

УДК 543 + 547.992

Детоксицирующие свойства гуминовых препаратов по отношению к Cd (II), Pb (II), Cu (II)

© 2016. С. П. Ли¹, доцент, Б. М. Худайбергенова², в. н. с.,
З. М. Пулатова³, с. н. с., В. А. Прохоренко³, с. н. с.,
¹Кыргызский национальный университет,
720033, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Фрунзе, д. 547,
²Институт биотехнологии НАН КР,
720071, Кыргызская Республика, г. Бишкек, пр. Чуй, д. 265,
³Институт химии и химической технологии НАН КР,
720071, Кыргызская Республика, г. Бишкек, пр. Чуй, д. 267,
e-mail: liserey@mail.ru, bermet66@gmail.com

Представлены данные по получению и использованию модифицированных гуминовых кислот – криоструктурированных, гиматомелановых, формилированных, оксигуминовых, азотпроизводных, фульвокислот в качестве детоксицирующих агентов по отношению к Cd (II), Pb (II), Cu (II) в вегетационных экспериментах с *Latuca sativa* L. Синтезированные гуминовые препараты оказывают стимулирующее действие на урожайность салата. В присутствии тяжёлых металлов модифицированные препараты оказывают различное детоксицирующее влияние на Cd (II), Pb (II) и Cu (II), соответствующее их средству к указанным металлам согласно величинам констант устойчивости образующихся между ними комплексов.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, модификация, тяжёлые металлы, детоксицирующая способность.

Detoxifying properties of humic preparations with respect to Cd (II), Pb (II), Cu (II)

S. P. Li¹, B. M. Khudaybergenova²,
Z. M. Pulatova³, V. A. Prokhorenko³,
¹Kyrgyz National University,
547 Frunze st., Bishkek, Kyrgyzstan, 720033,
²Institute of Biotechnology, NAS KR,
265 Chui avenue, Bishkek, Kyrgyzstan, 720071,
³Institute of Chemistry and Chemical Technology, NAS KR,
267 Chui avenue, Bishkek, Kyrgyzstan, 720071,
e-mail: liserey@mail.ru, bermet66@gmail.com

The complexing properties of humic substances are of primary importance for their application as detoxifying agents. The promising approach for enhancing solubility and detoxication potential of metal-humics complexes is incorporation of various groups into the structure of humics. The enriched humic materials can be used as flushing agents for heavy metal polluted sites and as chelating agents for production of microfertilizers. The objectives of this study are: 1) to synthesize a set of humic materials (cryostructured, hmatomelanic, formilated, oxyhumic, N-reached and fulvic acids); 2) to assess potential toxicity and detoxifying properties of the humic derivatives with respect to Cd (II), Pb (II), Cu (II). Humic acids (HA) from oxidized brown coal were used for modification. Assessment of the toxicity of the derivatives obtained and of their detoxifying properties was performed using vegetative experiments with *Latuca sativa* L. The humic derivatives did not exhibit adverse effects onto lettuce. Both parent and modified humic materials displayed high detoxifying properties with respect to heavy metals. So, the detoxification effects of the oxyhumic, fulvic and cryostructured humic materials are slightly stronger as compared to those of the parent materials. A decrease in detoxifying effect is much bigger for Cd(II) and Pb(II), than for Cu(II). The lower detoxifying efficiency of the humic derivatives compared to the parent material corroborates well the data on metal-binding properties of the humics with respect to Pb(II), Cd(II), Cu(II). The obtained results allow to consider modification as a promising tool for obtaining soluble metal-HA complexes.

Keywords: humic acids, modification, heavy metals, detoxifying ability.

