

УДК 631.4

## СТРУКТУРА ГУМАТОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2024 г. Г. Н. Федотов<sup>1,\*</sup>, член-корреспондент РАН С. А. Шоба<sup>1</sup>, И. В. Горепекин<sup>1</sup>,  
Т. А. Грачева<sup>1</sup>, А. В. Качалкин<sup>1,2</sup>, У. А. Конкина<sup>1</sup>, Д. А. Ушкова<sup>1</sup>

Поступило 23.01.2024 г.  
После доработки 25.04.2024 г.  
Принято к публикации 07.05.2024 г.

Известно, что гуминовые вещества (ГВ) формируют из частиц-молекул (первичных частиц ГВ) надмолекулярные образования (НМО). Позже было показано, что существует барьерная концентрация ГВ, ниже которой в растворе гуминовых веществ последние находятся только в виде частиц-молекул, а при концентрации, превышающей барьерную – только в виде НМО. Из этого следует, что свойства растворов ГВ должны определяться тем, в каком виде (частиц-молекул или НМО) находятся в растворах ГВ. Целью исследования была проверка влияния формы существования ГВ в растворах на свойства этих растворов и их биологическую активность. В работе использовали растворы гумата калия из бурого угля. Результаты экспериментов показали, что при увеличении концентрации гуматов рН скачкообразно увеличивается в диапазоне 30–50 мг л<sup>-1</sup>. Установлено, что при культивировании некоторых видов микроорганизмов в питательных средах, приготовленных на растворах гуматов, микроорганизмы развивались намного активнее при нахождении в питательных средах ГВ в виде частиц-молекул. Также показано, что при фоллиарной обработке побегов огурца растворами гуматов с концентрацией ниже барьерной эффект стимуляции возрастал. По-видимому, увеличение стимуляции связано с тем, что частицы-молекулы из-за малого размера могли поглощаться клетками растений.

*Ключевые слова:* надмолекулярные образования гуминовых веществ, барьерная концентрация гуминовых веществ, рН растворов гуматов, пленки растворов гуминовых веществ, фоллиарная обработка огурцов

DOI: 10.31857/S2686953524030057 EDN: ZIGNPT

## ВВЕДЕНИЕ

Представления о форме существования гуминовых веществ (ГВ) [1] в растворах были уточнены в 90-х годах XX века, когда было показано [2], что в водных растворах ГВ находятся в виде частиц-молекул размером 2–10 нм, которые при увеличении концентрации взаимодействуют, формируя надмолекулярные образования (НМО) размером 100–200 нм [3–5]. Эту структурную иерархию обеспечивает дифильность поверхности частиц-молекул ГВ, показанная в работе [6].

Есть мнение [7], что биологическая активность ГВ связана с их молекулярной массой: фракция менее 3500 Да, расчетный размер частиц которых не превосходит 3–4 нм, способна частично поглощаться клетками растений. При этом фракция более 3500 Да не поглощается клетками растения и взаимодействует только с клеточной стенкой. Пример такого взаимодействия – снижение гидравлической проводимости корневой системы при внесении ГВ под корень [8].

Учитывая, что размер пор в клетках растений исчисляется единицами нанометров [8], частицы-молекулы ГВ сопоставимого размера имеют больше шансов на проникновение в клетки.

Аналогичная ситуация должна наблюдаться в отношении микроорганизмов: чем меньше размер частиц ГВ, тем выше их шанс проникнуть в клетки [9–10]. В работе [11] было показано, что при добавлении ГВ в питательную среду в концентрациях ниже барьерной скорость развития

<sup>1</sup> Факультет почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова, 119992 Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального исследовательского центра “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, 142290 Пущино, Россия

\*E-mail: gennadiy.fedotov@gmail.com

некоторых микроорганизмов увеличивалась на 3 порядка.

