 0.01	7.0

\pm – стандартное отклонение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о преимущественном накоплении ГВ в апикальных частях растений. Ранее

аналогичные результаты были получены Фокиным для меченных по углероду гуминоподобных веществ [Фокин и др., 1975], однако для природных ГВ неравномерность их распределения в растениях показана впервые.

7.3.5.2. Сопоставление распределения ГВ в растениях с растительными гормонами

Из известных в настоящее время веществ преимущественным накоплением в корневых апексах характеризуются растительные гормоны цитокинины, а в апексах побегов – ауксины. Поэтому можно высказать предположение о сходстве распределения ГВ в растениях с растительными гормонами. Однако необходимо отметить и ряд наблюдаемых различий, особенно в отношении цитокининов. Так, повышенная концентрация цитокининов свидетельствует о благополучном развитии корневой системы и отсутствии необходимости в новых корнях. Поэтому цитокинины подавляют рост боковых корней. Для ГВ, в свою очередь, многочисленными исследованиями показан эффект усиления развития боковых корней. Кроме того, зависимость отношения $D_{\text{апексы}}/D_{\text{корни}}$ от времени экспозиции показала, что с увеличением времени взаимодействия ГВ – растения происходит снижение этого показателя (рис. 7.22). Обнаруженная тенденция свидетельствует, по-видимому, о том, что повышенная концентрация ГВ в апексах корней обусловлена не их накоплением, а тем, что поступление ГВ осуществляется преимущественно через эти зоны корня.

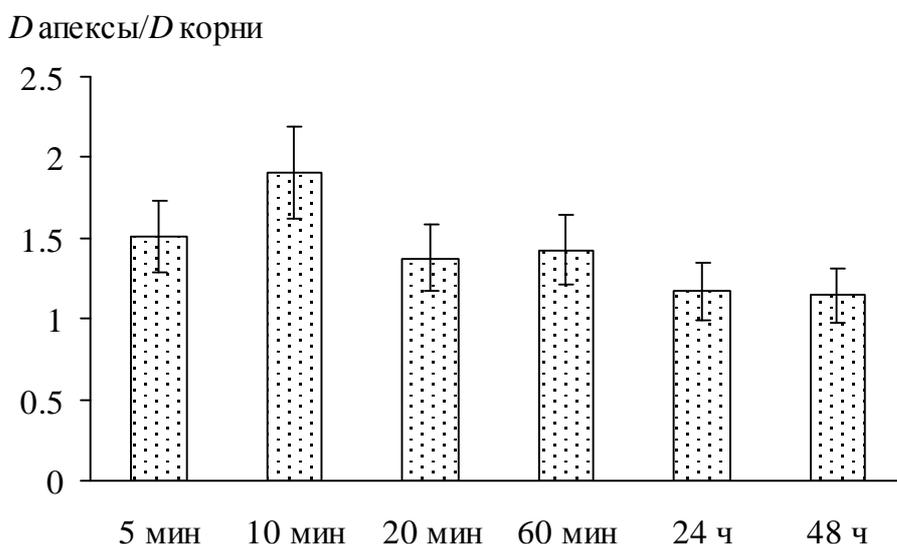


Рисунок 7.22. Зависимость отношения $D_{\text{апексы}}/D_{\text{корни}}$ от времени экспозиции.

Ауксины – растительные гормоны, вырабатываемые в апикальных меристемах побегов. Один из основных эффектов ауксина – аттрагирующий – проявляется в зоне активных делений клеток и состоит в «привлечении» в клетки апикальной меристемы сахарозы, аминокислот, нуклеотидов, неорганических ионов и воды. Ауксин влияет и на корневую систему: повышенное количество ауксинов является сигналом о росте побегов, для обеспечения роста которых растение образует дополнительные придаточные главные корни (ризогенез). Таким образом, нельзя не отметить установленного сходства между ауксинами и ГВ.

Химические вещества, обладающие свойствами растительных гормонов, привлекают внимание исследователей ещё с начала 20 века, и ауксины, наряду с гиббереллинами и цитокининами, относятся к основному классу таких веществ. Механизм их действия на растения до сих пор окончательно не установлен, хотя показано, что они действуют непосредственно на процессы клеточного роста [Syltie, 1985].

Растительные гормоны могут синтезироваться непосредственно растениями или почвенными микроорганизмами, при этом особая роль отводится микроорганизмам, обитающим в ризосфере. Так как предшественниками ГВ являются продукты разложения растительных и животных остатков, подвергшихся микробиологическому воздействию, они также могут проявлять фитогормональную активность. Действительно, в серии работ начиная с 1914 г. [Bottomley, 1914a, 1914b; Paszewski et al., 1957; O'Donnel, 1973; Azam, Malik, 1982; Cacco, Dell'Agnola, 1984] была продемонстрирована ауксиноподобная активность ГВ. Однако наблюдаемый эффект был значительно ниже, чем при использовании растительных гормонов, что привело исследователей к заключению об отсутствии гормоноподобной активности ГВ.

С другой стороны, наличие гормоноподобной активности ГВ в последнее время получило косвенные подтверждения благодаря ряду экспериментов, показавших наличие высокой гормональной активности у определённых фракций ГВ [Cacco, Dell'Agnola, 1984; Dell'Agnola, Nardi, 1987; Piccolo et al., 1992], особенно низкомолекулярных фракций гуминоподобных веществ (ГПВ) [Muscolo et al., 1993]. Дальнейшие эксперименты показали также способность низкомолекулярных фракций ГПВ связываться с мембранным рецептором,

являющимся специфическим для индолилуксусной кислоты (ИУК), производными которых являются ауксины [Muscolo et al., 1993]. Несмотря на это, до сих пор не существует прямых доказательств того, что действие ГВ обусловлено именно наличием в них растительных гормонов. Концентрация ИУК в ГВ, определённая методом иммуноферментного анализа, составила от 0.5 до 3.7% (масс.) [Muscolo et al., 1988], что доказывает наличие гормоноподобных фрагментов в структуре ГВ. Другими исследователями [Young, Galston, 1983] было продемонстрировано наличие в ГВ полиаминов – регуляторов роста растений. Определённые ими концентрации путресцина, спермидина и спермина составили 1.54-7.00, 0.39-3.88, 0.48-4.79 нМ/г соответственно.

Вне зависимости от того, какие именно структурные фрагменты представлены в ГВ, последние можно рассматривать как «хранилище» гормоноподобных веществ. При этом следует учитывать важную роль корневых экссудатов, влияющих на высвобождение гормоноподобных веществ из ГВ [Muscolo et al., 1988].

Наши эксперименты, проведённые с колеоптилями мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. также показали стимулирующую активность ГВ угля [Kulikova et al., 2003]. Исследованные ГВ включали в себя ГК, ГМК, бурые и серые ГК и их сумму. Для оценки ауксиноподобной активности ГВ семена пшеницы проращивали в темноте при 25°C в течение 72 ч. Затем от проростков пшеницы отрезали колеоптили сходной длины (около 5 мм) и насаживали их на стеклянные капилляры (3 колеоптиля на капилляр). При этом верхнюю часть колеоптилей предварительно удаляли для того, чтобы избежать влияния эндогенных ауксинов. После этого измеряли общую длину колеоптилей на капилляре и помещали капилляры с колеоптилями в чашки Петри с испытуемыми растворами. В качестве контроля использовали 5 мМ К-фосфатный буфер при pH 6.0. Колеоптили выращивали в течение 72 ч при 25°C после чего снова измеряли длину колеоптилей. Тест-откликом служило увеличение длины колеоптилей. Результаты представлены на рис. 7.23.

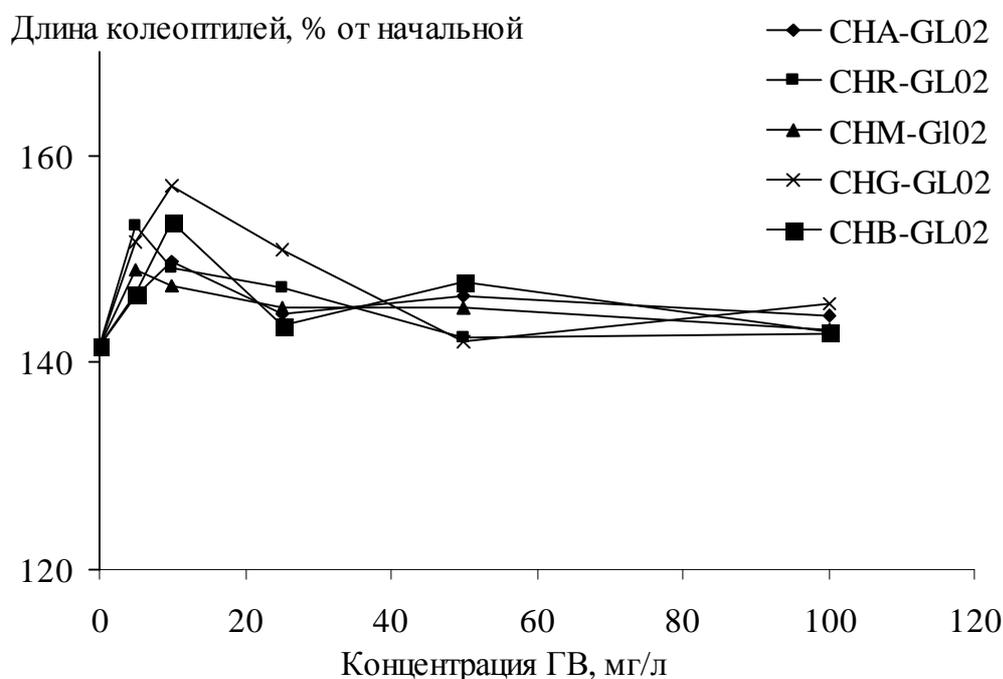


Рисунок 7.23. Влияние ГВ угля на рост coleoptилей пшеницы.

Как видно из рис. 7.23, все исследованные препараты ГВ обладали ауксиноподобной активностью. Максимальный стимулирующий эффект $156 \pm 9\%$ наблюдали при 10 мг/л для серых ГК угля, обладающего самым низким содержанием карбоксильных групп и самой большой молекулярной массой. Наименее выраженная активность была отмечена для препарата гиматомелановых кислот, характеризовавшегося самым высоким содержанием алкокси $C_{\text{АлКО}}$ и метокси CH_3O групп и наименьшей молекулярной массой. Статистическая обработка данных показала наличие прямой отрицательной корреляции ($r = -0.96$, $P = 95\%$) между содержанием в ГВ карбоксильных групп и величиной их гормоноподобной активности. Принимая во внимание определяющую роль карбоксильных групп в формировании отрицательного заряда ГВ и наличие отрицательного заряда на клеточной поверхности, можно высказать предположение, что проявляемая ГВ ауксиноподобная активность зависела от их сорбции на coleoptилях.

В последнее время особое внимание уделяется роли ауксина в способности растений адаптироваться к различным видам стрессов, как биотических, так и абиотических. Рядом работ было установлено, что как в присутствии патогенов [O'Donnell et al., 2003; Park et al., 2007], так и в условиях физико-химических стрессов происходит усиление поглощения экзогенных ауксинов [Park et al., 2007].

Поэтому следующим этапом нашей работы было изучение поглощения ГВ в условиях различных абиотических стрессов.

7.3.6. Сравнительная оценка поглощения и распределения ГВ в растениях в оптимальных и стрессовых условиях

Сравнительное изучение поглощения ГВ исследовали для следующих стрессовых условий: повышенная (35°C) и пониженная (4°C) температуры, избыточное и недостаточное освещение и солевой стресс, создаваемый с помощью 0.6 М NaCl (табл. 7.10). Эксперименты проводили на примере препарата ГК угля СНА-Ров. Концентрация ГК составляла 50 мг/л с начальной удельной радиоактивностью 16 мКи/л; время воздействия стресса 24-48 ч.

Таблица 7.10. Описание вариантов, использованных в работе при изучении поглощения ГВ в условиях абиотических стрессов

Вариант	Время действия стресса, ч	Температура	Освещение
Контроль	–	24°C	12 ч освещение / 12 ч темнота
Повышенная температура	24	35°C	12 ч освещение / 12 ч темнота
Пониженная температура	24	4°C	12 ч освещение / 12 ч темнота
Отсутствие света	48	24°C	48 ч в темноте
Постоянное освещение	48	24°C	48 ч на свету
0.6 М NaCl	48	24°C	12 ч освещение / 12 ч темнота

Для проведения экспериментов семена пшеницы предварительно проращивали на дистиллированной воде в течение 72 ч при 24°C. Затем проростки пшеницы переносили для дальнейшего роста на питательную среду Кноппа при рН 5.5. Одиннадцатидневные растения пшеницы помещали в растворы ГК и помещали в стрессовые условия (табл. 7.10), а через 48 ч проводили учет биомассы

растений и по снижению радиоактивности определяли концентрацию ГК, поглощенных растениями. Далее растения подвергали автордиографии. Полученные результаты представлены на рис. 7.24 и 7.25.

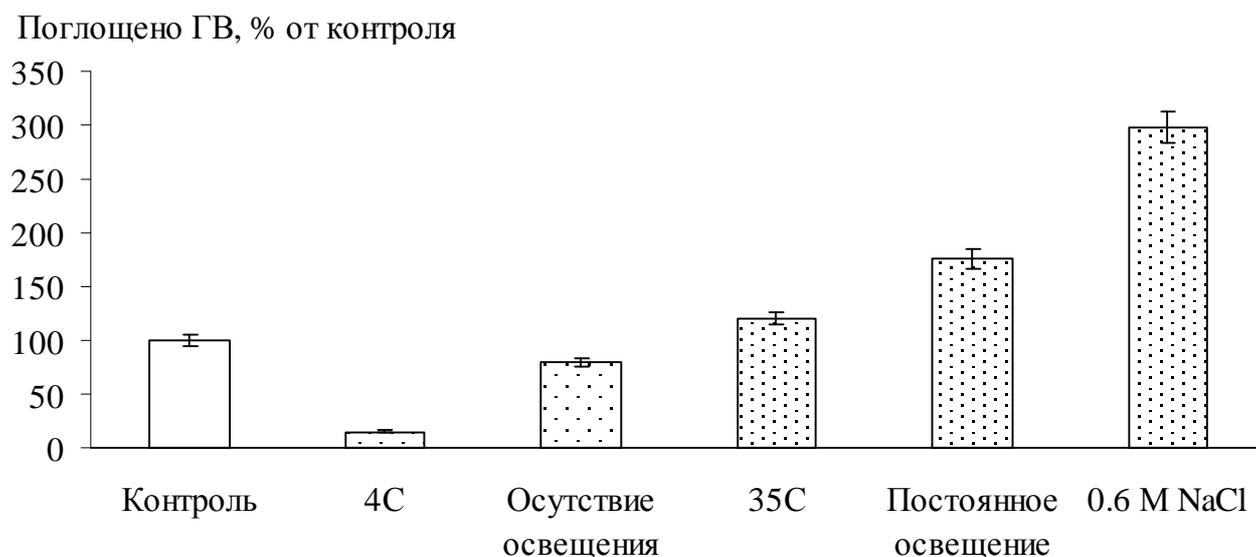


Рисунок 7.24. Поглощение ГК угля СНА-Pow в оптимальных и стрессовых условиях.

Как видно из рис. 7.24, поглощение ГК в значительной степени зависело от внешних условий. В зависимости от выбранного стресса наблюдали как повышенное, так и уменьшенное поглощение ГВ. Установленные зависимости поглощения ГВ от внешних условий были подтверждены данными автордиографии (рис. 7.25, табл. 7.11).

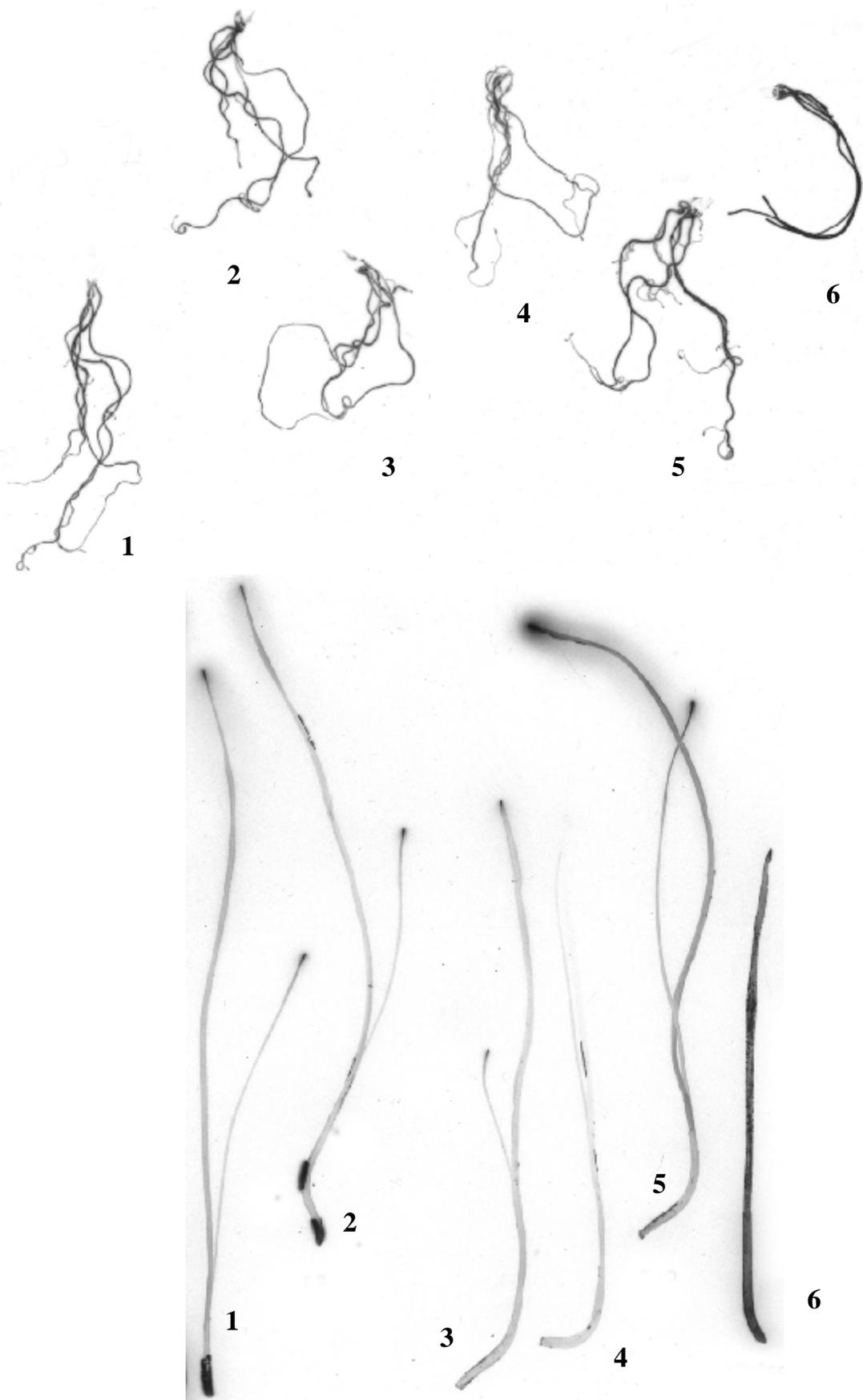


Рисунок 7.25. Поглощение ГК угля СНА-Row корнями (вверху) и побегами (внизу) в оптимальных и стрессовых условиях. 1 – контроль; повышенная температура – 2; пониженная температура – 3; отсутствие света – 4; постоянное освещение – 5; 0.6 M NaCl – 6.

Таблица 7.11. Оптические плотности D корней и побегов растений пшеницы после взаимодействия с ГК угля $^3\text{H-SHA-Pow}$ в оптимальных и стрессовых условиях. Экспозиция: корни 4 сут. 19 ч 30 мин, побеги 95 сут 2 ч

Вариант	$D_{\text{корни}}$	$D_{\text{побеги}}$	$D_{\text{корни}}/D_{\text{побеги}}^*$
Контроль	0.33 ± 0.03	0.07 ± 0.03	40
Повышенная температура	0.37 ± 0.03	0.09 ± 0.03	84
Пониженная температура	0.29 ± 0.04	0.04 ± 0.02	147
Отсутствие света	0.28 ± 0.03	0.03 ± 0.02	166
Постоянное освещение	0.34 ± 0.04	0.12 ± 0.03	57
0.6 М NaCl	0.48 ± 0.04	0.21 ± 0.03	45

* – для расчёта отношения использовали величины оптических плотностей, нормированные на время экспонирования

Максимальное поглощение было отмечено в условиях солевого стресса, а минимальное – при отсутствии света и пониженной температуре. Последнее наблюдение служит подтверждением высказанного нами выше предположение о том, что поглощение ГВ обусловлено активным транспортом, а не пассивной диффузией. Так, выраженное снижение поглощения ГВ, наблюдаемое при температуре 4°C объясняется тем, что в указанных условиях активный транспорт в растениях практически не осуществляется и исчезновение изучаемого вещества из раствора может быть обусловлено только либо наличием его поглощения по механизму пассивной диффузии, либо адсорбцией на поверхности корней.

Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о преимущественном движении ГВ в растениях от корня к побегам по апопластному пути. Так, в нормальных условиях вода и растворённые в ней вещества двигаются из почвенного раствора в клетки эпидермиса и коры. Далее они транспортируются в радиальном направлении к центру корня и затем по ксилеме вверх, в листья [Физиология растений, 2005]. Движение ионов в радиальном направлении корня, так же как и движение воды может осуществляться по апопласту (апопластный путь), и через клетки (от клетки к клетке, симпластный путь).

