

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Соркина Татьяна Александровна

**ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ
ДОСТУПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЖЕЛЕЗА,
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ГУМИНОВЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**

Специальность 03.02.08 – Экология (в химии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Перминова Ирина Васильевна

Москва - 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 8 |
| 1.1 Гуминовые вещества: строение, свойства и области применения..... | 8 |
| 1.1.1 Общая характеристика гуминовых веществ | 8 |
| 1.1.2 Функционально-групповой состав гуминовых веществ..... | 11 |
| 1.1.3 Окислительно-восстановительные свойства ГВ | 12 |
| 1.1.4 Кислотно-основные свойства ГВ | 13 |
| 1.1.5 Области применения гуминовых веществ | 17 |
| 1.2 Дефицит железа у растений: причины возникновения и способы коррекции | 20 |
| 1.2.1 Роль соединений железа в жизни живых организмов..... | 20 |
| 1.2.2 Способы поглощения железа у высших растений | 21 |
| 1.2.3 Биодоступность соединений железа..... | 21 |
| 1.2.4 Дефицит железа у растений..... | 23 |
| 1.2.5 Способы коррекции дефицита железа у растений | 25 |
| 1.3 Соединения железа с гуминовыми веществами..... | 30 |
| 1.3.1 Соединения железа в почвах | 30 |
| 1.3.2 Взаимодействие железа с ГВ в природных водах | 32 |
| 1.3.3 Механизмы взаимодействия железа с ГВ | 34 |
| 1.3.4 Способы получения соединений Fe-ГВ..... | 38 |
| 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 42 |
| 2.1 Оборудование | 42 |
| 2.2 Техника эксперимента | 43 |
| 2.2.1 Получение соединений Fe- ГВ и исследование их свойств | 43 |
| 2.2.2 Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ | 53 |
| 2.3 Физико-химические методы анализа | 60 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3 | ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 66 |
| 3.1 | Характеристика макролигандных свойств препаратов ГВ | 66 |
| 3.1.1 | Элементный состав исследуемых препаратов ГВ..... | 67 |
| 3.1.2 | ИК-спектроскопия исследуемых препаратов ГВ | 69 |
| 3.1.3 | Определение содержания кислотных групп в препаратах ГВ | 72 |
| 3.2 | Получение и исследование свойств соединений Fe-ГВ..... | 75 |
| 3.2.1 | Получение растворимых в воде соединений Fe-ГВ..... | 75 |
| 3.2.2 | Исследование соединений Fe-ГВ методами ИК-спектроскопии, РФА и просвечивающей электронной микроскопии..... | 78 |
| 3.2.3 | Исследование соединений Fe-ГВ методами EXAFS/XANES | 83 |
| 3.2.4 | Исследование соединений Fe-ГВ методом спектроскопии ЯГР | 89 |
| 3.2.5 | Проведение направленного синтеза соединений Fe-ГВ | 97 |
| 3.2.6 | Получение соединений Fe – ГВ на основе γ - и δ -FeOOH..... | 99 |
| 3.2.7 | Изучение влияния ГВ на рост частиц ферроксигита с использованием мессбауэровской спектроскопии замороженных растворов | 102 |
| 3.2.8 | Исследование коллоидной устойчивости суспензий Fe-ГВ..... | 106 |
| 3.3 | Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ по отношению к растениям..... | 107 |
| 3.3.1 | Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ методом водных культур на растениях огурца..... | 110 |
| 3.3.2 | Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ методом водных культур на растениях пшеницы..... | 118 |
| 3.3.3 | Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ методом почвенных культур..... | 122 |
| 3.3.4 | Исследование цитотоксичности соединений Fe - ГВ | 126 |
| | ВЫВОДЫ..... | 135 |
| | СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 136 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 137 |

Введение

Актуальность проблемы.

Одним из основных способов минимизации воздействия химических веществ на природные и искусственные агроэкосистемы является замена опасных для окружающей среды реагентов и агрохимикатов на безопасные аналоги на основе природных соединений. Перспективным сырьем для получения таких препаратов являются гуминовые вещества (ГВ) – соединения природного происхождения с широкой ресурсной базой, включающей окисленные бурые угли, торфы, сапропели, лигносодержащие отходы целлюлозно-бумажных и биоэтанольных производств. ГВ образуются при разложении растительных и животных останков и формируют основной компонент органического вещества почв, природных вод, торфов и углей. При этом они представляют собой природные полиэлектролиты с окислительно-восстановительными и поверхностно-активными свойствами, что в сочетании с безопасностью для окружающей среды делает их реальной альтернативой многим синтетическим реагентам. Особый интерес представляет способность ГВ стабилизировать высокодисперсные формы соединений железа, описанная на примере почвенных коллоидов, органоминеральных комплексов и других соединений, встречающихся в почве и природных водах. Данное свойство может быть положено в основу получения широкого спектра гибридных соединений с различными функциональными свойствами. Наиболее перспективными областями применения препаратов Fe – ГВ являются сельское хозяйство и природоохранные технологии.

Одной из проблем современного сельского хозяйства является отсутствие безопасных и эффективных препаратов биологически доступного железа. При дефиците железа у растений возникает комплексное заболевание, сопровождающееся угнетением роста, которое приводит к снижению урожайности и питательной ценности сельскохозяйственных продуктов. Основным симптомом данного состояния является пожелтение листьев, поэтому оно получило название железodefицитный хлороз. Возникает оно у растений, выращиваемых на почвах с высоким содержанием карбонатов, в жарких и засушливых регионах, а также в

оранжереях и теплицах. Для коррекции данного заболевания используют либо растворимые соли железа, которые в низких дозах малоэффективны, а в высоких токсичны, либо синтетические хелаты (Fe-ЭДТА, Fe-ДТПА, Fe-ЭДДГА и другие), которые оказывают негативное воздействие на окружающую среду. В связи с тем, что такие хелатные комплексы устойчивы в условиях окружающей среды и требуют регулярного внесения, они накапливаются в почве и попадают в природные водоемы, обладая высокой хелатирующей способностью по отношению к многозарядным катионам металлов, способствуют повышению подвижности тяжелых металлов и их фитоэкстракции (извлечению из почвы и поступлению в растения). В связи с этим, проблема создания безопасных и эффективных препаратов биодоступного железа стоит очень остро.

Другой перспективной областью применения реагентов на основе гуминовых веществ и железа является очистка природных вод и загрязненных территорий от различных экотоксикантов, включая тяжелые металлы, радионуклиды и полиароматические углеводороды. Дезактивирующее действие ГВ на соединения указанных классов достаточно подробно изучено, а стабилизация в их составе наночастиц оксидов железа позволяет получать новые свойства, такие как регулируемая растворимость и поверхность заряда при различных рН, а также магнитные свойства, что расширяет возможности их практического применения.

Кроме того, важным достоинством гуминовых веществ является их относительно низкая стоимость и наличие больших запасов сырья в нашей стране, что делает возможным производство и широкомасштабное применение препаратов на их основе в сельскохозяйственных и природоохранных технологиях.

При этом систематические исследования по применению гуминовых веществ для стабилизации биологически доступных форм железа, механизмам влияния их на формирование и рост частиц оксидов железа, а также по изучению форм существования железа в составе таких препаратов на настоящий момент отсутствуют, что затрудняет их практическое использование. Указанные проблемы определили постановку целей и задач настоящей работы.

Цель работы состояла в получении высокодисперсных соединений железа, стабилизированных гуминовыми веществами, и оценке возможности их

практического применения в качестве безопасных и эффективных источников биологически доступного железа.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- Разработать способы направленного получения соединений железа, стабилизированных ГВ.
- Определить формы железа, которые стабилизируются ГВ, и факторы, влияющие на их формирование.
- Охарактеризовать растворимость и коллоидную устойчивость полученных препаратов.
- Охарактеризовать биологическую доступность железа в составе полученных препаратов Fe-ГВ для растений с различными стратегиями поглощения железа.
- Оценить токсичность соединений Fe, стабилизированных ГВ.

Научная новизна. Впервые систематизированы и научно обоснованы способы получения биологически доступных форм железа, стабилизированных гуминовыми веществами. На основании комплексного исследования полученных препаратов Fe-ГВ современными методами анализа впервые показано, что основными формами существования железа в составе гуминовых матриц являются не хелатированные ионы, а высокодисперсные частицы гидратированных оксидов железа. Впервые показано также, что железо, стабилизированное ГВ, является биологически доступным для растений как в форме железа (II), так и железа (III). Впервые осуществлено получение наночастиц ферроксигита δ' -FeOOH в водных растворах ГВ, а также продемонстрировано влияние ГВ на формирование и рост частиц оксидов железа в водных растворах.

Практическая значимость работы. Сформулированные в работе теоретические подходы и практические рекомендации могут быть использованы для разработки технологий производства гуминовых микроудобрений, заменяющих синтетические хелатные комплексы, направленных на минимизацию воздействия химических производств и реагентов на окружающую среду. Полученные в работе характеристики форм существования железа могут быть

использованы для контроля качества препаратов биологически доступного Fe, стабилизированного ГВ. Результаты изучения влияния гуминовых веществ на формирование и рост частиц оксидных соединений в водных растворах могут быть использованы для создания полифункциональных сорбентов, в том числе магнитоуправляемых. Результаты оценки биодоступности железа в составе препаратов Fe-ГВ для растений с различными стратегиями поглощения могут быть использованы для разработки оптимальных способов применения и доз гуминовых микроудобрений.

Работа выполнялась в соответствии с планами проектов РФФИ 10 03 0083а, 11 03 12177, Госконтракта Министерства науки и образования РФ 16.11, а также проектов У.М.Н.И.К. 2009, У.М.Н.И.К. 2010 Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Способ получения растворимых в воде препаратов Fe-ГВ с высоким содержанием железа.
- 2) Результаты исследования форм существования железа в составе препаратов Fe ГВ физико-химическими методами анализа.
- 3) Результаты исследования влияния гуминовых макролигандов на рост частиц оксидов железа в водных растворах.
- 4) Результаты исследования цитотоксичности препаратов Fe-ГВ.
- 5) Результаты определения биологической доступности соединений железа, стабилизированных ГВ, для растений с различными стратегиями поглощения железа.

1 Обзор литературы

1.1 Гуминовые вещества: строение, свойства и области применения

1.1.1 Общая характеристика гуминовых веществ

Гуминовые вещества (ГВ) – это сложные смеси устойчивых к биодеструкции высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды [1]. ГВ представляют собой основную часть органического вещества почвенных и водных экосистем, а также твердых горючих ископаемых, особенно верхнего окисленного слоя бурого угля - леонардита. Их доля от общего содержания органических веществ в почвах и водах составляет 60-80%; в торфах и углях она колеблется от 20 до 90% [2].

Общепринятая классификация ГВ основана на различии их растворимости в кислотах и щелочах [3]. Согласно этой классификации ГВ подразделяют на три составляющие: гуминовые кислоты (ГК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах (при $pH < 2$); фульвокислоты (ФК) – фракция ГВ, растворимая и в щелочах, и в кислотах и гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах.

ГВ образуются в результате разложения останков живых организмов, при этом происходит отбор фрагментов, наиболее устойчивых в окружающей среде. 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. Формула гипотетического структурного фрагмента ГВ почв, предложенная в работе [4], приведена на Рисунке 1. Данная формула наиболее полно отражает стохастический характер строения ГВ.

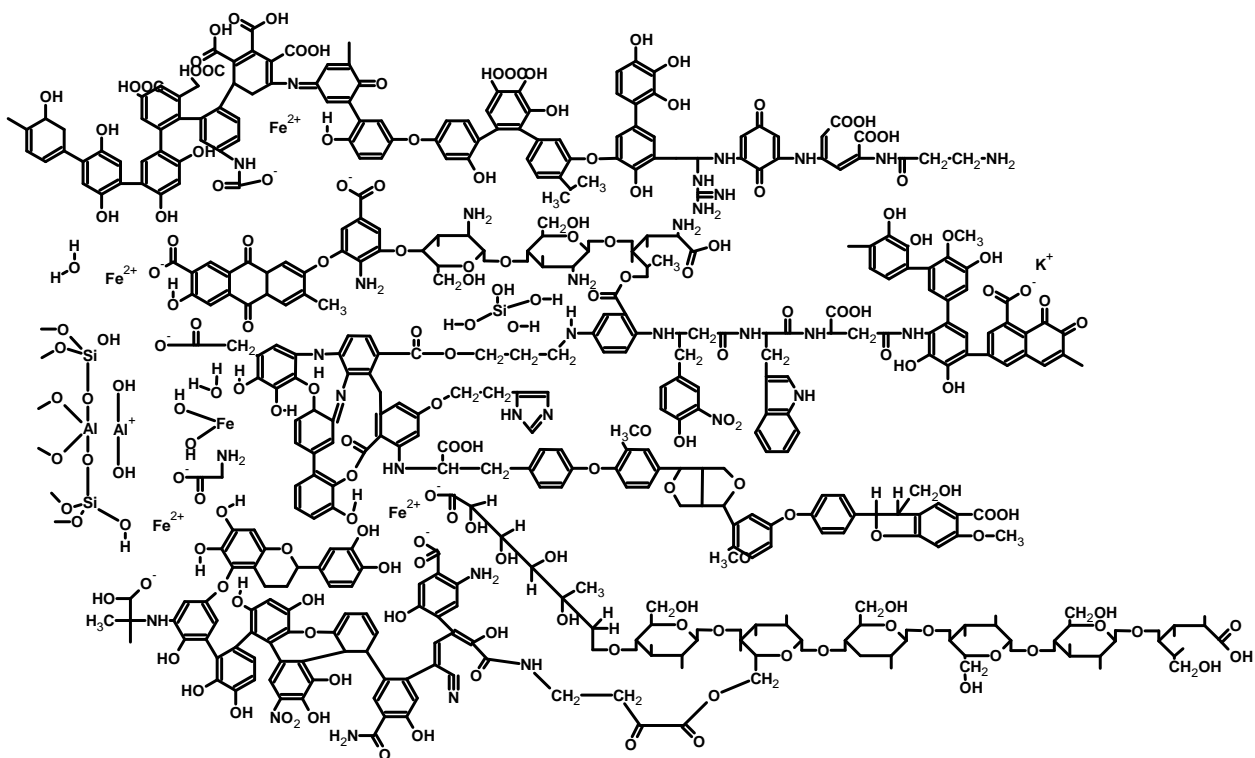


Рис. 1 Гипотетический фрагмент молекулы ГВ почв [4].

Как видно из Рисунка 1, ГВ обладают широким спектром структурных фрагментов, включая карбоксильные, фенольные, гидроксо- и аминогруппы.

Согласно традиционным представлениям, ГВ состоят из «каркасной» и «периферической» частей [5], [6]. «Каркасная» часть представлена высокозамещенными ароматическими фрагментами, соединенными алкильными, эфирными и другими мостиками. Преобладающими заместителями являются кислородсодержащие функциональные группы: карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные, карбонильные и метоксильные [7], [8]. Периферийная часть представлена углеводно-протеиновым комплексом, связанным с каркасной частью. Кроме того, в периферийную часть входят зольные компоненты – силикаты, алюмосиликаты, оксиды железа и т.п., связанные с органической матрицей кислородными мостиками [9]. Среди важнейших характеристик ГВ, определяющих их свойства, можно выделить следующие:

- элементный состав;
- качественный и количественный состав структурных фрагментов.

1.1.1.1 Элементный состав гуминовых веществ

Основными элементами, образующими молекулы ГВ, являются углерод, водород и кислород. Азот и сера содержатся в гумусовых кислотах на уровне 1-5%

[1], [10], [11]; обязательной составной частью ГВ являются микроэлементы и вода [1]. Брутто-формулу ГВ можно записать в общем виде следующим образом:



где М – ионы металлов.

Данные по элементному составу позволяют оценить простейшие структурные параметры: атомные соотношения элементов, степень окисленности, степень ненасыщенности, относительный вклад ароматических и алифатических фрагментов, предельные содержания функциональных групп [12], [13]. Эти параметры широко используют для характеристики особенностей генезиса ГВ различных источников происхождения [1], [14], [15].

Содержание углерода в ГК различного происхождения варьируется от 50 до 60%, кислорода – от 30 до 40% [16]. В целом, для ГК характерны более низкие значения атомных соотношений Н/С, чем для ФК, что указывает на большую ненасыщенность ГВ. Данный показатель убывает в ряду: морские донные отложения > пресные воды > торфы ≈ почвы. ФК характеризуются более низким содержанием углерода и более высоким – кислорода. Это предполагает большую степень замещения ароматического каркаса ФК кислородсодержащими функциональными группами. Максимальное содержание кислорода характерно для ФК пресных вод.

Атомные соотношения Н/С и О/С позволяют оценить такие параметры структуры, как содержание ненасыщенных фрагментов и кислородсодержащих функциональных групп. Так, при соотношении Н/С < 1 можно говорить о преобладании в структуре ГВ ароматических фрагментов. Если же это отношение лежит в диапазоне 1-1,4, то структура ГВ носит преимущественно алифатический характер [17]. Для характеристики количества кислородсодержащих групп в составе ГВ используют атомное отношение О/С. Величина этого отношения зависит от степени окисленности соединения и увеличивается при возрастании числа гидроксильных, фенольных, карбоксильных, хинонных и других кислородсодержащих функциональных групп в составе ГВ.

1.1.2 Функционально-групповой состав гуминовых веществ

Наличие большого количества функциональных групп в составе как ароматического каркаса, так и алифатической периферии, обеспечивает высокую комплексообразующую способность ГВ и их способность участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. Благодаря этому ГВ оказывают значительное влияние на поведение различных групп металлов в почвенных и водных системах. С точки зрения взаимодействия ГВ с металлами наиболее важными являются кислород- и азотсодержащие группы.