Поскольку структура ГВ может быть разной — частицы-молекулы и НМО — то концентрация их растворов определяет вид существования. Это подтверждается данными литературы [3, 12, 13]: при концентрациях ГВ выше 30–50 мг л<sup>-1</sup> частицы-молекулы перестают существовать в свободном раздельно-частичном виде и находятся только в составе НМО. Можно предположить, что переход между этими формами ГВ должен изменять физико-химические свойства и биологическую активность их растворов.

Цель работы — проверка влияния формы существования ГВ в растворах на свойства этих растворов и их биологическую активность.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали водные растворы гумата калия (ООО “Агротехнологии”, Россия), полученного из бурого угля.

Электронно-микроскопическое исследование растворов гуматов проводили при помощи растрового электронного микроскопа (РЭМ) при ускоряющем напряжении 2–5 кВ. На предметные столики наносили растворы, высушивали их, после чего напыляли золото.

Размеры частиц в суспензиях определяли при помощи лазерного дифрактометра.

рН растворов определяли в трехкратной повторности. Доверительный интервал при 95% доверительной вероятности не превышал 10% от измеряемой величины.

Механохимическую активацию растворов проводили с помощью измельчителя биологических тканей при скорости 20000 об. мин<sup>-1</sup> в течение 5 мин каждый раз перед обработкой растворами растений.

Биологическую активность растворов ГВ до и после достижения барьерной концентрации оценивали по скорости роста культур дрожжей базидиомицетового аффинитета, представленные видами *Saitozyma podzolica* — КБП У-4614 и *Solicoccozyma terricola* — КБП У-1265. Штаммы взяты из коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова. Штамм *Saitozyma podzolica* выделен из темно-серой лесной почвы (Калужская область,

Россия). *Solicoccozyma terricola* выделен из аллювиальной почвы (Северная Осетия, Россия).

Для культивирования дрожжей использовали жидкие питательные среды следующего состава: глюкоза (10 г л<sup>-1</sup>), дрожжевой экстракт (10 г л<sup>-1</sup>), пептон (10 г л<sup>-1</sup>). Жидкие питательные среды готовили на водных растворах гуматов концентрацией 1 и 100 мг л<sup>-1</sup>. Схема опыта включала в себя следующие варианты:

(1) питательная среда без гуматов, приготовленная на дистиллированной воде;

(2) питательная среда, приготовленная на растворе гумата 1 мг л<sup>-1</sup>;

(3) питательная среда, приготовленная на растворе гумата 100 мг л<sup>-1</sup>.

Способность дрожжевых культур к росту оценивали по мутности суспензии с помощью денситометра [14], определяя оптическую плотность через определенные промежутки времени (12–24 ч). Перед измерением оптической плотности культуры перемешивали при помощи вихревого смесителя в течение 5 с. Время культивирования составляло 5 сут. Для каждого штамма строили графики зависимости оптической плотности от времени. Растворы гуматов с концентрацией 1 и 100 мг л<sup>-1</sup> имеют разную оптическую плотность. Для получения корректных данных из значений оптической плотности опытного образца, т.е. раствора гумата, содержащего микроорганизмы, вычитали значения оптической плотности раствора гумата. В результате получали величину оптической плотности, которая соответствовала росту микроорганизмов в среде. Измерения выполняли в 3-кратной повторности. По полученным данным были рассчитаны средние значения и ошибка среднего.

Также биологическую активность растворов ГВ разных концентраций оценивали по скорости роста побегов огурцов (*Cucumis sativus* L.) среднеспелого сорта Кристина F1. Семена огурцов проращивали в установке Аэросад до появления проростков длиной 1–0.5 см. После этого проросшие семена высевали по 5 штук в литровый вегетационный сосуд с грунтом, содержащим питательные элементы: азот–фосфор–калий (NPK) 300, 500 и 600 мг кг<sup>-1</sup> соответственно. Для каждого варианта опыта использовали отдельный сосуд. Растения выращивали под фитолампами, создавая 18-тичасовую длину светово-

го дня. После появления семядольных листьев огурцы ежедневно опрыскивали растворами ГВ. Срезку побегов огурцов и их взвешивание проводили после появления настоящих листьев. Проводили сравнение прироста вегетативной массы побегов огурцов, выраженное в процентах по отношению к контролю – растениям, обработанным дистиллированной водой. Все варианты опыта проводили в пятикратной повторности. Доверительный интервал при 95% доверительной вероятности не превышал 20% от измеряемой величины.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы при помощи лазерного дифрактометра изучили размер частиц гуматов в растворе. При концентрации 1000 мг л<sup>-1</sup> величина наблюдаемых образований доходила до микронных размеров и соответствовала размеру НМО.