Значительная часть ионов, передвигающихся в радиальном направлении корня, достигнув эндодермы, вынуждена из-за поясков Каспари пересекать плазмалемму и входить в цитоплазму клеток этой ткани. Часто именно это является основным препятствием для поступления высокомолекулярных соединений в

сосудистую систему растений. Однако в последнее время показано наличие обходных путей (пропускные клетки эндодермы и незрелые ткани кончика корня), позволяющих ионам перемещаться по апопласту. Таким образом, эндодерма не является абсолютным барьером для поступающих в растения веществ, хотя её мембраны и вносят существенный вклад в регуляцию ионных потоков через корень. В условиях водного дефицита и солевого стресса роль апопластного транспорта значительно возрастает, т.к. вещества поступают в растения с массовым потоком воды по градиенту гидростатического давления. Таким образом, зафиксированное нами усиленное поступление ГВ в побеги пшеницы в условиях солевого стресса может свидетельствовать об их преимущественном транспорте именно по апопластному, а не симпластному пути.

Особый интерес представляют полученные результаты о распределении поглощённых ГВ между корнями и побегами растений. Во всех случаях было отмечено увеличение концентрации ГВ в корневых частях растений; максимальное отношение нормированных на время экспонирования оптических плотностей в корнях к аналогичному показателю в побегах наблюдали в вариантах при отсутствии света и пониженной температуре (табл. 7.11). По-видимому, это свидетельствует о том, что в условиях исследованных абиотических стрессов поглощение ГВ обусловлено главным образом их адсорбцией на поверхности корней и в меньшей степени – поступлением в надземные части растений. Обнаруженная зависимость поглощения ГВ в стрессовых условиях указывает на различие в поглощении ГВ и экзогенной ИУК, так как в условиях физико-химических стрессов происходит усиление поглощения экзогенных ауксинов [Park et al., 2007].

Необходимо также отметить, что во всех изученных стрессовых условиях сохранялось отмеченная нами выше преимущественная концентрация ГВ в апикальных частях растений (табл. 7.12)

Таблица 7.12. Оптические плотности D различных частей корней и побегов растений пшеницы после взаимодействия с ГК угля $^3\text{H-SHA-Pow}$ и ФК вод $^3\text{H-ANA-SR}$. Экспозиция: корни 5 сут. 10 мин, побеги 97 сут 22 ч.

Вариант	$D_{\text{апексы}}/D_{\text{корни}}$	$D_{\text{апексы}}/D_{\text{побеги}}$
Контроль	2.80	8.00
Повышенная температура	1.25	4.15
Пониженная температура	1.33	5.90
Отсутствие света	1.00	5.83
Постоянное освещение	1.13	4.48
0.6 М NaCl	1.18	1.87

± – стандартное отклонение

Исключение составил вариант с отсутствием света, где в побегах и их апексах наблюдали одинаковую концентрацию ГВ. В условиях остальных исследованных стрессов отношение концентраций ГВ в апексах к средней варьировалось в пределах 1.13-1.33. Следует отметить, что по сравнению с оптимальными условиями, зарегистрированные значения отношения концентраций ГВ в апексах к средней по побегу были значительно меньше. По-видимому, это свидетельствует о том, что ГВ в стрессовых условиях легче поступает в сосудистую систему растений, что связано с активизацией транспорта по апопластному пути.

Так как в исследованных стрессовых условиях растения поглощали воду с различной скоростью, нами было проведено сравнение количества поглощённой воды и ГВ (рис. 7.26).

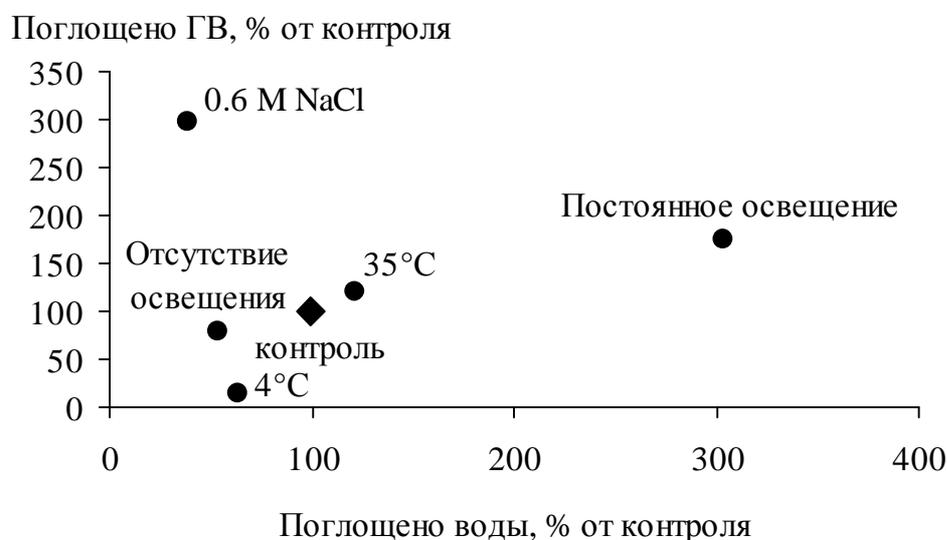
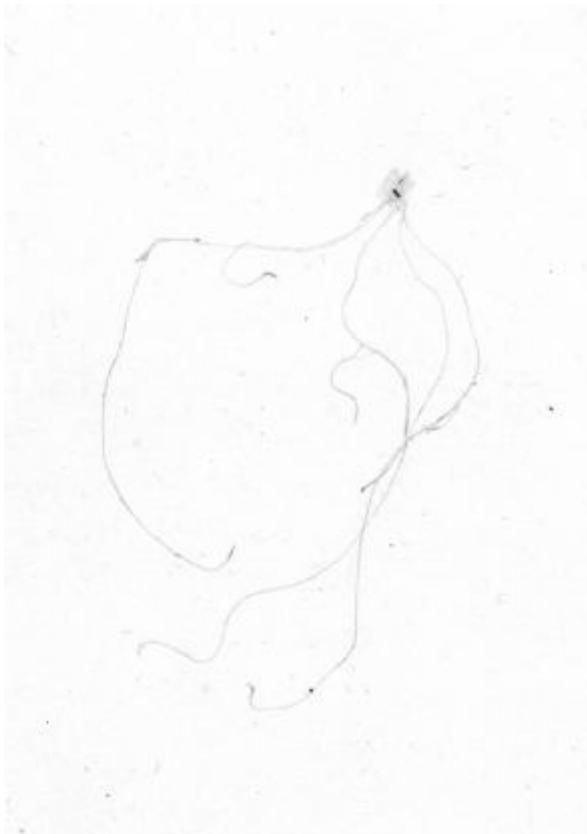


Рисунок 7.26. Поглощение ГК угля США-Pow и воды растениями пшеницы в оптимальных и стрессовых условиях.

Как видно из рис. 7.26, в целом можно сказать, что с возрастанием количества поглощённой растениями воды происходит увеличение количества поглощённых ГВ. Исключение составил вариант с солевым стрессом (0.6 M NaCl), где при значительном снижении количества поступившей в растения воды (40% от контроля) наблюдали выраженное усиление поглощения ГВ (300% от контроля). По-видимому, это можно объяснить изменением поведения ГВ в растворе с высокой ионной силой, каковым являлся раствор хлорида натрия. Известно, что повышение ионной силы приводит к частичной компенсации отрицательного заряда ГВ и, как следствие, к снижению электростатического отталкивания с отрицательно заряженной корневой поверхностью. Во всех остальных случаях, когда стрессы являлись не химическими (изменение химического состава среды), а физическим (нет изменения химического состава среды), можно констатировать зависимость поглощения ГВ растениями пшеницы от скорости поступления воды. Однако эксперименты по изучению поглощения тритиевой воды показали принципиальное различие в характере их распределения (рис. 7.27).



А



Б

Рисунок 7.27. Распределение тритиевой воды в корнях (А) и побегах (Б) пшеницы. Время экспонирования 29 с 20 ч.

Как видно из рис. 7.27, поглощение и распределение воды принципиально отличалось от такового для ГВ. Прежде всего, количество воды, обнаруженной в побегах не отличалось от количества воды, обнаруженной в корнях, тогда как для ГВ превышение концентрации в корнях над побегами составляло минимум 30 раз и могло достигать 166. При этом нами не было установлено преимущественного накопления воды в апикальных частях растений. Напротив, на авторадиограмме рис. 7.27Б хорошо заметно постепенное снижение количества воды при движении вверх по побегу. Таким образом, зависимость поглощения ГВ растениями пшеницы от количества поглощённой воды является определяющей на этапе поступления ГВ через корни растений, но не в процессе перемещения ГВ с ксилемным током.

7.3.7. Идентификация ГВ в тканях растений

Проведённые эксперименты показали, что ГВ поступают в растения, перемещаются с акропетальным током и аккумулируются в апикальных частях. Однако для понимания механизма их действия необходимо также представлять, в

какой форме они находятся в растениях. Поэтому следующей задачей нашего исследования стало изучение распределения ГВ в растениях на тканевом уровне.

Полученные результаты по поглощению ГВ растениями показали усиление этого процесса при возрастании гидрофобности ГВ, поэтому нами была проведена экстракция липидов из растений и их фракционирование методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для экспериментов использовали препараты ГК угля США-Pow и ФК вод AFA-SR. Опыты по поглощению ГВ растениями проводили аналогично описанным выше.

Выделение и фракционирование липидной фракции растений осуществляли согласно [Nichols, 1693]. После окончания экспериментов растения разделали на корни и побеги, измельчали ножницами и помещали в фарфоровую ступку (каждое растение обрабатывали отдельно), куда добавляли 5 мл горячего изопропанола (60°C) и растирали до однородной массы с дополнительным внесением горячего спирта. Образующуюся жидкость переносили в центрифужную пробирку, а растирание проводили повторно. Затем полученную суспензию объединяли с первым экстрактом и центрифугировали в течении 15 мин при 4000 об/мин, а полученный супернатант упаривали на роторном испарителе. Далее образовавшийся сухой экстракт липидов растворяли путём добавления смеси изопропанол:хлороформ 1:1, центрифугировали (15 мин; 4000 об/мин) и собирали супернатант. К осадку добавляли 10 мл хлороформа, проводили растворение, фильтровали и объединяли с экстрактом изопропанол:хлороформ. В полученном экстракте липидов определяли радиоактивность, что позволило рассчитать долю поглощённых ГВ, поступивших в липидную фракцию растений.

Результаты приведены в табл. 7.13.

Таблица 7.13. Описание вариантов, использованных в работе при изучении поглощения ГВ в условиях абиотических стрессов

ГВ	Содержание ГВ в липидной фракции, % от поглощённых		
	Корни	Побеги	Всего
США-Pow	82±6	16±2	98±8
AFA-SR	49±10	16±8	64±5

Как видно из табл. 7.13, практически всё количество ГК (98%), поглощённых растениями, обнаруживалось в липидной фракции, для ФК этот показатель составлял около 64%. Принимая во внимание, что содержание липидов в растениях составляет всего около 3-5%, можно сделать вывод о преимущественном концентрировании ГВ в липидной составляющей растений. Коэффициент накопления ГВ в липидной фракции, рассчитанный как отношение концентрации вещества в липидах к концентрации в целом растении показал, что для ГК угля этот показатель составил 43 ± 2 , а для ФК вод 25 ± 2 . С другой стороны, необходимо подчеркнуть, что согласно существующим данным в самих ГВ содержание липидов невелико и не обычно превышает 3-8% от общего содержания углерода [Орлов, Гришина, 1981]. Таким образом, преимущественное накопление ГВ в липидной фракции растений свидетельствует, по-видимому, об их предварительной модификации перед поступлением в растения.

Следует отметить, что согласно ранее полученным данным, количество ГВ, поступающих в побеги растений пшеницы, составляет всего от 3% в случае ГК до 10% в случае ФК от общего количества поглощённых ГВ. Однако, как показывают результаты, представленные в табл. 7.13, в липидной фракции побегов обнаруживалось в среднем 16%, т.е. в 1.5-5 раз больше, чем можно было бы ожидать исходя из распределения ГВ между корнями и побегами растений. Так как в побегах для ГК и ФК наблюдали равное относительное количество поглощённых ГВ (16%), можно сделать вывод, что перед поступлением в надземные органы в корнях происходит предварительная трансформация ГВ, и в побеги поступают преимущественно гидрофобные фрагменты ГВ.

Поиск возможных гидрофобных соединений в ГВ, проведённый с помощью гексановой экстракции с последующим определением состава методом газовой хроматографии (ГХ) (табл. 7.14) показал, что во всех исследованных препаратах ГВ обнаруживаются летучие жирные кислоты (ЛЖК) ряда C2-C6 (от уксусной до капроновой кислоты).

Таблица 7.14. Содержание ЛЖК в ГВ различного происхождения

ГВ	C2	C3	i-C4	C4	i-C5	C5	i-C6	C6	S
	мкг/мг								
CHA-AGK	0.05	0.01	0.004	0.008	0.008	0.0042	0	0.03	0.114
PFA-Sk300	0.043	0.005	0.003	0.002	0.004	0.003	0	0.009	0.069
PFA-TL398	0.021	0.004	0.001	0.007	0.004	0.024	0	0.014	0.075
PHM-Sk300	0.037	0.007	0.002	0.008	0.005	0.045	0.001	0.016	0.121
PHA-Sk300	0.124	0.021	0.007	0.012	0.006	0.008	0	0.015	0.193

C2 – уксусная; C3 – пропионовая; C4 – масляная; i-C4 – изомасляная; C5 – валериановая; i-C5 – изовалериановая; C6 – капроновая; i-C6 – изокапроновая

Во всех препаратах наиболее высокое содержание было установлено для уксусной кислоты (в среднем 46% от общего содержания ЛЖК). Наряду с ЛЖК в хлороформ-гексановом экстракте ГК были также обнаружены олеиновая C_{18:1} (2.7%) и пальмитиновая C_{16:0} (1.5%) кислоты. Таким образом, полученные результаты доказывают возможность трансформации ГВ до компонентов, способных поступать в липидную фракцию растений.

С другой стороны, можно отметить более высокое содержание ЛЖК в препаратах ГК по сравнению с ФК. Это наблюдение хорошо согласуется с ранее отмеченным нами преимущественным накоплением ГК в липидной фракции растений в большей степени, чем ФК.

В настоящее время под липидами подразумевают большую группу природных соединений, различных по строению и функциям, но близких по физико-химическим свойствам. Их характерной особенностью является высокое содержание в молекулах гидрофобных радикалов и групп, что делает их малорастворимыми в воде. Липиды делят на 2 основные группы: жиры и жироподобные вещества, или липоиды [Красильникова и др., 2004]. Растительные жиры выполняют запасную и энергетическую функции и содержатся в небольших количествах во всех растительных клетках; в листьях и стеблях их содержание не превышает 5%. Жиры представляют собой смесь сложных эфиров глицерина и высокомолекулярных кислот; основную массу представляют триглицериды, а моно- и диглицериды в жирах встречаются редко.

К липоидам относятся: фосфолипиды, гликолипиды, стероиды, воска, кутин и суберин, а также растворимые в жирах пигменты (хлорофиллы, каротиноиды и

фикобилины). Их функции в растениях крайне разнообразны: гликолипиды являются основными липидами мембран хлоропластов; стероиды (в растениях обычно представлены в виде стеролов) входят в состав клеточных мембран растений, мембраны ЭР и митохондрий; воска, кутин и суберин содержатся в кутикуле и увеличивают её защитные свойства. Разнообразие свойств и функций веществ, составляющих липидную фракцию свидетельствует о том, что только на основании концентрирования ГВ в ней трудно высказать какие-либо предположения об их роли в растениях. Поэтому далее экстракты липидов подвергали фракционированию с помощью тонкослойной хроматографии на силуфоле, позволяющей проводить фракционирование нейтральных липидов и фосфолипидов.

Для проведения фракционирования нейтральных липидов в качестве подвижной фазы использовали систему: гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (70:30:1). Фракционирование фосфолипидов проводили с использованием в качестве подвижной фазы смеси хлороформ – метанол – уксусная кислота (65:25:8). После проведения тонкослойной хроматографии различные фракции липидов проявляли с помощью Родамина Ж и детектировали под УФ-лампой. Полученные хроматограммы с обведенными липидными фракциями подвергали автордиографии (рис 7.28).

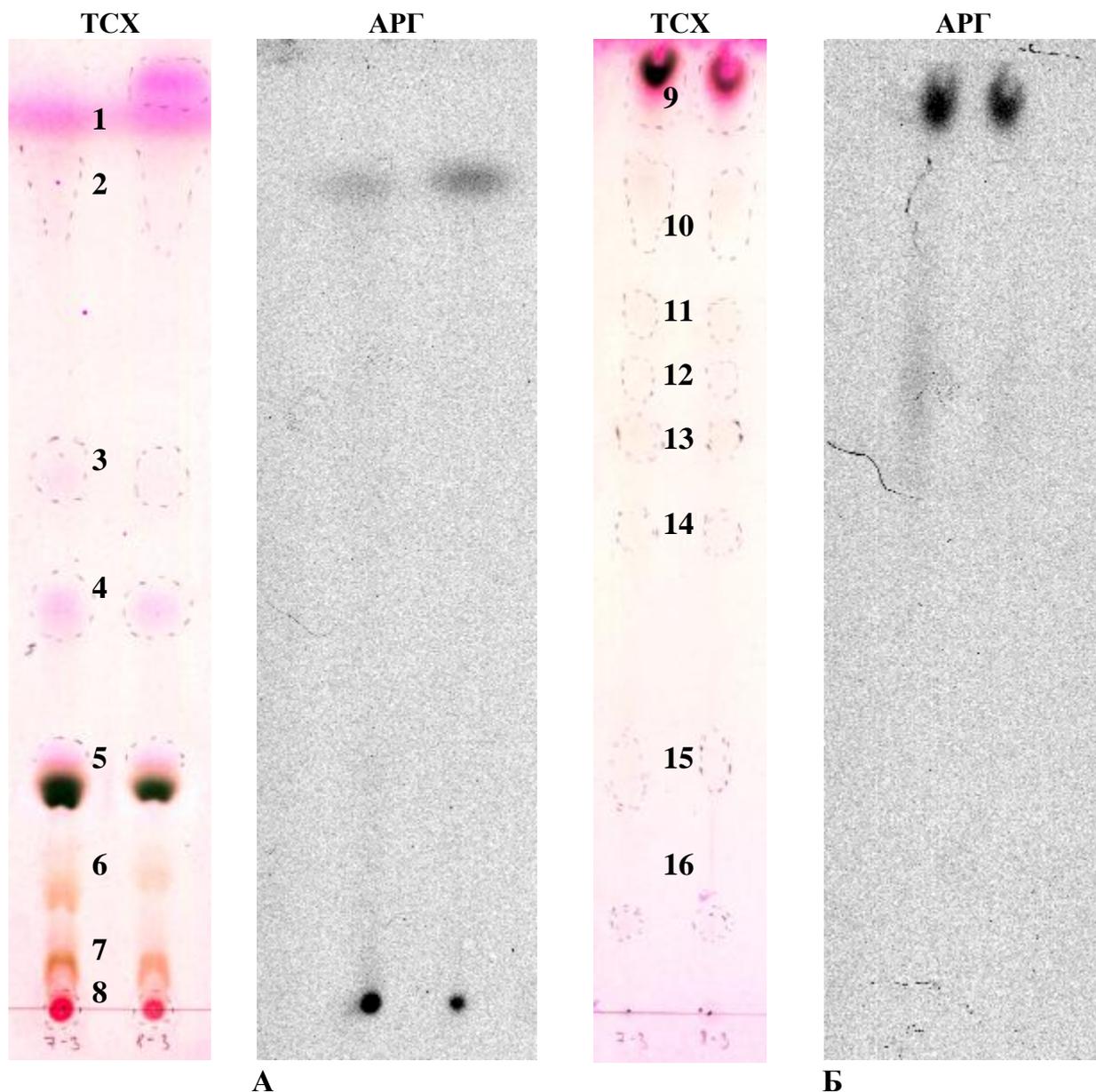


Рисунок 7.28. Хроматограммы и их автордиограммы нейтральных липидов (А) и фосфолипидов (Б) из липидных экстрактов побегов растений, находившихся во взаимодействии с ГК угля ^3H -СНА-Ров. На ТСХ нейтральных липидов: 1, 2 – пигменты; 3 – эфиры стеролов, 4 – триглицериды и свободные жирные кислоты; 5 – пигменты; 6 – стеролы и диглицериды; 7 – стеролы; 8 – пигменты, фосфо- и гликолипиды. На ТСХ фосфолипидов: 9 – пигменты и нейтральные липиды; 10 – стеролы; 11 – пигменты; 12 – гликозиды стеролов; 13 – моногалактолипиды; 14 – гликозиды стеролов; 15 – фосфатидил холины; 16 – фосфатидил инозитол и липид В.

Как видно из рис. 7.28, нейтральные липиды растений были представлены пигментами, стеролами и их эфирами, ди- и триглицеридами, свободными жирными кислотами, фосфо- и гликолипидами. Фосфолипиды, в свою очередь, фракционировались на гликозиды стеролов, пигменты, моногалактолипиды, фосфатидил холины, фосфатидил инозитол и липид В.

Результаты автордиографии (рис. 7.28) показали, что преимущественное накопление изотопа отмечается во фракциях пигментов, располагающихся либо в начале, либо в конце дорожек фракционирования. Это свидетельствует о том, что поступающие в растения ГВ практически полностью поступают в растительные пигменты, в то время как в других фракциях липидов может находиться только их следовое количество.