Кислородсодержащие группы. Кислород входит как в каркасную, так и периферийную части ГВ, составляя от 20 до 35%, масс. В ароматической части он находится преимущественно в составе карбоксильных и гидроксильных групп, в периферийной части – в углеводных фрагментах [12]. Около 75% кислорода в ГК и около 95% в ФК распределено между четырьмя основными типами функциональных групп: карбоксильными, фенольными, спиртовыми гидроксильными и карбонильными, причем вклад этих групп в общее содержание кислорода различен для ГК и ФК [18]. Как будет показано ниже, вышеперечисленные функциональные группы (в первую очередь, карбоксильные и фенольные), вносят определяющий вклад в связывающую способность ГВ по отношению к металлам.

Азотсодержащие группы. Содержание азота в ГВ составляет 1-5%, масс. Часть азота (40-60%) входит в состав каркасной части [14]. Остальной азот находится в составе периферической части. Азот периферической части распределяется следующим образом: 20-45% входит в состав аминокислотных остатков, 2-8% – в состав аминсахаров, 8-15% присутствует в виде солей аммония, до 20% – в виде неустановленных фрагментов. При этом азот каркасной части ГВ находится в составе следующих групп: $-NH_2$ группы, связанные с ароматическими кольцами; $-NH-$ и $=N-$ группы в открытых цепях; индольные, пиррольные и пиридиновые кольца; мостиковые NR -группы, связывающие хинонные кольца; аминокислоты, связанные с ароматическими ядрами через атом азота. Алифатические амины, аминокислоты и гетероциклы способны образовывать комплексные соединения с металлами. Таким образом, указанные

группы, наряду с кислородсодержащими, могут влиять на реакционную способность ГВ по отношению к металлам.

Хинонные и семихинонные фрагменты. Методом ЭПР показано, что содержание неспаренных электронов в ГВ составляет $(0,1-40) \cdot 10^{16}$ спин/г [19]. Присутствие данных групп обуславливает возможность протекания реакций с участием ГВ по свободнорадикальному механизму, в частности, восстановление ионов металлов и декарбоксилирование отдельных фрагментов ГВ. Окислительно-восстановительные переходы хинонных, семихинонных и гидрохинонных фрагментов определяют окислительно-восстановительные свойства гуминовых веществ [20].

1.1.3 Окислительно-восстановительные свойства ГВ

ГВ способны вступать в окислительно-восстановительные реакции как в качестве окислителя, например, по отношению к Cu(I), Sn(II) [21], так и восстановителя – Fe(III), Mn(IV), V(V), Hg(II), Pu(V, VI), U(VI), Cr(VI), I₂ и др. [22-28].

Для описания окислительно-восстановительных свойств ГВ в реакциях используют стандартный (либо формальный) электродный потенциал и окислительно-восстановительную емкость. В отличие от стандартного, формальный электродный потенциал (${}^F E_H^\circ$) напрямую связан с электродвижущей силой (ЭДС) электрохимической ячейки, и включает в себя действие различных факторов, характерных для конкретных условий [29]. Использование ${}^F E_H^\circ$ в качестве характеристики электрохимических свойств ГВ приводит к более адекватному прогнозу их окислительно-восстановительного поведения в природных условиях, при использовании данного параметра не требуется поправок на ионную силу, на распределение вещества по формам или на явления переноса. Значения формального электродного потенциала ГК, приводимые различными авторами, изменяются в пределах от +0,33 В [30] до +0,70 В [6], [31].

Еще одной важной электрохимической характеристикой ГВ является окислительно-восстановительная емкость, которая определяется как количество окислительно-восстановительного агента, вступающего в реакцию с ГВ, нормированное на массу ГВ. Приводимые в литературе значения окислительно-

восстановительной емкости варьируются в широких пределах (от 0 до 11,5 моль/кг) [27], [32] и зависят не только от природы ГВ, но и от природы окислителя (либо восстановителя), взаимодействующего с ГВ, а также от кислотности среды. Чем больше разница между стандартными электродными потенциалами ГВ и вещества, вступающего с ними в окислительно-восстановительную реакцию, тем больше получаемое значение окислительно-восстановительной емкости. Это связано с тем, что в ГВ имеется набор редокс-активных структурных фрагментов, отличающихся по значению электродного потенциала; при этом окислительно-восстановительная емкость сильно зависит от кислотности среды и возрастает с увеличением значения pH [27].

1.1.4 Кислотно-основные свойства ГВ

ГВ являются **полиэлектролитами**, высокомолекулярными соединениями, содержащими ионогенные группы. В растворе макромолекула полиэлектролита представляет собой полиион, окруженный эквивалентным количеством противоионов (малых ионов с зарядами противоположного знака), при этом размеры полииона на несколько порядков больше, чем противоионов [33].

Протолитические свойства ГВ представляют огромный интерес, так как они обеспечивают кислотно-основной баланс природных вод [34]. Кроме того, взаимодействие ГВ с соединениями металлов сильно зависит от pH [35], [36]; [37], [38], [39], [40], [41]. Для описания равновесий связывания металлов для ГВ и протонов были разработаны многочисленные модели. Наиболее распространенные из используемых: модель неидеальной конкурентной адсорбции (НИКА) [42], модель НИКА-Доннана [43], [44] [45], модели V и VI [46], [47] и модель конкурентного гауссова распределения [48], [49].

Для описания и прогнозирования взаимодействия ГВ с ионными веществами при различных условиях среды необходимы характеристики их протолитических свойств: значения констант кислотной диссоциации [50]. Непосредственным способом изучения протолитических равновесий и определения констант диссоциации является кислотно-основное потенциометрическое титрование [51]. Однако количественная интерпретация кривых титрования ГВ, которые не содержат явных перегибов, является сложной и неоднозначной задачей из-за

большого числа различных кислотных групп и полиэлектролитных эффектов [50]. В отличие от низкомолекулярных электролитов диссоциация каждой последующей группы полиэлектролита происходит в электрическом поле уже продиссоциировавших групп [52]. В связи с этим кислотные свойства ионогенных групп невозможно охарактеризовать одной константой диссоциации или набором ступенчатых констант, поэтому для описания протолитических свойств полиэлектролита пользуются величиной, называемой кажущейся константой диссоциации, которую рассчитывают по кривой титрования [52], [53].

Одним из основных параметров, получаемых из результатов исследования кислотно-основных свойств ГВ, является содержание кислотных групп на поверхности ГВ, способы определения которого более подробно изложены ниже.

1.1.4.1 Методы определения содержания кислотных групп ГВ

Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование является общепринятым методом определения содержания кислотных групп [54]. Однако использование этого простого метода для анализа ГВ сопряжено со значительными трудностями. Во-первых, кривые титрования ГВ не содержат четких перегибов, поэтому для установления конечной точки титрования требуется их математическая обработка [34]. Во-вторых, для полноты определения слабокислотных групп требуется достижение очень высоких концентраций щелочи, при которых точные измерения рН раствора затруднены [50], [51]. Несмотря на указанные проблемы, данный метод широко используется для оценки кислотности ГВ [55], [56], [57]. Наиболее распространенный способ определения точки эквивалентности при анализе ГВ заключается в титровании до фиксированного значения рН [56], [57], [58], [59]. Обычно рН 8,0 считают окончанием титрования карбоксильных групп, а рН 11 – всех кислотных групп [59], [55], [60]. Содержание фенольных групп рассчитывают как умноженную на 2 разность между количеством адсорбированных протонов при рН 8 и 10 [34]. Результаты определения кислотных групп ГВ потенциометрическим титрованием, как правило, существенно ниже данных баритового метода [58]. Вероятно, это связано с неполной диссоциацией фенольных гидроксидов в условиях титрования.

Баритовый и кальциево-ацетатный методы

ГВ образуют со щелочноземельными металлами малорастворимые соли [61], [62]. Данное свойство используется в традиционных методах определения кислотных групп в образцах ГВ по реакциям с гидроксидом бария и ацетатом кальция. Для оценки числа прореагировавших групп после осаждения гуматов в баритовом методе избыток $Ba(OH)_2$ титруется HCl , в Ca-ацетатном – определяется количество уксусной кислоты, высвободившейся в результате реакции.



Несмотря на образование малорастворимых соединений, обе реакции в значительной степени обратимы [50], и для достижения полноты превращения необходим существенный избыток реагента. Удаление ГВ из раствора в виде осадка гуматов бария или кальция приводит к сдвигу равновесия вправо и, следовательно, более полному определению групп по сравнению с потенциметрическим титрованием. Баритовый и Ca-ацетатный методы являются доступными и достаточно универсальными для анализа ГВ почв и углей.

В Таблице 1 приведены данные по содержанию кислотных групп в ГВ различного происхождения, полученные различными методами, приведенные в работе [34].

Таблица 1 Содержание карбоксильных и фенольных групп в ФК, ГК и РОВ [34]

| Образец | Метод анализа (титрование) | Содержание COOH групп, ммоль/г | | | Содержание Ar-OH групп, ммоль/г | | |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------|----|------------------------------------|-------------------|----|
| | | Ср. знач. | Станд. отклон. | n | Ср. знач. | Станд. отклон. | n |
| Фульвокислоты | | | | | | | |
| Образцы МГО | Прямое | 6,6 | 0,8 | 6 | 1,4 | 0,3 | 6 |
| Другие (а) | | 5,4 | 1,3 | 40 | 1,6 | 0,7 | 35 |
| НИКА- Доннан | | 5,4 | 1,2 | 18 | 2,6 | 1,9 | 18 |
| Другие (б) | $Ba(OH)_2$ / $Ca(OAc)_2$ | 6,1 | 2,0 | 83 | 4,1 | 1,9 | 83 |
| Гуминовые кислоты | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Образцы МГО | | 4,8 | 0,4 | 7 | 1,4 | 0,4 | 7 |
| Другие (а) | Прямое | 3,8 | 0,9 | 35 | 1,6 | 0,5 | 27 |
| НИКА-Доннан | | 3,2 | 0,9 | 20 | 2,7 | 1,4 | 20 |
| Другие (б) | Ва(ОН) ₂ / Са(ОАс) ₂ | 3,8 | 0,9 | 198 | 3,4 | 1,6 | 189 |

Здесь: (а), (б) – препараты, выделенные из различных источников, охарактеризованные прямым потенциметрическим титрованием (а), либо сочетанием баритового и кальциево-ацетатного методов (б).

Большую часть кислотных групп ГВ составляют карбоксильные группы, от 78% до 90% общей кислотности ФК и от 69% до 82% ГК [34]. Как видно из приведенных данных (Таблица 1), ФК содержат больше карбоксильных групп, чем ГК. Также видно, что баритовый метод дает более высокие результаты при определении содержания фенольных групп, в то время, как определение карбоксильных групп различными методами дает близкие результаты.

Проведенный анализ литературных данных показывает, что наиболее перспективным является независимое использование потенциметрического титрования и сочетания кальциево-ацетного методов.

Обладая указанными свойствами, ГВ выполняют целый набор важных биосферных функций. К их числу относятся структурирование почвы [63], [64], накопление питательных элементов и микроэлементов в доступной для растений форме [65], [66], регулирование геохимических потоков металлов в водных и почвенных экосистемах [67], [68], [69]. ГВ обладают способностью образовывать устойчивые комплексы с ионами металлов [70] и стабилизировать почвенные коллоиды, содержащие наночастицы оксидов [71]; а также оказывают защитное действие на организмы, находящиеся в состоянии стресса [72], [73], [74]. Под защитным (протекторным) действием ГВ подразумевают способность помогать живым организмам противостоять неблагоприятным условиям (стрессовым факторам) окружающей среды.

Широкая распространенность в природе, безопасность для окружающей среды и полифункциональность ГВ открывают широкие возможности для их практического применения.

1.1.5 Области применения гуминовых веществ

Способы практического применения ГВ основаны на использовании их различных физических, химических и биологических свойств.

Высокое сродство к органическим соединениям позволяет использовать ГВ в качестве энтеросорбентов, применяемых в ветеринарии (препараты «Гумадапт», «ЭСТ-1») и медицине (препарат «Гумивит»), а также при рекультивации территорий, загрязненных органическими веществами. Связывание загрязняющих веществ приводит к снижению их концентрации в подвижной форме и, следовательно, уменьшению токсичности. Поэтому ГВ выступают в качестве природных детоксицирующих веществ [75], [76], [77], в том числе для территорий загрязненных ПАУ [78] и нефтепродуктами [79]. [80]. За рубежом разработаны и используются твердые сорбенты на основе ГВ, предназначенные для очистки природных и грунтовых вод [76], [81].

Способность ГВ связывать ионы металлов позволяет использовать их при производстве микроудобрений и кормовых и пищевых добавок, содержащих микроэлементы [82], [83], [84], [85], [86], а также при рекультивации территорий, загрязненных тяжелыми металлами [87], [88].

Поверхностно-активные свойства ГВ делают их пригодными для использования в промышленности: в качестве компонентов буровых растворов (препараты «Полигум-К», «Полигум-К1»), в качестве компонентов крахмальных шлихтующих композиций при обработке хлопчатобумажных тканей [89], в виде добавок к растворам йода, используемым в качестве альтернативы цианистым растворителям при кучном выщелачивании тонкодисперсного золотосодержащего сырья и для удаления ароматических углеводородов нефтей из загрязненных водоносных горизонтов [78]. В отличие от синтетических ПАВ, обычно используемых для этих целей, при получении ГВ не используются токсичные вещества. Кроме того, гуминовые препараты не являются ксенобиотиками, т.е. их использование не наносит ущерба окружающей среде.

Способность ГВ образовывать органо-неорганические комплексы с минеральными частицами грунта позволяет использовать ГВ в качестве структурообразователей и мелиорантов почв.

Окислительно-восстановительные свойства позволяют использовать ГВ в качестве восстановительных агентов, снижающих подвижность экотоксикантов, таких как Cr(VI) [90], Pu(V), Np (V) [91].

Биологическая активность ГВ позволяет использовать их в качестве стимуляторов роста растений (препараты «Лигногумат», «Гумат», «Гумак» и др.) и неспецифических адаптогенов и биогенных стимуляторов в медицине (препараты «Гумизоль», «Триактив»). Наиболее широкое распространение ГВ получили в растениеводстве, где они используются как стимуляторы роста растений или микроудобрения, также отмечают гормоноподобную активность ГВ по отношению к растениям [92]. В Российской Федерации в список разрешенных к применению регуляторов роста растений и удобрений в 2013 году входит более 60 различных препаратов гуминовой природы, среди которых можно назвать такие, как «Биогум», «Гумми-Оми», «Гумисол-М», «Оргум-М», «Энерген», «Биогумус», «Биуд», «Биуд-компост», «Зоогумус», «Гумимакс» и др. [93]. В отличие от аналогичных синтетических регуляторов роста действие гуминовых препаратов не ограничивается влиянием на обмен веществ растений. При систематическом использовании препаратов улучшается структура почвы, ее буферные и ионообменные свойства, активизируется деятельность почвенных микроорганизмов.

В настоящее время на основе ГВ уже созданы и нашли применение такие лекарственные препараты как «Торфот», «ТРР», «Гумизоль», «Пелоидин», «ФиБС», «Эприл» и др. Несмотря на доказанную медицинскую эффективность этих препаратов, механизм действия входящих в их состав ГВ не известен, что вызвано, в первую очередь, отсутствием разработанных принципов исследования лекарственных средств на основе природного сырья.

Гетерогенность состава ГВ обеспечивает широкий спектр их свойств, например, при использовании гуминовых препаратов для рекультивации сред, загрязненных гидрофобными органическими соединениями, предпочтительно использовать ГВ, обладающие повышенным сродством по отношению к указанным

загрязняющим веществам, т.е. ГВ должны характеризоваться выраженными гидрофобными свойствами. При создании микроудобрений на гуминовой основе принципиальным свойством ГВ, напротив, является их высокая растворимость и обогащенность функциональными группами. Для повышения эффективности применения гуминовых препаратов и расширения спектра их применения может быть использована направленная химическая модификация ГВ, позволяющая получать препараты с заданными свойствами.

К настоящему времени в литературе описано несколько видов направленной модификации ГВ. К их числу относятся: введение в структуру природных ГВ различных соединений кремния [94], [95] и железа [82], [83], [84], [96]; сульфирование ГВ для повышения растворимости их комплексов с металлами [97]; кислотный гидролиз ГВ для удаления гидрофильных периферических фрагментов с повышением сродства ГВ к полиядерным ароматическим углеводородам [98]; обогащение структуры ГВ гидрохинонными фрагментами для повышения их восстановительной способности по отношению к актинидам в высших степенях окисления [91]; модификация с присоединением алкоксисилильных соединений к ГВ путем конверсии карбоксильных в аминогруппы для иммобилизации на поверхности оксида кремния [99].

Одним из направлений химической модификации является получение соединений на основе ГВ, содержащих биологически доступные формы металлов, представляющих собой гуматы калия и/или натрия с добавкой необходимых микроэлементов таких, как Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co и B. Примерами таких препаратов являются «Гумат+7» и «Гумат-Универсал». При этом значительный интерес представляют комплексные микроудобрения, имеющие высокое содержание биологически доступного железа, которое является одним из наиболее важных элементов минерального питания живых организмов. Более подробному рассмотрению факторов, влияющих на биологическую доступность железа, посвящен следующий раздел.

