

**ВОДОРАСТВОРИМЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА
КАК АКТИВАТОРЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ТЕСТ-РАСТЕНИЙ
*CUCUMIS SATIVUS L.*****Черепанов Игорь Сергеевич¹, Крюкова Полина Сергеевна²***ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»,
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, д. 1*¹ – канд. хим. наук, доцент кафедры Фундаментальной и прикладной химии;² – студент 1 курса магистратуры направления подготовки «Биология»

*Изучено влияние гуминовых веществ, синтезированных в системе D-глюкоза–п-аминобензойная кислота, на работу фотосинтетического аппарата тест-растений *Cucumis sativus L.* Показано, что на фоне общего увеличения ростовой активности, снижающейся с уменьшением концентрации синтезированных продуктов (в диапазоне 0,001 до 0,00025%) в растворах проращивания, происходит симбатное изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов. Анализ профилей полос в ИК-Фурье спектрах образцов листьев тест-растения показывает наличие пиков, характерных для поглощения структурных фрагментов хлорофиллов. Положение и интенсивность сигналов в спектрах отражения экстрактов, содержащих каротиноиды, подтверждает положительную динамику их образования в растворах проращивания. На основании полученных результатов, нами сделаны предположения относительно механизма влияния гуминовых веществ на образование фотосинтетических пигментов. Исходя из известных данных о влиянии гуматов на ферментную активность и низкой ароматической фенольной составляющей структуры синтезированных нами продуктов, предположено отсутствие снижения активности хлорофиллаз под их воздействием. При этом распад зеленых пигментов под влиянием гуминовых веществ, вероятно, реализуется в незначительной степени. Увеличение содержания каротиноидов с ростом концентрации растворов может быть связано с торможением окислительной деструкции пигментов в присутствии синтезированных продуктов, играющих роль антиоксидантов. Положительная ростовая динамика и активация работы фотосинтетического аппарата при малой фитотоксичности синтезированных продуктов в низких концентрациях предполагает перспективность их применения в качестве доступных и экологических рострегулирующих препаратов.*

Ключевые слова: хлорофиллы, каротиноиды, регуляторы роста, токсичность, *Cucumis sativus L.*, D-глюкоза, п-аминобензойная кислота.

В сельскохозяйственной практике для оптимизации продукционного процесса у растений наряду с удобрениями и химическими средствами защиты растений, весьма успешно применяются регуляторы роста, использование которых ввиду малого их расхода экономически целесообразно. Основными ограничениями применения природных регуляторов является сохранение ими природного генезиса, а также низкая растворимость в воде и узкий интервал действующих концентраций [1]. Таких ограничений могут быть лишены синтетические препараты, в процессе получения которых возможно направленное регулирование их свойств, при этом большинство из них содержат в качестве активно действующих веществ искусственно полученные химические компоненты, микродозы которых остаются в растениях. В случае их замедленного метаболизма последнее может приводить к нежелательным экологическим последствиям, в связи с чем в настоящее время

по-прежнему актуальна проблема получения синтетически регулируемых и экологически безопасных препаратов [2].

Весьма перспективны высокомолекулярные биоактивные вещества природного происхождения, сочетающие в себе активность и экологичность с повышенной функциональностью (полимерная матрица может выступать в качестве носителя биологически активных веществ) [3]. Идея сочетания низко- и высокомолекулярных структур посредством химического модифицирования практически реализуема и показывает положительные результаты [1].

Ранее нами были изучены механизмы взаимодействия двух биологически активных природных соединений: D-глюкозы и п-аминобензойной кислоты, продуктами которого являются высокомолекулярные меланоидины [4]. Меланоидиновые продукты являются биологически активными синтетическими гуминоподобными веществами,