Для дальнейшей идентификации ГВ в растительных тканях использовали метод масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР с Фурье преобразованием), позволяющего проводить определение органических молекул в сложных матрицах на основании точного определения отношений масса/заряд. В отличие от других масс-спектрометрических методов, при масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием сигнала образующиеся ионы захватываются цилиндрической ячейкой, хранящей их в газовой фазе в очень сильном магнитном поле. Далее, захваченные в ловушку ионы при возбуждении начинают радиальное движение от центральной оси цилиндрической ячейки и закручиваются в круговое движение. Возбуждение ионов осуществляется за счет приложения радиочастотного напряжения к возбуждающим электродам ячейки. Результирующая частота ионно-циклотронного движения зависит от отношения массы иона к его заряду и силы магнитного поля. При этом на электродах возникает изображение тока всех ионов (наведенный ток или образ тока), циркулирующих в ячейке, которое может быть записано. Каждый ион вращается в ячейке с индивидуальной частотой, а различные частоты анализируются и извлекаются из общего сигнала с помощью преобразования Фурье. Результирующий частотный спектр конвертируется в масс-спектр с использованием известного соотношения частоты и массы. Так как частота вращения иона является физической величиной, которая может измеряться с высокой точностью и воспроизводимостью, масс-спектрометрические системы ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием сигнала позволяют получать результаты с высокой степенью разрешения. Работу осуществляли совместно с проф. И.В. Перминовой и асп. Э.В. Куненковым (химический факультет МГУ) и д-ром Ф. Шмитт-Копплином (Институт экологической химии, HelmholtzZentrum muenchen, Германия).

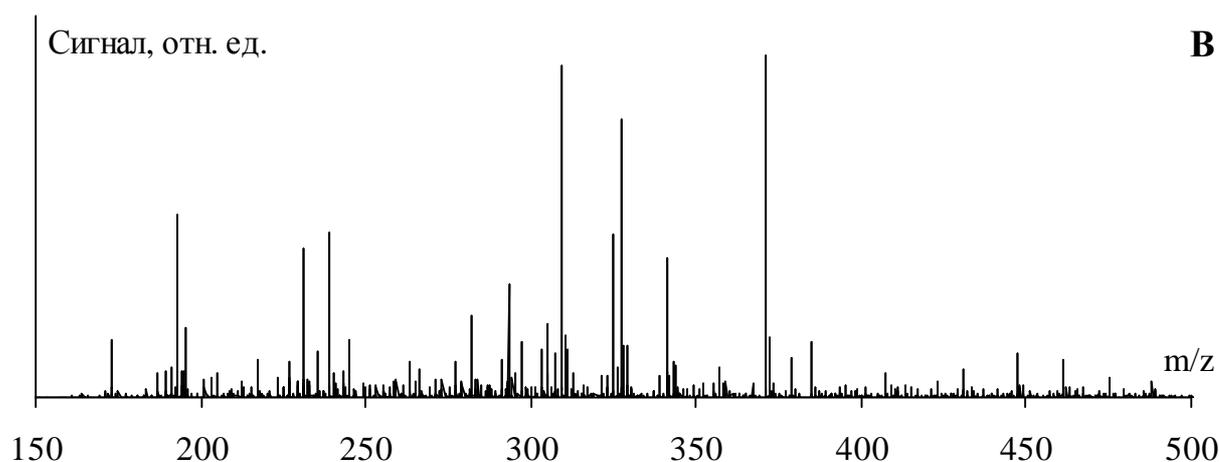
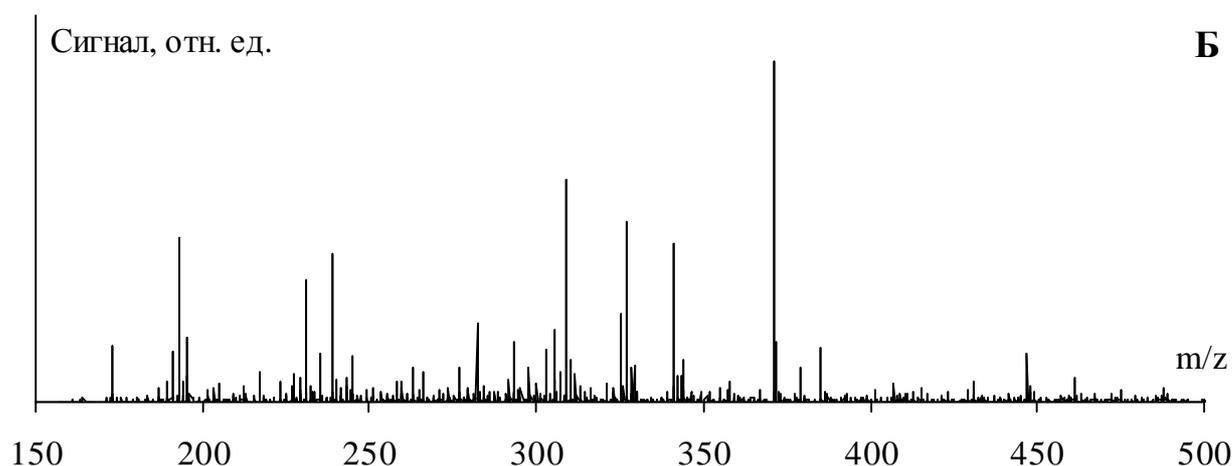
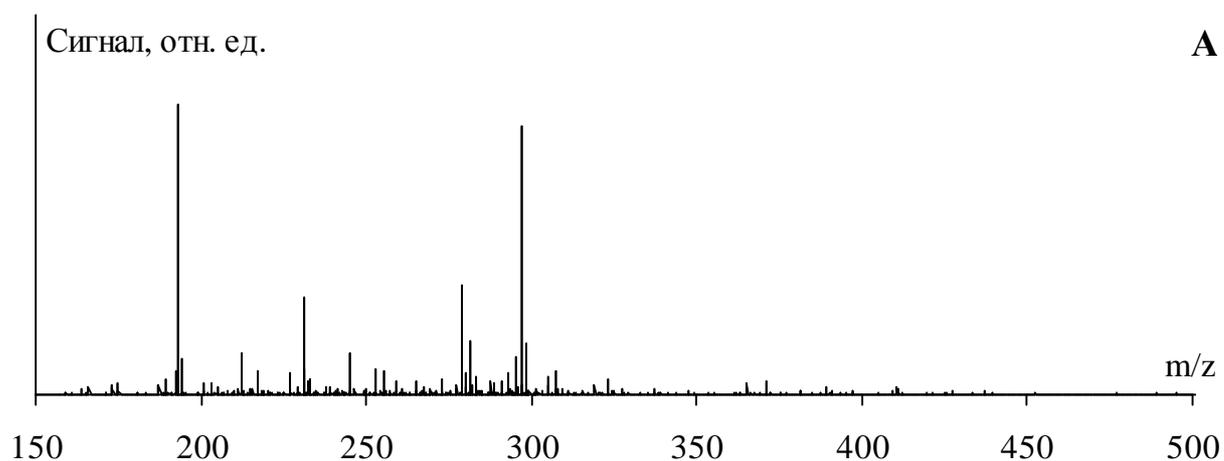


Рисунок 7.29. Спектры МС ИЦР с преобразованием сигнала: А – CHA-Pow; Б – метанольный экстракт побегов пшеницы, обработанных CHA-Pow; В – метанольный экстрактов контрольных побегов пшеницы.

Для анализа использовали метанольный экстракт побегов и корней растений, находившихся во взаимодействии с ГВ (ГК угля Н-CHA-Pow). Условия проведения анализа: масс спектрометр Apex Qe (Bruker Daltonics, Германия), оборудованный электроспреевым ионизатором Apollo II и магнитной ловушкой мощностью 12 Тесла; режим определения отрицательно заряженных ионов; скорость потока

120 мкл/ч; диапазон определяемых масс 15-2000 Да. Примеры получаемых спектров приведены на рис. 7.29.

Результаты проведённых экспериментов показали, что в присутствии ГВ в растениях не обнаруживаются каких-либо новых веществ, не присутствующих в контрольных растениях. Это свидетельствует о том, что ГВ (целиком или их отдельные фракции) быстро включаются с растительный метаболизм и не присутствуют в растениях в качестве индивидуальных соединений, не образующихся в растениях. Следует также подчеркнуть, в растениях, находившихся во взаимодействии с ГВ, было отмечено резкое снижение интенсивности ионов с общей формулой $C_{18}H_{30}O_x$, являющихся, по-видимому, продуктами окисления жирных кислот. Однако, так как методы МС ИЦР с преобразованием Фурье в настоящее время относятся к качественным, а не количественным, для исследования отмеченного феномена требуется проведение дальнейших экспериментов.

Результаты, полученные в ходе проведения экспериментов с ГК угля СНА-Pow, не позволили обнаружить в растениях конкретных соединений, в которых присутствуют ГК. Поэтому были проведены дополнительные эксперименты по анализу растений, находившихся во взаимодействии с мечеными тритием ГВ (на примере ГК угля 3H -СНА-Pow). При анализе полученных спектров для поиска соединений, присутствующих в растениях из ГВ, использовали программное обеспечение FIRAN [Куненков, 2006-2008] и принимали следующие допущения:

- меченый ион содержит только один атом трития;
- для каждого меченого иона есть аналогичный немеченый ион, состоящий из ^{12}C , 1H , ^{16}O и ^{14}N ;
- для каждого меченого иона существует немеченый аналог, содержащий один атом ^{13}C вместо ^{12}C (данное предположение использовали для поиска заряда ионов путём расчёта разницы масс между двумя немечеными ионами);
- меченый ион должен присутствовать в экстрактах растений, взаимодействовавших с 3H -ГВ, но должен отсутствовать в растениях, взаимодействовавших с немечеными ГВ.

Результаты показали, что в корнях соединения, отвечающие указанным требованиям, отсутствуют, тогда как в побегах растений тритий обнаруживался в составе соединений, отвечающих молекулярным формулам $C_{18}H_{32}O_2$ и $C_{14}H_{24}O_2$.

Первой молекулярной формуле соответствует более 40 соединений, однако большинство из них представляет собой феромоны насекомых или синтетические вещества. Поэтому с наибольшей вероятностью соединение $C_{18}H_{32}O_2$ является линолевой кислотой C18:2 – ключевым соединением липидного обмена растений – являющейся одной из 4 основных ЖК растительных мембран. Она является активатором различных процессов метаболизма и оказывает влияние на рост и морфогенез растений [Тарчевский, 1996]. Так, одним из основных метаболитов линолевой кислоты как в растительных, так и в животных тканях, является арахидоновая кислота – важнейший компонент фософлипидов, участвующий в регулировании текучести мембран и реализации апоптоза. С другой стороны, линолевая кислота (наряду с линоленовой) является промежуточным продуктом распада липидов в растениях, активация которого наблюдается при стрессах, так как многие продукты промежуточной биodeградации липидов (в т.ч. линолевая кислота) обладают свойствами гормонов или активаторов и ингибиторов различных процессов метаболизма и в конечном итоге оказывают влияние на рост и морфогенез растений. Например, при оксигеназном пути деградации линолеата и линолената происходит образование гидрокси- и эпоксипродуктов, играющих важную роль в защите растений от грибной инфекции. Ещё одна последовательность реакций превращения гидропероксидов жирных кислот приводит к образованию жасмоновой кислоты и метилжасмотана, относящихся к классу метилжасмонатов. Наконец, некоторые производные линолевой кислоты обладают способностью стимулировать роста растений и каллусных тканей; отмечено ускорение выхода семян из состояния покоя, усиление роста главного корня и новообразования боковых корней [Тарчевский, 1996].

Отсутствие линолевой кислоты непосредственно в экстрактах ГВ (табл. 7.14) свидетельствует о том, что она образуется из предшественников непосредственно в растении. Общая схема биосинтеза жирных кислот (ЖК) в растениях и возможная роль в нём ГВ представлена на рис. 7.30.

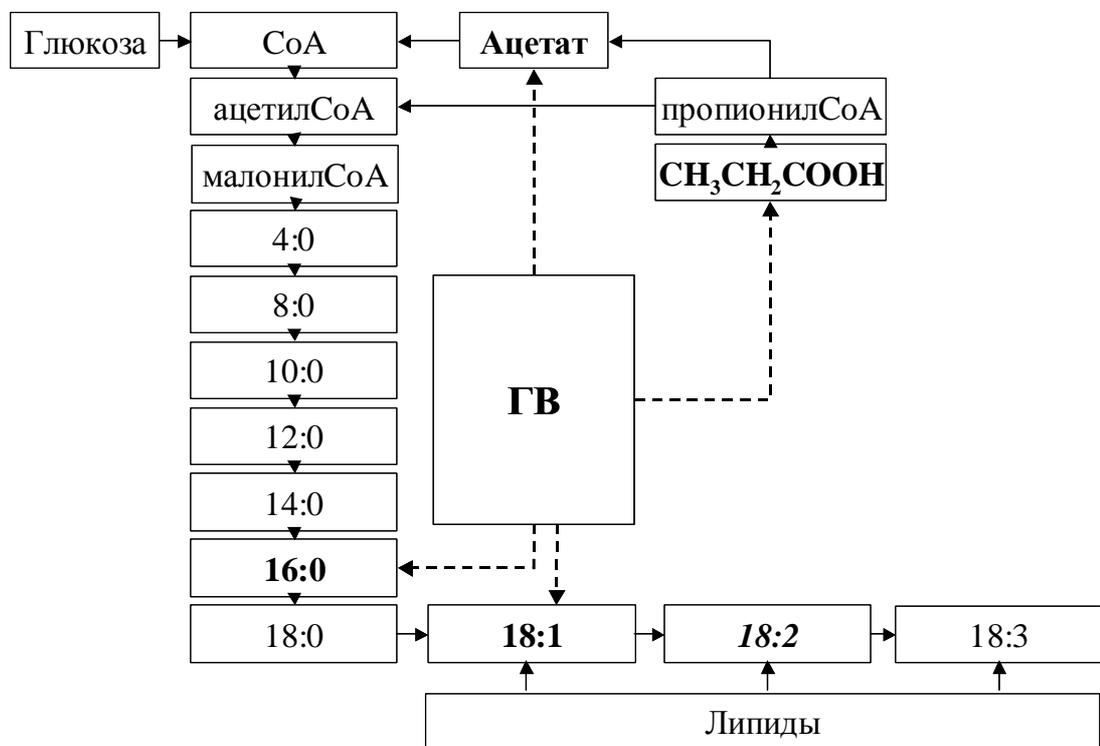


Рисунок 7.30. Биосинтез ЖК в растениях и возможная роль в нём ГВ. На схеме жирным шрифтом выделены вещества, экспериментально обнаруженные в составе ГВ, а наклонным – в растениях.

Как видно из рис. 7.30, в ГВ представлен целый ряд веществ, участвующих в биосинтезе ЖК. Однако промежуточных продуктов, которые можно было ожидать исходя из обнаруженных в ГВ соединений – олеиновой и пальмитиновой кислот – в тканях растений обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что поглощённые из ГВ соединения быстро усваиваются растениями, а определяемая линолевая кислота является продуктом деградации липидов, начинающемся при механическом повреждении листьев при их подготовке к анализу. В пользу этого предположения свидетельствует также второе идентифицированное соединение – $C_{14}H_{24}O_2$ – которое, по всей видимости, является промежуточным продуктом распада линолевой кислоты.

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что наиболее вероятной схемой поступления ГВ в растения является первоначальная аккумуляция на поверхности корней, прикорневая-корневая трансформация и включение в метаболизм растений на уровне липидного обмена.

7.4. Природа защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов

Многочисленными исследованиями установлено стимулирующее действие гуминовых соединений на рост и развитие растений, повышение их устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды. В настоящее время показано, что ГВ повышают всхожесть семян, способствуют протеканию процессов биосинтеза, стимулируют фотосинтез и дыхание и, вследствие своей мембранотропной активности, могут облегчать поступление ряда элементов питания в растения. Основные наблюдаемые эффекты ГВ на растения, обусловленные физиологической активностью ГВ, приведены в табл. 7.15.

Таблица 7.15. Основные эффекты гуминовых веществ на растения (по [Kulikova et al., 2005])

Наблюдаемые эффекты	Источник
Стимуляция прорастания семян	Bottomley, 1914a, Bottomley, 1914b; Hillitzer, 1932; Христева, 1953 и 1970; Paszewski et al., 1957; O'Donnel, 1973; Azam and Malik, 1982; Cacco and Dell'Agnoia, 1984; Syltie, 1985; Dell'Agnoia and Nardi, 1987; Nardi et al., 1988; Piccolo et al., 1992; Young and Chen, 1997
Стимуляция накопления биомассы	Niklewski and Wojciechowski, 1937; Христева, 1953 и 1970; Rauthan and Schnitzer, 1981; Iswaran et al., 1973; Mishra and and Srivastava, 1988; Solaippan et al., 1995; Loffredo et al., 1997; Sathiyabama and Selvakumari, 2001; Zachariakis et al., 2001
Стимуляция накопления азота	Prozorovskaya, 1936; Saalbach, 1956; Iswaran et al., 1973; Rauthan and Schnitzer, 1981; Vaughan et al., 1985; Mishra and and Srivastava, 1988; Nardi et al., 1991; Pinton et al., 1999; Nardi et al., 2000; Cacco et al., 2000.
Стимуляция поглощения элементов минерального питания	Rauthan and Schnitzer, 1981; Ram and Verloo, 1983; Fortun et al., 1985; Vaughan and Malcom, 1985; Chen and Avid, 1990, Mackowiak et al., 2001; Varanini and Pinton, 2001; Clapp et al., 2001; Zachariakis et al., 2001; Sánchez-Sánchez et al., 2002.
Стимуляция биосинтеза белков, углеводов, хлорофилла и др.	Христева, 1953 и 1970; Vaughan et al., 1985; Cincerová, 1964; Zachariakis et al., 2001
Стимуляция фотосинтеза и дыхания	Христева, 1953, 1970; Sladký, 1965; Visser, 1986; Muscolo et al., 1993; Rea, Pierandrei, 1994

Данные, представленные в табл. 7.15, показывают, что наблюдаемые положительные эффекты ГВ на растение крайне разнообразны и проявляются на разных стадиях развития растения. Для объяснения природы физиологической активности ГВ по отношению к растениям высказано много гипотез. Среди них чаще всего указывают следующие:

- способность ГВ облегчать питательных макро- и микроэлементов [Баталкин и др., 1983; Nardi et al., 2000; Fortun et al., 1985; Malcom, Vaughan, 1979; Xu et al., 1986; Chen et al., 1999; Gu et al., 2001; Zachariakis et al., 2001; Nikolic et al., 2003; Yamada et al., 2002; Pinto et al., 2004; Vocanegra et al., 2004; Tuerkmen et al., 2004; Neilsen et al., 2005];
- гормоноподобная активность [Bottomley, 1914, 1914a; Young, Galston, 1983; Muscolo et al., 1988; Chen et al., 2000; Kulikova et al., 2003];
- влияние на синтез белка и нуклеиновый обмен за счет активации процессов окислительного и фотосинтетического фосфорилирования [Христева, 1952, 1963, 1968, 1973, 1974, 1977];
- участие в окислительно-восстановительных процессах в качестве переносчиков электрона по различным ЭТЦ [Бобырь и Епишина, 1975];
- гуминовые вещества являются неспецифическими регуляторами роста, а их физиологическая активность представляет собой совокупность различных механизмов [Овчинникова, 1991].

Наиболее полная схема возможного участия ГВ в метаболизме растений была предложена Поповым [Попов, 2004], который на основании оценки физико-химических свойств ГВ (ГВ одновременно являются полиамфолитами, коллоидными дисперсиями и гетерополимерами, содержащими различные функциональные группы) предположил, что ГВ включаются во все биохимические и биофизические процессы растений, оказывая непосредственное влияние на дыхание, транспорт и циркуляцию пищевых веществ, фотосинтез, митоз и мейоз и т.д. Несмотря на универсальность предложенной схемы, её экспериментальных подтверждений в настоящее время не существует. Кроме того, следует подчеркнуть, что большинство процессов растительного метаболизма предполагают участие конкретных высокоспецифичных индивидуальных веществ.

Поэтому разнообразие регистрируемых эффектов ГВ свидетельствует, на наш взгляд, о неспецифичности действия ГВ и о том, что в большинстве случаев наблюдаемые эффекты могут являться вторичными.

7.4.1. Основные закономерности защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов

Проведённые нами исследования позволили выявить следующие основные закономерности защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов в водных и почвенных средах:

- ГВ способствуют адаптации растений к разнообразным стрессовым факторам, в том числе вызывающим разнонаправленные ответные реакции в организмах;
- в присутствии токсикантов защитное действие ГВ обусловлено образованием нетоксичных комплексов ГВ-токсикант и собственной физиологической активностью ГВ; относительный вклад этих процессов зависит от силы взаимодействия ГВ с токсикантом и биодоступности ГВ;
- в условиях абиотических стрессов, не обусловленных присутствием токсикантов, величина защитного действия ГВ практически не зависит от вида стресса, а определяется, главным образом, его уровнем. Разница между вариантами без внесения ГВ и в их присутствии является практически постоянной величиной и не превышает 20%;
- при переходе от водных сред к почвенным наблюдается выраженное уменьшение защитных свойств ГВ, связанное со снижением их доступности для растений.