1.2 Дефицит железа у растений: причины возникновения и способы коррекции

1.2.1 Роль соединений железа в жизни живых организмов

Железо, металл восьмой группы периодической системы химических элементов, занимает 4-ое место по распространенности в земной коре, его кларк составляет 4,7% [100]. Электронное строение атома железа ($1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^6 4s^2$) и относительно малые размеры как нейтральных атомов Fe^0 (1,26 Å) в металлическом железе, так и ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} (0,74 и 0,64 Å, соответственно) в соединениях определяют многообразие валентных состояний железа. Характерные степени окисления железа: 0, +2, +3, +6, при этом устойчивыми могут быть соединения, как с ионной, так и с ковалентной связью [101].

Для подавляющего большинства живых организмов железо является жизненно важным элементом, так как оно принимает участие в процессах, связанных с переносом электронов и сменой степени окисления. Это процессы дыхания и трансформации энергии в клетках, а также биосинтеза белков в клетках [102]. Одной из важнейших функций железа является взаимодействие с активными формами кислорода (АФК). В Таблице 2 приведены основные функции железа в живых организмах.

Таблица 2 Основные функции железа в живых организмах и железосодержащие комплексы, участвующие в осуществлении этих функций [102].

| Функция | | Железосодержащие биохимические комплексы |
|--|---|---|
| Обратимое связывание, транспорт и сохранение кислорода | | Гемоглобин, миоглобин, гемэритрин |
| Обратимый перенос электронов | | Железо-серные белки, цитохромы a, b, c, цитохром c оксидаза |
| Функционирование активных центров редокс-ферментов | Окисление биомолекул | Цитохромы P450, пероксидазы |
| | Детоксикация АФК | Каталаза, супероксиддисмутаза |
| | Образование АФК | Оксидаза фагоцитов |
| | Образование реакционноспособных азотсодержащих частиц | NO-синтаза |

Как видно из данных, приведенных в Таблице 2, железо играет огромную роль в жизни живых организмов, в первую очередь, в дыхательных процессах, а также в процессах с участием свободных радикалов. В связи с этим, недостаток железа может вызывать серьезные нарушения в жизнедеятельности живых организмов.

1.2.2 Способы поглощения железа у высших растений

У растений существует два основных способа поглощения железа, обычно называемые стратегиями I и II [103]. Растения со стратегией I, к которым относятся все двудольные и однодольные, кроме мятликовых, способны снижать значение pH в области ризосферы, что способствует восстановлению железа из Fe(III) до Fe(II) [104]. Поступление в клетку осуществляется путём связывания с железовосстанавливающими белками, ассоциированными с клеточными мембранами. Растения со стратегией II (мятликовые) выделяют фитосидерофоры – органические вещества, которые образуют хелатные комплексы с Fe(III).

Примерами культурных растений со стратегией I являются картофель, подсолнечник, горох, огурцы, томаты, все плодовые культуры, а со стратегией II – пшеница, кукуруза, сорго, ячмень и рожь. При стратегии I поступление железа в растения происходит после расщепления комплекса с органическими лигандами и восстановления Fe (III) до Fe (II). Восстановление происходит в результате активности железоредуктаз – ферментов ризосферы, выделение которых сопровождается подкислением среды. Так как растения этих двух групп используют разные механизмы поглощения железа, биологическая доступность различных соединений железа может значительно различаться для растений с различными стратегиями.

1.2.3 Биодоступность соединений железа

По сравнению с другими биогенными металлами биодоступность железа наиболее сильно зависит от изменения кислотности и окислительно-восстановительного потенциала среды. В диапазоне pH от 7 до 9 минеральные формы железа в почве представлены, главным образом, гидроксокомплексами $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ и $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$. Их концентрация в почвенном растворе составляет

около 10^{-10} М. При этом концентрация растворенного железа, необходимого для нормального роста растений, должна быть на несколько порядков выше: 10^{-6} - 10^{-5} М [104]. Кроме того, гидроксиды железа обладают способностью адсорбировать из почвенного раствора различные соединения, что может привести к дефициту фосфора, калия и некоторых микроэлементов, например, цинка. На почвах, обогащённых карбонатом кальция, при высоких значениях рН и хорошей аэрации, когда железо преимущественно находится в форме Fe^{3+} , оно является труднодоступным для растений. В карбонатных почвах доступность железа значительно снижается из-за щелочной среды и адсорбции на извести, а также из-за замещения ионов железа на кальций в соединениях с органическими лигандами. В кислых, особенно гидроморфных, почвах создаются благоприятные условия для восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} , что способствует повышению растворимости соединений железа. Присутствие различных соединений азота повышает биологическую доступность соединений железа [84], [105]. Немаловажную роль в биологической доступности соединений железа имеет органическое вещество почв и природных вод, которое препятствует окислению Fe (II) [106]. На Рисунке 2 приведена зависимость биологической доступности различных элементов питания растений от кислотности среды.

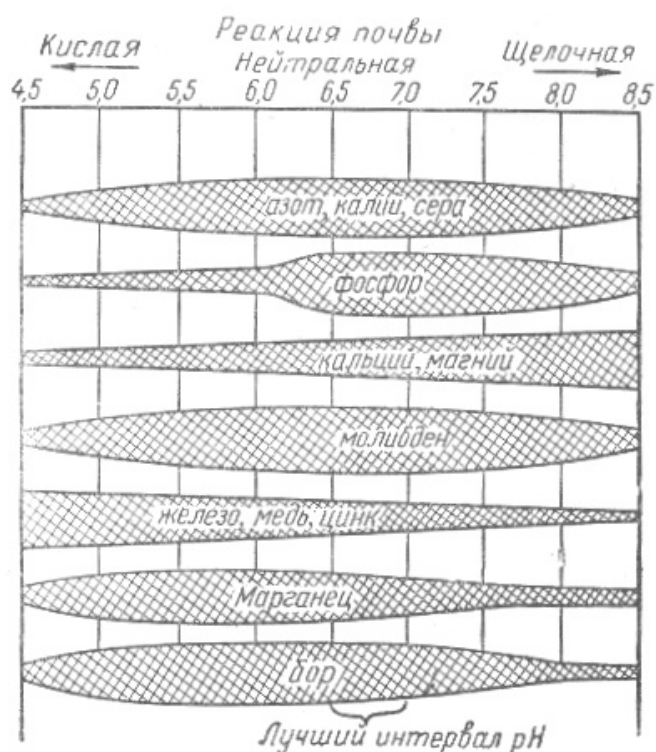


Рис. 2 Схематическое изображение влияния реакции почвы на доступность питательных веществ для растений [107].

Как видно из схемы, приведенной на Рисунке 2, биологическая доступность соединений железа повышается с понижением pH. Кроме того, в кислых почвах, где растворимость соединений железа повышается, растения иногда испытывают угнетение от его солей, находящихся в растворе (хлорида и сульфата) [107]. В нейтральных и слабощелочных почвах подвижность железа резко падает, и некоторые растения, в первую очередь, плодовые и ягодные, испытывают в нем недостаток.

1.2.4 Дефицит железа у растений

Дефицит железа у *животных и человека* носит название анемии и является наиболее распространенным нарушением минерального питания. Недостаток железа приводит к повышенной утомляемости, проблемам с дыханием, замедлению развития и ослаблению иммунитета. Наиболее эффективным подходом к устранению дефицита железа является введение в рацион пищевых добавок в сочетании с улучшением качества пищи, направленным на повышение содержания биологически доступного железа, как искусственно введенного, так и исходно присутствовавшего в пище [108], [109].

Здоровому человеку необходимо, чтобы сельскохозяйственные продукты обеспечивали, как минимум, 50 питательных веществ, включающих витамины, аминокислоты и незаменимые жирные кислоты и минеральные элементы, в том числе, железо. Если система рационального питания не удовлетворяет этим требованиям, возрастает число людей, страдающих онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями, диабетом и другими болезнями. Глобальное развитие сельскохозяйственных технологий направлено на создание продукции, полезной для здоровья человека, содержащей питательные элементы в доступной форме [110], [111]. Растения являются важным источником железа в пище, и создание сельскохозяйственной продукции с повышенным содержанием железа является одним из подходов к устранению анемии [112]. В связи с этим, необходимы исследования, направленные на разработку препаратов, содержащих железо, биологически доступное для растений.

Несмотря на то, что содержание железа в окружающей среде велико и в некоторых почвах достигает 3,8% [113], значительная его часть находится в формах, не доступных для растений [114]. В условиях интенсивного сельского хозяйства может происходить вынос железа из почв с сельскохозяйственной продукцией, что приводит к необходимости применения микроудобрений. Наиболее остро проблема железodefицитного хлороза стоит на карбонатных и черноземных почвах с высоким значением рН и большим содержанием карбоната кальция [114]. Такие почвы располагаются на так называемых, аридных территориях, занимающих около 1/3 площади земной поверхности, где проживают около 1 млрд. человек, или более 20% населения мира [115]. Сельскохозяйственное производство в России ведется на площади 197,6 млн. га, в том числе, посевных площадей – 88 млн. га. [103]. При этом практически вся территория юга России (27,1 млн. га) расположена в аридной зоне [115], а около 100 млн. га в России занимают районы, подверженные опустыниванию и засухам или потенциально опасные в этом отношении [103]. В связи с этим, разработка и применение эффективных и безопасных корректоров дефицита железа имеет огромное практическое значение.

1.2.5 Способы коррекции дефицита железа у растений

Наиболее простой способ борьбы с железodefицитным хлорозом, применявшийся в течение длительного времени, а именно внесение в почву солей железа, является недостаточно эффективным и не обладает продолжительным действием, так как ионы железа подвергаются гидролизу и выводятся из растворимой фазы почвы вследствие осаждения гидроксидов [85], [107]. Более эффективным является опрыскивание листьев слабыми растворами солей железа, чаще всего это сульфат или хлорид железа (II), лимоннокислое железо и соль Мора. Такой способ обработки обычно дает только точечное или пятнистое позеленение листьев, но, тем не менее, способствует значительному улучшению состояния растений и повышению их продуктивности. Опрыскивание нужно проводить дважды или трижды на протяжении сезона, что повышает стоимость работ, кроме того, даже многократная обработка не является достаточно эффективной. Эффективным способом устранения дефицита железа у плодовых деревьев является введение растворов солей или органических соединений железа в штамб в виде инъекций. Способ очень трудоемкий, для промышленных садов он мало пригоден и не всегда остается безвредным для растений [85]. Перечисленные способы борьбы с железodefицитным хлорозом при сильных проявлениях заболевания не спасают растения от значительного снижения продуктивности или даже гибели. Ситуация в корне изменилась после внедрения в сельскохозяйственную практику синтетических хелатов железа.

Комплексы железа с органическими хелатами, устойчивые к гидролизу в широком диапазоне pH и окислительно-восстановительного потенциала среды, представляют собой источник доступных соединений железа для растений [116]. Именно они и являются наиболее распространенными препаратами, используемыми для коррекции дефицита железа [117]. В настоящее время для коррекции железodefицитного хлороза в основном используются синтетические хелаты железа (III), органический лиганд которых содержит карбоксильные, фенольные и аминокгруппы. Наиболее распространенными являются следующие соединения [114]:

– Fe-ЭДТА – этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат железа;

- Fe-ДТПА – диэтилентриамин-N,N,N',N'',N'''-пентаацетат железа;
- Fe-ЭДДГА – этилендиамин-N,N'-ди(2-гидроксифенилацетат) железа;
- Fe-ЭДДГМА – этилендиамин-N,N'-ди(2-гидрокси-4-метилфенилацетат)

железа;

Fe-ЭДДГСА – этилендиамин-ди(2-гидрокси-5-сульфофенилацетат) железа;

Fe-ЭДДОА – этилендиаминдиоксифенилацетат железа.

Структурные формулы трех наиболее распространенных комплексонов – ЭДТА, ДТПА и ЭДДГА приведены на Рисунке 3.

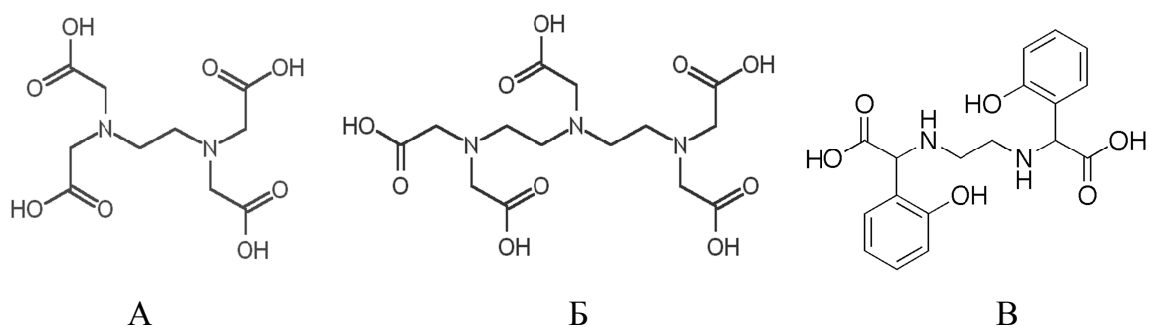


Рис. 3 Структурные формулы синтетических комплексонов ЭДТА (А), ДТПА (Б) и ЭДДГА (В).

Как видно из приведенных структурных формул (Рисунок 3), используемые синтетические комплексоны являются полидентатными лигандами, координация железа в комплексе с которыми осуществляется через атомы азота и кислорода. По структуре такие лиганды достаточно близки к природным фитосидерофорам, и также образуют с ионами металлов устойчивые комплексы (Таблица 3). При выборе хелата железа следует также уделять особое внимание различию в величинах констант устойчивости данного хелата с Fe(III) и Ca(II), так как при значительном превышении концентрации кальция над концентрацией железа в почвенном растворе возможно появление реакций конкурирующего комплексообразования, что приведет к уменьшению количества доступного для растений железа в растворе. Константы устойчивости комплексонов железа и кальция, то есть комплексов металлов с синтетическими лигандами [114], [118], приведены в Таблице 3.

Таблица 3 Константы устойчивости комплексонатов железа и кальция с различными синтетическими лигандами

| Комплексон | $\lg K_{уст} (Fe^{3+})$ | $\lg K_{уст} (Fe^{2+})$ | $\lg K_{уст} (Ca^{2+})$ |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ЭДДГА | 30,4 | - | 7,2 |
| ДТПА | 28,6 | 16,5 | 10,1 |
| ЭДТА | 25,1 | 14,3 | 10,6 |

Как видно из данных, приведенных в Таблице 3, комплексонаты железа (III) с данными лигандами более устойчивы, чем аналогичные с железом (II) и кальцием (II). Это обеспечивает биологическую доступность железа в составе хелатов в условиях карбонатных почв, на которых обычно и наблюдается дефицит железа. Основным процессом, в результате которого железо переходит в биологически недоступную форму, является гидролиз, поэтому важным свойством хелатов является устойчивость в щелочной среде. Наименее устойчив комплекс Fe-ЭДТА, он гидролизуется на 50 % даже при pH 7,5 [119]. Поэтому обычно предпочтение отдают Fe-ДТПА и Fe-ЭДДГА (коммерческие названия Sequestrene 138-Fe, Libfer SP), так как эти хелаты наиболее устойчивы в почве при значениях pH до 10 [85].

Причиной широкого распространения хелатов является то, что они полностью отвечают требованиям, предъявляемым к препаратам биологически доступного железа, предназначенным для применения в сельском хозяйстве, таким, как высокое содержание железа (больше 5% масс.), устойчивость к воздействию света, устойчивость к высоким концентрациям кальция в почве, высокая растворимость [120], [121].

Эффективность хелатов для коррекции железодефицитного состояния растений была продемонстрирована в работах [85], [116], [122], [123].

Различия между растениями со стратегией I и стратегией II особенно ярко проявляются в реакции на действие синтетических хелатов. Это наглядно демонстрируется результатами работы [124]. Авторами было показано, что в то время как огурцы при дефиците железа эффективно поглощали его из комплекса с этилендиаминдиоксифенилацетатом (Fe-ЭДДОА) и довольно слабо реагировали на внесение фитосидерофоров, ячмень поглощал Fe из комплексов с сидерофорами в 10^2 - 10^3 быстрее, чем из синтетического хелата железа.

Несмотря на доказанную эффективность этих комплексонов, в последнее время все большее внимание уделяется их недостаткам, к которым, в первую очередь, относится небезопасность для окружающей среды [125]. Показано, что они относятся к труднодеградируемым соединениям, что приводит к их накоплению в сельскохозяйственных землях и миграции в сопредельные среды – поверхностные и грунтовые воды. Попадая в природные водоемы, комплексоны переводят тяжелые металлы из донных осадков в подвижную, биологически доступную форму, что особенно опасно с точки зрения биоаккумуляции загрязняющих веществ, то есть накопления в живых организмах. Поэтому регулярное внесение синтетических хелатов железа в земли сельскохозяйственного назначения может приводить не только к возрастанию химической нагрузки на почву, но и загрязнению сельскохозяйственного сырья и продуктов питания. Широкое применение синтетических хелатов на практике сдерживается также очень высокой ценой этих препаратов, что в нашей стране имеет большое значение. Кроме того, при промышленном синтезе лигандов используют монохлоруксусную кислоту и этилендиамин, получаемые из хлорированных углеводов. Все эти вещества представляют значительную опасность, как для человека, так и для окружающей среды в целом. Одним из возможных путей решения перечисленных проблем является использование соединений железа с природными соединениями – гуминовыми веществами.

Перспективность использования гуматов железа в качестве экологически безопасной альтернативы синтетическим хелатам железа неоднократно рассматривалась в литературе [126]. В работе [127] указывается, что комплексы Fe(III) с ГВ являются биodeградируемыми безопасными для окружающей среды эффективными заменителями синтетических хелатов, а в работе [128] показывается возможность использования синтетических хелатов в смеси с ГВ. В указанной работе было продемонстрировано, что комплексы железа (III) с ГВ устойчивы в широком диапазоне pH, как и синтетические хелаты, а также подчеркнуто, что присутствие калия и ГВ повышает агрономическую ценность данных препаратов.