Уникальные свойства гуминовых веществ (ГВ), такие как нетоксичность, биосовместимость, устойчивость и обуславливающая высокие комплексообразующие свойства полифункциональность [1], определяют их потенциал для использования в качестве детоксицирующих агентов и микроудобрений. При этом рекомендуемые дозы ГВ не оказывают токсического действия на биоту. Протекторное действие гуминовых веществ объясняют, как правило, образованием нетоксичных и недоступных для живых организмов комплексов с экотоксикантами, что подтверждается данными по снижению биоаккумуляции токсичных элементов водными организмами в присутствии ГВ [2, 3]. Положительный эффект ГВ в ряде случаев обеспечивается и за счёт стимуляции функционирования биоты [4, 5].

Однако широкое использование гуминовых веществ ограничивается их нестехиометричностью и гетерогенностью ввиду отсутствия генетического кода при их образовании, что требует направленного регулирования структуры ГВ путём их модификации. Известно, что функционально обогащённые гуминовые вещества обладают большей связывающей и детоксицирующей способностью по отношению к тяжёлым металлам (ТМ) [6]. В зависимости от типа экотоксикантов требования к модификации ГВ могут существенно меняться, поэтому исследование структуры и детоксицирующих свойств модифицированных гуминовых кислот (ГК) является необходимым условием успешного решения проблемы выбора наиболее подходящих производных в качестве детоксицирующих агентов. В частности, для рекультивационных технологий наиболее важными свойствами ГВ являются комплексообразующие свойства [7], обусловленные присутствием карбоксильных и гидроксильных групп, ответственных за хелатирующее действие ГВ по отношению к ТМ. Поэтому можно ожидать усиления хелатирующих свойств ГВ по мере их обогащения различными функциональными фрагментами.

Цель настоящего исследования – показать, какие стратегии модифицирования гуминовых кислот приводят к получению производных с низкой токсичностью и наиболее ярко выраженной детоксицирующей способностью по отношению к Cd (II), Pb (II) и Cu (II) в условиях вегетационных экспериментов с *Latuca sativa* L.

Материалы и методы исследования

В работе использован ряд гуминовых препаратов (ГП): исходные ГК, выделенные

из окисленного бурого угля (Кара-Кече, Кыргызстан), и их модифицированные производные – криоструктурированные гуминовые кислоты (КГК), полученные путём пятикратного замораживания исходных ГК при -40°C с последующим размораживанием при 20°C ; гиматомелановые кислоты (ГМК), выделенные из ГК экстракцией 96%-ным этанолом; формилированные гуминовые кислоты (ФГК), полученные из ГК по реакции Гаттермана-Коха; оксигуминовые кислоты (ОГК), полученные из продуктов окисления ГК перманганатом калия экстрагированием метилэтилкетонном; азотпроизводные гуминовые кислоты (АГК), полученные взаимодействием ГК с *n*-фенилендиамидом; фульвокислоты (ФК) – водорастворимая фракция.

Содержание углерода, водорода и азота в образцах определяли на анализаторе «Карло Эрба», серы – согласно ГОСТ 30404-2000, содержание карбоксильных групп – кальций-ацетатным методом, фенольных групп – методом ацетилирования, карбонильных групп – по реакции с фенилгидразином солянокислым [8].

Вегетационные эксперименты проведены с семенами салата *Latuca sativa* L. на керамзите (d гранул – 2,0–3,0 мм, объёмная масса (гранулированный) – 0,59 г/см³) с применением питательных растворов. Состав питательных растворов, мг-экв/л: по 3 – NaNO₃, NH₄NO₃ и H₃PO₄, 2 – KNO₃, 6 – Ca(NO₃)₂, 1 – MgSO₄, 0,5 – CaSO₄. В качестве токсикантов, использованы CdSO₄, PbSO₄, CuSO₄ соответственно, детоксициантов – модифицированные препараты ГК, тест-отклика – масса наземной сухой биомассы салата. В вегетационные сосуды (d – 15 см, h – 10 см) помещали 100 г керамзита, в которые при тщательном перемешивании вливали 200 мл водных растворов металлов различных концентраций: 0,2; 0,5; 0,75; 1,0 и 1,25 мг/л. При этом содержание ионов металлов в керамзите составило 4, 10, 15, 20 и 25 мг/кг. Гуминовые препараты вносили в количестве, соответствующем следующим концентрациям в растворе: 5, 10, 50 и 100 мг/л. В сосуды помещали пророщенные семена салата в количестве 20 штук на сосуд. Продолжительность выращивания – 30 дней, освещение – естественное.