Разнообразие стрессовых факторов, при которых регистрируется защитное действие ГВ, а также независимость его величины от вида стресса свидетельствует о неспецифической природе защитного действия ГВ, обусловленного их непосредственным взаимодействием с мембранами. Установленное в нашей работе включение ГВ в метаболизм ЖК и накопление ГВ в липидной фракции растений свидетельствует о преимущественном влиянии ГВ на липидный обмен, в том числе и липидную составляющую мембран. Повреждение липидной компоненты мембран в стрессовых условиях происходит вследствие процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), вызываемого образованием избыточного количества

свободных радикалов, для тушения которых у растений синтезируется целый ряд антиоксидантов.

7.4.2. Антиоксидантная активность ГВ

Химическая структура ГВ (наличие фенольных радикалов) позволяет предполагать у них наличие антиоксидантных свойств, которые были многократно освещены в литературе [Espeland & Wetzell, 2001; Korotkova et al., 2003; Latch & McNeil, 2006; Crisostomo et al., 2007]. Однако систематических исследований антиоксидантных свойств ГВ не проводилось, что, вероятно, объясняется отсутствием простого и надежного метода для их тестирования. Поэтому совместно с группой д.б.н. О.В. Королёвой (институт биохимии им. Баха РАН) нами были проведены эксперименты, направленные на определение антиоксидантной ёмкости (АОЕ) ГВ.

Для определения АОЕ ГВ использовали метод, основанный на способности веществ, обладающих антиоксидантной активностью, тушить радикал 2,2-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС) – $ABTS^{\bullet+}$ –, генерируемый путём внесения в раствор АБТС пероксодисульфат калия [Re et al., 1999]. Измерения проводили в калий-фосфатном буфере (0.1 М, рН 6.8) и цитратном буфере (0.1 М, рН 4.3) при концентрации ГВ 2-10 мг/л. В качестве стандарта использовали Тролокс (синтетический аналог витамина Е, 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), а получаемые результаты пересчитывали в эквиваленты Тролокса. Это позволило сравнить получаемые результаты с другими природными веществами, обладающими антиоксидантной активностью [Prior et al., 2005].

Снижение оптической плотности растворов $ABTS^{\bullet+}$ в присутствии ГВ (рис. 7.31) и галловой кислоты, использованной для сравнения, регистрировали на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 25 UV-VIS (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc. США) при 734 нм.

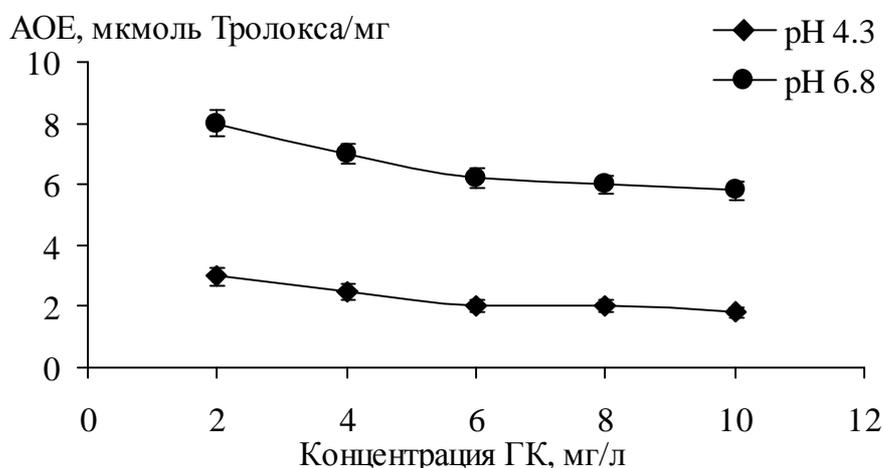


Рисунок 7.31. Концентрационная зависимость антиоксидантной ёмкости ГК угля СНА-Ald при различных значениях pH.

Результаты экспериментов (табл. 7.16) показали, что ГВ обладают АОЕ, сопоставимой с таковой других высокоактивных природных антиоксидантов.

Таблица 7.16. Антиоксидантная ёмкость (АОЕ) гуминовых веществ и галловой кислоты

ГВ	АОЕ, мкм Тролокса / мг	
	pH 6.8	pH 4.3
AFA-SR	5.68±0.05	2.8±0.1
АНА-SR	8.4±0.1	3.59±0.07
ADOM-SR	6.9±0.2	2.79±0.06
СНА-ALD	5.3±0.3	2.05±0.09
Галловая кислота	19.9±0.4	14.4±0.3

Величины АОЕ ГВ при pH 4.3 изменялись в диапазоне 2.05-3.59 мкмоль Тролокса/мг, что близко к АОЕ дигидрокверцетина (2.67 мкмоль/мг) и нарингенина (3.27 мкмоль/мг) – природных антиоксидантов растительного происхождения [Re te al., 1999]. При увеличении pH до 6.8 АОЕ изученных ГВ возрастала до 5.3-8.4 мкмоль/мг, что составляет 6.8-12.3 мкмоль/мг ОС. Полученные величины были близки к данным приводимым для почвенных ГВ, которые составляют 4.38-26.57 мкмоль/мг ОС [Rimmer, 2006].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой антиоксидантной активности ГВ.

7.4.3. Концептуальный механизм защитного действия ГВ

Ранее нами была показана преимущественная аккумуляция ГВ, поступающих в растения, в липидной фракции и, в частности, в растительных пигментах. С другой стороны, в настоящее время известно, что основными продуцентами АФК в растительном организме являются хлоропласты, а клеточные мембраны тилакоидов являются основными мишенями АФК [Mittler, 2002; Foyer & Noctor, 2005]. Атака АФК провоцирует цепной процесс разрушения мембран, обусловленный перекисным окислением липидов (ПОЛ). АФК, в первую очередь, $O_2^{\bullet-}$ и HO^{\bullet} вступают в реакции с остатками ненасыщенных жирных кислот, в результате чего образуются липидные радикалы L^{\bullet} . Липидные радикалы, в свою очередь, вступает в реакцию с растворённым в среде кислородом, образуя липопероксидный радикал, атакующий соседний фосфолипид с образованием гидроперекиси липидов и L^{\bullet} , запускающего новый цикл окисления.

В хлоропластах постоянно образуются синглетный кислород, супероксидрадикал и перекись водорода, что неразрывно связано с процессами фотосинтеза, протекающими в тилакоидной мембране. Тушение синглетного кислорода, способного окислять белки фотосинтетического аппарата, молекула хлорофилла и липиды тилакоидных мембран, происходит в растениях с помощью транс-каротиноидов, присутствующих в составе антенных комплексов и реакционных центров [Полесская, 2007]. Нейтрализация супероксидрадикала происходит в результате т.н. реакции «вода-вода» с участием аскорбатпероксидазы.

Несмотря на действующие пути ликвидации АФК, их уровень в растительном организме является нестабильным. Так, интенсивность генерации АФК быстро возрастает во всех стрессовых условиях, т.е. вне зависимости от природы стресса в растительной клетке начинается сверхпродукция АФК и развивается окислительный стресс [Физиология растений, 2005; Полесская, 2007]. Иными словами, развитие окислительного стресса – первая неспецифическая реакция всех растительных организмов на стрессы любой природы.

Принимая во внимание установленные в работе особенности взаимодействия ГВ с клетками и растениями можно предложить следующий концептуальный механизм неспецифического защитного действия ГВ (рис. 7.32).

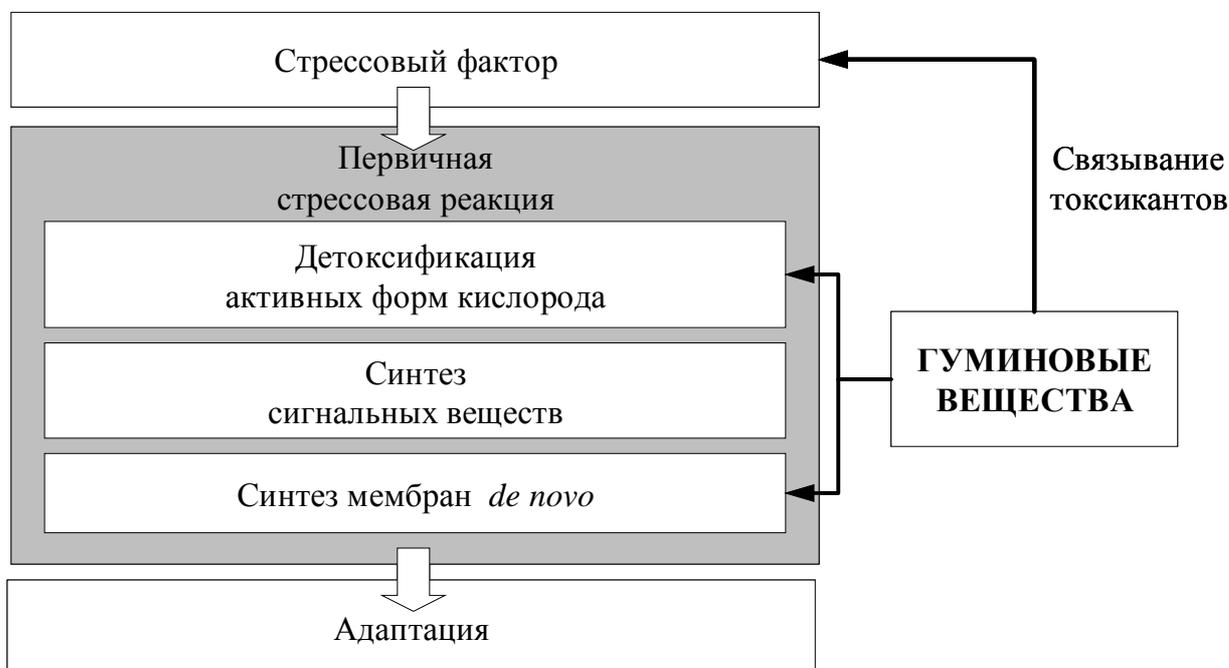


Рисунок 7.32. Концептуальная модель неспецифического защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов.

Таким образом, выполненные в диссертационной работе исследования показали, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов обусловлено не только образованием комплексов ГВ с токсикантами, но также включением ГВ в липидный метаболизм растений и участием в неспецифических реакциях растений на стресс, направленных на восстановление повреждений мембранных структур вследствие разрывов в мембране и ПОЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные в диссертационной работе исследования показали, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов может быть обусловлено как образованием комплексов ГВ с токсикантами, так и непосредственным действием ГВ на растения, а именно их включением в липидный метаболизм растений и участием в неспецифических реакциях растений на стресс, направленных на восстановление повреждений мембранных структур вследствие разрывов в мембране и ПОЛ.

На основании количественной оценки детоксицирующих свойств ГВ в присутствии токсикантов показано, что защитное действие ГВ в почвенных средах обусловлено, прежде всего, образованием нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как в водных средах значительный вклад может вносить собственная биологическая активность ГВ. В случае высоких констант связывания (тяжёлые металлы), ведущую роль в защитных свойствах ГВ играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как при слабом химическом взаимодействии (гербициды) основную роль играет собственная физиологическая активность ГВ.

Проведённые в работе исследования показали перспективность использования модифицированных ГВ в качестве средств защиты растений нового поколения, а именно: хинон-обогащённых гуминовых производных – в качестве детоксикантов почв, загрязнённых тяжёлыми металлами, гуматов железа – в качестве корректоров хлороза у растений, обогащённых кремнием ГВ – в качестве биоактиваторов.

ВЫВОДЫ

1. Защитное действие ГВ в присутствии токсикантов в почвенных средах обусловлено, прежде всего, образованием нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как в водных средах значительный вклад может вносить собственная биологическая активность ГВ. В случае высоких констант связывания (тяжёлые металлы), ведущую роль играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, при слабом химическом взаимодействии (гербициды) доминирует собственная физиологическая активность ГВ.
2. При переходе от водных сред к почвенным наблюдается выраженное уменьшение защитных свойств ГВ, связанное со снижением их доступности для растений. В условиях абиотических стрессов в водных средах величина защитного действия ГВ не зависит от их происхождения или вида стресса. Разница между вариантами без внесения ГВ и в их присутствии является практически постоянной величиной и не превышает 20%. В случае тяжелых металлов (или других токсикантов, с которыми возможно интенсивное связывание) указанная закономерность не соблюдается вследствие небольших величин действия ГВ по сравнению с эффектами, определяемыми процессами связывания токсикантов.
3. ГВ способны сорбироваться на поверхности живых клеток и поступать во внутриклеточное пространство. Величины фактора бионакопления ГВ варьируются в диапазоне 0.9-13.1 л/кг. Количество ГВ, поступающих в клетки, возрастает при увеличении поверхностной активности ГВ и составляет 20-100% от общего количества поглощённых ГВ. В условиях солевого стресса происходит усиление поглощения ГВ клетками, при этом фактор бионакопления ГВ может возрастать в 10 раз по сравнению с оптимальными условиями.
4. Поглощение ГВ растениями в целом подчиняется закономерностям, установленным для ионов и индивидуальных веществ. Оно характеризуется наличием фазы обратимого малоизбирательного поглощения и фазы стационарного поглощения. Основной особенностью поступления ГВ в растения является большая продолжительность обратимой стадии, которая

составляет не менее 1 ч, что связано с трансформацией ГВ перед их поглощением растениями.

5. Кинетика поглощения ГВ описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. Диапазон значений константы Михаэлиса K_m составляет 2.1-7.0 мкмоль/л, что сопоставимо со значениями этой константы для ионов и индивидуальных веществ. Максимальная скорость поглощения ГВ возрастает при увеличении их гидрофобности и находится в диапазоне 0.9-4.2 нмоль/г/ч, что на несколько порядков ниже, чем для ионов и индивидуальных веществ.
6. ГВ аккумулируются преимущественно в корнях растений. Отношение количества ГВ в корнях к количеству в побегах изменяется в диапазоне от 10 до 22 и объясняется высокой адсорбцией ГВ на поверхности корней. Поступившие в растения ГВ накапливаются преимущественно в апикальных частях растений.
7. Поступление ГВ в растения происходит по механизму активного транспорта и напрямую связано со скоростью метаболизма растений.
8. ГВ аккумулируются преимущественно в липидной фракции растений. Продукты метаболизма ГВ присутствуют в составе ненасыщенных ЖК. Количество ГВ в липидной фракции от общего количества поглощённых ГВ составляет 64-98%.
9. Концептуальная модель защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов включает в себя поступление ГВ растения, включение их в липидный метаболизм растений и участие в неспецифических реакциях растений на стресс, направленных на восстановление мембранных структур вследствие разрывов в мембране и перекисного окисления липидов.
10. Усиление защитных свойств ГВ с целью их применения в сельском хозяйстве в качестве средств защиты растений может быть достигнуто с помощью соответствующей направленной модификации ГВ, а именно: введения хинонных фрагментов в ГВ для получения детоксикантов почв, загрязнённых тяжёлыми металлами; обогащения железом – для синтеза корректоров хлороза у растений и обогащения кремнием – для получения биоактиваторов.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность:

- д.х.н., проф. И.В. Перминовой (химический ф-т МГУ) и сотрудникам её группы за предоставленные препараты природных и модифицированных ГВ и оказанную всестороннюю помощь;
- к.б.н., доц. Г.Ф. Лебедевой (каф. земледелия ф-та почвоведения МГУ) за постоянное внимание к работе и многолетнюю разностороннюю поддержку;
- д.б.н. О.В. Королёвой (Институт биохимии РАН) и сотрудникам её группы за помощь в организации биологических экспериментов, определении антиоксидантной активности ГВ и обсуждение результатов;
- к.х.н. Г.А Бадуну, З.Я. Тясто и к.х.н. М.Г. Чернышевой (каф. радиохимии химического ф-та МГУ) за предоставленные меченные тритием ГВ и оказанную помощь в проведении радиохимических экспериментов;
- О.И. Филипповой (каф. земледелия ф-та почвоведения МГУ) и к.б.н. В.А. Холодову (Почвенный институт РАСХН) за оказанную помощь в проведении токсикологических экспериментов;
- к.х.н. В.И Коробкову (каф. радиохимии химического ф-та МГУ) за помощь в проведении автордиографии;
- д.б.н. Д.Н. Маторину и д.б.н. П.С. Венедиктову (каф. биофизики биологического факультета МГУ) за оказанную помощь в организации токсикологических экспериментов и оказанную всестороннюю поддержку;
- к.х.н. Е.А. Цветковой (Институт органической химии РАН) за проведение экспериментов по выделению и фракционированию липидной фракции и обсуждение результатов;
- доц. Ф. Шмитт-Копплину (Helmholtz Zentrum München, ФРГ) и асп. Э.В. Куненкову (химический ф-т МГУ) за проведение анализов методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агрохимия // В.М. Ключковский, А.В. Петербургский (ред.) – М.: Колос, 1964 – 527с.
2. Алиев, С.А. Парамагнетизм органического вещества почв / С.А. Алиев // Новосибирск, 1987 – 20с.
3. Андриянов, А.Ю. Авторадиография с использованием различных источников активации и компьютерных способов обработки для определения благородных металлов в геологических образцах / А.Ю. Андриянов // Дисс. на соиск. уч. ст. к.ф.-м.н. – Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского – М., 2004.
4. Анисимова, М.А. Детоксицирующая способность почв и выделенных из них гуминовых кислот по отношению к гербицидам / М.А. Анисимова // Дисс. на соиск. уч. степени к.б.н. – М., 1997.
5. Битюцкий, Н.П. Необходимые микроэлементы растений / Н.П. Битюцкий // СПб.: Издательство ДЕАН, 2005 – 256с.
6. Бутаев, Б.С. Оценка физиологической активности гуминовых веществ окисленных углей / Б.С. Бутаев, Е.В. Золтоев, Н.В. Бодоев, И.П. Быков, А.Д. Дащицыренова // Химия в интересах устойчивого развития – 2005 – т.13 – №4 – с. 501-505.
7. Варшал, Г.М. Геохимическая роль гумусовых кислот в миграции элементов / Г.М. Варшал, Т.К. Велюханова, И.Я. Кощеева // В: Гуминовые вещества в биосфере – М.: Наука, 1993 – с. 97-116.
8. Васильев, И.Р. Метод биотестирования природных вод по замедленной флуоресценции микроводорослей / И.Р. Васильев, Д.Н. Маторин, П.С. Венедиктов // Методы биотестирования вод – Черноголовка, ОИХФ АН СССР, 1988 – с. 23-26.
9. Вахмистров, Д.Б. Гуминовые кислоты: связь между поверхностной активностью и стимуляцией роста растений / Д.Б. Вахмистров, О.А. Зверкова, С.Ю. Дебеец, Н.Е. Мишустина // Докл. АН СССР – 1987 – т.293 – №5 – с. 1277-1280.

10. Воробьёва, Л.А. Химический анализ почв / Л.А. Воробьёва // М.: Изд-во МГУ, 1998 – 272с.
11. Гольдфельд, М.Г. Физико-химические основы действия гербицидов / М.Г. Гольдфельд, Н.В. Карапетян // Итоги науки и техники ВИНТИ, Биол. химия – т.30 – с. 1-144, 1989.
12. Горовая, А.И. Гуминовые вещества. Строения, функции, механизма действия, протекторные свойства, экологическая роль / А.И. Горовая, Д.С. Орлов, О.В. Щербенко // Киев: Наукова Думка, 1995 – 302с.
13. Горовая, А.И. Клеточные механизмы природной и модифицированной физиологически активными веществами сопротивляемости сельскохозяйственных растений к повреждающему действию пестицидов / А.И. Горовая, А.Ф. Кулик // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1980 – т.7 –с. 75-105.
14. Горовая, А.И. Роль физиологически активных гумусовых препаратов в регуляции процессов клеточного цикла / А.И. Горовая, А.Ф. Кулик, И.А. Огинова // В: Регуляция клеточного цикла растений – Киев, 1985 – с. 101-109.
15. Данченко, Н.Н. Определение карбоксильной кислотности гумусовых кислот титриметрическими методами / Н.Н. Данченко, И.В. Перминова, А.В. Гармаш, А.В. Кудрявцев // Вест. Моск. Ун-та, сер. 2 (Химия) – 1998 – т.39 – №2 – с. 127-131.
16. Дмитриев, Е.А. Математическая статистика в почвоведении / Е.А. Дмитриев // М.: МГУ, 1995 – 320с.
17. Епишина, Л.А. Влияние физиологически активных гумусовых веществ на биоэнергетические процессы у растений / Л.А. Епишина, Л.Ф. Бобырь // В: Доклады о гумусе – Брно, ЧССР, 1979.
18. Жилин, Д.М. Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II) / Жилин, Д.М. // Дисс. на соиск. уч. ст. к.х.н. – Москва, 1998.
19. Захаренко, В.А. Гербициды / В.А. Захаренко // М.: Агропромиздат, 1990 – 240 с.