Снижение концентрации ниже 30 мг л<sup>-1</sup>, согласно данным растровой электронной микроскопии, уменьшало средний размер частиц в растворах гуматов. Распад надмолекулярных образований, сопровождавшийся снижением их размера, происходил в течение нескольких недель.

На следующем этапе было изучено влияние концентрации гумата на pH растворов (рис. 1). В области концентрации гумата около 50 мг л<sup>-1</sup> наблюдался скачок pH с 6.7 до 9.5. Это значение концентрации близко к диапазону, в котором растворы гуматов меняют структуру [12, 13]: частицы-молекулы перестают существовать в раздельно-частичной, то есть свободной форме, и образуют НМО. Механизм этого процесса, вероятно, основан на самосборке ГВ [3].

С позиции структурной организации ГВ скачок pH можно объяснить тем, что кислотные гидрофильные группы заключены между гидрофобными участками ГВ, которые защищают их от диссоциации. Реализация подобного механизма показана при добавлении в почву меченого спирта (2-деканола) индивидуально и в составе смеси с гуминовыми веществами [15].

Вследствие защиты гидрофобными участками способность к диссоциации кислотных групп восстанавливается только при распаде НМО. Мы предположили, что частицы-молекулы отделяются от крупных образований, и но-

вые участки поверхности ГВ взаимодействуют с раствором.

Для проверки этого предположения растворы гуматов, в которых ГВ существуют в виде НМО, обработали на высокоскоростной мешалке (20000 об мин<sup>-1</sup>) в течение 5 мин. Контроль – необработанный раствор. Результаты экспериментов показали, что при перемешивании pH снижался быстрее (рис. 1).

Еще одно подтверждение существования барьерной концентрации у изучаемых гуматов было основано на изучении пленок ГВ, формирующихся на поверхности воды из-за дифильности ГВ [16]. Эти конденсированные пленки могут быть жидкообразными и твердообразными. Их вид зависит от энергии взаимодействия частиц ПАВ между собой: чем больше частицы, тем сильнее когезия между ними и толще пленка.

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что частицы-молекулы образовывали жидкообразные пленки, а НМО – твердообразные пленки. Это позволило предложить полуколичественный метод определения барьерной концентрации между формами ГВ в растворах. Для обнаружения перехода конденсированной пленки в твердое состояние на нее наносили порошок талька. Если пленка твердообразная, то при осторожном сдувании порошок остается неподвижным. Если пленка жидкообразная, то порошок передвигается по поверхности, что хорошо видно даже без микроскопа.

Кроме концентрации гумата на тип образующихся на поверхности раствора пленок влияет длительность концентрирования частиц гумата

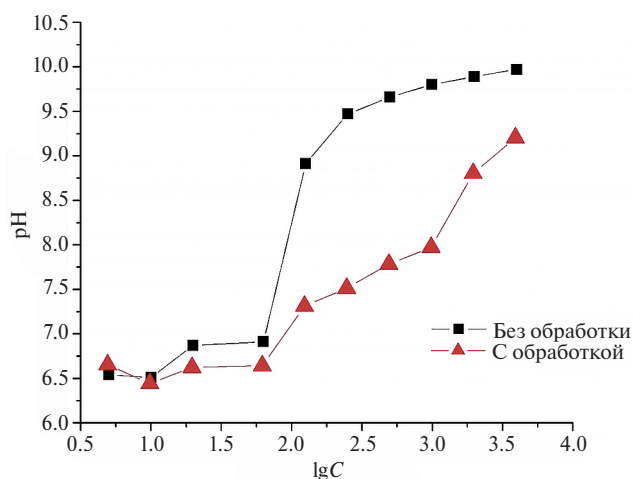


Рис. 1. Влияние концентрации гумата  $C$  на pH раствора.