Для количественной оценки детоксицирующей способности гуминовых препаратов рассчитаны коэффициенты детоксикации (D) [6].

$$D = 1 - \frac{R_d - R_{d+t}}{R_d} / \frac{R_0 - R_t}{R_0}, \quad (1)$$

где R_0 – отклик контроля, R_d – отклик в присутствии ГП, R_t – отклик в присутствии

токсиканта, R_{d+1} – отклик в присутствии токсиканта и ГП.

На основе значений D рассчитаны константы детоксикации ионов металлов гуминовыми препаратами, нормализованные к содержанию органического углерода в ГП, K_{OC}^D с использованием уравнения (2):

$$D = \frac{K_{OC}^D \cdot C_{ГП}}{1 + K_{OC}^D \cdot C_{ГП}}, \quad (2)$$

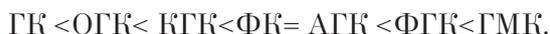
где $C_{ГП}$ – концентрация гуминового препарата.

Полученные значения K_{OC}^D в дальнейшем использованы для сравнения детоксицирующей способности различных гуминовых препаратов по отношению к металлам.

Результаты исследования

Согласно данным элементного анализа (табл. 1), наиболее обуглероженными являются образцы исходных гуминовых кислот (63,9%), криоструктурированных (63,7%) и окисленных ГК (63,8%).

Соотношение С/Н, характеризующее степень ненасыщенности ГК, т. е. содержание алифатических фрагментов, для изучаемых препаратов изменяется в ряду:



Высокие значения С/О (степени окисленности) для образцов АК, ФК и ОГК указывают на значительный вклад О-содержащих функциональных групп, а также периферических фрагментов в структуру этих ГП. Результаты элементного анализа и рассчитанные значения степени восстановленности (ω) указывают на низкую восстановленность ОГК и ФК по сравнению с другими ГП, в частности, с наиболее восстановленными ГМК ($\omega = -0,29$).

Результаты исследований по определению концентрации функциональных групп, в частности кислотных групп, определяющих реакционную способность, а также распределения кислорода по структурным фрагментам ГП (табл. 2) показывают, что от 17 до 45 % кислорода в исследуемых ГП распределено между тремя типами групп: -COOH, -OH, -C=O. Доля кислорода, входящего в состав этих групп, значительно выше для препаратов ОГК и ФК по сравнению с другими ГП.

Данные по дозозависимому отклику ионов металлов Cd (II), Pb (II), Cu (II) (рис. 1) в вегетационных экспериментах показывают, что при увеличении их концентрации в растворе наблюдается снижение веса сухой массы салата. Так, при концентрации металлов 1,25 мг/л снижение веса достигает ~20 %.

Синтезированные гуминовые препараты оказывают стимулирующее действие на уро-

Таблица 1

Содержание элементов на беззольную пробу (% масс.) и их атомные соотношения в ГП

Препарат	Зольность, %	C	H	N	S	O	C/H	C/O	ω
ГК	5,10	63,93	4,07	1,17	0,33	30,50	0,76	0,32	-0,05
КГК	4,85	63,70	4,17	1,17	0,33	30,73	0,78	0,36	-0,06
ФГК	4,73	63,90	4,62	1,0	0,30	31,18	0,86	0,35	-0,15
ГМК	0,55	63,32	5,30	0,70	0,30	30,17	1,00	0,35	-0,29
АК	4,60	60,30	4,20	4,80	0,28	30,47	0,83	0,37	-0,08
ОГК	3,16	63,80	4,10	0,82	0,01	31,27	0,77	0,36	-0,04
ФК	4,40	61,62	4,27	1,05	0,30	32,76	0,83	0,39	-0,03