20. Зединг, Г. Ростовые вещества растений / Г. Зединг // М.: Иностранная литература, 1955 – 300с.
21. Ибрагимов, К.Ш. Поступление в растения водорастворимых фракций гумусоподобных веществ из почв подзолистого типа / К.Ш. Ибрагимов, А.Д. Фокин // Изв. Тимирязев. с.-х. акад. – 1985 – т.5 – с. 74-80.
22. Ипатова, В.И. Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды / В.И. Ипатова // М.: «Графикон-принт», 2005 – 224с.
23. Карпюк, Л.А. Синтез алкокисилильных производных гуминовых веществ и их иммобилизация на минеральных поверхностях / Л.А. Карпюк, И.В. Перминова, С.А. Пономаренко, А.М. Музафаров // Тезисы докладов XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии, 23-28 сентября 2007, Москва, Россия – 2007 – т.5 – с. 408.
24. Келдербенк, А. Распространение и роль связанных почвой остатков пестицидов / А. Келдербенк // В: Проблемы загрязнения окружающей среды и токсикологии – М.: Мир, 1986 – с. 84-117.
25. Ковалевский, Д.В. Выбор условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот / Д.В. Ковалевский, А.Б. Пермин, И.В. Перминова, В.С. Петросян // Вест. Моск. Ун-та, сер. 2 (Химия) – 2000 – №41 – с. 39-42.
26. Когут, Б.М. Трансформация гумусового состояния черноземов при их сельскохозяйственном использовании / Б.М. Когут // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. доктора с-х наук – М., 1996.
27. Козюкина, Т.Ж. Некоторые аспекты положительного действия гумата натрия на устойчивость растений к промышленному загрязнению атмосферы // Т.Ж. Козюкина – Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1983 – т.9.
28. Красильникова, Л.А. Биохимия растений / Л.А. Красильникова, О.А. Авксентьева, В.В. Жмурко, Ю.А. Садовниченко // Харьков: Торсинг, 2004 – 224с.
29. Круглов, В.П. Влияние торфяных физиологически активных веществ на интенсивность течения ростовых процессов / В.П. Круглов // Докл. Всес. Акад. с-х наук им. В.И. Ленина – 1985 – №4 – с. 16-18.

30. Кузнецова, И.А. Трансформация гумат-симазинового комплекса в культуре почвенных актиномицетов / И.А. Кузнецова, Т.Л. Вожик, В.А. Кончиц // Бюлл. ВНИИ СХН – 1987 – №16 – с. 30-32.
31. Кулик, А.Ф. Особенности белкового метаболизма в клетках культурных растений при воздействии физиологически активных гумусовых веществ на фоне фитотоксического действия некоторых пестицидов / А.Ф. Кулик, А.И. Горовая // Труды Днепропетровского с.-х. ин-та – 1983 – т. 9.
32. Кулик, А.Ф. Физиологически активные вещества как фактор нормализации состояния компонентов искусственных экосистем, нарушенного действием симм-триазинов / А.Ф. Кулик, А.И. Горовая // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1980 – т.7 – с. 151-158.
33. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин // М.: Высшая школа, 1990 – 352с.
34. Ларина, Г.Е. Оценка и прогноз фитотоксичности сульфонилмочевинных и имидазолиноновых гербицидов / Г.Е. Ларина, Ю.Я. Спиридонов Ю.Я., С.А. Захаров, Т.В. Захарова // Агрехимия – 2004 – №4 – с. 22-32.
35. Линник, П.Н. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах / П.Н. Линник, Б.И. Набиванец // Л.: Гидрометеиздат, 1986 – 268с.
36. Логинов, Л.Ф. Влияние гуминовых препаратов на ростовые процессы растений и животноводство / Л.Ф. Логинов, И.Д. Комиссаров // Науч. тр. Тюменского с.-х. ин-та – 1971 – т.14 – 266с.
37. Майер-Боде, Г. Гербициды и их остатки / Г. Майер-Боде // М.: Мир, 1972 – 206с.
38. Минеев, В.Г. Биотест для определения экологических последствий применения химических средств защиты растений / В.Г. Минеев, Е.Х. Ремпе, Л.П. Воронина // Докл. ВАСХНИЛ – 1991 – т.7 – с. 5.
39. Наумова, Г.В. Взаимосвязь молекулярной структуры гуминовых кислот и их биологической активности / Г.В. Наумова, В.П. Стригуцкий, Н.А. Жмакова, Т.Ф. Овчинникова // Химия твёрдого топлива – 2000 – №2 – с. 3-13.
40. Новикова, Л.Н. Структурные особенности и биологическая активность гуминовых кислот угля / Л.Н. Новикова, Т.Е. Чеченина, Ю.Н. Яковлева, Р.М. Островская, Д.Ф. Кушнарёв, В.А. Серышев // Почвоведение – 2001 – №3 – с. 333-337.

41. Орлов, Д.С. Гуминовые вещества в биосфере / Д.С. Орлов // М.: Наука, 1993 – с.16-27.
42. Орлов, Д.С. Практикум по химии гумуса: учеб. пособие / Д.С. Орлов, Л.А. Гришина // М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981 – 272с.
43. Орлов, Д.С. Химия почв // Д.С. Орлов – М.: Изд-во МГУ, 1992 – 259с.
44. Островская, Л.К. Железо в растительном мире и карбонатный хлороз / Л.К. Островская // Киев: Наукова думка, 1993 – 147с.
45. Перминова, И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гуминовых кислот / И.В. Перминова // Дисс... докт. химических наук – М., 2000.
46. Перминова, И.В. Дизайн гуминовых препаратов с заданными свойствами / И.В. Перминова, Л.А. Карпюк, С.А. Пономаренко, А.Н. Коваленко, Н.С. Щербина, Н.А. Куликова, Т.А. Соркина, В.В. Лунин // Труды IV Всерос. конф. «Гуминовые вещества в биосфере», Москва, 19-21 дек. 2007 – 2007 – с. 508-509.
47. Першина, И.В. Исследование молекулярно-массового распределения и спектральных характеристик фульвокислот природных вод. II. Последовательное фракционирование фульвокислот и определение коэффициентов поглощения фракций / И.В. Першина, В.М. Вермул, Т.В. Поленова, Е.К. Иванова // Вестник МГУ, сер. 2, Химия – 1989 – №30 – с. 176-182.
48. Петербургский, А.В. Агрохимия и физиология питания растений / А.А. Петербургский // М.: Россельхозиздат, 1981 – 183с.
49. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О.Г. Полесская // М.: КДУ, 2007 – 140с.
50. Попов, А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / А.И. Попов // СПб.: Изд-во С.-Петерб. Ун-та, 2004 – 258с.
51. Прянишников, Д.Н. Агрохимия / Д.Н. Прянишников // М.: Сельхозгиз, 1940 – 644с.
52. Сизов, А.П. Проблемы борьбы с загрязнением почв и продукции растениеводства / А.П. Сизов, Д.М. Хомяков, П.М. Хомяков // М., 1990 – 51с.

53. Соколов, М.С. Микробиологическое самоочищение почвы от пестицидов / М.С. Соколов, Р.В. Галиулин // М., 1987 – 215с.
54. Сосновая, О.Н. Формирование растениями систем детоксификации атразина в зависимости от условий питания в присутствии ФАВ гумусовой природы / О.Н. Сосновая, Л.А. Приходько, М.П. Булгакова // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1983 – т.8 – с. 44-47.
55. Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации // М.: ООО «Издательство Агрорус», 2007 – 399с.
56. Сюняев, Х.Х. Радиоиндикаторное исследование трансформации и миграции симазина в почвах подзолистого и черноземного типов / Х.Х. Сюняев // Автореферат на соиск. уч. степени к.б.н. – М., 1984.
57. Тарчевский, И.А. Процессы деградации у растений / И.А. Тарчевский // Процессы деградации у растений – Соросовский образовательный журнал – 1996 – №6 – с. 13-19.
58. Ткаченко, Л.К. Минеральные и гуминовые удобрения как фактор снятия ингибирующего действия гексахлорана у ячменя / Л.К. Ткаченко, Т.В. Филиппова, А.И. Горовая, А.А. Давыдовский, Г.Ф. Сулиман, Л.А. Христева // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1977 – т.6 – с. 31-45.
59. Удовенко, Г.В. Механизмы адаптации растений к стрессам / Г.В. Удовенко // Физиология и биохимия культурных растений – 1979 – т.11 – №2.
60. Физиология растений: учебник для студ. вузов / Н.Д. Алёхин, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко и др. // М.: Издательский центр «Академия», 2005 – 640с.
61. Филенко, О.Ф. Водная токсикология / О.Ф. Филенко // Черноголовка: МГУ, 1988 – 155с.
62. Флайг, В. К изучению гуминовых кислот. Исследование влияния тимогидрохинона как модельного вещества предшественников гуминовых кислот или продуктов их разложения на начальные стадии развития зерновых в опытах в чашках Нейбауэра / В. Флайг, Заадельбах // Биология – 1957 – №12.

63. Фляйг, В. Соотношение между дегидразным действием веществ, являющихся моделью исходного строения гуминовых кислот и ростом растений / В. Фляйг // РЖ Биология – 1958 – №14.
64. Фокин, А.Д. Исследование процессов трансформации, взаимодействия и переноса органических веществ железа и фосфора в подзолистой почве / А.Д. Фокин // Автореф. на соиск. уч. ст. д.б.н. – М., 1975.
65. Фокин, А.Д. О проникновении гумусовых веществ в клетки растений / А.Д. Фокин, Л.Ф. Бобырь, Л.Е. Епишина, Л. Кравцова, Л.А. Христева // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1975 – т.5 – с. 57-58.
66. Фокин, А.Д. Роль гуминовых соединений в минеральном питании растений / А.Д. Фокин // Гуминовые удобрения: теория и практика их применения – 1975 – т.5 – с. 38-56.
67. Христева, Л.А. Гуминовые кислоты углистых сланцев как новый вид удобрений / Л.А. Христева // Дисс. на соиск. уч. ст. д.б.н. – Киев, 1949.
68. Христева, Л.А. Действие физиологически активных гуминовых кислот на растения при неблагоприятных внешних условиях / Л.А. Христева // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1973 – т.4 – с. 5-23.
69. Христева, Л.А. Еще о функции гуминовых кислот в обмене веществ у высших растений / Л.А. Христева // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1962 – т.2 – с. 123-129.
70. Христева, Л.А. О природе действия физиологически активных гумусовых веществ на растения в экстремальных условиях / Л.А. Христева // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения – 1977 – т.6 – с. 3-14.
71. Христева, Л.А. Роль гуминовой кислоты в питании растений и гуминовые удобрения / Л.А. Христева // Труды почвенного ин-та им. В.В.Докучаева, АН СССР – 1951 – т.38 – с. 108-184.
72. Христева, Л.А. Участие гуминовых кислот и других органических веществ в питании высших растений / Л.А. Христева // Почвоведение – 1953 – №10 – с. 46-59.

73. Abelman, K. Sorption of HOC in soils with carbonaceous contamination: Influence of organic-matter composition / K. Abelman, S. Kleineidam, H. Knicker, P. Grathwohl, I. Kögel-Knabner // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* – 2005 – V.168 – pp. 293-306.
74. Agbenin, J.O. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter / J.O. Agbenin, L.A Olojo // *Geoderma* – 2004– V.119 – pp. 85-95.
75. Alonso, R. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis* / R. Alonso, S. Elvira, F.J. Castillo, B.S. Gimeno // *Plant Cell Environ.* – 2001 – V.24 – pp. 1331-1341.
76. Aluwihare, L.I. A major biopolymeric component of dissolved organic carbon in surface sea water / L.I. Aluwihare, J. Repeta, R.F. Chen RF // *Nature* – 1997 – V.387 – pp. 166-169.
77. Anisimova, M.A. Detoxifying ability of different soil humic acids in relation to herbicide trifluralin / M.A. Anisimova, I.V. Perminova, G.F. Lebedeva // Seventh Annual Meeting of SETAC-Europe RAI Congress Centre, Amsterdam, the Netherlands, April 6-10, 1997, SETAC, Amsterdam – 1997 – p. 288.
78. Anisimova, M.A. Detoxifying capacity of humic acids toward the triphluraline herbicide / M.A. Anisimova, I.V. Perminova, G.F. Lebedeva // 1998 – *Eurasian Soil Sci.* – V.31 – №9 – pp. 1079-1084.
79. Aroca, R. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity / R. Aroca, J.J. Irigoyen, M. Sanchez-Diaz // *Plant Sci.* – 2001 – V.161 – pp. 719-726.
80. Azam, F. Effect of humic acids on seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under different conditions / F. Azam, K.A. Malik, K.A. // *Pak. J. Botany* – 1982 – V.14 – pp. 47-48.
81. Badun, G.A. New variant of scintillation phase method / G.A. Badun, V.Yu. Pozdnyakova, Z.A. Tyasto, M.G. Chernysheva // *Radiokhimiya* – 2005 – №47 – pp. 536-540 (in Russian).
82. Bailey, G.W. Soil-pesticide relationships, review of adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids, with implication concerning pesticide

- bioactivity / G.W. Bailey, J.L. White // *Agric Food Chem.* – 1964 – V.12 – №4 – pp. 324-332.
83. Bais, H.P. How plants communicate using the underground information superhighway / H.P. Bais, S.-W. Park, T.L. Weir, R.M. Callaway, J.M. Vivanco // *Trends Plant Sci.* – 2004 – V.9 – №1 – pp. 26-32.
84. Balarezo, A.L. Influence of humic acid on 1-aminopyrene ecotoxicity during solar photolysis process / A.L. Balarezo, V.N. Jones, H. Yu, H.-M. Hwang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2002 – V.3 – pp. 1133-1144.
85. Baraud, F. Effect of cadmium and humic acids on metal accumulation in plants / F. Baraud, T.W.-M. Fan, R.M. Higashi // In: *Environmental Chemistry: Green Chemistry And Pollutants In Ecosystems*, Springer Verlag, The Netherlands, 2005 – pp. 205-214.
86. Barriuso E. Incorporating non-extractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time / E. Barriuso, W.C. Koskinen // *Soil. Sci. Soc. Am. J.* – 1996 – V.60 – pp. 150-157.
87. Bender, M.E. Significance of metal complexing agents in secondary sewage effluents / M.E. Bender, W.R. Matson, S.A. Jordan // *Environ. Sci. Technol.* – 1970 – V.4 – №6 – pp. 520-521.
88. Biesinger, K.E. Chronic toxicity of NTA (nitrilotriacetate) and metal-NTA complexes to *Daphnia magna* / K.E. Biesinger, R.W. Andren, J.W. Arthur // *J. Fish. Res. Board Can.* – 1974 – V.31 – №4 – pp.486-490.
89. Black, M.C. Dissolved organic macromolecules reduce the uptake of hydrophobic organic contaminants by the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / M.C. Black, J.F. McCarthy // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1988 – V.7 – pp. 593-600.
90. Blondeau, R. Biodegradation of natural and synthetic humic acids by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* / R. Blondeau // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989 – V.55 – pp. 1282-1285.
91. Bocanegra, M.P. Iron-humate as a source of iron for plants / M. Bocanegra, J.C. Lobartini, G.A. Orioli // *Comm. Soil Sci. Plant Analysis* – 2004 – V.35 – №17-18 – pp. 2567-2576.
92. Bollag, J.-M. Decontaminating soil with enzymes / J.-M. Bollag // *Environ. Sci. Technol.* – 1992 – V.26 – pp. 1876-1881.

93. Bollag, J.-M. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances / J.-M. Bollag, K. Mayers // *Sci. Total Environ.* – 1992 – V.117/118 – pp. 357-366.
94. Borgmann U. Determination of free metal ion concentrations using bioassays / U. Borgmann // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1981 – V.38 – №8 – p. 999-1002.
95. Bottomley, W.B. Some accessory factors in plant growth and nutrition / W.B. Bottomley // *Proc. of the Royal Society of London (Biology)* – 1914a – V.88 – pp. 237-247.
96. Bottomley, W.B. The significance of certain food substances for plant growth / W.B. Bottomley // *Annals of Botany (London)* – 1914b – V.34 – pp. 353-365.
97. Bracewell, J.M. Thermal degradation relevant to structural studies of humic substances / J.M. Bracewell, K. Haider, S.R. Larter, H.-R. Schulten // In: *Humic Substances II: In Search of Structure* – M.B.H. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm, R.S. Swift (Eds.) – New York, Wiley, 1989 – pp. 181-222.
98. Brack, W. Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effect in the photosynthetic apparatus / W. Brack, H. Frank // *Exotoxicol. Environ. Safety* – 1998 – V.40 – pp. 34-41.
99. Bressler, D.C. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioloropsis gallica* / D.C. Bressler, P.M. Fedorak, M.A. Pickard // *Biotech. Lett.* – 2000 – V.22 – pp. 1119–1125.
100. Brooks, M.L. Complexation and time-dependent accumulation of copper by larval fathead minnows (*Pimephales promelas*): implications for modeling toxicity / M.L. Brooks, C.J. Boese, J.S. Meyer // *Aquat. Toxicol.* – 2006 – V.78 – pp. 42-49.
101. Bruchet, A. THM formation potential and organic content: A new analytical approach / A. Bruchet, C. Rousseau, J. Mallevalle // *J. Am. Water Works Assoc.* – 1990 – V.82 – pp. 66-74.
102. Bubner M. Synthesis of isotopically labeled synthetic humic acids / M. Bubner, S. Pompe, M. Meyer, K.H. Heise, H. Nitsche // *Annual report 1998 of Institute of Radiochemistry – Forschungszentrum Rossendorf, Jan 1999 – FZR-247.*

103. Buchwalter, D.B. Modulation of cupric ion activity by pH and fulvic acid as determinants of toxicity in *Xenopus laevis* embryos and larvae / D.B. Buchwalter, G. Linder, L. R. Curtis // Environ. Toxicol. Chem. – 1996 – V.15 – №4 – pp. 568-573.
104. Cabaniss, S.E. A stochastic model for the synthesis and degradation of natural organic matter. Part III: modeling Cu(II) complexation / S.E. Cabaniss, P.A. Maurice, Madey G. // Appl. Geochem. – 2007 – V.22 – pp. 1646-1658.
105. Cacco, G. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings / G. Cacco, A. Giovanni, G. Emilio, A. Gelsomino, M. Sidari // J. Plant Nutr. Soil Sci. – 2000 – V.163 – №3 – pp. 313-320.
106. Cacco, G. Plant growth regulator activity of soluble humic complex / G. Cacco, G. Dell’Agnola // Can. J. Soil Sci. – 1984 – V.62 – pp. 306-310.
107. Campbell, P.G. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells – implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota / P.G. Campbell, M.R. Twiss, K.J. Wilkinson, K.J. // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1997 V.54 – pp. 2543-2554.
108. Capriel, P. Distribution and nature of bound (nonextractable) residues of atrazine in a mineral soil nine years after herbicide application / P. Capriel, A. Haisch, S.U. Khan // J. Agric. Food Chem. – 1985 – V.33 – pp. 567-569.
109. Carabias-Martinez, R. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography: evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters / R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernandez, F.J.S.-S. Roman, M.G.P. Flores // J. Chromatography A – 2002 – V.950 – pp. 157–166.
110. Carlberg, G.E. Influence of aquatic humus on the bioavailability of chlorinated micropollutants in *Atlantic salmon* / G.E. Carlberg, K. Martinsen, A. Kringstad, E. Gjessing, M.Grande, T. Källqvist, J.U. Skare, J.U. // Arch. Environ. Contam. Toxicological – 1986 – V.15 – pp. 543–548.
111. Carlsen, L. Radio-labelling of humic and fulvic materials for use in environmental studies / L. Carlsen, P. Lassen, P., J.V. Christiansen, P. Warwick, A. Hall, A. Randall // Radiochim. Acta – 1992 – V.58/59 – pp. 371-376.

112. Celis, R. Sorption of atrazine and simazine by model associations of soil colloids / R. Celis, J. Cornejo, M.C. Hermosin, W.C. Koskinen // Soil Sci. Soc. Am. J. – 1998 – V.62 – pp. 165-171.
113. Celis, R. Sorption–desorption of atrazine and simazine by model soil colloidal components / R. Celis, J. Cornejo, M.C. Hermosin, W.C. Koskinen // Soil Sci. Soc. Am. J. – 1997 – V.61 – pp. 436-443.
114. Chaney, K. The influence of organic matter on aggregate stability in some British soils. / K. Chaney, R.S. Swift // J. Soil Sci. – 1984 – V.35 – pp.223-230.
115. Chefetz, B. Sorption-desorption behavior of triazine and phenylurea herbicides in Kishon river sediments / B. Chefetz, Y.I Bilkes, T. Polubesova // Water Res. – 2004 – V.38 – pp. 4383-4394.
116. Chen, Y. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes / Y. Chen, C.E. Clapp, H. Magen // Soil Sci. Plant Nutr. – 2004 – V.50 – pp. 1089-1095.
117. Chen, Y. Stimulation of plant growth by humic substances: effects on iron availability / Y. Chen, C.E. Clapp, H. Magen, V.W. Cline // R. Soc. Chem. – 1999 – V.247 – 255-263.
118. Chen, Yu. Effect of fulvic acid on ABA, IAA and activity of superoxide dismutase and peroxidase in winter wheat seedling under drought condition / Yu. Chen, M. Cao, Yu. Li, X. Zhou // Zhiwu Shenglixue Tongxun – 2000 – V.36 – №4 – pp. 311-314.
119. Cheshire, M.V. Humic acid-III / M.V. Cheshire, P.A. Cranwell, R.D. Haworth // Tetrahedron – 1968 – V.24 – pp. 5155-5167.
120. Chinnusamy, V. Understanding and improving salt tolerance in plants / V. Chinnusamy, A. Jagendorf, J.-K. Zhu // Crop Sci. – 2005 – V.45 – pp. 437-448.
121. Christman, R.F. Chemical nature of organic color in water / R.F. Christman, M. Ghassemi // J. Am. Water Works Assoc. – 1966 – V.58 – pp. 723-741.
122. Clapp, C.E. Isolation, fractionation, functionalities, and concepts of structure of soil organic macromolecules / C.E. Clapp, M.H.B. Hayes, R.S. Swift // In Organic substances in soil and water, A J. Beck, K.C. Jones, M.B.H. Hayes, U. Mingelgrin (Eds.) – Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1993 – pp. 31-69.