на поверхности воды. Мы использовали время в качестве фиксируемого параметра и построили график зависимости твердения пленки в часах от логарифма концентрации гумата (рис. 2). Растворы гумата разных концентраций для приближения к равновесию обрабатывали на высокоскоростной мешалке и наливали в чашки Петри. Затем на них наносили порошок талька с частицами микронных размеров и помещали в эксикатор. Через каждые 30 мин на поверхность жидкости воздействовали слабой струей воздуха, отмечая наличие перемещения частиц талька друг относительно друга. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Это коррелирует с результатами, полученными при изучении рН растворов гуматов.

После экспериментального подтверждения существования барьерной концентрации растворов гуматов были проведены испытания по изучению влияния структуры растворов гуматов на развитие микроорганизмов и проростков огурца.

Для некоторых изученных видов микроорганизмов при добавлении в питательные среды механоактивированного гумата в концентрациях ниже барьерной наблюдали стимуляцию их развития (рис. 3, 4).

Хорошо известно, что многие базидиомцетовые дрожжи, в том числе и представители исследованных видов и родов, могут хорошо усваивать фенольные вещества [17]. Однако при исследовании веществ фенольной природы необходимо учитывать и возможный токсический

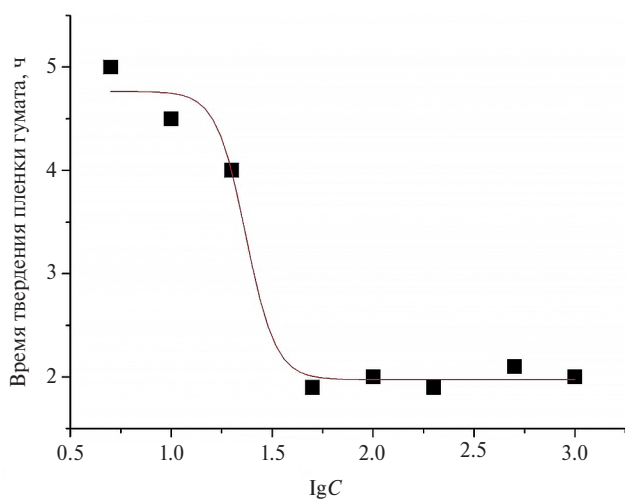


Рис. 2. Влияние концентрации гуминовых веществ на прочность пленок, образующихся на поверхности воды.

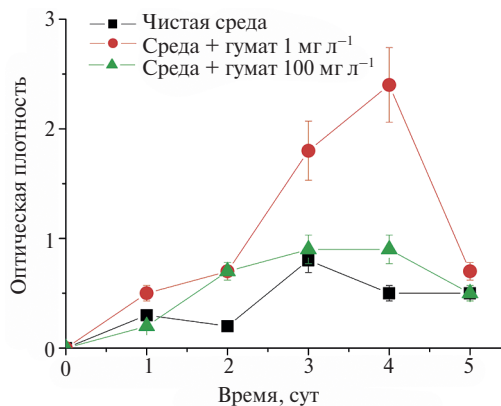


Рис. 3. Влияние добавления гуматов в питательную среду на рост *Solicocozyma terricola*.

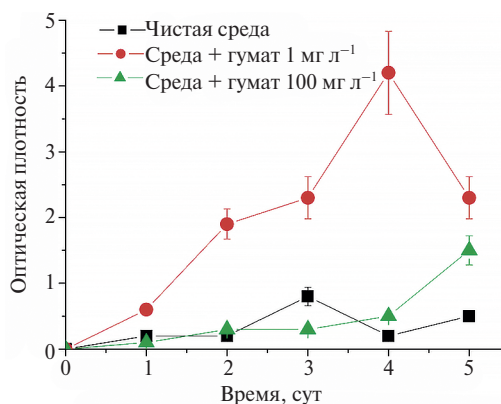


Рис. 4. Влияние добавления гуматов в питательную среду на рост *Saitozyma podzolica*.