Таблица 2

Содержание кислотных групп и распределение кислорода между функциональными группами в синтезированных ГП, %

Препарат	-COOH	-Ar-OH	-C=O	Распределение кислорода между функциональными группами, %		
				-COOH	-Ar-OH	-C=O
ГК	22,50	4,08	4,02	17,18	4,54	2,29
КГК	24,03	4,69	4,48	17,04	4,41	2,55
ФГК	24,21	4,83	5,17	15,97	3,83	2,94
ГМК	26,15	3,29	4,56	18,57	3,09	2,59
АК	15,39	4,08	4,02	10,92	3,83	2,29
ОГК	38,34	6,94	19,48	27,22	6,52	11,10
ФК	24,30	6,63	3,92	17,25	6,23	2,23

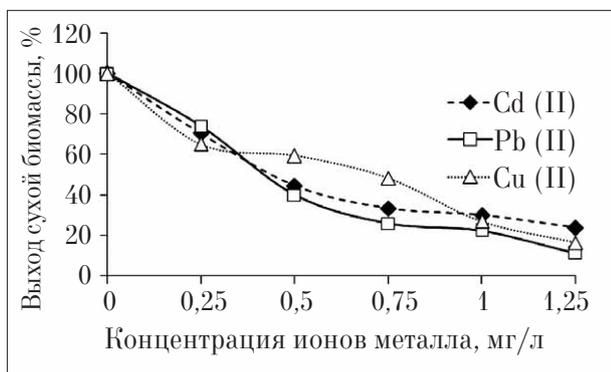


Рис. 1. Влияние ионов металлов на выход биомассы

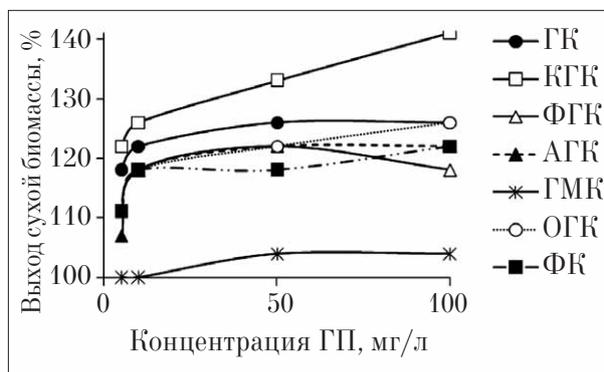


Рис. 2. Влияние гуминовых препаратов на выход биомассы салата

Таблица 3

Влияние ионов металлов на выход сухой биомассы *Latuca sativa L.*

Варианты эксперимента	Сухая биомасса, мг/см ³	% от контроля	Коэффициент вариации, %
Контроль	0,27	100	6,8
Токсикант – Cd (II)			
Контроль+токсикант (доза – 0,25 мг/л)	0,19	70,30	6,0
Контроль+токсикант (доза – 0,50 мг/л)	0,12	44,44	6,2
Контроль+токсикант (доза – 0,75 мг/л)	0,09	33,33	6,2
Контроль+токсикант (доза – 1,00 мг/л)	0,07	25,92	6,0
Контроль+токсикант (доза – 1,25 мг/л)	0,04	–	6,9
Токсикант – Pb (II)			
Контроль+токсикант (доза – 0,25 мг/л)	0,20	74,00	6,9
Контроль+токсикант (доза – 0,50 мг/л)	0,11	40,00	6,0
Контроль+токсикант (доза – 0,75 мг/л)	0,07	25,92	6,0
Контроль+токсикант (доза – 1,00 мг/л)	0,06	22,22	6,2
Контроль+токсикант (доза – 1,25 мг/л)	0,03	11,10	6,2
Токсикант – Cu (II)			
Контроль+токсикант (доза – 0,50 мг/л)	0,016	59,28	5,8
Контроль+токсикант (доза – 0,75 мг/л)	0,13	48,14	5,9
Контроль+токсикант (доза – 1,00 мг/л)	0,08	26,92	6,5

Примечание: количество растений – 6, контроль – керамзит + питательная среда. Прочерк означает, что показатель не определяли.