123. Clapp, C.E. Measurements of sorption-desorption and isotherm analysis / C.E. Clapp, M.B.H. Hayes, U. Mingelgrin // In: Humic substances in transport processes, Anaheim, California, USA, 1997 – 1997, p. 13.
124. Cole, M.A. Effect of compost addition on pesticide degradation in planted soils / M.A. Cole, X. Liu, L. Zhang // In: Bioremediation of Recalcitrant Organics, R.E. Hinchee, D.B. Anderson, R.E. Hoeppe (Eds.) – Battelle Press, Columbus, 1995 – pp. 183-190.
125. Cooper, R.J. Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass / R.J. Cooper, C. Liu, D.C. Fisher // Crop Sci. – 1998 – V.38 – pp. 1639-1644.
126. Coquet, Y. Sorption of pesticides atrazine, isoproturon, and metamitron in the vadose zone / Y. Coquet // Vadose Zone J. – 2003 – V.2 – pp. 40-51.
127. Cozzi, R. Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity / R. Cozzi, M. Nicolai, P. Perticone, R. De Salvia, F. Spuntarelli // Mutat. Res. – 1993 – V.299 – pp. 37-44.
128. Crisostomo, A.G. Generation of superoxide and singlet oxygen from atocopherolquinone and analogues / A.G. Crisostomo, R.B. Moreno, S. Navaratnam, J.A. Wilkinson, R.H. Bisby // Free Radic. Res. – 2007 – V.41 – №6 – pp. 730-737.
129. Croué, J.-P. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site / J.-P. Croué, M.F. Benedetti, D. Violleau, J. Leenheer // Environ. Sci. Technol. – 2003 – V.37 – №2 – pp. 328-336.
130. Currie, H.A. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies / H.A. Currie, C.C. Perry // Ann. Botany - 2007 – V.100 – pp. 1383–1389.
131. Dakora, F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes / F.D. Dakora // New Phytologist – V.158 – pp. 39-49.
132. Dakora, F.D. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments / F.D. Dakora, D.A. Phillips // Plant Soil – 2002 – V.245 – pp. 35-47.

133. Danchenko, N.N. A use of barita method for determination of the total acidity of humic substances: conditions of applicability / N.N. Danchenko, I.V. Perminova, V.S. Petrosyan // Russian J. Ecol. Chem. – 1995 – V.4 – №4 – pp. 313-317.
134. David, P.P. A humic acid improves growth of tomato seedlings in solution culture / P.P. David, P.V. Nelson, D.C. Sanders // J. Plant Nutr. – 1994 – V.17 – pp. 173-184.
135. Day, K.E. Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus) / K.E. Day // Environ. Toxicol. Chem. – 1991 – V.10 – pp. 91–101.
136. Dec, J. Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions / J. Dec, K. Haider, J.-M. Bollag // Chemosphere – 2003 – V.52 – p. 549.
137. Dehorter, B. Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* / B. Dehorter, R. Blondeau, R. // FEMS Microbiol. Lett. – 1992 – V.94 – pp. 209–216.
138. Dell’Agnola, G. Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces / G. Dell’Agnola, S. Nardi // Biol. Fertil. Soils – 1987 – V.4 – pp. 115-118.
139. Dell’Agnola, G. News about biological effect of humic substances / G. Dell’Agnola, S. Nardi // In: Humic Substances Effect on Soil and Plant – Italy, Reda, 1986 – pp. 78-88.
140. Demir, K. Effects of humic acids on the yield and mineral nutrition of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown with different salinity levels / K. Demir, A. Günes, A. Inal, M. Alpaslan // Acta Hort. (ISHS) – 1999 – V.492 – pp. 95-104.
141. Devere, O.C. Stabilization of fertilizer nitrogen-15 into humic substances in aerobic vs. waterlogged soil following straw incorporation / O.C. Devere, W.R. Horwath // Soil Sci. Soc. Am. J. – 2001 – V.65 – pp. 499-510.

142. Devitt, E.C. Dialysis investigation of atrazine-organic matter interactions and the role of divalent metal / E.C. Devitt, M.R. Weisner // *Environ. Sci. Technol.* – 1998 – V.32 – pp. 232-237.
143. Di Toro, D.M. Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: methodology and initial application / D.M. Di Toro, J.A. McGrath, D.J. Hansen, W.J. Berry, P.R. Paquin, R. Mathew, K.B. Wu, R. C. Santore // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2005 – V.24 – №10 – pp. 2410-2427.
144. Diallo, M.S. 3-D structural modeling of humic acids through experimental characterization, computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. 1. Chelsea soil humic acid / M.S. Diallo, A. Simpson, P. Gassman, J.L. Faulon, J.H. Jr. Johnson, W.A. Goddard III, P.G. Hatcher // *Environ. Sci. Technol.* – 2003 – V.37 – pp. 1783-1793.
145. Dierckx, A. Stability of ^{125}I and ^{14}C labeled boom clay organic matter / A. Dierckx, A. Hall, P. De Cannière, P. Warwick, M. Put // *Radiochim. Acta* – 1998 – V.82 – pp. 379-384.
146. DiTomaso, J.M. Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings / J.M. DiTomaso, J.J. Hart, L.V. Kochian // *Plant Physiol.* – 1992 – V.98 – pp. 611-620.
147. Doblin, M. Uptake of humic substances by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* / M. Doblin, C. Legrand, P. Carlsson, C. Hummert, E. Granéli, G. Hallegraeff // *Abstracts of the 9th conference on Harmful Algal Blooms – Tasmania, 2000.*
148. Dudal, Y. Accounting for natural organic matter in aqueous chemical equilibrium models: a review of the theories and applications / Y. Dudal, F. Gerard // *Earth Sci. Rev.* – 2004 – V.66 – pp. 199–216.
149. Dunstone, R.L. Variable responses of stomatal conductance, growth, and yield to fulvic acid applications to wheat / R.L. Dunstone, R.A. Richards, H.M. Rawson // *Aust. J. Agric. Res.* – 1988 – V.39 – pp. 547-553.
150. Environmental Protection Agency. Water Quality Standards; establishment of numeric criteria for priority toxic pollutants for the state of California // Rule, 40 CFR Part 131, Fed. Register. – 2000 – V.65 – №97 – pp. 31682-31719.

151. Ermakov, E.I. Effect of humus acids on the mechanical properties of cell walls / E.I. Ermakov, I.N. Khitorova, O.V. Skobeleva // *Rus. J. Plant Physiol.* – 2000 - №47 – pp. 518-525.
152. Ervin, E.H. Applied physiology of natural and synthetic plant growth regulators on turfgrasses / E.H. Ervin, X. Zhang // In: *Handbook of turfgrass management and physiology* – Pessarakli (ed.) – Taylor and Francis, 2007 – pp. 171-200.
153. Espeland, E.M. Complexation, stabilization and UV photolysis of extracellular and surface-bound glucosidase and alkalinephosphatase: implications for biofilm microbiota / E.M. Espeland, R.G. Wetzel // *Microbial ecology* – 2001 – V.42 – pp. 572-585.
154. Evans, E.A. Tritium and its compounds / E.A. Evans // Butterworths, London, 1966 – 441p.
155. Fein, J.B. Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces / J.B. Fein, J.-F. Boily, K. Guclu, E. Kaulbach // *Chem. Geol.* – 1999 – V.162 – pp. 33-45.
156. Fielding, M. Pesticides in ground water and drinking water / M. Fielding, D. Barcelo, A. Helweg, S. Galassi, L. Torstensson, P. Readman, J.W., T.A. Albanis, D. Barcelo, S. Galassi, J. Tronczynski, Van Zoonen, R. Wolter, G. Angeletti // *Water Pollut. Res. Rep.* – 1992 – V.27 – pp. 1–136.
157. Fielding, M. Pesticides in ground water and drinking water / M. Fielding, D. Barcelo, A. Helweg, S. Galassi, L. Torstensson, P.J.W. Readman, T.A. Albanis, D. Barcelo, S. Galassi, J. Tronczynski, Van Zoonen, R. Wolter, G. Angeletti // *Water Pollut. Res. Rep.* – 1992 – V.27 – p. 1–136.
158. Flaig, W. Nachweis der Bildung von Hydroxy-p-Benzochinon als Zwischenprodukt bei der Autooxydation von Hydrochinon in schwach alkalischer Lösung / W. Flaig, J.C. Salfeld // *Naturwissenschaften* – 1960 – V.47 – p. 516.
159. Flaig, W. UV-Spektren und Konstitution von p-Benzochinonen / W. Flaig, J.C. Salfeld // *Liebigs Ann. Chem.* – 1958 – V.618 – p. 117.
160. Fong, S.S. Characterization of the coal derived humic acids from Mukah, Sarawak as soil conditioner / S.S. Fong, L. Seng, W.N. Chong, J. Asing, M. Nor, A. Pauzan // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2006 - V.17 – №3 – pp. 582-587.

161. Fortun, C. Action of humic acid preparations on leaf development, mineral elements contents and chloroplast ultrastructure of ryegrass plants / C. Fortun, S. Rapsch, C. Ascaso // *Photosynthetica* – 1985 – V.19 – pp. 294-299.
162. Foyer, C.H. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-valuation of the concept of oxidative stress in a physiological context / C.H. Foyer, G. Noctor // *Plant Cell Environ* – 2005 – V.28 – pp. 1056-1071.
163. Frangne, N.T. Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and *Arabidopsis* cell culture vacuoles. Energization occurs by H⁺-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms Eggmann / N.T. Frangne, C. Koblischke, G. Weissenbo, E. Martinoia, M. Klein M // *Plant Physiol.* – 2002 – V.128 – pp. 726–733.
164. Franke, K. A new technique for radiolabelling of humic substances / K. Franke, J.T. Patt, H. Kupsch, J. Steinbach // *Radiochim. Acta* – 2004 – V.92 – №4-6 – pp. 359-362.
165. Franke, K. Use of radioactive for the characterization of humic and fulvic acids in high performance size exclusion chromatography / K. Franke, H. Kupsch // *Proceed. 20th International Meeting of the International Humic Substances Society* – Boston, USA, 2002.
166. Freidig, A.P. Estimating impact of humic acid on bioavailability and bioaccumulation of hydrophobic chemicals in guppies using kinetic solid-phase extraction / A.P. Freidig, E.A. Garicano, F.J.M. Busser, J.L.M. Hermens // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1998 – V.18 – №6 – pp. 998-1004.
167. Frimmel, F.H. Behaviour and functions of freshwater humic substances some biological, physical and chemical aspects / F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun, B. Hamsch, S. Huber, S. Scheck, U. Schimiedel // *In: Humic substances in the global environment and implications on human health* – N. Senesi, T.M. Miano, (Eds.) – Elsevier Science, New-York, 1994 – pp. 735-755.
168. Frost, P.C. The effect of cadmium on fulvic acid adsorption to *Bacillus subtilis* / P.C. Frost, P.A. Maurice, J.B. Fein // *Chem. Geol.* – 2003 – V.200 – pp. 217-224.

169. Fu, J. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress / J. Fu, B. Huang // *Environ. Experiment. Bot.* – 2001 – V.45 – pp. 105-114.
170. Fukushima, M Functionalities of humic acid for the remedial processes of organic pollutants / M. Fukushima, K. Tatsumi // *Analyt. Sci.* – 2001 – V.17 – pp. i821-i823.
171. Gaechter, R. Regulation of copper availability to phytoplankton by macromolecules in lake water / R. Gaechter, J.S. Davis, A. Mares // *Environ. Sci. Technol.* – 1978 – V.12 – №13 – pp.1416-1421.
172. Galston, A.W. Polyamines and senescence in plants / A.W. Galston, R. Kaur-Sawhney // In: *Plant senescence: its biochemistry and physiology* - Thomson W.W., Nothnagel E.A., Huffaker R.C (Eds.) – Am. Soc. Plant Physiologists – Rockville, MD, 1987 – pp 167-181.
173. Galston, A.W. Polyamines in plant physiology / A.W. Galston, R.K. Sawhney // *Plant Physiol.* – 1990 – V.94 – pp. 406-410.
174. Gamble, D.S. Atrazine hydrolysis in aqueous suspension of humic acid at 25.0°C / D.S. Gamble, S.U. Khan // *Can. J. Chem.* – 1988 – V.66 – pp. 2605-2617.
175. García-Mina, J.M. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types / J.M. García-Mina, M.C. Antolín, M. Sanchez-Diaz // *Plant and Soil* – 2004 – V.258 – pp.57-68.
176. Gardner, J.L. Interactive effects of aluminum and humic substances on salvinia / J.L. Gardner, S.H. Al-Hamdani // *J. Aquat. Plant Manage* – 1997 – V.35 – pp. 30-34.
177. Gaspar, A. Multiple charged constituents in Suwannee river natural organic matter / A. Gaspar, E. Kunenkov, R. Lock, M. Desor, I. Perminova, Ph. Schmitt-Kopplin // In: *From molecular understanding to innovative applications of humic substances* – I.V. Perminova, N.A. Kulikova (Eds.) – Proc. 14th Meeting of Int. Humic Substances Soc., Moscow – Saint Petersburg, Sept. 14-19, 2008 – pp. 15-18.

178. Gau, R.J. Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF-kappa B activation / R.J. Gau, H.L. Yang, S.N. Chow, J.L. Suen, F.J. Lu // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2000 – V.166 – pp. 59-67.
179. Genevini, P.L. Herbicide effect of atrazine, diuron, linuron and prometon after interaction with humic acids from coal / P.L. Genevini, G.A. Saxxhi, D. Borio // In: *humic substances in the global environment and implications on human health* – N. Senesi, T.M. Miano (Eds.) – Elsevier Science, 1994 – pp. 1291-1296.
180. Gerritsen, J. Electrophoretic mobility of natural particles and cultured organisms in fresh water / J. Gerritsen, S.W. Bradley // *Limnol. Oceanogr.* – 1987 – V.32 – pp. 1049-1058.
181. Gevao, B. Bound residues in soils: a review / B. Gevao, K.T. Semple, K.C. Jones // *Environ. Pollution* – 2000 – V.180 – pp. 3–14.
182. Gianfreda, L. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes / L. Gianfreda, J.-M. Bollag // *Soil Sci. Soc. Am. J.* – 1994 – V.58 – pp. 1672-1681.
183. Giesy, J.P. Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (*Daphnidae*) / J.P. Giesy, A. Newell, G.J. Levesee // *Sci. Total. Environ.* – 1983 – V.28 – pp. 23–36.
184. Gilmour, J.T. S-triazines adsorption studies: Ca-H-humic acid / J.T. Gilmour, N.T. Coleman // *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* – 1971 – V.35 – №2 – pp. 256-259.
185. Gjessing, A.M.B. Oxidative coupling during gut passage in marine deposit-feeding invertebrates / A.M.B. Gjessing, L.M. Mayer // *Limnol. Oceanogr.* – 2004 – V.49 – №3 – pp. 716-726.
186. Gjessing, E.T. Physical and chemical characteristics of aquatic humus / E.T. Gjessing // Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science, 1976.
187. Gjessing, E.T. The effect of aquatic humus on the biological availability of cadmium / E.T. Gjessing // *Arch. Hydrobiol.* – 1981 – V.91 – №2 – pp.144-149.

188. Goodman, B.A. The occurrence of copper porphyrin complexes in soil humic acids / B.A. Goodman, M.V. Cheshire // *J. Soil Sci.* – 1976 – V.27 – pp. 337-347.
189. Graber, E.R. Hydration-facilitated sorption of specific interacting organic compounds by model soil organic matter / E.R. Graber, M.D. Borisover // *Environ. Sci. Technol.* – 1998 – V.32 – №2 – pp. 258–263.
190. Gramss, G., Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes / G. Gramms, D. Ziegenhagen, S. Sorge // *Microbial Ecol.* – 1999 – V.37 – pp. 140–151.
191. Gu, C. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid / C. Gu, K.G. Karthikeyan, S.D. Sibley, J.A. Pedersen // *Chemosphere* – 2006 – V.66 – pp. 1494-1501.
192. Gu, Zh. Effects of fulvic acid on the bioavailability of rare earth elements and GOT enzyme activity in wheat (*Triticum aestivum*) / Zh. Gu, X. Wang, X. Gu, J. Cheng, W. Jing, D.L. Liansheng, Y. Chen // *Chemosphere* – 2001 – V.44 – №4 – pp. 545-551.
193. Gunasekara, A.S. Sorption and desorption of naphthalene by soil organic matter: importance of aromatic and aliphatic components / A.S. Gunasekara, B. Xing // *J. Environ. Qual.* – 2003 – V.32 – pp. 240-246.
194. Gustafsson, J.P. Modeling the acid–base properties and metal complexation of humic substances with the Stockholm humic model / J.P. Gustafsson // *J. Colloid Interface Sci.* – 2001 – V.244 – pp. 102–112.
195. Haider, K.M. Mineralization of ¹⁴C-labelled humic acids and of humic acid bound ¹⁴C-xenobiotic by *Phanerochaete chrysosporium* / K.M. Haider, J.P. Martin // *Soil Biol. Biochem.* – 1988 – V.20 – p. 425.
196. Haitzer, M. Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances / M. Haitzer, G. Abbt-Braun, W. Traunspurger, Ch.E.W. Steinberg // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1999 – V.18 – №12 – pp. 2782-2788.
197. Hallett, F.R. Mechanical properties of vesicles / F.R. Hallett, J. Marsh, B.G. Nickel, J.M. Wood // *Biophys. J.* – 1993 – V.64 – pp. 426–434.

198. Hamman, B. Cell-wall extension as a mode of action of coal-derived humates / B. Hamman, G. Koning, H.A. Van De Venter // S. Afr. J. Bot. – 1999 – V.65 – №3 – pp. 197-202.
199. Hansch, C. Exploring QSAR hydrophobic, electronic, and steric constants / C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman // American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
200. Hartmann, T. Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris* / T. Hartmann, H. Sander, R. Adolph, G. Toppel // Planta – 1988 – V.175 – pp. 82-90.
201. Harvey, G.R. Synthesis of marine humic substances from unsaturated lipids / G.R. Harvey, D.A. Boran, S.R. Piotrowicz, C.P. Weisel // Nature – 1984 – V.309 – pp. 244-246.
202. Hayes, M.H.B. Adsorption of triazine herbicides on soil organic matter, including a short review on soil organic matter chemistry / M.B.H. Hayes // Residue Rev. – 1970 – V.32 – pp. 131-174.
203. Hayes, M.H.B. Solvent systems for the isolation of organic components from soils / M.H.B. Hayes // Soil Sci. Soc. Am. J. – 2007 – V.70 – pp.986-994.
204. Hernando, F. Semaine d'etude. Matiere organique et fertilite du Sol / F. Hernando // Ponlifica Aced/ Scient – 1968 – p. 805.
205. Higgs, J.J. Colloid transport in a glacial sand aquifer. Laboratory and field studies / J.J. Higgs, G.M. Williams, I. Harrison, P. Warwick, M.P. Gardiner // Colloids Surf. A – 1993 – V.73 – pp. 179-200.
206. Hofrichter, D. Degradation of lignite (low-rank coal) by ligninolytic basidiomycetes and their manganese peroxidase system / D. Hofrichter, S. Ziegenhagen, R.U. Sorge, W.F. Bublitz // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999 – V.52 – pp. 78-84.
207. Hofrichter, M. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* / M. Hofrichter, K. Scheibner, I. Schneegaû, W. Fritsche // Appl. Environ. Microbiol. – 1998 – V.64 – pp. 399-404.

208. Imbufe, A.U. Effects of potassium humate on aggregate stability of two soils from Victoria, Australia / A.U. Imbufe, A.F. Patti, D. Burrow, A. Surapaneni, W.R. Jackson, A.D. Milner // *Geoderma* – 2005 – V.125 – pp. 321-330.
209. Inaba, Sh. Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts / Sh. Inaba, Ch. Takenaka // *Environ. Int.* – 2005 – V.31 – №4 – pp. 603-608.
210. Ji, R. Transformation and mineralization of synthetic ¹⁴C-labeled humic model compounds by soil-feeding termites / R. Ji, A. Kappler, A. Brune // *Soil Biol. Biochem.* – 2000 – V.32 – p. 1281-1290.
211. John, B. Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use / B. John, T. Yamashita, B. Ludwig, H. Flessa // *Geoderma* – 2005 – V.128 – pp. 63-79.
212. Jolivalt, C. Transformation of N1, N1 – dimethyl – N – (hydroxyphenyl) ureas from the white rot fungus *Trametes versicolor* / C. Jolivalt, A. Raynal, E. Caminade, B. Kokel, F. le Goffic, C. Mougin // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999 – V.51 – pp. 676–681.
213. Jones, M.N. Colloidal properties of humic substances / M.N. Jones, N.D. Bryan // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1998 – V.78 – pp. 1–48.
214. Kappler, A. Synthesis and characterization of specifically ¹⁴C-labeled humic model compounds for feeding trials with soil-feeding termites / A. Kappler, R. Ji, A.L. Brune // *Soil Biol. Biochem.* – 2000 – V.32 – pp. 1271-1280.
215. Karickhoff, S.W. Organic pollutant sorption in aquatic systems / S.W. Karickhoff // *J. Hydraul. Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng.* – 1984 – V.110 – pp. 707–735.
216. Kaur-Sawhney, R. Polyamine induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts / R. Kaur-Sawhney, H.E. Flores, A.W. Galston // *Plant Physiol.* – 1980 – V.65 – pp. 368-371.
217. Khalaf, M. Comparison of sorption domains in molecular weight fractions of a soil humic acid using solid-state ¹⁹F NMR / M. Khalaf, S.D. Kohl, E. Klumpp, J. Rice, E. Tombacz // *Environ. Sci. Technol.* – 2003 – V.37 – pp. 2855-2860.