Способность соединений железа с ГВ корректировать железodefицитное состояние растений была неоднократно продемонстрирована [129], [130], [131], [132]. Например, при внесении железа, находящегося в комплексе с

экстрагируемыми водой ГВ (Fe-ЭВГВ), в растворы, на которых выращивали огурцы, испытывающие дефицит железа, происходило восстановление зеленой окраски листьев и повышение накопления биомассы. Результаты показали, что комплексы Fe-ЭВГВ служили для растений источником железа, при этом корни огурцов выделяли фермент железоредуктазу, который восстанавливал железо (III) [129].

В работе [130] были проведены исследования с использованием питательных растворов по изучению комплексов железа с ГВ в качестве источников железа для растений. Эксперименты по изучению поглощения гумата железа были проведены с растениями подсолнечника в качестве тест-объекта. Гумат железа был получен пропусканием очищенных гуминовых кислот через катионообменную смолу, насыщенную радиоактивным изотопом ^{59}Fe в качестве метки. Эксперименты показали, что гумат железа – хороший источник железа, которое было успешно поглощено корнями растений.

Аналогичные данные приведены в работе [130], где были проведены исследования по изучению комплексов железа с ГВ в качестве источников железа для растений подсолнечника в условиях водной культуры. Эксперименты показали, что комплексы железо – ГВ являются источником доступного для растений железа, которое легко поглощалось корнями растений [131], [132]. Кроме данных о биологической доступности комплексов железо – ГВ, есть также результаты, свидетельствующие о том, что ГВ оказывают положительное действие на биодоступность микроэлементов, в том числе железа, вносимых в виде других соединений [133].

Принимая во внимание участие ГВ в транспорте и обеспечении биологической доступности элементов минерального питания растений, можно предположить, что ГВ являются доступной, эффективной и безопасной альтернативой синтетическим хелатам.

1.3 Соединения железа с гуминовыми веществами

1.3.1 Соединения железа в почвах

В почве минералы железа представлены, в основном, оксидами и гидроксидами; минералы других классов – карбонаты и сульфиды – встречаются значительно реже. Подробному изучению почвенного железа посвящены работы [106], [134]. Гидроксиды образуют ряд минералов, различающихся термодинамической стабильностью: ферригидрит $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{FeOOH} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, ферроксигит $\delta\text{-FeOOH}$, лепидокрокит $\gamma\text{-FeOOH}$ и гетит $\alpha\text{-FeOOH}$. Единственным термодинамически стабильным гидроксидом является гетит. С течением времени ферроксигит может спонтанно переходить в гетит, а ферригидрит - в гематит или гетит. Однако в каждый момент времени в почвах присутствует какое-то количество нестабильных гидроксидов. Это объясняется тем, что в почве не только исчезают, но и образуются новые частицы нестабильных гидроксидов. Кроме того, присутствие ферригидрита и ферроксигита свидетельствует об активности в почве гетеротрофных окисляющих микробов. Без участия микроорганизмов происходит химическое осаждение железа с формированием гетита и лепидокрокита. В почве происходит процесс образования и накопления в почве оксидов и гидроксидов железа – оксидогенез [135], при этом активное участие в этом процессе принимает органическое вещество почвы, в том числе ГВ [106].

В почвоведении определение группового состава соединений железа проводят по схеме анализа почв, предложенной С. В. Зонном [136], которая позволяет оценить содержание железа в виде силикатных и несиликатных соединений. В составе несиликатных соединений железа выделяют окристаллизованные и аморфные, в составе аморфных – минеральные и органические. Для извлечения этих групп соединений железа применяют три основные экстракционные схемы: методы Мера-Джексона, Тамма и Баскомба. Кроме того, используют и другие методы исследования состояния железа в почве. В составе органоминеральных соединений выделяют два типа гидроски-железистых органических комплексов по степени их ополимеризованности, их извлекают из почв растворами тетрабората натрия и натриевой соли ЭДТА [137]. В жидких фазах почв железо может присутствовать в степени окисления +2 и +3. Их

концентрация и соотношение зависят от кислотно-основных и окислительно-восстановительных условий и других факторов. И трех-, и двухвалентное железо в жидких фазах представлено аква- и гидроксокомплексами, а также комплексами с более сложными органическими лигандами. Несиликатные соединения железа в почвах представлены главным образом гидроксидами и оксидами, в составе которых содержится до 90% всего железа в почвах. Оксиды и гидроксиды могут быть представлены дискретными частицами, пленками на поверхности почвенных минералов, могут находиться в форме материала, цементирующего почвенные частицы. Определение несиликатного железа по Меру - Джексону основано на восстановлении дитионитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) и извлечении двухвалентного железа раствором цитрата натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$). Определение аморфных, наиболее молодых, свежесоздаваемых несиликатных соединений железа проводится по методу Тамма растворением в оксалатном буфере ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + (\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) с pH 3,3 [106]. Установлено, что при таком методе определения извлекаются не только аморфные, но и кристаллические формы, поэтому в настоящее время для железа, извлекаемого оксалатным буфером, вместо понятия «аморфное» используют термин «оксалаторасторимое». Для определения содержания железа, связанного с органическим веществом, используют метод, предложенный Баскомбом, основанный на извлечении соединений железа пиррофосфатами натрия и калия. Железо, связанное с органическим веществом, извлекают раствором $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ с pH 10. Однако пиррофосфат калия извлекает из почв не только железо, связанное с органическим веществом, но и часть свежесоздаваемых наиболее растворимых гидроксидов железа. Растворению гидроксидов железа способствует образование растворимых относительно устойчивых пиррофосфатных комплексов железа. Содержание силикатных соединений железа оценивается по разности общего содержания железа и несиликатных соединений.

В ходе выветривания и почвообразования железо теряется в глобальном масштабе, в результате чего содержание железа в почвах составляет 3,8% при содержании в литосфере 5,1%. Выносимое из почв железо обогащает морские и океанические осадки, содержание железа в которых выше, чем в литосфере – 5,6% [138], а также поступает в природные воды.

1.3.2 Взаимодействие железа с ГВ в природных водах

Железо является непременным компонентом природных вод, концентрации которого изменяются от микрограммов до миллиграммов на 1 л [139], [140]. К природным процессам, определяющим поступление соединений железа в поверхностные воды, относится химическое выветривание горных пород; подземный сток, а также хозяйственная деятельность человека [141].

В зависимости от окислительно-восстановительного потенциала (Eh) природных вод железо проявляет характерные для него степени окисления +2 и +3. В водных растворах чаще всего встречаются соединения Fe (II), как термодинамически более устойчивые. На это указывает диаграмма состояния железа E-pH, построенная с использованием основных термодинамических характеристик применительно к окислительно-восстановительным реакциям и процессам осаждения гидроксидов (Рисунок 4).

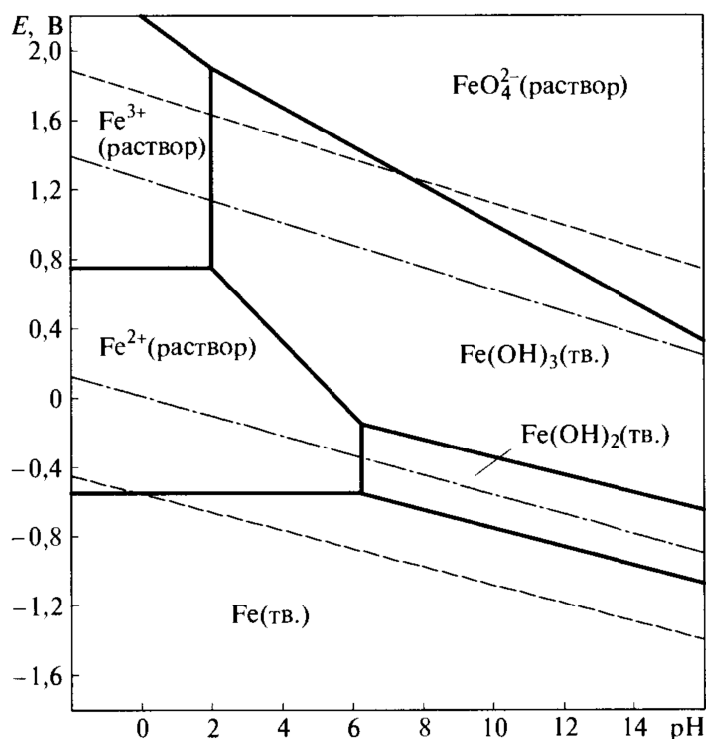


Рис. 4 Диаграмма E-pH (диаграмма Пурбе) для железа [142]. Штрихпунктирной линией показана область термодинамической устойчивости воды к окислению и восстановлению, штриховой линией — область кинетической устойчивости.

Как видно из Рисунка 4, железо (II) обнаруживается в основном в водах с низкими значениями Eh (например, воды эвтрофных озер, некоторые грунтовые

воды и др.). Насыщение воды кислородом приводит к быстрому окислению Fe(II) до Fe(III). Необходимо отметить, что скорость окисления Fe(II) в природных водах в несколько раз ниже, чем в чистом водном растворе. Многие исследователи [22], [24], [143], [144] считают, что подобное явление обусловлено способностью органических соединений природных вод стабилизировать Fe (II).

В работе [144] предложена диаграмма, описывающая поведение железа в присутствии органических веществ и кислорода (Рисунок 5).

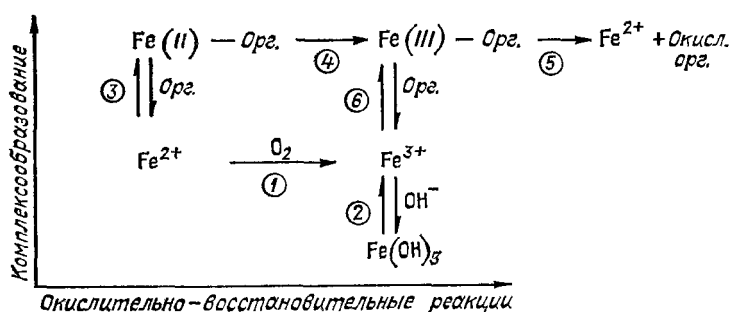


Рис. 5 Схема превращений соединений железа в водных средах в присутствии растворенного органического вещества [144].

Из диаграммы видно (Рисунок 5), что при отсутствии ощутимых количеств органического вещества ионы Fe^{2+} быстро окисляются растворенным кислородом до Fe^{3+} , осаждаются в виде гидроксидов железа (III) и удаляются из системы (реакции 1 и 2). Если же содержание в воде органических соединений, например, ГВ, значительно, то реакция комплексообразования с ионами Fe^{2+} может конкурировать с реакцией окисления. Доля Fe^{2+} , находящегося в составе комплексов, от общего Fe (II), зависит от pH, а также от количественного и качественного состава растворенного органического вещества. Окисление Fe^{2+} в составе комплексов (реакция 4) происходит медленно, в течение нескольких дней, с последующим образованием соответствующих комплексов Fe^{3+} . В результате этой реакции образуются неустойчивое Fe (III), которое восстанавливается органическими соединениями (реакция 5), хотя связанное в комплексы Fe (III) не во всех случаях способно к восстановлению. Высвободившееся Fe^{2+} снова участвует в описанном цикле. Кроме того, как отмечено авторами [144], существует конкуренция между реакциями 2 и 6. Кислотность среды является фактором, определяющим соотношение Fe^{3+} , находящегося в комплексе с

органическим веществом (реакция 6), восстановленного органическими соединениями (реакция 5) или связанного гидроксил-ионами (реакция 2).

Как и большинство металлов, железо в водных растворах подвергается гидролизу и гидролитической полимеризации. Однако образование гидролитических полиядерных соединений железа в поверхностных водах происходит редко, так как концентрация его свободных (гидратированных) ионов чрезвычайно низка [139].

Согласно [145], [146], [147], [148], речные воды содержат высокие концентрации железа в растворе за счет образования преимущественно отрицательно заряженных коллоидных частиц путем адсорбции на поверхности гидроксида железа (III) органических веществ; в особенности это касается ГВ. То есть значительная часть растворенного в воде железа мигрирует в виде органоминеральных коллоидов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что растворенное органическое вещество природных вод играет значительную роль в окислительно-восстановительных реакциях железа и процессах миграции его соединений в природных водах.

1.3.3 Механизмы взаимодействия железа с ГВ

Единого взгляда на природу взаимодействия ГВ с металлами вообще и железом в частности до сих пор не существует. Это связано со сложностью качественной и количественной интерпретации данных тех методов, которые применяются для анализа ГВ и образующихся соединений с металлами. Основываясь на исследованиях функционального состава ГВ, а также ИК- и ЭПР-спектроскопическом исследовании комплексов ГВ с металлами, полагают, что за взаимодействие ГВ с металлами прежде всего ответственны следующие структурные фрагменты (Рис. 6):

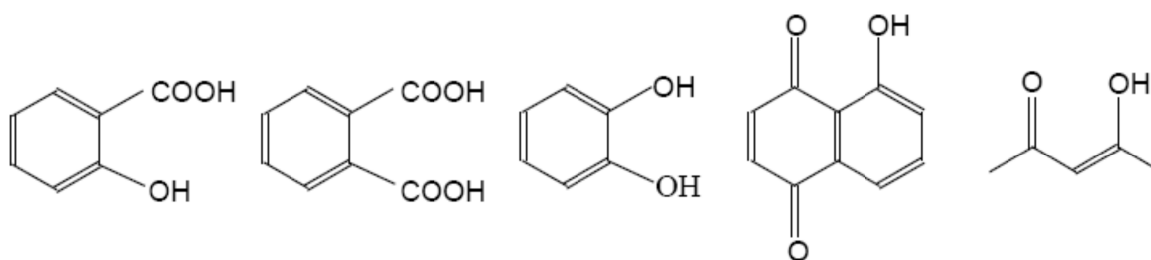


Рис. 6 Структурные фрагменты, участвующие во взаимодействии ГВ с металлами [8].

Среди перечисленных групп, согласно данным работ [8], [12], [149], во взаимодействии металлов с ГВ определяющую роль играют карбоксильные группы, входящие в состав двух основных типов связывающих центров: салицилатных и фталатных. В то же время в работах [150], [151] указывается на существенный вклад группировок типа пирокатехина, а в работах [152], [153], [154] – на одновременное участие карбоксильных и фенольных групп (Рис. 6). Кроме того, считается возможным и участие в данном процессе групп, содержащих гетероциклический или аминный азот [8], [149], [61]. Однако ввиду низкого процентного содержания азота, принято считать, что этот тип связывания не может играть существенной роли. В то же время для ГВ, содержащих значительные количества азота, имеются данные ЭПР-исследований о координации ионов металлов азотом с образованием комплексов порфиринового типа [155], [156]. В то же время данные других ЭПР-исследований [139] свидетельствуют об участии только карбоксилат-ионов, при этом в ряде случаев наблюдают связи солевого типа. Существуют работы, указывающие на возможность взаимодействия металлов с ГВ с образованием комплексов фталатного [157] и салицилатного [12] типа. Обобщая литературные данные [8], [10], [11], можно построить таблицу с классификацией взаимодействий ГВ с металлами по характеру связи «ГВ-металл» (Таблица 4).

Таблица 4 Взаимодействие ГВ с металлами и характер образующихся соединений

| Металлы | Класс соединений | Тип связи |
|--|-----------------------------|----------------------|
| Щелочные и щелочно-земельные | Соли | Ионная |
| Поливалентные катионы Al и Fe, входящие в состав глинистых минералов | Органоминеральные комплексы | Ковалентная полярная |
| Переходные металлы | Комплексы | Координационная |

Следует, однако, подчеркнуть, что в реальных условиях следует ожидать образование соединений со связями смешанного характера с преобладанием того или иного типа в зависимости от природы катиона [1]. В случае с железом также можно предположить образование всех трех типов связей.

В большинстве случаев ГВ рассматривают как хелатирующие агенты по отношению к железу [157], [158]. В частности, комплексообразующие свойства ГВ по отношению к железу были продемонстрированы в работе [157] при растворении фосфатов железа в их присутствии. В работе [159] было показано, что мессбауэровские параметры гуматов железа (II) указывают на образование хелатных комплексов внутрисферного типа с участием таких функциональных групп, как карбоксильные, фенольные и гидроксильные, а также молекул воды. Реже приводятся данные о возможности образования связей «железо-ГВ» другой природы. При взаимодействии ГК и ФК почв с железом в кислой среде при pH 2,8-5,0 методом мессбауэровской спектроскопии было показано образование стабильных комплексов с переносом заряда [160]. Принимая во внимание такие особенности поведения железа в природе, как возможность быстрого перехода между степенями окисления, гидролиз солей с образованием различных полиядерных комплексов и образование аквакомплексов, необходимо также учитывать возможные взаимодействия ГВ не только непосредственно с ионами железа, но также и с продуктами гидролиза их солей и аквакомплексами.

Так, в работе [161] было показано, что при высоких концентрациях Fe (III) при взаимодействии с ГВ образуются соединения, содержащие железо в количествах, значительно превышающих емкость металл-связывающих центров. Авторами был сделан вывод, что железо может связываться с ГВ в виде многоядерных гидроксокомплексов Fe (III), что было подтверждено результатами УФ-видимой спектрофотометрии, при этом количество связанного железа оставалось неизменным в течение нескольких недель эксперимента. Изучение характера связи железа с гуминовыми и фульвокислотами, проведенное методом мессбауэровской спектроскопии, также показало, что доказательства непосредственной связи железа с органическим веществом отсутствуют и что связывание железа с ГВ происходит в виде многоядерных гидроксокомплексов [162]. В ряде работ указывается также на возможность образования соединений железа с ГВ в виде оксидов железа, покрытых органической оболочкой [163]. В работе [164] также сообщается о возможности образования полиядерных комплексов металл – ГВ.