строение и биохимические свойства которых во многом определяются природой аминокомпонента реакции Майяра. Ранее на семенах огурца сорта «Нежинский» была изучена рострегулирующая активность меланоидинов и ее связь со структурно-групповым составом [3]: показано увеличение их стимулирующей активности при уменьшении концентрации с 10^{-1} % до уровня 10^{-3} %, что свойственно природным гуминовым препаратам. Анализ литературных данных показывает [1–3, 5] потенциальную возможность уменьшения действующих концентраций гуминовых веществ как рострегуляторов и активаторов, что предполагает снижение уровня содержания синтезированных препаратов в растворах проращивания. Последнее является полезным как в плане снижения расходов на обработку посевов, так и аспекте уменьшения общего негативного влияния на окружающую среду. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение влияния водорастворимых искусственных гуминовых веществ системы п-аминобензойная кислота–D-глюкоза в концентрациях 10^{-3} % и ниже на ростовые показатели и образование фотосинтетических пигментов в листьях тест-растений *Cucumis sativus* L.

Методика

Синтез гуминовых веществ проводили в течение 2 ч по ранее предложенной методике [3, 4], используя в качестве растворителя абсолютный этанол фирмы «Merck». По окончании синтеза после удаления растворителя твердый остаток промывали дистиллированной водой на стеклянных фильтрах до исчезновения поглощения фильтрата при длине волны 465 нм. Водорастворимая фракция (проба фильтрата объемом 25 мл) подвергалась диализу через целлофановые мембраны в 10-кратный объем чистого растворителя в течение 24 ч и использовалась в исходном и разбавленном до требуемой концентрации виде для биотестирования. Концентрации растворов предварительно установлены гравиметрически.

Биотестирование полученных препаратов проводили с использованием в качестве тест-растений семена огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта «Нежинский» в трех параллелях. В чашки Петри, выложенные фильтровальной бумагой, полностью смоченной рабочими растворами (рабочие концентрации 0,001; 0,0005 и 0,00025%), выкладывали по 10 семян и помещали в термостат для проращивания. Морфологические параметры (длина проростков в сравнении с контролем) оценивали на 6-е сутки в шести параллелях, результаты получены с достоверностью 95% ($P=0,95$). Содержание пигментов определяли в спиртовых экстрактах, для чего по окончании вегетационных экспериментов пророщенные образцы выдерживали на свету в течение 4 ч и проводили экстрак-

цию хлорофиллов 96%-м этанолом. Электронные спектры поглощения экстрактов регистрировали в кварцевых кюветах (1 см) на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», СПб, Россия) в интервале длин волн 200–700 нм с шагом 5 нм. Расчет содержания фотосинтетических пигментов в этанольных экстрактах проводили по формулам [5]. Для оценки состояния пигментной системы и ее работоспособности важно знать содержание разных форм хлорофилла, в связи с чем рассчитывали содержание форм а и b в выделенных экстрактах. Высушенные пробы листьев биотестируемых образцов измельчали, таблетировали с KBr (1:300) и исследовали ИК-Фурье спектроскопически. Спектры снимали в режиме поглощения в таблетках KBr («Fluka», 1:200) на ИК-Фурье спектрометре ФСМ-2201 (ООО «Инфраспек», СПб, Россия) в интервале волновых чисел 4000–500 см^{-1} со спектральным разрешением по волновому числу 4 см^{-1} при 60 сканах относительно воздуха. Дополнительно проводили выдерживание образцов листьев в CCl_4 до появления устойчивой красно-оранжевой окраски, после чего фильтровали и снимали ИК-Фурье спектры отражения экстрактов с использованием приставки МНПВО-36 (ООО «Инфраспек») в интервале волновых чисел 1800–800 см^{-1} при 90 сканах.

Результаты и обсуждение

К настоящему времени установлено, что проявление биологической активности веществами, в том числе регуляторами роста, напрямую связано с наличием в их составе определенных функциональных групп и структурных фрагментов. Синтезированные гуминовые вещества, как и природные гуминовые кислоты известны своим полифракционным составом. Наиболее эффективным методом исследования структурного-группового состава сложных гетерофункциональных систем является колебательная спектроскопия.