жайность салата. Повышение концентрации ГП в тестовых системах вызывает увеличение выхода сухой биомассы *Latuca sativa L.* (рис. 2).

Использование гуминовых препаратов в тестах с металлами показало достоверное снижение токсического воздействия тяжёлых металлов (рис. 3), так, в присутствии отдельных образцов ГП в концентрации 50 мг/л выход сухой биомассы салата, который под воздействием Cd (II) снижался до 44,4 % от контроля, повышается от 71 до 82 %. Смягчающий эффект ГП чётко проявляется также в опытах с Pb (II), Cu (II) (табл. 3).

С повышением концентрации ГП в присутствии токсиканта выход сухой биомассы салата увеличивается (табл. 3), однако полной

детоксикации достичь не удаётся, так как связывание ионов металлов с ГП протекает обратимо. Другими словами, в системе всегда имеется токсикант в свободной форме, что предотвращает возможность полной детоксикации.

Модифицированные препараты оказывают различное детоксицирующее влияние на Cd (II), Pb (II) и Cu (II) в условиях вегетационных экспериментов с *Latuca sativa L.* (табл. 4).

На основе рассчитанных значений D и K_{OC}^D (табл. 4), характеризующих детоксицирующую способность по отношению к Cu (II), Pb (II), Cd (II), гуминовые препараты можно расположить в ряд:

$$ОГК > ФК > КГК \geq ГК > ФГК > АГК > ГМК,$$

Таблица 4

Коэффициенты и константы детоксикации металлов гуминовыми препаратами (концентрация ионов металлов – 0,5 мг/л, ГП – 50 мг/л)

Препарат	Cd (II)		Pb (II)		Cu (II)	
	D	$lg K_{OC}^D$, л/кг С	D	$lg K_{OC}^D$, л/кг С	D	$lg K_{OC}^D$, л/кг С
ГК	0,30	4,13	0,35	4,23	0,36	4,25
КГК	0,30	4,12	0,36	4,25	0,36	4,25
ФГК	0,29	4,11	0,33	4,19	0,34	4,21
АГК	0,28	4,09	0,28	4,09	0,30	4,13
ГМК	0,26	4,07	0,28	4,08	0,27	4,06
ОГК	0,40	4,34	0,40	4,34	0,44	4,42
ФК	0,34	4,23	0,37	4,29	0,42	4,38

Примечание: жирным шрифтом выделены наиболее значимые результаты.

соответствующий возрастанию их средства к указанным металлам согласно величинам констант устойчивости образующихся между ними комплексов [9, 10].

Заключение

Полученные результаты позволяют рассматривать модификацию ГК путём обогащения различными функциональными группами в качестве перспективного инструмента для получения растворимых комплексов гуминовых производных с металлами. Модификация ГК приводит к образованию устойчивых комплексов гуминовых производных с ионами металлов, что в конечном итоге проявляется в эффективной детоксикации последних. Препараты ОГК, ФК и КГК вызывают увеличение детоксикации по сравнению с исходными гуминовыми кислотами по отношению к Pb (II), Cd (II), Cu (II). Кроме того, модификация ГК не индуцирует токсичность соответствующих производных. Полученные данные по детоксицирующим свойствам модифицированных гуминовых кислот позволяют выбрать тип модификации для разработки детоксицирующих агентов комплексного действия, способных связывать экотоксиканты различной химической природы, с одной стороны, и стимулировать рост растений в условиях химического стресса – с другой.

Литература

1. Жоробекова Ш.Ж. Макролигандные свойства гуминовых кислот. Фрунзе: Илим, 1987. 196 с.
2. Perminova I.V., Kovalenko A., Schmitt-Kopplin P., Hatfield K., Hertkorn N., Belyaeva E.Y., Petrosyan V.S. Design of quinonoid-enriched humic materials with

enhanced redox properties // Environmental Science and Technology. 2005. Vol. 39. No. 21. P. 8518–8524.