В работе [165] сообщается, что Fe(III) было обнаружено в составе минеральных фракций, содержащихся в составе ГВ. При этом анализ форм существования железа в составе природных ГВ методом мессбауэровской спектроскопии не позволил выявить наличия непосредственной связи между ионами железа (III) и гуминовыми макролигандами [162]. Однако в работе [166] эти результаты оспариваются со ссылкой на то, что использование одной мессбауэровской спектроскопии не является достаточным для однозначного вывода. Тот же автор (Senesi, 1977) [167] приводит данные о существовании несколько типов позиций Fe(III) в составе ГВ, в двух из которых Fe(III) образует устойчивые связи с органической матрицей; при этом оно достаточно устойчиво к комплексообразованию и восстановлению и находится либо в тетраэдрическом (I_s 0,18, Q_s 0,67 мм/с), либо в октаэдрическом окружении (I_s 0,65, Q_s 0,68 мм/с). В третьей позиции Fe(III) адсорбируется на внешней поверхности ГВ и находится в октаэдрическом окружении (I_s 0,40, Q_s 0,60 мм/с), будучи слабо связанным с лигандом.

В работе [168] указывается, что тип соединений железа с органическими веществами почв зависит от соотношения органической и минеральной части: при низких концентрациях железа это – комплексы, при высоких – оксиды и гидроксиды, стабилизированные в органической матрице.

1.3.3.1 Окислительно-восстановительные реакции ГВ с железом

Восстановительные свойства ГВ по отношению к ряду элементов, в том числе к железу, выявлены как в лабораторных [144], [169], [170], [171], так и в естественных условиях [172], [173], [174]. При этом фульвокислоты (ФК) обладают более сильными восстановительными свойствами, чем гуминовые кислоты (ГК)— потенциал восстановления Eh ГК равен 0,5 В, тогда как Eh(ФК) составляет 0,7 В относительно нормального водородного электрода [24]. По данным [22] 1 г гуминовой кислоты при pH = 3,0 восстанавливает около 1,6 мг (0,03 ммоль) Fe³⁺. Аналогичные сведения по восстановлению Fe³⁺ при более высоких значениях pH, свойственных большинству природных вод, отсутствуют. В то же время результаты изучения восстановительных свойств ФК свидетельствуют о более интенсивном восстановлении ионов Fe³⁺ в их присутствии; 1 моль ФК при pH = 5,5-5,7 способен восстановить по крайней мере 0,5 моль Fe³⁺ [24].

Стабилизирующими свойствами по отношению к железу обладают и другие органические соединения, в частности пигменты и липиды [175].

Скорость окисления Fe^{2+} в присутствии гуминовых кислот зависит от концентрации последних и pH; самое медленное окисление наблюдается при высоких значениях $C_{гк}$ (около 500 мг/л) и сравнительно низких значениях pH. Цикл реакции, предлагаемый авторами работы [171], включает фоторедукцию Fe^{3+} до Fe^{2+} гумусовым веществом и последующее окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} растворенным кислородом.

Таким образом, несмотря на большое количество накопленного к настоящему времени экспериментального материала, посвященного взаимодействию ГВ с железом, единой теории о природе процесса связывания металла не существует, что затрудняет направленный синтез соединений железа с ГВ. Так как механизм взаимодействия в значительной степени определяет возможные подходы к получению соединений Fe - ГВ, необходимы дальнейшие исследования органо-неорганических соединений ГВ с железом с применением современных физико-химических методов.

1.3.4 Способы получения соединений Fe-ГВ

Представленные в настоящее время на сельскохозяйственном рынке продукты гуминовой природы, содержащие железо (часто в комплексе с другими микроэлементами), такие как DIENARD™ HUMATE SP (Sarasota International Trade Center, США), ГУМИСОЛ (Биоком плюс, РФ), Гумат+7 (АгроТех ГУМАТ, РФ), Wuxal Microplant (Aglukon, ФРГ) и др., представляют собой смесь ГВ с солями железа, что ставит под сомнение биологическую доступность содержащегося в них железа. Кроме того, все они обладают таким недостатком как чрезвычайно низкое содержание железа, не превышающее 2%, масс. Для сравнения можно сказать, что для корректоров железодефицитного хлороза на основе хелатов железа этот показатель достигает 6-11%.

В Таблице 5 перечислены основные способы получения органо-неорганических соединений железо – ГВ, описанные в российских и международных патентах.

Таблица 5 Способы получения препаратов железа на основе гуминовых веществ

| Название патента | Способ получения | Содержание железа, % масс | Источник |
|--|--|---|----------|
| Способ получения железосодержащего препарата для лечения и профилактики железодефицитной анемии у животных | Взаимодействие ГК, ФК и ГФК торфа с солью Мора, соотношение Fe(II) : C(COOH) = 1 | 6,5-9,9 общее 6,0-8,9 растворимое | [82] |
| Способ получения комплексных гуминовых удобрений | Взаимодействие гуматов Na и K с сульфатами металлов при pH 7,0-7,8, соотношение металл : катионная ёмкость ГВ $\leq 0,3$ | 11,8% в хелатной форме 0,3% в виде других соединений | [83] |
| Способ получения гуматов железа с заданными свойствами | Соли железа, используемые в качестве коагулянтов в водоочистке (сульфаты и хлориды железа) реагируют с ГВ при pH 3,8-5,6, гумат выпадает в осадок. | 50 мг/кг растворимого железа | [84] |
| Способ получения хелатированного железа для предотвращения пожелтения листьев | Получают из водных растворов гуминовых кислот, сульфата железа (II), сульфата магния и мочевины. | Не приводится | [176] |
| Соединения гуминовых кислот с металлами: получение, строение и применение | Внесение насыщенного раствора сульфата железа (II) в 5-7% растворы гумата калия при pH 10 | 6% железа в виде растворимых соединений | [96] |

Как видно из Таблицы 5, в российских и международных патентах содержится информация о способах получения органо-неорганических соединений железо – ГВ, в первую очередь, для нужд сельского хозяйства, при этом в качестве источников железа используют растворимые соли Fe (II). Большое значения для обеспечения необходимых свойств имеет соотношение железа и кислотных групп в составе ГВ.

Предлагаемые в литературе способы получения растворимых соединений ГВ с железом, то есть соединений с железом в биодоступной форме, также характеризуются целым рядом недостатков, таких как длительность и дороговизна процедуры [129], получение соединений с низким содержанием железа или использование экологически небезопасных реагентов [160]. В качестве примера можно привести способ получения растворимых комплексов железа путем пропускания водного раствора ГВ через колонку с катионообменной смолой, насыщенную Fe (III) [129], [130]. При использовании в качестве ГВ ФК торфа указанный подход позволил провести стехиометрический ионный обмен железом между смолой и ФК и получить фульват железа с содержанием железа 40 мкмоль/г органического углерода [129]. Принципиально другой подход, обоснованный не только технологически, но и экономически был предложен авторами работы [84]. Он заключается в использовании отработанных сорбентов, использовавшихся для очистки природных вод при pH 3,8-5,0 в качестве источника биодоступного железа. Получаемый гуминовый продукт был нерастворим, но, по мнению авторов, все же мог быть использован в качестве источника железа. Для повышения растворимости получаемого продукта было предложено обогащать его азотом, доводя содержание азота до 0,5-12%, масс., в результате чего содержание растворимого железа составляло 50 мг/кг.

Таким образом, приводимые в литературе способы синтеза не вполне отвечают требованиям получения новых экологически безопасных железосодержащих материалов для живых систем. Тем не менее, анализ существующего литературного материала позволяет провести разработку собственных подходов к синтезу новых материалов на основании железа и ГВ, учитывающих вышеперечисленные недостатки. На основании литературных данных можно сделать вывод о том, что способом получения растворимых производных ГВ, обогащенных биологически доступными соединениями железа, может быть внесение растворов солей железа (II) в растворы ГВ при соотношении железо : карбоксильные группы не более 0,3.

Другим подходом является внесение насыщенных растворов железа в водные растворы ГВ при высоких pH (9-11). Данный способ, разработанный под руководством Перминовой И.В. [96], позволяет получать растворимые в воде

препараты с высоким содержанием железа (до 6 %). Данный способ, механизм которого не был ранее подробно изучен, был взят за основу для получения биодоступных соединений железа, стабилизированных ГВ.

Таким образом, обзор литературы показал, что растворимые в воде препараты на основе ГВ с высоким содержанием биологически доступного железа могут стать заменой синтетическим хелатам железа. Основной проблемой, сдерживающей широкое применение гуматов железа в сельском хозяйстве, является отсутствие теоретических основ направленного синтеза новых соединений железа на основе ГВ. Поэтому целью данной работы был систематический анализ физико-химических свойств препаратов Fe - ГВ и исследование их биологической активности для оценки возможности их применения в качестве источника биологически доступного для растений железа в качестве эффективных и безопасных заменителей синтетических хелатных комплексов.

2 Экспериментальная часть

2.1 Оборудование

В работе было использовано следующее лабораторное оборудование: магнитная мешалка с нагревом MCHS-300 (Biosan, Латвия), ультразвуковая баня RK102H super (Sonorex, Германия), аналитические весы SPB31 (Scaltec, Германия), автоматический шейкер Ротамикс RM-1 (Elmi, Латвия). Для измерения pH использовали pH-метр Metrohm 713 (Metrohm, Швейцария) с комбинированным стеклянным электродом. Для проведения спектрофотометрических анализов использовали спектрофотометр Cary 50 (Varian, США). Для проведения мокрого озоления суспензий, растворов и растительных образцов использовали дигестор DS-8 (Foss Tecator, Италия) и титановый автоклав МКП-05 (Россия). Для высушивания образцов использовали вакуумный шкаф Binder VD53 и роторный испаритель Laborota 4000 (Heidolph, Германия). Для центрифугирования образцов использовали центрифугу ThermoSoo B4i (Thermo, Германия) и микроцентрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия). Для получения воды высокой степени очистки использовали установку Millipore Simplicity 185 (Millipore, Франция).

Для отбора аликвот и проведения разбавлений использовали дозаторы Research на 1000 и 5000 мкл (Eppendorf, Германия), а также стеклянную мерную посуду второго класса точности. Для центрифугирования и хранения проб использовали пластиковые центрифужные пробирки Falcon (Greiner Bio-One, Германия) объёмом 15 и 50 мл и микроцентрифужные пробирки объёмом 0,5, 1,5 и 2,0 мл (Eppendorf, Германия), стеклянные пипетки Пастера ёмкостью 1 мл (Hirschmann Laborgerate, Германия).

Для проращивания семян применяли термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 (СПУ, Россия), вегетацию растений проводили в климатической камере с регулируемой температурой и освещённостью.

Для определения жизнеспособности клеток использовали люминесцентный инвертированный микроскоп Axiovert 200 (ZEISS, Германия).

2.2 Техника эксперимента

2.2.1 Получение соединений Fe- ГВ и исследование их свойств

2.2.1.1 Методика выделения ГВ

Выделение ГВ леонардита проводили из коммерческих гумата калия “PowHumus” (Humintech , Германия) и «Сахалинский» (Биомир-2000, Россия) по методике, описанной в работе [91].

Для выделения ГВ из коммерческих препаратов навеску 50 г препарата растворяли в 5 л воды и выдерживали в течение суток для осаждения минеральной части. Затем раствор декантировали с осадка и подкисляли HCl конц. (х.ч.) до pH 1-2. Осадок ГВ отделяли центрифугированием, затем его промывали несколько раз дистиллированной водой. Промытый препарат диализовали с помощью мембраны из целлюлозы с диаметром пор 14 кДа против дистиллированной воды до отрицательной реакции промывных вод на Cl по AgNO₃ (ч.д.а.). Полученное вещество упаривали на ротаторном испарителе для получения препарата в твердом виде. Зольность полученных препаратов определяли согласно [177].

2.2.1.2 Методика приготовления водных растворов ГВ

Обессоленные препараты растворяли в 3 мл 10 М NaOH, далее раствор помещали в ультразвуковую баню на 20 мин при комнатной температуре, после чего количественно переносили в стакан и после разбавления дистиллированной водой с использованием 0,1 М HCl доводили pH до 7,0. Далее раствор переносили в мерную колбу и доводили до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора SR FA IHSS навеску растворяли в воде, значение pH полученного раствора составляло 3,5; далее 1 М раствором NaOH его доводили до 7,0.

2.2.1.3 Методика определения содержания карбоксильных групп Са - ацетатным методом

Для определения содержания карбоксильных групп Са-ацетатным методом использовали 0,02 М NaOH, приготовленный из фиксаля (Германия) и моногидрат ацетата кальция Ca(OAc)₂·H₂O (ч.д.а.).

Сухую навеску 19,7 г моногидрата ацетата кальция $\text{Ca}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворяли в 500 мл дистиллированной воды MQ. Полученный раствор $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ с концентрацией 0,25 М хранили герметично закрытым в холодильнике.

Навеску 20 мг образца гуминовых веществ массой помещали в центрифужные пробирки емкостью 50 мл, после чего добавляли 20 мл дистиллированной воды MQ. Для растворения образца пробирки помещали в ультразвуковую баню на 30 мин.

Затем добавляли 20 мл рабочего раствора ацетата кальция с концентрацией 0,25 М, пробирки с растворами герметично закрывали, встряхивали, после чего перемешивали в течение 8 часов в шейкере. Далее для обеспечения полного осаждения гумата кальция раствор помещали на 24 ч в холодильник при температуре 5°C. Полученные растворы центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об./мин и декантировали надосадочную жидкость. Далее отбирали 10 мл супернатанта и проводили потенциометрическое титрование выделившейся уксусной кислоты раствором NaOH точно установленной концентрации (0,02 М) на автотитраторе.

Для учета гидролиза $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ в условиях титрования проводили контрольное титрование холостого раствора. Холостой раствор готовили параллельно с остальными образцами без добавления ГВ. Для этого к 20 мл дистиллированной воды MQ добавляли 20 мл раствора ацетата кальция, после чего выполняли те же операции, что и с анализируемыми растворами.

Содержание карбоксильных групп в образцах гуминовых веществ и их производных (ммоль/г) рассчитывали по следующей формуле:

$$C_{\text{COOH}} = (C_{\text{NaOH}} \cdot (V_{\text{NaOH}} - V_0) \cdot 4) / m,$$

где:

V_{NaOH} – объем NaOH, пошедшей на титрование выделившейся AcOH, мл;

V_0 – объем NaOH, пошедший на титрование $\text{Ca}(\text{AcO})_2$ в холостом опыте, мл;

C_{NaOH} – концентрация щелочи, моль/л;

m – масса навески, г;

C_{COOH} – содержание COOH^- групп в твердом препарате ГВ, ммоль/г.

Для определения статистической погрешности проводили три параллельных эксперимента.

2.2.1.4 Методика определения протолитических свойств ГВ методом прямого кислотно-основного титрования

Для определения протолитических свойств ГВ методом прямого кислотно-основного титрования использовали растворы HCl и NaOH с концентрацией около 0,1 М, определенной с точностью до 5 знака после запятой; стандарт-титры для калибровки рН-метра на 4,01, 7,01 и 10,0 (Hanna, Германия); NaCl (99+, Merck, Германия) для приготовления растворов фонового электролита.

Исследование протолитических свойств образцов ГВ и оксидов железа выполняли методом кислотно-основного титрования 0,1 М HCl и 0,1М NaOH суспензий или растворов исследуемых образцов. Для установления содержания адсорбированных протонов на поверхности исследуемых образцов титрование проводили в диапазоне рН от 3,5 до 10,5. К навеске ГВ 10 мг добавляли 50 мл 0,01 М раствора NaCl.

Комбинированный рН-электрод был откалиброван с помощью трех буферных растворов (рН 4,0, 7,0 и 10,0). Зависимость активности ионов водорода от концентрации была определена из титрования раствора сравнения (холостое титрование), таким образом, показания рН-метра можно было напрямую переводить в концентрацию ионов водорода, а не в активность. Рассчитанное количество стандартного раствора HCl добавляли к суспензии исследуемого образца, в результате чего устанавливался соответствующий рK_a ГВ рН раствора (около 3,5-4). После пропускания потока азота через раствор в течение 15 минут суспензию титровали стандартным раствором соляной кислоты до значения рН 3,5, далее стандартным раствором NaOH до рН 10,5, после чего вновь стандартным раствором HCl до рН 3,5. В результате были получены три кривые титрования, две из которых полностью находились в диапазоне рН 3,5-10,5.

2.2.1.5 Методика синтеза соединений Fe ГВ - гуматов железа

В качестве железосодержащего прекурсора использовали железный купорос FeSO₄·7H₂O, в качестве добавок, стабилизирующих железо (II), были использованы аскорбиновая кислота (фарм., Acrus) и серная кислота H₂SO₄конц (х.ч.), для установления необходимого значения рН использовали 1 М КОН (ч.д.а.).

Синтез гумата железа проводили по модифицированной схеме, описанной в работе [96]. В качестве источников ГВ бурого угля были использованы

коммерческие гуматы калия «PowHumus» (Humintech, Германия) и «Сахалинский» (Россия, «Биомир-2000»). Для отделения минеральной части 24 г гумата калия растворяли в 400 мл дистиллированной воды, полученную смесь центрифугировали, декантировали, надосадочную жидкость высушивали. Для получения 5%-го раствора, 8 г сухого безбалластного гумата калия растворяли в 160 мл дистиллированной воды, рН полученного раствора составлял 10,2.