Строение продуктов недиализуемой водорастворимой фракции, как было детально показано нами ранее [3], может быть представлено как преимущественно неароматический остов, функционализированный O–H, C–O, C=O, C=C–C=O, COOH-группами. Полосы невысокой интенсивности в области спектра 1640–1510 см^{-1} свидетельствуют о наличии связанных остатков исходного ариламина в структуре, подтверждая наличие C=C-ароматической составляющей продуктов. Описанная функционализация позволяет на основании общих представлений и имеющихся литературных данных [6] предположить влияние продукта синтеза на всхожесть и прорастание семян. Непредельные фрагменты проявляют себя в радикальных реакциях, вызывающих изменение скорости метаболических процессов при действии ре-

Динамика изменения содержания фотосинтетических пигментов (мг/мл) в этанольных вытяжках листьев тест-растения

Концентрация, %	Длина проростков, см	Хлорофилл а	Хлорофилл b	Каротиноиды
Контроль	7,85±0,34	0,211±0,020	0,290±0,030	0,095±0,005
0,001	10,40±0,76	0,510±0,003	1,051±0,020	0,208±0,004
0,0005	9,90±0,62	0,404±0,016	0,770±0,030	0,162±0,001
0,00025	9,86±0,76	0,364±0,020	0,679±0,020	0,089±0,003

гуляторов роста. Кислород- и азотсодержащие функциональные группы участвуют в образовании межмолекулярных связей с компонентами-ингибиторами процессов развития, снижая их активность.

Результаты настоящей работы показывают снижение содержания хлорофиллов и каротиноидов с уменьшением концентрации растворов препарата (таблица) и демонстрируют прямую зависимость между накоплением фотосинтетических пигментов и ростовыми параметрами в исследованном интервале концентраций.

Положительная динамика ростовой активности подтверждает отсутствие фитотоксического эффекта исследуемых веществ в отношении развития тест-растения [3]. Содержание зеленых пигментов оказывается выше контрольного для всех концентраций, при этом содержание хлорофилла b, выше, чем хлорофилла а; последнее также было отмечено авторами [2] при изучении

влияния гуминовых веществ на динамику накопления пигментов. ИК-Фурье спектры образцов листьев тест-растения (рис. 1) показывают ряд интенсивных полос, характерных для фотосинтетических пигментов и биополимеров [7].

Характеристические сигналы 1745, 1651 см⁻¹ относятся к колебаниям С=О-групп, 1543 см⁻¹ – к νC=C ароматических циклов и поглощению амидных фрагментов. Смещенная в высокочастотную область полоса 1745 см⁻¹ указывает на наличие неассоциированных Н-связями сложноэфирных карбонильных групп, С=О-ассоциированная составная полоса 1651 см⁻¹ характеризует наличие хлорофилла и протеинов, ее повышенная интенсивность обусловлена суммарным поглощением карбонильных групп а- и b-хлорофиллов [7].

Известно, что содержание в растениях зеленых пигментов зависит от активности ферментов, катализирующих биосинтез и гидролиз пигментных комплексов. В частности, показано [8], что гуми-