3. Кыдралиева К.А., Жоробекова Ш.Ж., Акулова М., Топильская О.М., Терехова В.А. Экспериментальная характеристика ремедиационных свойств гуминовых препаратов разного генезиса по фону загрязнения почв медью // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 2. С. 94–99.

4. Пукальчик М. А., Терехова В.А. Экотоксикологическая оценка городских почв и детоксицирующего эффекта наноконпозиционного препарата // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2012. № 4. С. 26–31.

5. Канискин М.А., Изосимов А.А., Терехова В.А., Якименко О.С., Пукальчик М.А. Влияние гуминовых препаратов на биоактивность почвогрунта с фосфогипсом // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 1. С. 86–93.

6. Perminova I.V., Grechishcheva N.Yu., Kovalevskii D.V., Kudryavtsev A.V., Matorin D.N., Petrosyan V.S. Quantification and prediction of detoxifying properties of humic substances to polycyclic aromatic hydrocarbons related to chemical binding // Environ. Sci. Technol. 2001. 35. P. 3841–3848.

7. Gerse R., Csicsor J., Pinter L. Application of humic acids and their derivatives in environmental pollution control. In: Humic Substances in the Global Environment and Implication for Human Health. Elsevier Science B.V., New York, 1994. P. 1297–1303.

8. Жоробекова Ш.Ж., Королева Р.П. Методы анализа гуминовых веществ. Бишкек: Илим, 2011. 160 с.

9. IUPAC Stability constants data base (computer edition). IUPAC and Academic Software, 1997. 2000 p.

10. Ли С.П. Модифицированные гуминовые препараты детоксицирующего назначения. Бишкек: Илим, 2015. С. 213–216.

References

1. Zhorobekova Sh.Zh. Macromolecular properties of the humic acids. Frunze: Ilim, 1987. 196 p. (in Russian)

2. Perminova I.V., Kovalenko A., Schmitt-Kopplin P., Hatfield K., Hertkorn N., Belyaeva E.Y., Petrosyan V.S. Design of quinonoid-enriched humic materials with enhanced redox properties // *Environmental Science and Technology*. 2005. Vol. 39. No. 21. P. 8518–8524.

3. Kydraliyeva K.A., Zhorobekova Sh.Zh., Akulova M., Topilskaya O.M., Terekhova V.A. Experimental characterization of remediation properties of different humic preparations in copper contaminated soil // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2015. No 2. P. 94–99. (in Russian)

4. Pukalchik M. A., Terekhova V.A. Ecotoxicological assessment of urban soils and detoxifying nanocomposite // *Vestnik Moscovskogo Universiteta. Seria 17. Pochvovedeniye*. 2012. No. 4. P. 26–31. (in Russian)

5. Kaniskin M.A., Izosimov A.A., Terekhova V.A., Yakimenko O.S., Pukalchik M.A. Impact of humic preparations on bioactivity of soil with phosphogypsum // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2011. No. 1. P. 86–93. (in Russian)

6. Perminova I.V., Grechishecheva N.Yu., Kovalevskii D.V., Kudryavtsev A.V., Matorin D.N., Petrosyan V.S. Quantification and prediction of detoxifying properties of humic substances to polycyclic aromatic hydrocarbons related to chemical binding // *Environ. Sci. Technol.* 2001. 35. P. 3841–3848.

7. Gerse R., Csicsor J., Pinter L. Application of humic acids and their derivatives in environmental pollution control. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implication for Human Health*. Elsevier Science B.V., New York, 1994. P. 1297–1303.

8. Zhorobekova Sh.Zh., Koroleva R.P. Methods for humic acids analysis. Bishkek: Ilim, 2011. 160 p. (in Russian)

9. IUPAC Stability constants data base (computer edition). IUPAC and Academic Software, 1997. 2000 p.

10. Li S.P. Modified humic materials of detoxifying application. Bishkek: Ilim, 2015. P. 213–216. (in Russian)