Насыщенный раствор FeSO_4 готовили путем растворения 6,25 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.) в 25 мл дистиллированной воды на ультразвуковой бане в течение 4 ч. Раствор сульфата железа по каплям вносили в раствор гумата калия при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Параллельно добавляли 1 М КОН для поддержания значения рН около 10, как в процессе внесения сульфата железа, так и в течение 1,5 ч после того, как весь сульфат железа был внесен. Синтез проводили, непрерывно контролируя значение рН с использованием рН-метра, оснащенного комбинированным рН электродом. Полученный раствор гумата железа переносили в кристаллизатор и помещали для высушивания в вакуумный шкаф при температуре 40°C , а затем в эксикатор над P_2O_5 .

2.2.1.6 Методика определения растворимости гуматов железа

Для определения растворимости гуматов железа навеску 5 г исследуемого препарата растворяли в 30 мл дистиллированной воды, раствор в течение 30 мин перемешивали на магнитной мешалке, затем переносили растворы в центрифужные пробирки на 50 мл и центрифугировали 5 мин (7000 об/мин). На дне пробирки оставался темный осадок. Во взвешенную круглодонную колбу помещали 20 мл надосадочной жидкости. Измеряли массу сухого препарата и рассчитывали растворимость в граммах на литр.

2.2.1.7 Методики разложения органической части в объектах исследования

Для разложения органической части проб использовали персульфат калия $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (ч.д.а.), концентрированные кислоты H_2SO_4 (х.ч.), HNO_3 (о.с.ч.), и 10 М HCl (о.с.ч., фиксаж).

Разложение органической части анализируемых образцов составляло основной этап пробоподготовки при определении содержания железа в пробах. Разложение органической части проводили в следующих объектах: а) в сухих препаратах (гуматах и синтетических хелатах) железа, б) в растительных образцах,

в) в питательных средах для биологических тестов, г) в коллоидных растворах, содержащих наночастицы оксигидроксидов железа. Разложение представляло собой окислительную деструкцию органических веществ с помощью персульфата калия в кислой среде при нагревании.

а) Разложение органической части сухих препаратов проводили в титановом автоклаве. Четыре навески исследуемого препарата, массой около 30 мг, помещали в тефлоновые сосуды автоклава, куда добавляли по 300 мг персульфата калия и 1 мл концентрированной HNO_3 , после чего автоклав закрывали и помещали в сушильный шкаф, где выдерживали в течение 3 часов при температуре 200°C . Далее нагрев отключали и автоклав оставляли в шкафу на ночь. На следующий день автоклав извлекали, содержимое тефлоновых сосудов количественно переносили в мерные колбы на 100 мл, доводили до метки дистиллированной водой, после чего колбы помещали в ультразвуковую баню на 20 мин для растворения остатков непрореагировавшего персульфата. Далее в полученных прозрачных растворах проводили спектрофотометрическое определение содержания железа.

б) В растительных образцах содержание минеральных компонентов, в том числе железа, приводят в пересчете на сухую массу, разложение органической части производится после высушивания. Высушивание образцов проводили в сушильном шкафу в течение двух суток при температуре 70°C либо в течение недели на воздухе в бумажных конвертах. Разложение органической части растительных образцов проводили в дигесторе по модифицированной методике мокрого озоления [178].

Навески растительной биомассы около 500 мг помещали в пробирки дигестора и добавляли по 15 мл HNO_3 конц. Далее включали нагрев и доводили температуру дигестора до 220°C . В исследуемые растворы добавляли по 300 мг персульфата калия и 15 мл азотной кислоты, кипятили до полного обесцвечивания, при необходимости добавляя ещё 1 или 2 порции азотной кислоты по 15 мл, после чего упаривали почти досуха и добавляли 50 мл дистиллированной воды. Кроме разложения органического вещества, необходимо было также добиться, по возможности, полного удаления азотной кислоты, так как низкий уровень кислотности среды ($\text{pH} < 3$) не позволяет использовать о-фенантролиновый метод

определения железа. По окончании озоления пробы должны представлять собой бесцветные прозрачные растворы, возможно с белым осадком; в случае присутствия желтой окраски озоление необходимо продолжать (с добавлением одной или нескольких порций азотной кислоты) до полного обесцвечивания.

в) Разложение органической части суспензий, содержащих железо, на водяной бане проводили следующим образом: в пробирки объемом 12 мл отбирали 7 мл исследуемого раствора, нагревали на кипящей водяной бане около 3 мин., в каждую пробирку добавляли по 70 мг $K_2S_2O_8$ и после полного обесцвечивания раствора по 2 капли HNO_3 . Затем спектрофотометрически определяли содержание железа в препаратах.

г) Разложение органической части в водных суспензиях, содержащих ГВ и наночастицы оксидов железа в дигесторе проводили по следующей схеме: пробы по 10 мл, находящиеся в центрифужных пробирках на 50 мл, количественно переносили в стеклянные пробирки дигестора, устанавливали температуру дигестора в диапазоне 150-200°C, после закипания добавляли 300 мг персульфата. После обесцвечивания раствора приливали 1 мл неразбавленной соляной кислоты из фиксанала и упаривали почти досуха. Далее добавляли немного воды для того, чтобы смыть анализируемый образец со стенок, после чего количественно переносили его в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки дистиллированной водой.

2.2.1.8 Методика определения содержания железа в объектах исследования

При проведении спектрофотометрического определения содержания железа для получения окрашенных комплексов использовали 0,1% раствор о-фенантролина хлористоводородного (ч.д.а.) и буферный раствор, приготовленный сливанием равных объемов 0,1 М раствора гидроксилamina сернокислого $(NH_3OH)_2SO_4$ (ч) и 1 М NaOH (ч.д.а.). Для определения железа тиоцианатным методом применяли NH_4SCN (ч.д.а.) и KSCN (ч.д.а.).

Для приготовления стандартных образцов для построения калибровочных графиков использовали ГСО Fe(III) с содержанием железа 1 г/л и 10 г/л (Экоаналитика, Россия).

Определение содержания железа проводили после разложения органической части образцов. Для анализа большинства объектов использовали

о-фенантролиновый метод [179], в основе которого лежит способность ионов железа (II) образовывать с о-фенантролином устойчивый красно-оранжевый комплекс, называемый ферроином. Данный метод позволяет определять как отдельно содержание железа (II), так и суммарное содержание железа (II) и (III); во втором случае необходимо применение восстановителя (как правило, это гидроксилламин или аскорбиновая кислота). В данной работе определяли только валовое содержание железа, поскольку после разложения органической части пробы содержат только железо (III), для анализа проб во всех случаях в качестве восстановителя использовали гидроксилламин. Этот метод является наиболее распространенным и надежным способом определения содержания железа с использованием спектрофотометра. Ограничением для применения данного метода является требование, что значения pH анализируемых растворов должны быть в диапазоне от 3 до 10 [179], что не позволяет применять данный способ для анализа проб непосредственно после кипячения в кислых средах. Для анализа проб с низким значением pH использовали спектрофотометрическое детектирование железа в виде комплекса с тиоционат-ионом.

Для определения содержания железа готовили серии стандартных растворов из государственных стандартных образцов железа (III) (ГСО, Экоаналитика, Россия) с концентрацией 1000 мг/л.

При проведении определения содержания железа о-фенантролиновым методом из раствора ГСО с содержанием железа 1 г/л готовили раствор с содержанием железа 100 мг/л (срединное разбавление), который возможно использовать в течение месяца, так как в нем и после разбавления сохраняется кислая среда (pH менее 1), что препятствует гидролизу ионов железа. Рабочий раствор с содержанием 5 мг/л готовили непосредственно перед проведением анализа разбавлением в 20 раз раствора 100 мг/л. Для построения градуировочного графика готовили серию из восьми стандартных образцов (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 мг/л). В мерные колбы ёмкостью 10 мл вносили по 1 мл о-фенантролина, аликвоту рабочего раствора объёмом от 0 до 7 мл с шагом 1 мл и по 1 мл гидроксилламинового буфера, после чего доводили до метки дистиллированной водой. Через пять минут с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность полученных растворов на длине волны излучения 512 нм.

2.2.1.9 Методика синтеза наночастиц ферроксигита δ -FeOОН

Так как ферроксигит использовали в качестве образца сравнения, моделирующего наноразмерные гидратированные оксиды железа (III), стабилизированные в органической матрице ГВ, необходимо было получить и охарактеризовать свойства наночастиц ферроксигита. Синтез сфероидных наночастиц ферроксигита δ -FeOОН проводили по модифицированной методике, описанной в работе [168]. Исходным реактивом для получения δ -FeOОН выступал 0,09-0,1 М раствор FeCl₂, приготовленный растворением карбонильного железа в 4% соляной кислоте. Для предотвращения окисления Fe(II) максимально ограничивали контакт полученного раствора с кислородом воздуха. После добавления раствора аммиака взвесь имела зеленовато-белёсый цвет из-за высокого содержания Fe(OH)₂. Добавление избытка пероксида водорода H₂O₂, используемого в качестве окислителя, проводили при интенсивном перемешивании реакционной смеси¹.

2.2.1.10 Методика синтеза органо-неорганических соединений ферроксигита и гуминовых кислот «in situ»

Направленный синтез органо-неорганических соединений ферроксигита с ГВ “in situ” состоит в получении магнитных наночастиц оксогидроксидов железа в растворах гуминовых веществ. В качестве основы был взят синтез наночастиц ферроксигита δ -FeOОН методом осаждения гидроксидов. Синтез проводили в растворах гумата калия при концентрации ГВ 100 мг/л в трехгорлой колбе на 500 мл в токе аргона под контролем pH. Для получения 3 г ферроксигита было дегазировано 350 мл очищенной воды MQ и 150 мл 0,5 М NaOH, в воду MQ вносили 6,965 г (0,035 моль) FeCl₂·4H₂O (о.с.ч.). В 8-10 мл 0,5 М NaOH растворяли 43,75 мг сахалинского гумата и вносили щелочной раствор гумата в реакционную смесь. pH реакционной смеси доводили до значения 8,0 добавлением 0,5 М NaOH, объем пошедший на корректировку pH, составил 110 мл. Далее в реакционную смесь добавляли 50 мл 37% H₂O₂. После прекращения активного выделения газа

¹ Автор выражает благодарность сотруднице лаборатории неорганических материалов кафедры неорганической химии химического факультета МГУ Гольд А.Е. и аспиранту ФНМ МГУ Полякову А. за помощь в проведении синтезов, обработке и интерпретации результатов

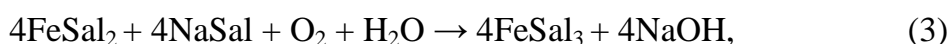
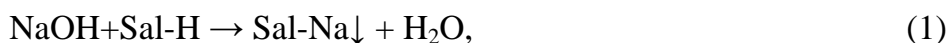
содержимое колбы переносили в кристаллизатор и сушили продукт в вакуумном шкафу при комнатной температуре в течение 2-3 дней до высыхания.

2.2.1.11 Методика синтеза салицилата железа (III)

Для синтеза салицилата железа использовали: твердый гидроксид натрия (х.ч.), салициловую кислоту (х.ч.); этиловый спирт; диэтиловый эфир, P₂O₅ (ч.). Для синтеза салицилата железа (III) использовали сульфат железа (II) FeSO₄·7H₂O (х.ч.), аскорбиновую кислоту C₆H₈O₆(ч.д.а.) и оксид фосфора (V) P₂O₅ (ч.).

Для изучения строения соединений железа с ГВ синтезировали комплекс Fe(III) с салициловой кислотой, который использовали в качестве модельного соединения ГВ.

Первой стадией синтеза является получение салицилата натрия. Далее при взаимодействии сульфата железа и салицилата натрия образуется салицилат двухвалентного железа, из которого под действием кислорода воздуха в процессе синтеза получается салицилат трехвалентного железа. Проведение реакции через промежуточную стадию образования салицилата железа (II) и использование салицилата натрия вместо салициловой кислоты позволяет избежать образования смеси многочисленных комплексов железа (III) [180].



Sal – остаток салициловой (2-гидроксibenзойной) кислоты, C₆H₄(OH)COO⁻

Для синтеза салицилата натрия готовили растворы 5,0 г гидроксида натрия в 50 мл этилового спирта и 17,25 г салициловой кислоты в 150 мл этилового спирта. Указанные растворы смешивали в эквимолярном соотношении, перемешивали на магнитной мешалке в течении двух часов и помещали в холодильник на ночь. Затем раствор отфильтровывали на воронке Бюхнера, полученные кристаллы салицилата натрия промывали эфиром от остатков салициловой кислоты, а затем сушили в эксикаторе над P₂O₅. Масса полученного салицилата составляла 2,62 г, выход - 13%.

Для синтеза салицилата железа (III) готовили растворы исходных реагентов путем растворения 2 г салицилата натрия в 25 мл дистиллированной воды и 1,73 г FeSO₄·7H₂O в 25 мл дистиллированной воды. Реагенты брали в стехиометрическом

соотношении 2:1, что соответствует 0,125 моль салицилата натрия на 0,0625 моль FeSO_4 . Раствор сульфата железа содержал 0,39 г аскорбиновой кислоты для стабилизации двухвалентного железа в водном растворе. Растворы салицилата натрия и сульфата железа (II) сливали, помещали на 50 минут в ультразвуковую баню при температуре 70°C, после чего стакан с раствором помещали в эксикатор, где в течение 8 дней над P_2O_5 происходил рост кристаллов салицилата железа. Затем кристаллы отделяли от маточного раствора путем декантации и досушивали в эксикаторе над P_2O_5 еще 10 дней.

2.2.1.12 Методика синтеза смешанных слоистых сульфгидроксидов Fe (II)/Fe (III) - зеленых ржавчин

Зелеными ржавчинами называют слоистые смешанные гидроксиды железа (II)/(III), содержащие хлориды, карбонаты или сульфаты. Образец сульфатной зелёной ржавчины был получен в соответствии с методикой, приведенной в работе [181], в качестве модельного соединения для описания химического окружения в составе гуматов железа.

Синтез проводили в трехгорлой колбе емкостью 250 мл, в одно горло которой был вставлен рН-электрод, в другое – аргоновый кран, центральное горло закрывали герметичной резиновой пробкой (септой), через которую шприцом вводили раствор NaOH.

Навески 7,025 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ и 20,85 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ смешивали в колбе, после чего туда добавляли 80 мл дистиллированной воды MQ, и при перемешивании на магнитной мешалке через раствор пропускали аргон. Для облегчения растворения сульфата железа (II) добавляли 1 каплю концентрированной серной кислоты и колбу на 5 минут помещали в ультразвуковую баню. Процесс растворения солей занимал около 3-х часов, далее при интенсивном перемешивании добавляли щёлочь (0,5 М NaOH) до значений рН, равных 6,2-6,3. Всего вносили около 120 мл щёлочи. В результате была получена болотно-зелёная взвесь, состоящая из мелких частиц, которые не притягивались магнитом. Далее из колбы извлекали электрод и аргоновый кран, отверстия закрывали септами, раствор оставляли для старения на сутки в боксе, наполненном аргоном при комнатной температуре.

2.2.1.13 Методика определения критической концентрации коагуляции водных суспензий Fe-ГВ

Определение критической концентрацией коагуляции проводили с использованием метода динамического рассеяния света путем определения времени осаждения частиц при различных концентрациях фонового электролита (NaCl). Концентрация фонового электролита изменялась в пределах от 0,005 до 0,200 М. С использованием динамического рассеяния света определяли изменение размера частиц во времени. Скорость коагуляции вычисляли из угла наклона кривых коагуляции. Критическую концентрацию коагуляции определяли из логарифмической зависимости скорости коагуляции от концентрации фонового электролита.

2.2.2 Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ

2.2.2.1 Методика исследования цитотоксичности

Исследование цитотоксичности проводили с культурой фибробластов линии NCTC clon L-929. Клетки культивировали в среде ДМЕМ/F12 (ПанЭко) (1:1) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Hy Clone) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO₂. Для определения жизнеспособности клеток методом оптической микроскопии проводили окрашивание 0,1% раствором трипанового синего (Sigma). Для определения цитотоксичности материалов методом МТТ-теста использовали соль тетразолия (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид - МТТ (Sigma))

Исследования цитотоксичности проводили с культурой фибробластов линии NCTC clon L-929. Клетки культивировали в среде ДМЕМ/F12 (ПанЭко) (1:1) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Hy Clone) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO₂.

Через 24 ч культивирования проводили визуальную оценку состояния клеток и определение их жизнеспособности. Определение жизнеспособности клеток проводили методом оптической микроскопии путем окрашивания 0,1% раствором трипанового синего (Sigma). Жизнеспособность клеток определяли как отношение неокрашенных красителем (живых) клеток к общему числу клеток в поле зрения.

Для определения цитотоксичности материалов был применен МТТ-тест, основанный на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид - МТТ (Sigma)) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде.