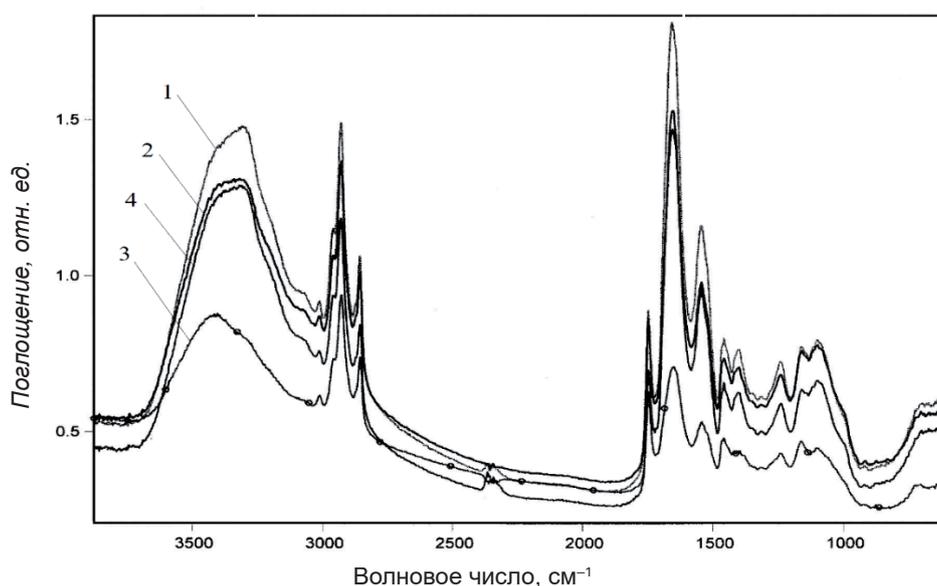


Рис. 1. ИК-Фурье спектры образцов листьев тест-растения:
1 – после обработки раствором с концентрацией 0,001 %;
2 – после обработки раствором с концентрацией 0,0005 %;
3 – после обработки раствором с концентрацией 0,00025 %;
4 – контроль

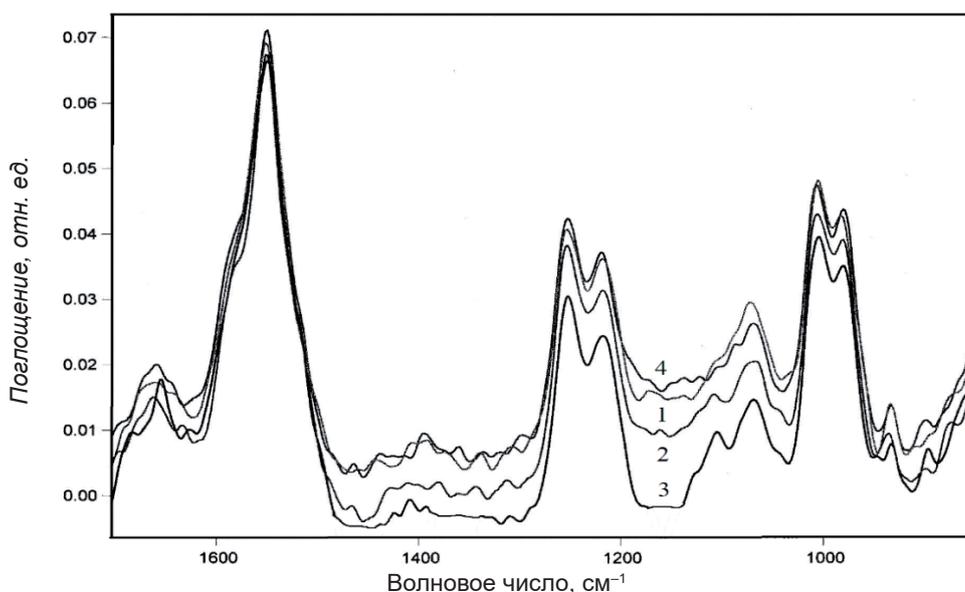


Рис. 2. ИК-Фурье спектры отражения экстрактов листьев тест-растения:

- 1 – после обработки раствором с концентрацией 0,001 %;
 2 – после обработки раствором с концентрацией 0,0005 %;
 3 – после обработки раствором с концентрацией 0,00025 %;
 4 – контроль

новые кислоты могут ингибировать биосинтез хлорофиллов и/или стимулировать их деградацию. В последнем случае, вероятно, имеет место изменение активности хлорофиллаз, катализирующих гидролиз эфирных связей, причем гуминовые кислоты изменяют активность преимущественно хлорофиллазы b, тогда как фульвокислоты оказывают влияние на активность хлорофиллазы a [8,9]. Авторы [9] отмечают, что основную роль фенольных компонент гуминовых веществ во влиянии на биосинтез хлорофиллов посредством увеличения активности хлорофиллаз и торможения действия Mg-хелатазы. Таким образом, выводы относительно влияния гуминовых веществ на активность фотосинтетического аппарата должны учитывать их структурно-групповой состав. Как было отмечено выше, ароматическая, в том числе фенольная составляющая структуры синтезированных нами продуктов незначительна, в связи с чем распад зеленых пигментов под их влиянием если и реализуется, то в незначительной степени.