218. Khan, S.U. The interaction of organic matter with pesticides / S.U. Khan // In: Soil organic matter – M. Schnitzen, S.U. Khan (Eds.) – Amsterdam Oxford NJ, Elsev. Scien. Pub. Comp., 1978 – Ch. 4. – p. 137-171.
219. Khwaja, A.R. Binding constants of divalent mercury (Hg^{2+}) in soil humic acids and soil organic matter / A.R. Khwaja, P.R. Bloom, P.L. Brezonik // Environ. Sci. Technol. – 2006– V.40 –pp. 844-849.
220. Kim, J.I. Complexation of metal ions with humic acid: metal ion charge neutralisation model / J.I. Kim, K.R. Czerwinski // Radiochim. Acta – 1996 – V.73 – pp. 5–10.
221. Kinniburgh, D.G. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency / D.G. Kinniburgh, W.H. van Riemsdijk, L.K. Koopal, M. Borkovec, M.F. Benedetti, M.J. Avena // Colloids Surf., A – 1999 – V.151 – pp. 147–166.
222. Kirschner, R.A. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium* / R.A. Kirschner, B.C. Parker, J.O Falkinham // FEMS Microbiol. Ecol. – 1999 – V.30 – pp. 327-332.
223. Klavins, M. Humic substances as catalysts in condensation reactions / M. Klavins, J. Dipane, K. Babre // Chemosphere – 2001 – V.44 – pp. 737-742.
224. Kleinhempel, D. Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes / D. Kleinhempel // Albrecht-Thaer-Archiv. – 1970 – V.14 – №1 – pp. 3-14.
225. Kölbl, A. A comparison of two methods for the isolation of free and occluded particulate organic matter / A. Kölbl, J. Leifeld, I. Kögel-Knabner // J. Plant Nutr. Soil Sci. – 2005 – V.168 – pp.660-667.
226. Koopal, L.K. Ion binding to natural organic matter: general considerations and the NICA–Donnan Model / L.K. Koopal, T. Saito, J.P. Pinheiro, W.H. van Riemsdijk // Ion Colloids Surf., A – 2005 – V.265 – pp. 40–54.
227. Koprivnjak, J.F. Coupling reverse osmosis with electrodialysis to isolate natural organic matter from fresh waters / J.F. Koprivnjak, E.M. Perdue, P.H. Pfromm // Water Res. – 2006 – V.40 – pp. 3385-3392.
228. Korotkova, E.I. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltamperometry / E.I. Korotkova,

- Y.A. Karbainov, O.A. Avramchik // *Annal Bioanal. Chem.* – 2003 – V.375 – pp. 465-468.
229. Kulikova, N.A. Auxin-like activity of different fractions of coal humic acids / N.A. Kulikova, A.D. Dashitsyrenova, I.V. Perminova, G.F. Lebedeva // *Bulgarian J. Ecolog. Sci.* – 2003 – V.2 – №3-4 – pp. 55-56.
230. Kulikova, N.A. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota / N.A. Kulikova, E.V. Stepanova, O.V. Koroleva // In: *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice – I.V. Perminova, K. Hatfield, N. Hertkorn (Eds.) – NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences – V.52 – Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006 – pp. 285-310.*
231. Kulikova, N.A. Sorption-desorption of atrazine on mineral-bound humic substances related to their structure / N.A. Kulikova, I.V. Perminova // *Fresenius Environ. Bull.* – 2007 – V.16 – №9a – pp. 1061-1068.
232. Lafond, G.P. Soil temperature and moisture stress effects on kernel water uptake and germination of winter wheat / G.P. Lafond, D.B. Fowler // *Agron. J* – 1989 – V.81 – №3 – pp. 447-450.
233. Landrum, P.F. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter / P.F. Landrum, M.D. Reinhold, S.R. Nihart, B.J. Eadie // *Environ. Toxicological Chem.* – 1985 – V.4 – pp. 459-467.
234. Landrum, P.F. Reduction in bioavailability of organic contaminants to the amphipod *Pontoporeia hoyi* by dissolved organic matter of sediment interstitial waters / P.F. Landrum, S.R. Nihart, B.J. Eadie, L.R. Herche // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1987 – V.6 – pp. 11-20.
235. Lange, N. Grundlagenuntersuchungen zu immunologischen Reaktionen an der Laboratoriumstratte unter dem Einfluss von Huminsäuren / N. Lange, S. Golbs, M. Kuhnert // *Arch. Exper. Veter.-Med.* – 1987 – V.41 – pp. 140-146.
236. Langford, C.H. When should humic substances be treated as dynamic combinatorial systems? / C.H. Langford, J.R. Melton // In: *Humic Substances: Molecular Details and Applications in Land and Water Conservation –*

- E.A. Ghabbour, G. Davies (Eds.) – New York, Taylor & Francis, 2005 – pp. 65-78.
237. Latch, D.E. Microheterogeneity of singlet oxygen distributions in irradiated humic acid solutions / D.E. Latch, K. McNeil // *Science* – 2006 – V.311 – pp. 1743-1747.
238. Leenheer, J.A. Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry / J.A. Leenheer, C.E. Rostad, P.M. Gates, E.T. Furlong // *Anal. Chem.* – 2001 – V.73 – pp. 1461-1471.
239. Leenheer, J.A. Progression from model structures to molecular structures of natural organic matter components / J.A. Leenheer // *Annals Environ. Sci.* – 2007 – V.1 – pp. 57-68.
240. Leenheer, J.A. Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia. 2. Major structures / J.A. Leenheer, R.L. Wershaw, M.M. Reddy // *Environ. Sci. Technol.* – 1995 – V.29 – pp. 399-405.
241. Leenheer, J.A. Structural components and proposed structural models of fulvic acid from the Suwannee River / J.A. Leenheer, D.M. McKnight, E.M. Thurman, P. MacCarthy // In: *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties, and Proposed Structures* – R.C. Averett, J.A. Leenheer, D.M. McKnight, K.A. Thorn (Eds.) – U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2373, Denver, CO: U.S. Geological Survey, 1994 – pp. 195-211.
242. Leenheer, J.A. Terpenoids as major precursors of dissolved organic matter in landfill leachates, surface water, and groundwater / J.A. Leenheer, M.A. Nanny, C. McIntyre // *Environ. Sci. Technol.* – 2003 – V.37 – pp. 2323-2331.
243. Leenheer, J.A. Progression from model structures to molecular structures of natural organic matter components / J.A. Leenheer // *Annals Environ. Sci.* – 2007 – V.1 – pp. 57-68.
244. Lesage, S. Humic acids enhanced removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers: developing a sustainable technology / S. Lesage, K.S. Novakowski, S. Brown, K. Millar // *J. Environ. Sci. Health A* – 2001 – V.36 - №8 – pp. 1515-1533.

245. Lesan, H.M. Evaluation of atrazine binding to surface soils / H.M. Lesan, A. Bhandari // Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research – 2000 – pp. 76-89.
246. Li, L. Chemical and molecular heterogeneity of humic acids repetitively extracted from a peat / L. Li, W. Huang, P. Peng, G. Sheng, J. Fu // Soil Sci. Soc. Am. J. – 2003 – V.67 – pp. 740–746.
247. Li, M. Physiological effect of a new FA antitranspirant on maize / M. Li, S. Li, Sh. Zhang, B. Chi // Zhongguo Nongye Kexue (Beijing, China) – 2003 – V.36 – №11 – pp. 1266-1271.
248. Liang, Y. Mechanisms of siliconmediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review / Y. Liang, W. Sun, Y.-G. Zhu, P. Christie // Environ. Poll. – 2007 – V.147 – pp. 422–428.
249. Lieber, M.R. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghost / M.R. Lieber, T.L. Steck // J. Biol. Chem. – 1982 – V.257 – pp. 11660-11666.
250. Lippold, H. Effect of humic acid on the pH-dependent adsorption of terbium (III) onto geological materials / H. Lippold, N. Müller, H. Kupsch // Appl. Geochem. – 2005 – V.20 – pp. 1209-1217.
251. Lippold, H. Investigations on the influence of trivalent electrolytes on complexation and adsorption of heavy metals with humic substances by means of radioactive tracers / H. Lippold; D. Rößler, H. Kupsch // In: Investigations on the complexation behavior of humic acids and their influence on the migration of radioactive and non-radioactive substances under conditions close to nature – Scientific report FZKA 6999 – C.M. Marquardt (Ed.) – Forschungszentrum Karlsruhe, 2004 – pp 177-217.
252. Loiseau, L. Characterization of the atrazine's bound (nonextractable) residues using fractionation techniques for soil organic matter / L. Loiseau, E. Barriuso // Environ. Sci. Technol. – 2002 – V.36 – pp. 683–689.
253. Lorenzo, J.I. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater / J.I. Lorenzo, O. Nieto, R. Beiras // Aquat. Toxicol. – 2002 – V.58 – pp. 27-41.

254. Lowe, L.E. Studies on the nature of sulfur in peat humic acids from Fraser River Delta, British Columbia / L.E. Lowe // *Sci. Total Environ.* – 1992 – V.113 – pp. 133-145.
255. Lu, Y. Demonstration of the "Conditioning Effect" in soil organic matter in support of a pore deformation mechanism for sorption hysteresis / Y. Lu, J.J. Pignatello // *Environ. Sci. Technol.* – 2002 – V.36 – pp. 4553-4561.
256. Ma, Y.B. Determination of labile Cu in soils and isotopic exchangeability of colloidal Cu complexes / Y.B. Ma, E. Lombi, A.L. Nolan, M.J. McLaughlin // *European J. Soil Sci.* – 2006 – V.57 – pp. 147-153.
257. Mackowiak, C.L. Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat / C.L. Mackowiak, P.R. Grossl, B.G. Bugbee // *Soil Sci. Soc. Am. J.* – 2001 – V.65 – pp. 1744-1750.
258. Maggioni, A. Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺ + K⁺) ATPase activity / A. Maggioni, Z. Varanini, S. Nardi, R. Pinton, R. // *Sci. Total Environ.* – 1987 – V.62 – pp. 355-363.
259. Maheswari, M. Transverse relaxation time of leaf water protons and membrane injury in wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to high temperature / M. Maheswari, D.K. Joshi, R. Saha, S. Nagarajan, P.N. Gambhir // *Ann. Botany* – 1999 – V.84 – pp. 741-745.
260. Maillard, L.C. Synthèse de matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs / L.C. Maillard // *Ann. Chim. Phys.* – 1916 – V.5 – pp. 258-317.
261. Malcom, R.E. Humic substances and phosphatase activities in plant tissues / R.E. Malcom, D. Vaughan // *Soil Biol. Biochem.* – 1979 – V.11 – pp. 65-72.
262. Manning, P.G. Equilibrium studies of metal-ion complexes of interest to natural waters — VII. Mixed ligand complexes of Cu(II) involving fulvic acid as primary ligand / P.G. Manning, S. Ramamoorthy // *J. Inorg. Nucl. Chem.* – 1973 – V.35 – №5 – p. 1577.
263. Mantoura, R.F.C. The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds / R.F.C. Mantoura, J.R. Riley // *Anal. Chim. Acta* – 1975 – V.78 – pp. 193-200.

264. Mao, J.D. Correlation of poly(methylene)-rich amorphous aliphatic domains in humic substances with sorption of a nonpolar organic contaminant phenanthrene / J.D. Mao, L. Hundal, M. Thompson, K. Schmidt-Rohr // *Environ. Sci. Technol.* – 2002 – V.36 – pp. 929-936.
265. Mao, J.D. Structural investigation of humic substances using 2-D solid-state nuclear magnetic resonance / J.D. Mao, K. Schmidt-Rohr, B. Xing // In: *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soil, and Water* – E.A. Ghabbour, G. Davies (Eds.) – Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry, 2000 – pp. 83-89.
266. Maqueda, C. Adsorption of chlordimeform by humic substances from different soils / C. Maqueda, E. Morillo, J.L. Perez, A. Justo // *Soil Sci.* – 1990 – V.150 – p. 431.
267. Martin, J.P. Influence of microorganisms on soil aggregation and erosion. II / J.P. Martin, S.A. Waksman // *Soil Sci.* – 1941 – V.52 – pp.381-394.
268. Martin-Neto, L. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances / L. Martin-Neto, D. Gomes Traghetta, C.M.P. Vaz, S. Crestana, G. Sposito // *J. Environ. Qual.* – 2001 – V.30 – pp. 520-525.
269. Masciandaro, G. Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substances / G. Masciandaro, B. Ceccanti // *Soil Tillage Res.* – 1999 – V.51 – pp. 129-137.
270. Mathur, S.P. A chemical and spectroscopic characterization of some synthetic analogues of humic acids / S.P. Mathur, M. Schnitzer // *Soil. Sci. Soc. Am. J.* – 1978 – V.42 – pp. 591-596.
271. Maurice, P.A. Fractionation of an aquatic fulvic acid upon adsorption to the bacterium, *Bacillus subtilis* / P.A. Maurice, M. Manecki, J.B. Fein, J. Schaefer // *Geomicrobiol. J.* – 2004 – V.21 – pp. 69-78.
272. Mayer, A.M. Laccase: new functions for an old enzyme / A.M. Mayer, R.C. Staples // *Phytochemistry* – 2002 – V.60 – pp. 551-565.
273. McCarthy, J.F. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material / J.F. McCarthy, B.D. Jimenez // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1985 – V.4 – pp. 511-521.

274. McClaine, J.W. Reversal of flagellar rotation is important in initial attachment of *Escherichia coli* to glass in a dynamic system with high- and low-ionic-strength buffers / J.W. McClaine, R.M. Ford // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002 – V.68 – pp. 1280-1289.
275. Meinelt, T. Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances / T. Meinelt, R.C. Playle, M. Pietrock, B.K. Burnison, A. Wienke, Ch.E.W. Steinberg // *Aquat. Toxicol.* – 2001 – V.54 – 205-215.
276. Merdy, P. Modeling metal–particle interactions with an emphasis on natural organic matter / P. Merdy, S. Huclier, L.K. Koopal // *Environ. Sci. Technol.* – 2006 – pp. 7954-7466.
277. Milne, C.J. Generic NICA–Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances / C.J. Milne, D.G. Kinniburgh, E. Tipping // *Environ. Sci. Technol.* – 2003 – V.37 – pp. 958–971.
278. Misra, V. Effect of humic acid on the bioavailability of γ -hexachlorocyclohexane in *Marsilea minuta* (L.) / V. Misra, S.D. Pandey, P.N. Viswanathan // *Environ. Monitor. Assessment* – 2000 – V.61 – pp. 229-235.
279. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance / R. Mittler // *Trends Plants Sci.* – 2002 – V.7 – №9 – pp. 405-410.
280. Mougín, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications / C. Mougín, C. Jolival, P. Briozzo, C. Madzak // *Environ. Chem. Lett.* – 2003 – V.1 – pp. 145–148.
281. Muscolo, A. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism / A. Muscolo, F. Bovallo, F. Gionfriddo, S. Nardi // *Soil Biol. Biochem.* – 1999 – V.31 – pp. 1303-1311.
282. Muscolo, A. Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia* / A. Muscolo, M. Felici, G. Concheri, S. Nardi, S. // *Biol. Fertil. Soils* – 1993 – V.15 – pp. 127-131.
283. Muscolo, A. IAA detection in humic acids / A. Muscolo, S. Cutrupi, S. Nardi // *Soil Biol. Biochem.* – 1998 – V.30 – pp. 1199-1201.

284. Myasoedov, N.F. Introduction of tritium into organic compounds by isotope exchange reactions / N.F. Myasoedov // J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticuls – 1993 – V.33 – №5 – pp. 391-401.
285. Nardi, S. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings / S. Nardi, C. Gessa, L. Ferrarese, L. Trainotti, G. Casadoro, D. Pizzeghello // Soil Biol. Biochem. – 2000 – V.32 – pp. 415-419.
286. Nardi, S. Physiological effect of humic substances on higher plants / S. Nardi, D. Pizzeghello, A. Muscolo, A. Vianello // Soil Biol. Biochem. – 2002 – V.34 – pp. 1527-1536.
287. Nardi, S. Release of hormone-like activities from *Allobophora rosea* and *A. caliginosa faeces* // S. Nardi, G. Arnoldi, G. Dell’Agnola, G. // Can. J. Soil Sci. – 1988 – V.68 – pp. 563-567.
288. Neilsen, G.H. Postbloom humic- and fulvic-based zinc sprays can improve apple zinc nutrition / G.H. Neilsen, E.J. Hogue, D. Neilsen, P. Bowen // Hort. Sci. – 2005 – V.40 – №1 – pp. 205-208.
289. Nichols, B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography / B.W. Nichols // Biochim. Biophys. Acta – 1963 – V.70 – pp. 417-422.
290. Nikolic, M. Uptake of iron (^{59}Fe) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves / M. Nikolic, S. Cesco, V. Roemheld, Z. Varanini, R. Pinton // J. Plant Nutr. – 2003 – V.26 – №10-11 – pp. 2243-2252.
291. O’Donnel, R.W. The auxin-like activity of humic preparations from leonardite / R.W. O’Donnel // Soil Sci. – 1973 – V.116 – pp. 106-112.
292. O’Donnell, P.J. Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response / P.J. O’Donnell, E.A. Schmelz, P. Moussatche, S.T. Lund, J.B. Jones, H.J. Klee // Plant J. – 2003 – V.33 – №2 – pp. 245-257.
293. Oris, J.T. Humic acids reduce the photo-induced toxicity of anthracene to fish and daphnia / J.T. Oris, A.T Hall, J.D. Tylka // Environ. Toxicol. Chem. – 1990 – V.9 – pp. 575-583.

294. Parent, L. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: a test of the free-ion model of trace metal toxicity / L. Parent, M.R. Twiss, P.G. Campbell // *Environ. Sci. Technol.* – 1996 – V.30 – pp. 1713-1720.
295. Park, J.-E. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis* / J.-E. Park, J.-Y. Park, Y.-S. Kim, P.E. Staswick, J. Jeon, J. Yun, S.-Y. Kim, J. Kim, Y.-H. Lee, C.-M. Park // *J. Biol. Chem.* – 2007 – V.282 – №13 – pp. 10036-10047.
296. Paszewski, A. Influence of the humus fraction on the growth of oat coleoptiles / A. Paszewski, J. Trojanowski, W. Lobarzewska // *Annales Universitatis Marie Curie Sklodowska* – 1957 – V.12 – pp. 1-13.
297. Pegoraro, R.F. Diffusive flux of cationic micronutrients in two Oxisols as affected by low-molecular-weight organic acids and cover-crop residue / R.F. Pegoraro, I.R. Silva, R.F. Novais, E.S. Mendonca, V. Hugo Alvarez, F.N. Nunes, F.M. Fonseca, T.J. Smyth // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* – 2005 – V.168 – pp. 334-341.
298. Perminova, I.V. Humic substances as natural detoxicants / I.V. Perminova, D.V. Kovalevsky, N.Yu. Yashchenko, N.N. Danchenko, A.V. Kudryavtsev, D.M. Zhilin, V.S. Petrosyan, N.A. Kulikova, O.I. Philippova, G.F. Lebedeva // In: *Humic substances and organic matter in soil and water environments: characterization, transformations and interactions* – C.E. Clapp, M.H.B. Hayes, N. Senesi, and S.M. Griffith (Eds.) – St. Paul, MN, USA, 1996 – pp. 399-406.
299. Perminova, I.V. Mediating effects of humic substances in the contaminated environments. Concepts, results, and prospects / I.V. Perminova, N.A. Kulikova, D.M. Zhilin, N.Yu. Grechischeva, D.V. Kovalevskii, G.F. Lebedeva, D.M. Matorin, P.S. Venediktov, A.I. Konstantinov, V.A. Kholodov, V.S. Petrosyan // In: *Viable methods of soil and water pollution monitoring, protection and remediation* – Twardowska, I., Allen, H.E., Haggblom, M.H., Stefaniak, S. (Eds.) – *Earth and Environmental Sciences, Series IV*: – Springer, Netherlands, 2006 – V.69 – pp. 249-274.
300. Perminova, I.V. Quantification and prediction of detoxifying properties of humic substances to polycyclic aromatic hydrocarbons related to chemical binding

- / I.V. Perminova, N.Yu. Grechishcheva, D.V. Kovalevskii, A.V. Kudryavtsev, V.S. Petrosyan, D.N. Matorin // *Environ. Sci. Technol.* – 2001 – V.35 – pp. 3841-3848.
301. Perminova, I.V. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors / I.V. Perminova, N.Yu. Grechishcheva, V.S. Petrosyan // *Environ. Sci. Technol.* – 1999 – V.33 – pp. 3781-3787.
302. Pflug, W. Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids / W. Pflug, W. Ziechmann // *Soil Biol. Biochem.* – 1981 – V.13 – pp. 293-299.
303. Phuong, H.K. Activity of humus acids from peat as studied by means of some growth regulator bioassays / H.K. Phuong, V. Tichy // *Biologia Plantrum (Praha)* – 1976 – V.18 – №3 – pp 195-199.
304. Piccolo, A. Interaction of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolysed products / A. Piccolo, G. Celano, C. De Simone // *Sci. Total Environ.* – 1992 – V.117/118 – pp. 403-412.
305. Piccolo, A. Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability / A. Piccolo, J.S.C. Mbagwu // *Soil Sci. Soc. Am. J.* – 1999 – V.63 – pp. 1801-1810.
306. Piccolo, A. Structural characteristics of humus and biological activities / A. Piccolo, S. Nardi, G. Concheri // *Soil Biol. Biochem.* – 1992 – V.24 – pp. 273-380.
307. Pinto, A.P. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants / A.P. Pinto, A.M. Mota, A. de Varennes, F.C. Pinto // *Sci. Total Environ.* – 2004 – V.326 – №1-3 – 239-247.
308. Pinton, R. Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H^+ ATPase / R. Pinton, S. Cesco, G. Iacoletti, S. Astolfi, Z. Varanini // *Plant Soil* – 1999 – V.215 – №2 – pp. 155-161.
309. Pinton, R. Soil humic substances affect transport properties of tonoplast vesicles isolated from oak roots / R. Pinton, Z. Varanini, G. Vizotto, A. Maggioni // *Plant Soil* – 1992 – №142 – pp. 203-210.