Клетки высевали в лунки 48-луночного планшета в концентрации 30 тыс. кл./см² в среде 500 мкл ДМЕМ/F12 без сыворотки. В качестве положительного контроля использовали клетки в среде ДМЕМ/F12 (1:1) без добавления сыворотки. Среда ДМЕМ/F12 (1:1) с добавлением 20% ДМСО использовалась как отрицательный контроль, так как добавление в культуру клеток 20% ДМСО вызывает их массовую гибель из-за высокой степени токсичности диметилсульфоксида. Через 1 ч часть среды замещали на 250 мкл, 50 мкл и 5 мкл суспензии исследуемых препаратов (концентрация суспензии составила 50, 10 и 1 об.%, соответственно) и инкубировали в течение суток. По окончании инкубации в каждую лунку вносили по 50 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в растворе PBS (150 мМ натрий-фосфатный буфер, pH - 7,2, 150 мМ NaCl), профильтрованного через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм). После выдерживания в течение 3 ч при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ жидкость удаляли, вносили по 500 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) (Sigma) и путем встряхивания планшетов при комнатной температуре в течение 5 мин растворяли образовавшиеся соли формазана. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на длине волны излучения 540 нм в лунках 96 луночного планшета с помощью фотометра (BIO-RAD 680, США). Число параллельных экспериментов составляло не менее трех. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin, за достоверные принимали различия средних величин по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05^2$.

² Автор выражает благодарность с.н.с. лаборатории роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), к.ф.-м.н. Давыдовой Г. А. за проведение экспериментов и помощь в интерпретации результатов.

2.2.2.2 Методика проведения биотестирования на растениях мягкой пшеницы методом водной культуры

При проведении биотестирования на растениях пшеницы использовали питательную среду Кнопа, которую готовили из $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а.), KH_2PO_4 (ч.д.а.), KCl (ч.д.а.), KNO_3 (ч.д.а.), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.). Для доведения pH до требуемых значений использовали 0,1 М NaOH (х.ч.).

В качестве положительного контроля использовали коммерческий хелат «Секвестрен» Fe-ЭДДА. Для приготовления питательных сред применяли высокочистую дистиллированную воду MQ.

Растворы исследуемых препаратов готовили на базе питательной среды Кнопа, при этом хлорид железа, входящий в состав данной среды, заменяли на исследуемый препарат. Для приготовления 10 л питательной среды отбирали навески солей $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl , KNO_3 и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ массой 2,9 г; 1,4 г; 0,7 г; 1,4 г и 9,8 г, соответственно. Навески солей кальция, калия и магния растворяли в дистиллированной воде в трёх стаканах отдельно друг от друга, чтобы избежать выпадения нерастворимых солей. Содержимое стаканов количественно переносили в пластиковый сосуд емкостью 12 л и доводили объём дистиллированной водой до 10 л. При перемешивании 0,1 М NaOH значение pH доводили до 5,5 (на 10 л питательной среды расходовалось около 1 мл NaOH).

Навески железосодержащих препаратов рассчитывали так, чтобы в конечном растворе концентрация железа составляла 25 мкМ, как в среде Кнопа, где железо присутствует в виде FeCl_3 такой же концентрации. Навески препаратов взвешивали на аналитических весах и растворяли в питательной среде, содержащей все остальные компоненты в мерных колбах на 2000 мл.

Семена мягкой пшеницы сорта «Крестьянка», взятые с 20%-м избытком, замачивали в чашках Петри по 10 штук в 10 мл дистиллированной воды MQ и помещали в термостат при температуре 25°C на трое суток. Выбирали проростки приблизительно одинаковой длины и помещали в пластиковые вегетационные сосуды; корни опускали в питательный раствор через отверстия в крышках. Для каждого варианта использовали по три вегетационных сосуда емкостью 500 мл, в каждый из которых помещали по 15 растений. Вегетационные сосуды с

проростками помещали в климатическую камеру с температурой 25°C и фотопериодом 12 часов для дальнейшего роста в течение 7 дней.

По окончании этого времени, растения извлекали и проводили учет длины и биомассы. Сразу же после этого проводили экстракцию хлорофилла ацетоном и определение содержания хлорофилла в частях растений. Определение содержания железа осуществляли после высушивания растений³.

2.2.2.3 Методика проведения биотестирования на растениях огурцов методом водной культуры

Для приготовления среды Хогланда применяли следующие соли: KNO_3 (ч.д.а.), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а.), KH_2PO_4 (ч.д.а.), H_3BO_3 (х.ч.), MnCl_2 (ч.д.а.), ZnSO_4 (ч.д.а), Na_2MoO_4 (х.ч.), CuSO_4 (х.ч.), 0,5мМ CaSO_4 для замачивания семян и 0,1 М раствор NaOH (х.ч.) для доведения рН.

Для проведения биотестов на растениях огурцов методом водной культуры использовали питательную среду Хогланда, которую готовили согласно работе [182] с некоторыми изменениями: железо вносили в виде исследуемых препаратов с концентрацией 25 мкмоль/л, а не в виде цитрата Fe(III) с концентрацией 10 мкмоль/л, а значение рН раствора составляло 8,5 вместо 6,5. Данная концентрация железа была выбрана потому, что опыты на растениях пшеницы проводили при концентрации железа в питательных средах 25 мкМ; более высокое значение рН было выбрано, чтобы приблизить условия эксперимента к природным, так как железодефицитный хлороз проявляется в первую очередь при высоком уровне рН.

Семена огурцов сорта «Дальневосточный» замачивали по 10 штук в чашках Петри в 10 мл дистиллированной воде и помещали на 2 дня в термостат при температуре 25°C, после чего переносили в чашки Петри с 10 мл 0,5 мМ CaSO_4 и выдерживали ещё 1 сутки в растворе сульфата кальция при температуре 25°C. Далее по одному проростку огурцов помещали в вегетационные сосуды ёмкостью 130 мл, на каждый тестируемый препарат (вариант) высаживали по 15 растений.

³ Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры земледелия факультета Почвоведения МГУ д.б.н. Куликовой Н.А., Филипповой О.И., к.б.н. Лебедевой Г.Ф. и к.б.н. Железовой С.В. за помощь в проведении биотестов, обработке и интерпретации результатов.

Питательные среды готовили непосредственно перед экспериментом, навески солей макроэлементов растворяли в дистиллированной воде MQ, микроэлементы вносили из концентрированного совместного раствора. Раствор микроэлементов готовили путем растворения навесок микроэлементов в мерной колбе на 1000 мл, переносили в сосуд из темного стекла, хранили в холодильнике и при приготовлении свежих питательных сред на 5 литров питательной среды вносили по 1 мл.

По окончании этого периода времени, растения извлекали из вегетационных сосудов и проводили учет длины и биомассы (см. пункт 2.2.2.5). В тот же день проводили экстракцию хлорофилла ацетоном и определение содержания хлорофилла в частях растений (2.2.2.6). Определение содержания железа проводили после высушивания растений (2.2.1.8).

2.2.2.4 Методика проведения биотестирования на растениях огурцов методом почвенной культуры

Эксперименты методом почвенной культуры выполняли с использованием аридных пустынных почв⁴ с растениями огурца в качестве тест-культуры. Субстрат был составлен усреднением 8 образцов (подробное описание см. в Приложении 2), отобранных в пустыне Нейдж (Оман). Проростки огурца проращивали в термостате в течении трех суток при температуре 25°C. По 100 г почвенного субстрата помещали в пластиковые вегетационные сосуды емкостью 130 мл и поливали 10 мл дистиллированной воды. В почвенный субстрат помещали трехдневные проростки пшеницы и добавляли по 20 мл растворов исследуемых препаратов железа. На каждый вариант брали по 4 растения огурца, которые выращивали в климатической камере в течение 30 дней, каждые 7 дней поливая растения 20 мл исследуемых растворов, и каждые 3-4 дня 20 мл дистиллированной воды.

⁴ Автор выражает благодарность профессору по кафедре общего почвоведения факультета Почвоведения МГУ д.с.-х.н. Водяницкому Ю.Н. за предоставленные образцы почв и помощь в обсуждении результатов.

2.2.2.5 Методика определения длины и биомассы растений

Для определения длины проростков пшеницы корни и побеги отделяли по зерновке, отдельно с помощью линейки измеряли длину побега до кончика самого длинного листа и длину корня по самому длинному корню. Для огурцов длину побега измеряли по стеблю, длину корней - по самому длинному корню.

Массу побегов пшеницы определяли, взвешивая одновременно все побеги растений из вегетационного сосуда (15 штук), массу сырых корней измеряли после кратковременного высушивания корней фильтровальной бумагой, в некоторых случаях определяли массу сухих корней после высушивания их в сушильном шкафу.

2.2.2.6 Методика определения содержания хлорофилла в растительных образцах

Для определения хлорофилла в растительных образцах использовали ацетон (х.ч.), CaCO_3 (ч.д.а.) и кварцевый песок (Merck, 99+).

Экстракционное спектрофотометрическое определение содержания хлорофилла в растительных образцах [178] проводили в тот же день, когда и определение биомассы, так как разрушение хлорофилла начинается сразу после удаления растения с питательной среды. Для оценки накопления хлорофилла проводили экстракцию ацетоном и спектрофотометрическое определение хлорофиллов **a** и **b**.

Растения мелко нарезали ножницами, отбирали навеску около 300 мг, которую помещали в фарфоровую чашку. В чашку добавляли около 10-20 мл ацетона, по полному шпателью карбоната кальция и кварцевого песка; полученную смесь тщательно перетирали фарфоровым пестиком до равномерной кашицы, несколько раз добавляя ацетон. Далее полученную смесь фильтровали через стеклянный фильтр на водоструйном насосе, собирая прозрачный зеленый ацетоновый экстракт; при этом на фильтре оставались бесцветные сухие остатки. Полученный раствор количественно переносили в мерные колбы на 50 или 100 мл.

Записывали оптические спектры поглощения полученных экстрактов в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм. Затем из измеренных значений оптической плотности при 662 и 644 нм по формулам 4 и 5 вычисляли содержание в

исследуемых растворах хлорофиллов а и b, и содержание пигментов в исходных растениях (в мг/г).

$$C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644} \quad (4)$$

$$C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662} \quad (5)$$

Для характеристики функционального состояния растений использовали такие параметры, как содержание каждого из пигментов хлорофилла **a** и **b**, а также их суммы (**a+b**) и отношения (**a/b**).

2.2.2.7 Методика определения значения рН водной вытяжки почв

Определение значения рН водной вытяжки образцов почв проводили согласно [137]. Почвенные образцы просеивали через сито с диаметром отверстий 3 мм. Навеску образца почвы массой около 10 г помещали в центрифужную пробирку на 50 мл, добавляли 25 мл дистиллированной воды, после чего пробирки устанавливали в автоматический шейкер на 1,5 часа. После перемешивания образцы центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 10000 об/мин; затем с помощью рН-метра определяли значение рН надосадочной жидкости.

2.2.2.8 Методика составления морфологического описания образцов почв

С использованием иллюстрированного справочника [183] были определены такие параметры как 1) строение почвенного профиля, 2) окраска (цвет) почвы и процентное содержание включений, 3) степень увлажнения, 4) механический состав, 5) структура, 6) сложение, 7) новообразования. Для определения наличия вскипания на почвенный образец из пипетки Пастера капали 0,1 М HCl.

2.3 Физико-химические методы анализа

Элементный анализ⁵. Для определения элементного CHN состава и зольности образцов использовали элементные анализаторы CHN Vario Micro cube Elementar (Германия) и Carlo Erba Strumentazione 1106 (Италия). Содержание кремния определяли на анализаторе Specord M40 (Германия).

ИК спектроскопия⁶. ИК-спектры пропускания препаратов регистрировали с использованием ИК спектрометра с фурье-преобразованием IR-200, ThermoNicolet (США). Регистрацию ИК-спектров проводили в таблетках KBr с разрешением 4 см⁻¹ и количеством сканов 64. Для обработки результатов использовали программу ACD/Spec Manager.

Титриметрические методы анализа⁷. Для проведения потенциометрического титрования кальциево-ацетатным методом использовали автотитратор Metrohm 716 DMS Titrino, оснащенный стеклянным комбинированным электродом.

Для проведения прямого кислотно-основного потенциометрического титрования использовали установку GIMET1, состоящую из двух автотитраторов, оснащенных бюретками 665 Dosimat (Metrohm), потенциометра высокого разрешения и управляемой с персонального компьютера с помощью программы AUTOTITRsoftware (Венгрия).

Спектрофотометрия. Для измерения оптической плотности растворов использовали спектрофотометр Cary Varian Probe 50 с рабочим диапазоном длин волн 200-800 нм.

⁵ Автор выражает благодарность научному сотруднику лаборатории органического анализа кафедры органической химии химического факультета МГУ к.х.н. Арутюновой А.С. за проведение анализов.

⁶ Автор выражает благодарность доценту лаборатории органического анализа кафедры органической химии химического факультета МГУ к.х.н. Тарасевичу Б.Н. за проведение анализов.

⁷ Автор выражает благодарность руководителю группы коллоидной химии Университета города Сегеда (Венгрия) проф. Этелке Томбаш и её сотрудникам за помощь в проведении экспериментов и интерпретации результатов.

Динамическое рассеяние света. Для определения гидродинамического радиуса дисперсионной фазы коллоидных растворов использовали прибор Malvern Zetasizer Nano ZS.

Рентгенофазовый анализ⁸. Рентгенофазовый анализ (РФА) и анализ профиля рентгеновских линий проводили на дифрактометре с вращающимся анодом Rigaku D/MAX 2500 (Rigaku, Япония) в геометрии Брегга-Брентано с использованием CuK_α излучения. Накопление спектров проводили в режиме непрерывного $\Theta - 2\Theta$ сканирования при скорости движения детектора 5 °/мин или 1°/мин и параметром усреднения 0,02° по шкале 2 Θ . Интервал съемки составлял 10 - 70° по шкале 2 Θ .

Мессбауэровская спектроскопия⁹. Регистрацию мессбауэровских спектров проводили на экспрессном мессбауэровском спектрометре электродинамического типа с равноускоренным режимом работы вибратора МС1101-Э (производства “MosTec”, г. Ростов-на-Дону). Измерение мессбауэровских спектров проводилось при комнатной температуре, при температуре жидкого азота и жидкого гелия. Источником гамма-излучения служил стандартный источник ⁵⁷Co/Rh производства ЗАО “Циклотрон”, г. Обнинск, активностью 0,6 Гбк. Полученные спектры обрабатывали с помощью специализированного программного обеспечения (Univem MS 4,02b, НИИ физики РГУ, Ростов-на-Дону) методом наименьших квадратов. Параметры мессбауэровских спектров приведены в работе относительно α -железа. Высокое содержание железа в гуматах железа (9-11% масс.) позволяло снимать спектры непосредственно с порошков исследуемых органико-неорганических соединений, в то время как для получения мессбауэровских спектров гуматов калия (содержание железа 1% масс.) прессовали таблетки.

⁸ Автор выражает благодарность н.с. кафедры неорганической химии химического факультета МГУ к.х.н. Гаршеву А.В. за проведение измерений.

⁹ Автор выражает благодарность старшему научному сотруднику лаборатории ядерно-химических методов кафедры радиохимии химического факультета МГУ к.х.н. Панкратову Д.А. и заведующему лабораторией д.х.н., проф. Перфильеву Ю.Д. за проведение измерений и помощь в интерпретации результатов.

*Спектроскопия рентгеновского поглощения*¹⁰. Регистрацию спектров XAFS проводили на станции "Структурное Материаловедение" Российского Научного Центра «Курчатовский институт». На Рис. 7 приведена схема экспериментальной установки «Структурное материаловедение»

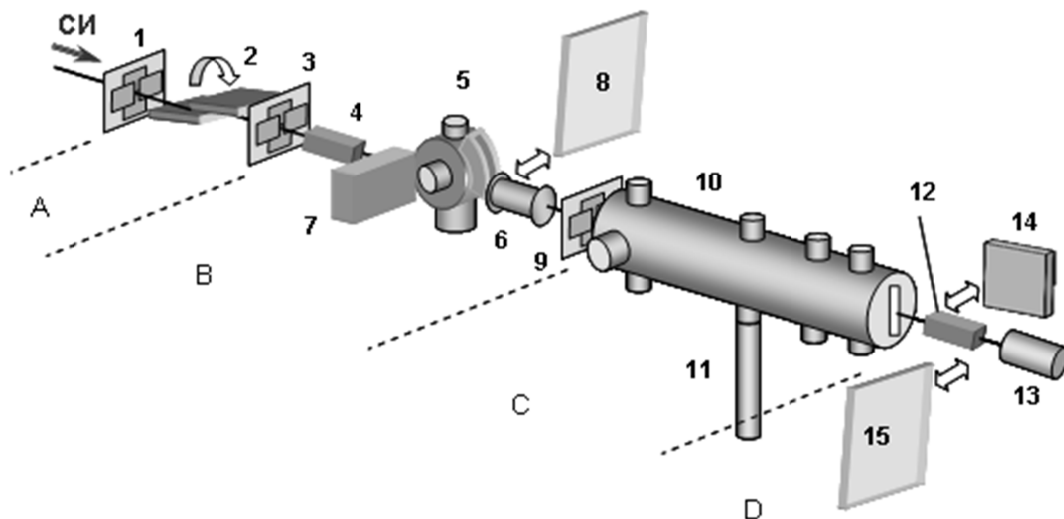


Рис. 7 Принципиальная схема станции «Структурное материаловедение». Установка условно разделена на четыре зоны: А) блок формирования пучка; В) блок камеры образца и XAFS-измерений; С) блок малоуглового рассеяния; D) блок детекторов. 1, 3, 9 – моторизованные коллиматоры; 2 – монохроматор-”бабочка”; 4 – мониторирующая ионизационная камера (воздух); 5 – камера образца (газовая среда + температура); 6 – детектирующая ионизационная камера (Xe + Ar); 7 – детектор флуоресценции; 8, 15 – Imaging Plate; 10 – вакуумная камера малоуглового рассеяния; 11 – шлюз ввода образцов; 12 – ионизационная камера контроля поглощения; 13 – видеокамера контроля пучка и положения образца; 14 – линейный координатный детектор.