Спектры отражения растворов красно-желтых пигментов в CCl_4 (рис. 2) показывают наличие характерных для каротиноидов полос поглощения [10]. Поглощение в области $1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ связано с наличием сопряженных $\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$ -фрагментов, интенсивная полоса с максимумом 1549 см^{-1} и плечом $1580\text{--}1590\text{ см}^{-1}$ относится к валентным колебаниям связей $\text{C}=\text{C}$ разных типов. Полосы $1252, 1217, 1070, 1005, 968\text{ см}^{-1}$ согласно данным [10] относятся к колебаниям $\nu\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $\nu\text{C}-\text{O}$ и

$\gamma=\text{CH}$ ($\text{trans}-\text{C}=\text{C}$); последняя полоса относится к структуре β -каротина [11].

Обращает также на себя внимание наличие полосы 1107 см^{-1} , усиливающейся с уменьшением концентрации растворов и отсутствующей в спектре контроля. Данная полоса относится к поглощению $\text{C}-\text{O}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -связей, характерных для молекул трансформированных каротиноидов, содержащих фрагменты спиртов и простых эфиров, при этом имеющих менее протяженную сопряженную систему. Последнее может быть связано с процессами трансформации β -каротина, протекающими как пероксидное окисление [12], приводящими к карбонильным соединениям. Уширение полос в ИК-Фурье спектрах в области $1610\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ обусловлено дополнительным поглощением $\text{C}=\text{O}$ -групп продуктов окисления каротиноидов (рис. 2, спектры 2, 3). Интенсивность полос 968 см^{-1} с уменьшением концентрации растворов также несколько снижается, что, вероятно, является следствием окислительных трансформаций [12]. Предполагается, что при увеличении содержания синтезированного препарата в растворах проращивания окислительные процессы частично переносятся на неопределенную систему синтезированных гуминовых веществ [4].

Заключение

Изучено влияние искусственных гуминовых веществ, синтезированных в системе D-глюкоза-п-аминобензойная кислота, на работу фотосинтетического аппарата тест-растения *Cucumis sativus* L. Показано, что на фоне общего уве-

личения ростовой активности, снижающейся с уменьшением концентрации гуминовых веществ (в диапазоне 0,001 до 0,00025%) в растворах проращивания, происходит симбатное изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов. Анализ профилей полос в ИК-Фурье спектрах образцов листьев тест-растения показывает наличие пиков, характерных для поглощения структурных фрагментов хлорофиллов. Интенсивность сигналов в спектрах отражения экстрактов, содержащих каротиноиды, также подтверждает динамику их образования в растворах проращивания. На основании полученных данных нами сделаны предположения относительно механизма влияния гуминов на образование фотосинтетических пигментов. Исходя из известных данных о влиянии гуминовых веществ на ферментную активность и того факта, что ароматическая фенольная составляющая структуры синтезированных нами продуктов незначительна, предположено отсутствие снижения активности хлорофиллаз, при этом распад зеленых пигментов под их влиянием реализуется в незначительной степени. Увеличение содержания каротиноидов с ростом концентрации гуминовых веществ в растворе может быть связано с торможением окислительной деструкции пигментов в присутствии синтезированных продуктов, играющих роль антиоксидантов. Результаты исследования показывают возможность получения на основе синтезированных гуминоподобных веществ биологически активных препаратов, характеризующихся комплексом таких свойств как водорастворимость, ростовая активность и стимуляция работы фотосинтетического аппарата при низкой фитотоксичности и малом расходе. Направлением дальнейших исследований является разработка технологии получения предложенных препаратов в масштабах производства.

Литература:

1. Швыкин А.Ю., Чилачава К.Б., Бойкова О.И., Переломов Л.В., Атрощенко Ю.М. Химическая модификация гуминовых кислот торфа природными и синтетическими регуляторами роста растений и биологическая активность полученных препаратов // Агрохимия. – 2017. – № 6. – С. 45–51.
2. Fernandez M., Chavez E., Montero D., Garcia A., Lopez D., Ardisana E., Alvarez S. Influence of vermicompost

humic acid on chlorophyll content and acclimatization in banana clone, Enano Guantanamero // Afr. J. Biotech. – 2016. – V. 15. – P. 2659–2670.