эффект, а не только размер молекул и концентрацию. Например, дрожжевые грибы неохотно потребляют фенол, а протокатеховую кислоту и гидроксibenзойные кислоты в тех же концентрациях усваивают гораздо лучше [17]. Многие почвенные бактерии, в том числе ассоциированные с почвенной мезофауной, неспособны к росту на питательной среде при добавлении гуматов в концентрации 200 мг л<sup>-1</sup> [18].

Фолиарная обработка проростков огурца механоактивированными растворами гуматов улучшила прирост вегетативной массы при концентрации ГВ ниже барьерной (табл. 1). При этом не перемешанные растворы ГВ даже низких концентраций практически не оказывали на растения значимого влияния.

Результаты проведенных опытов дополнили представления о биологической активности растворов ГВ за счет информации о формах существования ГВ — частиц-молекул и НМО. Последние, в отличие от частиц-молекул, не

**Таблица 1.** Влияние механоактивации растворов гуматов на прирост вегетативной массы огурцов

Концентрация гумата в растворе, мг л <sup>-1</sup>	Наличие механохимической активации	Прирост вегетативной массы, %
1	Нет	5
20	Нет	5
100	Нет	5
1	Да	23
3	Да	37
5	Да	40
10	Да	47
20	Да	20
100	Да	5

могут проникнуть через клеточные стенки растений и микроорганизмов, что приводит к снижению эффективности применения растворов гуматов для стимуляции растений и микроорганизмов.

### ВЫВОДЫ

1. Изменение рН растворов гуматов при изменении их концентрации отражает процессы самосборки частиц-молекул в надмолекулярные образования.

2. На основе определения концентрации твердения пленок ГВ на границе раствор–воздух впервые предложен полуколичественный метод определения концентрации, соответствующей переходу между существованием ГВ в растворах в виде частиц-молекул и НМО. Установлено, что переход происходит в диапазоне концентраций ГВ 20–50 мг л<sup>-1</sup>.

3. При изучении биологической активности механоактивированных гуматов установлено, что при их добавлении в питательные среды в концентрациях ниже барьерной наблюдается стимуляция развития некоторых видов микроорганизмов.

4. Показано, что фолиарная обработка проростков огурца механоактивированными растворами ГВ при концентрациях ниже 50 мг л<sup>-1</sup> стимулирует ускоренный прирост вегетативной массы растений.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке работы РНФ (проект № 22-14-00107).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. с. 325.
2. Österberg R., Mortensen K. // Eur. Biophys. J. 1992. V. 21. № 3. P. 163–167. <https://doi.org/10.1007/BF00196759>
3. Angelico R., Colombo C., Di Iorio E., Brtnický M., Fojt J., Conte P. // Appl. Sci. 2023. V. 13. № 4. 2236. <https://doi.org/10.3390/app13042236>
4. Senesi N., Wilkinson K.J. Biophysical chemistry of fractal structures and processes in environmental systems. Senesi N., Wilkinson K.J. (Eds.). John Wiley & Sons Ltd., 2008. p. 342.
5. Федотов Г.Н., Шейн Е.В., Ушкова Д.А., Салимгарева О.А., Горепекин И.В., Потапов Д.И. // Почвоведение. 2023. № 8. С. 903–908. <https://doi.org/10.31857/S0032180X22601608>
6. Милановский Е.Ю. Гумусовые вещества почв как природные гидрофобно-гидрофильные соединения. М.: ГЕОС. 2009. с. 186.
7. Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. // Soil Biol. Biochem. 2002. V. 34. №. 11. P. 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)
8. Asli S., Neumann P.M. // Plant Soil. 2010. V. 336. P. 313–322. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0483-2>
9. Scherrer R., Loudon L., Gerhardt P. // J. Bacteriol. 1974. V. 118. № 2. P. 534–540. <https://doi.org/10.1128/jb.118.2.534-540.1974>
10. De Nobel J.G., Barnett J.A. // Yeast. 1991. V. 7. № 4. P. 313–323. <https://doi.org/10.1002/yea.320070402>