310. Pinton, R. Water- and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants / R. Pinton, S. Cesco, M. De Nobili, S. Santi, Z. Varanini // *Biol. Fertil. Soils* – 1998 – V.26 – pp. 23-27.
311. Piotrowicz, S.R. Cadmium, copper and zinc interactions with marine humus as a function of ligand structure / S.R. Piotrowicz, G.R. Harvey, D.A. Boran // *Marine Chem.* – 1984 – V.14– p.333-346.
312. Poldoski, J.E. Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibriums in lake superior water / J.E. Poldoski // *Environ. Sci. Technol.* – 1979 – V.13 – №6 – pp. 701-706.
313. Prat, S. Humic acids with C¹⁴ / S. Prat, F. Pospisil // *Biol. Plant. (Praha)* – 1959 – V.1 – №1 – pp. 71-80.
314. Prat, S. Permeability of plant tissues to humic acids / S. Prat // *Biol. Plant. (Praha)* – 1963 – V.5 – N4 – pp. 279-283.
315. Premovic, P.I. Copper and copper(II) porphyrins of the Cretaceous-Tertiary boundary at Stevns Klint (Denmark) / P.I. Premovic, N.D. Nikolic, I.R. Tonsa, M.S. Pavlovic, M.P. Premovic, D.T. Dulanovic // *Earth Planet. Sci. Lett.* – 2000 – V.177 – 105-118.
316. Prior, R.L. Standardized methods for the determinations antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements / R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich // *J. Agric. Food Chem.* – 2005 – V.53 – pp. 4290-4302.
317. Prosen, H. Evaluation of photolysis and hydrolysis of atrazine and its first degradation products in the presence of humic acids / H. Prosen, L. Zupancic-Kralj // *Environ. Pollution* – V.133 – pp. 517-529.
318. Ramalho, J.C. Changes in photosynthetic performance of *Ceratonia siliqua* in summer / J.C. Ramalho, J.A. Lauriano, M.A. Nunes // *Photosynthetica* – 2000 – V.38 – pp. 393-396.
319. Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999 – V.26 – №9-10 – pp. 1231-1237.
320. Rea, E. Effects of fertilization with humic acids on soil and metabolism: a multidisciplinary approach / E. Rea, F. Pierandrei // In: *Humic substances in the*

- global environment and implications to human health – N. Senesi, T.M. Miano (Eds.) – Elsevier Science, Amsterdam, 1994 – pp. 343-348.
321. Ribas, G. Genotoxicity of humic acids in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide / G. Ribas, E. Carbonell, A. Creus, N. Xamena, R. Marcos // *Environ. Mol. Mutagenesis* – 1997 – V.29 – pp. 272-276.
322. Rimmer, D.L. Free radicals, antioxidants, and soil organic matter recalcitrance / D.L. Rimmer // *J. Soil Sci.* – 2006 – V.57 – №2 – pp. 91-94.
323. Rossler, D. Synthesis and chromatographic characterization of [Tc-99m]technetium-humic acid species / D. Rossler, K. Franke, R. Suss, E. Becker, H. Kupsch // *Radiochim. Acta* – 2000 – V.88 – p. 95-100.
324. Ruttimann-Johnson, C. Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes / C. Ruttimann-Johnson, R.T. Lamar // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996 – V.62 – №10 – pp. 3890-3893.
325. Saito, T. Electrostatic interaction models for ion binding to humic substances / T. Saito, Sh. Nagasaki, S. Tanaka, L.K. Koopal // *Colloids Surf., A* – 2005 – V.265 – pp. 104–113.
326. Salloum, M.J. Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter / M.J. Salloum, B. Chefetz, P. Hatcher // *Environ. Sci. Technol.* – 2002 – V.36 – pp. 1953-1958.
327. Salvetat, R. Measurements of chlorophyll fluorescence by synchronous detection in integrating sphere: a modified analytical approach for the accurate determination of photosynthesis parameters for whole plants / R. Salvetat, Ph. Juneau, R. Popovic // *Environ. Sci. Technol.* – 1998 – V.32 – pp. 2640-2645.
328. Samson, G. Surface-active effects of humic acids on potato cell membrane properties / G. Samson, S.A. Visser // *Soil Biol. Biochem.* – 1989 – V.21 – pp. 343-347.
329. Sánchez-Sánchez, A. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees / A. Sánchez-Sánchez, J. Sánchez-Andreu, M. Juárez, J. Jordá, D. Bermúdez // *J. Plant Nutr.* – 2002 – V.25 – pp. 2433 – 2442.

330. Santi, S. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants / S. Santi, R. Pinton, S. Cesco, F. Agnolon, Z. Varanini // *Plant Soil* – 1999 – V.210 – pp. 145-157.
331. Sato, T. Desmutagenic effect of humic acid // T. Sato, Y. Ose, H. Nagase – *Mutat. Res.* – 1986 – N162 – pp. 173-178.
332. Sato, T. Mechanism of desmutagenic effect of humic acid / T. Sato, Y. Ose, H. Nagase, K. Hayase // *Mutat. Res.* – 1987 – V.176 – pp. 199-204.
333. Scharpenseel, H.W. Preparation and purification of gray and brown humic acid samples labeled with tritium and of tritium-pupurogallin / H.W. Scharpenseel // *Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung, Duengung, Bodenkunde* – 1960 – V.91 – pp. 131-146.
334. Schnitzer, M. Humic substances: Chemistry and reactions / M. Schnitzer // In: *Soil Organic Matter* – M. Schnitzer, S.U. Khan (Eds.) – New York, Elsevier, 1978 – pp. 1-64.
335. Senesi, N. Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils / N. Senesi, V.D. D'orazio, T.M. Miano // *Geoderma* – 1995 – V.66 – pp. 273-283.
336. Servos, M.R. The effect of dissolved organic matter on the bioavailability of polychlorinated dibenzo-p-dioxins / M.R. Servos, D.C.G. Muir, G.R.B. Webster // *Aquat. Toxicol.* – 1989 – V.14 – pp. 169-184.
337. Shcherbina, N.S. Reduction of actinides in higher oxidation states by hydroquinone-enriched humic derivatives / N.S. Shcherbina, St.N. Kalmykov, I.V. Perminova, A.N. Kovalenko // *J. Alloys and Compounds* – 2007 – V.444-445 – pp. 518-521.
338. Silva, E. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine / E. Silva, A. Fialho, I. Sa-Correia, R. Burns, L. Shaw // *Environ. Sci. Technol.* – 2004 – V.38 – pp. 632-637.
339. Simpson, M.J. Noncovalent interactions between aromatic compounds and dissolved humic acid examined by nuclear magnetic resonance spectroscopy / M.J. Simpson, A.J. Simpson, P.G. Hatcher // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2004 – V.23 – №2 – pp. 355-362.

340. Singh, A.K. Influence of fulvic acid on transport of iron in soils and uptake by paddy seedlings / A.K. Singh, P. Dhar, S.B. Pandeya // *Plant Soil* – 1998 – V.198 – pp. 117-125.
341. Skyllberg, U. Complexation of mercury(II) in soil organic matter: EXAFS evidence for linear two-coordination with reduced sulfur groups / U. Skyllberg, P.R. Bloom, J. Qian, C.-M. Lin, W.F. Bleam // *Environ. Sci. Technol.* – 2006 – V.40 – pp. 4174-4180.
342. Sosa, L. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera* / L. Sosa, A. Llanes, H. Reinoso, M. Reginato, V. Luna // *Ann. of Botany* – 2005 – V.96 – №2 – pp. 261-267.
343. Steffen, K.T. Degradation of humic acids by the litter-decomposing Basidiomycete *Collybia dryophila* / K.T. Steffen, A. Hatakka, M. Hofrichter // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002 – V.68 – p. 3442.
344. Steinberg, C.E.W. Dissolved humic substances – ecological driving force from the individual to the ecosystem level? / C.E.W. Steinberg, S. Kamara, Yu. Prokhotskaya, L. Manusadžianas, T. Karasyova, M.A. Timofeev, Z. Jie, A. Paul, T. Meinelt, V.F. Farjalla, A.Y.O. Matsuo, B.K. Burnison, R. Menzel // *Freshwater Biology* – 2006 – V.51 – pp. 1189-1210.
345. Stenson, A.C. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultra-high resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra / A.C. Stenson, A.G. Marshall, W.T. Cooper // *Anal. Chem.* – 2003 – V.75 – pp. 1275-1284.
346. Stepchenko, L. Metabolic and immune-modulating properties of commercial humic preparations produced from peat / L. Stepchenko, E. Mihailenko // *Proc. 14-th Int. Meeting of IHSS “From molecular understanding to innovative applications of humic substances”*, Sept. 14-19, Moscow – Saint Petersburg, 2008 – I.V. Perminova, N.A. Kulikova (Eds.) – pp. 723-724.
347. Stevenson, F.J. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions* / F.J. Stevenson // New York, Wiley, 1994 – 512p.
348. Stevenson, F.J. Organic matter-micronutrient reactions in soil / F.J. Stevenson // *In: Micronutrient in agriculture Soil Science* – J.J. Morevedt,

- F.R. Cox, L.M. Shuman, and R.M. Welch (Eds.) – Soc. of America, Madison, 1991 – pp. 145-186.
349. Stewart, A.J. Interactions between dissolved humic materials and organic toxicants / A.J. Stewart // In: Synthetic fossil fuel technologies – K.E. Cowser, K.E. Boston (Eds.) – Butterworth Publ., 1984 – pp. 505-521.
350. Sullivan, J.D. A study of the interaction of s-triazine herbicides with humic acids from three different soils / J.D. Sullivan, G.T. Felbeck // Soil Sci. – 1968 – V.106 – №1 – p. 42.
351. Sutton, R. Molecular structure in soil humic substances: The new view / R. Sutton, G. Sposito // Environ. Sci. Technol. – 2005 – V.39 – pp. 9009-9015.
352. Swift, R.S. Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion / R.S. Swift // Soil Sci. – 1999 – V.164 – pp. 790-802.
353. Syltie, P.W. Effects of very small amounts of highly active biological substances on plants growth / P.W. Syltie // Biol. Agricult. Horticult. – 1985 – V.2 – pp. 245-269.
354. Tamiya, H. Mode of nuclear division in synchronous cultures of *Chlorella*: comparison of various methods of synchronization / H. Tamiya, K. Morimura, M. Yokota, R. Kunieda // Plant Cell Physiol. – 1961 – V.2 – 383-403.
355. Tao, S. Uptake of copper by neon tetras (*Paracheirodon innesi*) in the presence and absence of particulate and humic matter / S. Tao, T. Liang, Ch. Liu, Sh. Xu // Ecotoxicol. – 1999 – V.8 – pp. 269-275.
356. Tate, R.L. Organic matter and its interaction with inorganic soil constituents / R.L. Tate, B.K.G. Theng // In: Soil with a variable charge – G.K.G. Theng (Ed.) – New Zealand Soc. Soil Sci. – Lower Hutt., 1980 – pp.225-249.
357. Taupin, C. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles / C. Taupin, M. Dvolaitzky, C. Sauterey // Biochem. 1975 – V.14 – pp. 4771– 4775.
358. Tester, M. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants / M. Tester, R. Davenport // Ann. Bot. (Lond.) – 2003 – V.91 – pp. 503-527.
359. Tinnacher, R.M. A new method to radiolabel natural organic matter by chemical reduction with tritiated sodium borohydride / R.M. Tinnacher, B.D. Honeyman // Environ. Sci. Technol. – 2007 – V.41 – pp. 6776-6882.

360. Tipping, E. Cation binding by humic substances / E. Tipping // Cambridge Environ. Chem. Series 12 – Cambridge University Press, New York, 2002 – 320p.
361. Tipping, E. Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances / E. Tipping // Aquat. Geochem. – 1998 – V.4 – pp. 3–47.
362. Trapmann, S. Progress in herbicide determination with the thylakoid bioassay / S. Trapmann, N. Etxebarria, H. Schnabl, K.H. Grobeker // Environ. Sci. Pollut. Res. – 1998 – V.5 – №1 – pp. 17-20.
363. Tsutsumi, Y. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes / Y. Tsutsumi, T. Haneda, T. Nishida // Chemosphere – 2001 – V.42 – pp. 271–276.
364. Tuerkmen, O. Calcium and humic acid affect seed germination, growth, and nutrient content of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings under saline soil conditions / O. Tuerkmen, A. Dursun, M. Turan, C Erdinc // Acta Agricult. Scandinavica, Sec. B: Soil Plant Sci. – 2004 – V.54 – №3 – pp. 168-174.
365. Tunçturk, M. Changes in micronutrients, dry weight and plant growth of soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars under salt stress / M. Tunçturk, R. Tunçturk, F. Yasar // African J. Biotechnol. – 2008 – V.7 – №11 – pp. 1650-1654.
366. Van der Weerd, L. Quantitative NMR spectroscopy of osmotic stress responses in maize and pearl millet / L. Van der Weerd, M.M.A.E. Claessens, T. Ruttink, F.J. Vergeldt, T.J. Schaafsma, H.V. As // J. Exp. Botany – 2001 – V.52 – №365 – pp. 2333-2343.
367. Varanini, Z. Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots / Z. Varanini, R. Pinton, M.G. De Biasi, S. Astolfi, A. Maggioni // Plant Soil – 1993 – V.153 – pp. 61-69.
368. Vaughan, D. Influence of humic substances on biochemical processes in plants / D. Vaughan, R.E. Malcom, B.G. Ord // In: Soil organic matter and biological activity – D. Vaughan, R.E. Malcom (Eds.) – Martinus Nijhoff/Junk W Publishers, Dordrecht, 1985 – pp. 77-108.
369. Vaughan, D. Influence of humic substances on growth and physiological processes / D. Vaughan, R.E. Malcom // In: Soil organic matter and biological

- activity – D. Vaughan, R.E. Malcom (Eds.) – Martinus Nijhoff/Junk W Publishers, Dordrecht, 1985 – pp. 37-76.
370. Verrengia Guerrero, N.R. Modeling pentachlorophenol bioavailability and bioaccumulation by the freshwater fingernail clam *Sphaerium corneum* using artificial particles and humic acids / N.R. Verrengia Guerrero, M.G. Taylor, E.A. Wider, K. Simkiss // Environ. Toxicol. Chem. – 2001 – V.20 – №12 – pp. 2910-2915.
371. Vigneault, B. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances / B. Vigneault, A. Percot, M. Lafleur, P.G.C. Campbell // Environ. Sci. Technol. – 2000 – V.34 – pp. 3907-3913.
372. Visser, S.A. Physiological action of humic substances on microbial cells / S.A. Visser // Soil Biol. Biochem. – 1985 – V.17 – pp. 457-462.
373. Visser, S.A. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin / S.A. Visser // Rev. Fr. Sci. Eau. – 1982 – V.1 – pp. 285-296.
374. Vymazal, J. Short-term uptake of heavy metals by periphyton algae / J. Vymazal // Hydrobiologie – 1984 – V.119 – pp. 171-179.
375. Wang, D. Preparation of tritium-labeled fulvic acid (^3H -FA) / D. Wang, S. Guan, X. Xu, D. Yang, H. Zhu, X. Pang, M. Yi // Zhiwu Shenglixue Tongxun – 1984 – V.6 – pp. 42-44.
376. Wang, W.H. The fate of ^{14}C -labelled humic substances in rice cells in cultures / W.H. Wang, C.M. Bray, M.N. Jones // J. Plant Physiol. – 1999 – V.154 – pp. 203-211.
377. Wang, X.S. Effects of NaCl and silicon on ion distribution in the roots, shoots and leaves of two alfalfa cultivars with different salt tolerance / X.S. Wang, J.G. Han // Soil Sci. Plant Nutr. – 2007 – V.53 – №3 – pp. 278-285.
378. Wang, Z.-D. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors / Z.-D. Wang, D.S. Gamble, C.H. Langford // Anal. Chim. Acta – 1990 – V.232 – pp. 181-188.

379. Warwick, P. ^{14}C and ^{125}I labelling of humic material for use in environmental studies / P. Warwick, L. Carlsen, A. Randall, R. Zhao, P. Lassen // Chem. Ecol. – 1993 – V.8 – №2 – p. 65-80.
380. Warwick, P. The mobility and stability of iodine-humic and iodine-fulvic complexes through sand / P. Warwick, R. Zhao, J.J.W. Higgo, B. Smith, G.M. Williams // Sci. Total Environ. – 1993 – V.130/131 – pp. 459-465.
381. Wilson, M.A. NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry / M.A. Wilson // New York, Pergamon, 1987.
382. Wolf, M. Migration behaviour of I-125 labelled aquatic fulvic acid from a peat bog / M. Wolf, D. Klotz, G. Teichmann, N. Hertkorn, W. Schimmack // In: Isotope Techniques in the Study of Environmental Change – International Atomic Energy Agency, Vienna, 1997 – pp 888-892.
383. Wrobel, K. Effect of metal ions on the molecular weight distribution of humic substances derived from municipal compost: ultrafiltration and SEC with spectrophotometric and ICP-MS detection / K. Wrobel, B.B.M. Sadi, J.R. Castillo, J.A. Caruso // Anal. Chem. – 2003 – V.75 – pp. 761-767.
384. Wu, X. High activity nutrient which promotes plant drought-resisting ability and its preparation process / X. Wu // Patent CA Section: 19 (Fertilizers, Soils, and Plant Nutrition) – Application: CN 2002-139388 27 Aug 2002 – Gongkai Shuomingshu CN 1478763 A 3 – Mar 2004 –9p.
385. Xia, G. Detailed sorption isotherms of polar and apolar compounds in a high-organic soil / G. Xia, J.J. Pignatello // Environ. Sci. Technol. – 2001 – V.35 – pp. 84-94.
386. Xu, X. The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and yield in wheat / X. Xu // Aust. J. Agric. Res. – 1986 – V.37 – pp. 343-350.
387. Yamada, P. Plant physiological activities by humic acid and fulvic acid extracted from peat and weathered coal / P. Yamada, K. Asou, Y. Yazawa, T. Yamaguchi // Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi – 2002 – V.73 – №6 – pp. 777-781.
388. Yeo, A.R. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow / A.R. Yeo, S.A. Flowers, G. Rao, K. Welfare, N. Senanayake // Plant Cell Environ. – 1999 – V.22 – pp. 559-565.

389. Young, C.C. Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings / C.C. Young, Y. Chen // *Plant Soil* – 1997 – V.195 – pp. 143-149.
390. Young, N.D. Putrescine and acid stress / N.D. Young, A.W. Galston // *Plant Physiol.* – 1983 – V.71 – pp. 767-771.
391. Yu, S. Adsorption–desorption behavior of copper at contaminated levels in red soils from China / S. Yu, Z.L. He, C.Y. Huang, G.C. Chen, D.V. Calvert // *J. Environ. Qual.* – 2002 – V.31 – pp. 1129-1136.
392. Zachariakis, M. Humic substances stimulate plant growth and nutrient accumulation in grapevine rootstocks / M. Zachariakis, E. Tzorakakis, I. Kritsotakis, C. Siminis, V. Manios // *Acta Horticulturae* – 2001 – V.549 – pp. 131-136.
393. Zeng, K. Effect of dissolved humic substances on the photochemical degradation rate of 1-aminopyrene and atrazine / K. Zeng, H.-M. Hwang, H. Yu // *Int. J. Mol. Sci.* – 2002 – V.3 – pp. 1048-1057.
394. Zhang, X. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance / X. Zhang, E.H. Ervin // *Crop Sci.* – 2004 – V.44 – pp. 1737-1745.
395. Zhang, X. Plant growth regulators can enhance the recovery of Kentucky bluegrass sod from heat injury / X. Zhang, E.H. Ervin, R.E. Schmidt // *Crop Sci.* – 2003 – V.43 – pp. 952–956.
396. Zhang, X. Turfgrass plant growth regulators / X. Zhang // In: *Advance in Turfgrass and Ground-Covering Plant Science* – Z.Z. Chen, H. Zhou (Eds.) – China Forestry Publisher, Beijing, China, 2006 – pp. 74-97.
397. Zhorina, L.V. The content of free amino acids in the tissues of broiler chicks administered sodium humate in the ration / L.V. Zhorina, L.M. Stepchenko // *Nauchnye Dokl. Vyss. Shkoly Biol. Nauki* – 1991 – №10 – pp. 147-150.
398. Zhou, J.L., Mechanism of humic acid colour removal from natural waters by fungal biomass biosorption / J.L. Zhou, C.J. Banks // *Chemosphere* – 1993 – V.27 – pp. 607-620.
399. Zhu, J.-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress / J.-K. Zhu // *Curr. Opinion Plant Biol.* – 2003 – V.6 – pp. 441-445.
400. Ziechmann, W. Über Modellreaktionen zur Bildung synthetischer Huminsäuren. 2. Die Synthese von Huminsäuren im neutralen Milieu / W. Ziechmann // *Brennstoff-Chem.* – 1960 – V.41 – pp.334.