3. Черепанов И.С., Крюкова П.С. Биостимулирующее влияние синтетических гуминоподобных веществ на ранние стадии роста *Cucumis sativus* L. по данным ИК-Фурье спектроскопии // Вестник КрасГАУ. – 2020. – Т. 164. – № 11. – С. 81–86.
4. Черепанов И.С., Сергеева К.А. Процессы меланоидинообразования в этанольных системах моносахарид–ариламин–медь (II) // Вестник МГТУ. – 2017. – Т. 20. – № 3. – С. 526–532.
5. Дмитриева Е.Д., Сюдюкова К.В., Акатова Е.В., Леонтьева М.М., Волкова Е.М., Музафаров Е.Н. Биологическая активность гуминовых веществ сапропеля реки Упы Тульской области // Химия растительного сырья. – 2017. – № 1. – С. 137–144.
6. Федотов Г.Н., Федотова М.Ф., Шалаев В.С., Батырев Ю.Н. Повышение эффективности применения гуминовых препаратов для предпосевной обработки семян // Лесной вестник. – 2017. – Т. 21. – № 2. – С. 37–44.
7. Chapados C., Lemieux S., Carpentier R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy // Biophys. Chem. – 1991. – V. 39. – P. 225–239.
8. Haidar Al-Madhagi I. Effect of humic acid and yeast on the yield of greenhouse cucumber // J. Hort. Post. Res. – 2019. – V. 2. – P. 67–82.
9. Yang C.-M., Wang M.-C., Lu Y.-F., Chang I.-F., Chou C.-H. Humic substances affect the activity of chlorophyllase // J. Chem. Ecol. – 2004. – V. 30. – P. 1057–1065.
10. Lorand T., Deli J., Molnar P., Toth G. FTIR study of some carotenoids // Helv. Chim. Acta. – 2002. – V. 85. – P. 1691–1697.
11. De Nardo T., Shiroma-Kian S., Halim Y., Francis D., Rodriguez-Saona L. Rapid and simultaneous determination of lycopene and β -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V. 57. – P. 1105–1112.
12. Burton G., Daroszewski J., Nickerson J., Johnston J., Mogg T., Nikifiriv G. β -carotene autoxidation: oxygen copolymerization, non-vitamin A products, and immunological activity // Can. J. Chem. – 2014. – V. 92. – P. 305–316.

Cherepanov I.S., Kryukova P.S.

**WATER-SOLUBLE SYNTHETIC HUMIC SUBSTANCES AS ACTIVATORS OF
CUCUMIS SATIVUS L. TEST-PLANTS PHOTOSYNTHETIC SYSTEM**

The influence of humic substances synthesized in the D-glucose–p-aminobenzoic acid system on the activity of the photosynthetic apparatus of the test plant Cucumis sativus L. It was shown that against the background of a general increase in growth activity, which decreases with a decrease in the concentration of synthesized products (in the range 0.001 to 0.00025%) in germination solutions, there is a symbolic change in the content of chlorophylls and carotenoids. Analysis of bands profiles in IR-Fourier transform spectra of test plant leaf samples shows the presence of characteristic peaks uptake of chlorophyll structural fragments. The wavenumbers positions and intensity of signals in the reflection spectra of extracts containing carotenoids confirms the positive dynamics of their formation in germination solutions. Based on the data obtained, we made assumptions about the mechanism of the influence of humic substances on the formation of photosynthetic pigments. Based on the known data on the influence of humic substances on enzyme activity and the insignificant aromatic phenolic component of synthesized products structure, the absence of a decrease in the activity of chlorophyllases is suggested, while the decay of green pigments under the influence of humins is insignificant. An increase in carotenoid content with an increase in the concentration of humic substances in the solution can be associated with inhibition of oxidative degradation of pigments in the presence of synthesized products that play the role of antioxidants. The positive growth dynamics and activation of the photosynthetic apparatus with low phytotoxicity of synthesized products in low concentrations suggests the prospect of their use as affordable and environmental positive growth regulating drugs.

Keywords: *chlorophylls, carotenoids, plant growth regulators, toxicity, Cucumis sativus L., D-glucose, p-aminobenzoic acid.*