11. *Visser S.A.* // Soil Biol. Biochem. 1985. V. 17. № 4. P. 457–462.  
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90009-4)
12. *Fasurová N., Čechlovská H., Kučerik J.* // Pet. Coal. 2006. V. 48. № 2. P. 24–32.
13. *Евдокимов И.П., Лосев А.П.* Природные нанообъекты в нефтегазовых средах. М.: РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, 2008. с. 104.
14. *Arachchige M.S.A., Mizutani O., Toyama H.* // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2019. V. 33. № 1. P. 1505–1515.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1676167>
15. *Spaccini R., Piccolo A., Conte P., Haberhauer G., Gerzabek M.H.* // Soil Biol. Biochem. 2002. V. 34. № 12. P. 1839–1851.  
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00197-9)
16. *Воицкий С.С.* Курс коллоидной химии. М.: Химия, 1975. с. 512.
17. *Sampaio J.P.* // Can. J. Microbiol. 1999. V. 45. № 6. P. 491–512.  
<https://doi.org/10.1139/w99-020>
18. *Tikhonov V.V., Yakushev A.V., Zavgorodnyaya Y.A., Byzov B.A., Demin V.V.* // Eurasian Soil Sci. 2010. V. 43. P. 305–313.  
<https://doi.org/10.1134/S1064229310030087>

## THE STRUCTURE OF HUMATES IN AQUEOUS SOLUTIONS AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

**G. N. Fedotov<sup>a, #</sup>, Corresponding Member of the RAS S. A. Shoba<sup>a</sup>, I. V. Gorepekin<sup>a</sup>,  
T. A. Gracheva<sup>a</sup>, A. V. Kachalkin<sup>a, b</sup>, U. A. Konkina<sup>a</sup>, D. A. Ushkova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Faculty of Soil Science of Lomonosov Moscow State University,  
119992 Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin,  
Federal Research Center “Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,  
142290 Pushchino, Russian Federation*

<sup>#</sup>*E-mail: gennadiy.fedotov@gmail.com*

When studying humate solutions, it is often not taken into account that humic substances (HS) can form supramolecular formations (SMFs) from molecular particles. These SMFs are highly stable, that is, the particles-molecules of HS do not separate from them spontaneously. It follows that at concentrations of the existence of SMFs, it is they, and not the particles-molecules of HS, that should be in solutions and determine their properties. The purpose of the study is to assess the influence of the form of existence of HS in solutions on their physico-chemical properties and biological activity. Solutions of sodium humate from brown coal were used in the work. The experimental results showed that with an increase in the concentration of humates, an abrupt increase in pH in the range of 30–50 mg l<sup>-1</sup> is observed. These concentrations correspond to the literature data on changes in the structure of HC in solutions: at concentrations above 30 mg l<sup>-1</sup> – barrier concentration – HS molecules form SMFs by self-assembly. Both molecular particles and SMFs, due to the diphilicity of HS, have the properties of surfactants. That is, in solutions at the interface of the “water–air” phases, HS films form. The strength of the films depends on the size of its constituent particles and the speed of their movement from the thickness to the surface of the solution. When plotting graphs in the coordinates “Film formation time in hours–Log humate concentration, mg l<sup>-1</sup>”, a jump corresponding to the barrier concentration was detected on the curves. It was also found that during foliar treatment of cucumber shoots with mechanoactivated humate solutions with concentrations below the barrier, the stimulation effect increases, apparently due to the transition from the existence of HS in solution in the form of SMFs to existence in the form of particles-molecules that, due to their small size, can penetrate plant cells.

*Keywords:* supramolecular formations of humic substances, pH of humate solutions, films of humic substances solutions, foliar treatment of cucumber shoots