Общая схема станции «Структурное материаловедение» представлена на Рис. 7. Диапазоны энергий: 4,5÷18 кэВ и 10÷30 кэВ, соответственно, с разрешением $\Delta\lambda/\lambda \sim 1,4 \times 10^{-4}$ и $2,4 \times 10^{-4}$ при 10 кэВ. Размер пучка формируется свинцовыми щелевыми коллиматорами, перемещаемыми с помощью шаговых двигателей. Размер может изменяться в пределах от 3×3 мм до ~10×10 мкм с дискретностью 4,25 мкм. Характерные размеры пучка для измерений EXAFS составляют 1(v)×3(h) мм.

¹⁰ Автор выражает благодарность научному сотруднику РНЦ «Курчатовский институт» к.ф.-м.н. Велигжанину А.А. и зав. лабораторией д.х.н. Зубавичусу Я. В. за проведение измерений и помощь в обработке и интерпретации результатов

Измерение спектров поглощения осуществляется с помощью двух ионизационных камер, заполняемых смесью инертных газов (Ar/Xe/N₂/He). Камеры располагаются до и после образца. Газовые смеси в камерах подбираются таким образом, чтобы поглощение в первой камере составляло около 10%, а вторая камера поглощала $\approx 70\%$ пучка рентгеновских лучей, что оптимизирует отношение сигнал/шум. Считывание осуществляется пикоамперметром Keithley 6785, позволяющим регистрировать ток с точностью до 10 фА.

Камера образца предназначена преимущественно для исследований катализаторов *in situ*. Для этой цели образец находится в контролируемой газовой среде и при контролируемой температуре – от комнатной до 500 °С. Предусмотрено также получение низкой температуры без разгерметизации объема камеры. Достижима температура -196°С без термостабилизации. Изучение структуры образца в камере осуществляется методами XRD и EXAFS/XANES. Спектры пропускания регистрируются с помощью газонаполняемых ионизационных камер. Для анализа спектров EXAFS использовали пакет программ Ifeffit [184].

Магнитные измерения¹¹. Для измерения намагниченности использовали магнитометр «весы Фарадея» с максимальной индукцией магнитного поля 0,9 Тл. Измерения проводили при комнатной температуре.

Просвечивающая электронная микроскопия¹². Микрофотографии исследуемых образцов были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO912 AB OMEGA, (Zeiss, Германия), оборудованного энергетическим фильтром и системой Келлера. Основные характеристики микроскопа: ускоряющее напряжение 60, 80, 100 и 120 кВ, область освещения 1-75 мкм, апертура освещения 0,02-5 миллирадиан, увеличение: от 80х до 500 000х,

¹¹ Автор выражает благодарность с.н.с. лаборатории неорганического материаловедения кафедры неорганической химии химического факультета МГУ д.х.н., проф. Казину П. Е. и к.х.н. Усович О. за проведение измерений.

¹² Автор выражает благодарность доценту лаборатории физической химии полимеров физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ к.т.н. Абрамчуку С. С. за проведение измерений.

разрешение изображения: 0,2-0,34 нм, разрешение по энергии неупругого рассеяния: 1,5 эВ, область измерения энергии неупругого рассеяния: 0-2500 эВ.

Оценка интенсивности флуоресценции хлорофилла¹³. В качестве параметра, характеризующего функциональное состояние растений, оценивали эффективность фотосинтеза хлорофилла по скорости электронного транспорта и квантового выхода регулируемого рассеяния энергии. Для этого использовали флуориметр с импульсной модуляцией амплитуды (IMAGING PAM-2000, Walz, Германия). Индукция флуоресценции хлорофилла (эффект Каутского) возникает при сильном освещении фотосинтезирующего объекта после его предварительного пребывания в темноте или на слабом свете. Общий вид кривой индукции флуоресценции приведен на Рис. 8.

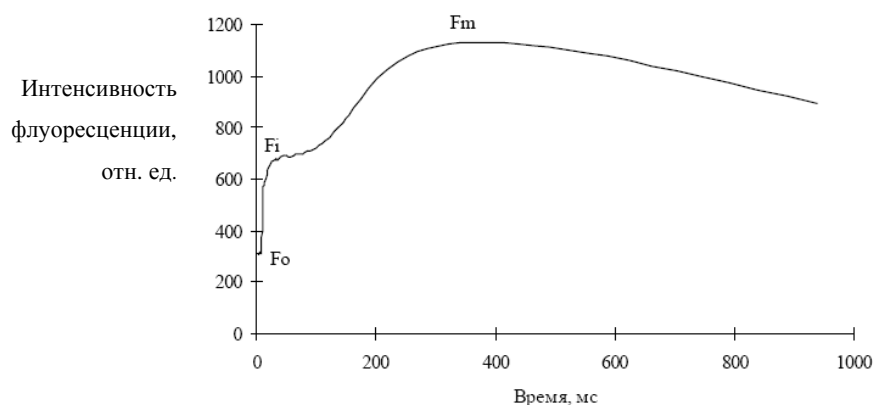


Рис. 8 Кривая индукции флуоресценции (эффект Каутского).

F_0 - минимальная интенсивность флуоресценции, F_i – интенсивность флуоресценции перегиба, F_m – пиковая интенсивность флуоресценции.

Параметр F_0 (минимальная интенсивность) соответствует флуоресценции, когда все акцепторы (переносчики) электронов в электронтранспортной цепи (ЭТЦ) находятся в окисленном состоянии. В условиях насыщающего освещения интенсивность флуоресценции быстро возрастает и достигает своего максимального значения (F_m), когда все акцепторы в ЭТЦ восстановлены. Возрастание флуоресценции с F_0 до F_m характеризует общее количество

¹³ Автор выражает благодарность с.н.с. кафедры земледелия факультета почвоведения МГУ д.б.н. Куликовой Н.А. за проведение измерений и помощь в интерпретации результатов.

акцепторов, которые могут принимать электрон, то есть могут быть восстановлены. Интенсивность флуоресценции перегиба F_i определяется количеством акцептров ЭТЦ, которые могут быть восстановлены, но не способны передавать электроны по цепи. Отношение F_i/F_m отражает долю таких центров от общего их числа и варьируется от 0,17-0,21 в оптимальных условиях до единицы у поврежденных клеток. Относительный выход переменной флуоресценции, характеризующий квантовую эффективность первичной фотосинтетической реакции, рассчитывали как отношение F_v/F_m , где $F_v = F_m - F_0$. У растений в оптимальных условиях F_v/F_m обычно составляет 0,75-0,78. Мертвые клетки характеризуются отношением F_v/F_m , равным нулю [185].

3 Обсуждение результатов

Анализ литературы показал, что в ряде случаев ГВ рассматривают как хелатирующие агенты по отношению к ионам железа [83], [158], [162], однако есть также сведения, указывающие на то, что железо в составе соединений с ГВ непосредственно не связано с органической матрицей и существует в виде различных включений [161], [165] [186]. В данной работе было проведено направленное получение соединений Fe-ГВ с различным соотношением органической и минеральной частей, выполнен комплексный анализ их строения с использованием современных физико-химических методов, а также произведена оценка их биологической активности по отношению к растениям и клеткам животных.

Первый этап работы состоял в исследовании макролигандных свойств ГВ различного происхождения; по результатам этого этапа были выбраны наиболее подходящие препараты ГВ.

Основным доступным на рынке источником гуминовых веществ в настоящее время являются соли щелочных металлов (K^+ и Na^+) ГК леонардита. Выбор катиона определяется областью применения конечного продукта: для использования в ветеринарии и медицине больше подходит гумат натрия, для применения в растениеводстве более предпочтительным является использование гуматов калия, так как калий является компонентом минерального питания растений. В связи с тем, что данная работа была нацелена на разработку препаратов для минерального питания растений, в качестве исходных препаратов ГВ были использованы коммерческие гуматы калия.

3.1 Характеристика макролигандных свойств препаратов ГВ

После анализа данных, приведенных в литературе, для создания органо-неорганических соединений железо – ГВ нами были выбраны следующие препараты: 1) коммерческие гуматы калия, выделенные из **бурого угля** с высоким содержанием как ароматических фрагментов, так и кислородсодержащих групп; 2) образец **модифицированных ГК бурого угля**, обогащенный силанольными группами и обладающий высоким сродством к минеральным (показано на оксиде кремния); 3) образец **фульвокислот**, выделенный из речных вод, с высоким

содержанием алифатических кислородсодержащих фрагментов, являющийся стандартным образцом Международного гуминового общества (МГО). Для оценки макролигандных свойств выбранных препаратов был проведен элементный CHN-анализ, исследованы ИК-спектры и охарактеризованы кислотно-основные свойства.

3.1.1 Элементный состав исследуемых препаратов ГВ

Под элементным составом ГВ понимают состав их органической части, образованной углеродом, водородом, кислородом и азотом, который является обязательным минорным элементом ГВ. Помимо органической в состав всех ГВ входит и неорганическая часть. Она состоит из зольных элементов (преимущественно ионов металлов, оксидов кремния и алюминия) и гигроскопической влаги, содержание которой достигает 7-20% [18]. Анализ высокзольных образцов коммерческих гуматов до сих пор представляет собой сложную проблему, в частности, из-за возможного образования карбонатов в золе, приводящего к занижению определяемого содержания углерода. Тем не менее, определение элементного состава методом CHN-анализа является неотъемлемой частью характеристики свойств ГВ. Определение содержания железа в исходных гуматах калия проводили после разложения органической части методом спектрофотометрии. Шифры использованных в работе препаратов ГВ и данные по их элементному составу, полученные с прибора без корректировки на влажность и зольность, приведены в Таблице 6. В названиях препаратов используются сокращения от английских названий: С - carbon, Н - humic, Р - Powhumus, S - Sakhalinskii, APTS – aminopropylthri-ethoxysysilane, FA - Fulvic Acid, SR - Suwanne River.

Таблица 6 Препараты ГВ, использованные в работе, и их элементный состав: исходные данные (% , масс).

| Шифр | Препарат | Зольность | С | Н | N | Fe |
|-------|-------------------------------------|-----------|------|-----|-----|-----|
| К-СНР | Гумат калия «PowHumus» | 21,6 | 52,8 | 3,9 | 1,1 | 1,0 |
| К-СНС | Гумат калия «Сахалинский» | 33,7 | 31,7 | 3,3 | 1,1 | 1,0 |
| Н-СНР | ГК бурого угля, выделенные из СНР-К | 10 | 62,2 | 4,7 | 1,7 | 1,1 |

| | | | | | | |
|----------|---|------|------|-----|------|------|
| CHP-APTS | Модифицированные ГК угля, степень модификации 20% | 15,9 | 65,6 | 6,1 | 5,3 | ? |
| SR-FA * | Фульвокислоты речных вод, стандарт МГО | 0,58 | 43,2 | 3,6 | 0,55 | <0,1 |

*элементный CHN состав данного препарата приводится по данным МГО (кат. № 2S101F)

Как видно из данных, приведенных в Таблице 6, содержание зольных компонентов (33,7%, масс) в гумате калия отечественного производства значительно выше зольности импортного аналога (21,6%, масс), что связано как с минеральным составом природного сырья, так и с более высоким содержанием гидроксида калия. Высокая зольность модифицированного препарата связана с введением силанольных фрагментов, содержащих кремний. Низкая зольность использованного препарата ФК является характерной для растворенного органического вещества природных вод, так как в воде минеральные вещества содержатся в составе других соединений и в значительно более низких концентрациях, чем в почве и в углях. Согласно полученным результатам, во всех угольных препаратах содержится около 1% железа, которое не удаляется при обессоливании. Результаты исследования форм существования железа в составе ГВ методом мессбауэровской спектроскопии приведены ниже.

В данной работе было использовано два различных гумата калия, и для того, чтобы выбрать оптимальный, необходимо было сравнить их элементный состав. Сравнительный анализ элементного состава ГВ проводят после пересчета исходных данных на сухую и обеззоленную пробу [18]. Типичная влажность ГВ составляет 8 %, масс. [187]. В Таблице 7 приведен элементный состав в пересчете на сухую и обеззоленную пробу, содержание кислорода рассчитано вычитанием из 100% значений процентного содержания углерода, водорода и азота.

Таблица 7 Элементный состав препаратов в пересчете на сухую и обеззоленную пробу и атомные соотношения

| Препарат | %, масс | | | | Атомные соотношения | |
|----------|---------|-----|-----|------|---------------------|------|
| | С | Н | Н | О | Н/С | О/С |
| К-CHP | 61,7 | 4,3 | 1,5 | 32,5 | 0,83 | 0,36 |
| К-CHS | 53,5 | 4,3 | 1,8 | 40,5 | 0,96 | 0,57 |

На основании данных элементного анализа были рассчитаны атомные отношения Н/С и О/С. (Таблица 7). Величина атомного соотношения Н/С характеризует разветвленность боковых цепей и степень замещения ароматических колец, при этом она обратно пропорциональна количеству кратных связей. В исследованных препаратах отношение Н/С меньше единицы, что указывает на преобладание в структуре ГВ ароматических фрагментов по сравнению с алифатическими. Полученные значения Н/С несколько выше среднего значения для ГВ угля (0,66), что связано с высоким содержанием кислородсодержащих заместителей, но при этом хорошо согласуются со средним для ГВ значением (0,90 [18]). Это позволяет рассматривать выбранные препараты ГВ как типичные и в дальнейшем экстраполировать получаемые результаты на другие группы ГВ. С точки зрения получения органо-неорганических соединений Fe – ГВ высокое содержание ароматических структур является достаточно перспективным, так как именно ароматические кислородсодержащие группы, согласно данным [12], [149], [152], [153], вступают во взаимодействие с ионами и оксидами металлов. Для характеристики количества кислородсодержащих групп в составе ГВ используют атомное отношение О/С. Величина этого отношения зависит от степени окисленности соединения и увеличивается при возрастании числа гидроксильных, фенольных, карбоксильных, хинонных и других кислородсодержащих функциональных групп в составе ГВ. Значение О/С, полученное для препарата отечественного К-СНС (0,57) выше аналогичного значения для К-СНР (0,36), что свидетельствует о более высоком содержании кислородсодержащих групп в указанном препарате; это делает его более перспективным с точки зрения получения органо-неорганических соединений Fe – ГВ.

Таким образом, проведенный анализ показал, что использованные в работе ГВ имеют элементный состав, типичный для ГВ угля. Для более детального исследования проводили изучение функционального состава ГВ методом ИК-спектроскопии.

3.1.2 ИК-спектроскопия исследуемых препаратов ГВ

ИК-спектроскопия является весьма информативным методом исследования строения индивидуальных органических соединений, однако ее применение для ГВ

затрудняется перекрыванием полос поглощения, вызванным неупорядоченностью строения [1]. Как следствие, информация, извлекаемая из ИК-спектров пропускания ГВ, обычно ограничивается идентификацией основных функциональных групп. Спектры использованных в работе препаратов имеют относительно широкие, в основном, составные, полосы поглощения с несколько размытыми максимумами (Рис. 9), что является типичным для ГВ.

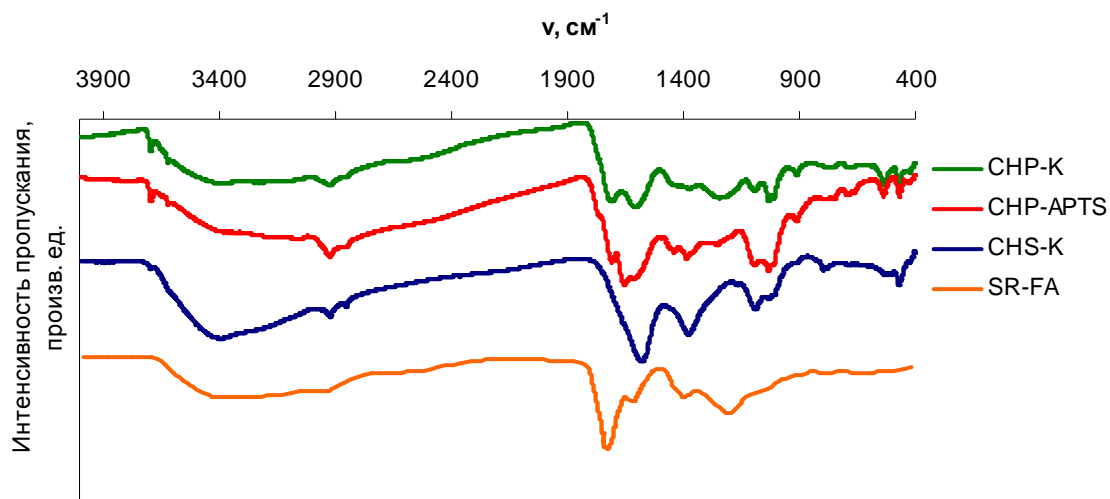


Рис. 9 ИК спектры пропускания исследованных препаратов ГВ.

Как видно из Рис. 9, спектры пропускания всех исследованных препаратов сходны между собой: отдельные и составные полосы в интервале $\nu \leq 1900 \text{ см}^{-1}$; в области $\nu \geq 2500 \text{ см}^{-1}$ существует широкая область с несколькими уступами. ИК-спектр фульвокислот имеет меньше полос поглощения, и их положения отличаются от положений полос в спектрах угольных препаратов. Основные полосы поглощения приведены ниже (Таблица 8); сопоставление полос поглощения со структурными фрагментами препаратов проводили по данным работ [18], [188], [189].

Таблица 8 Положение основных полос поглощения (в см^{-1}) на ИК спектрах исследованных препаратов ГВ

| К-СНР | СНР-АPTS | К-СНС | SR-FA | Группы |
|------------|----------|---------|-------|-------------|
| 702 сл | 705 сл | 719 сл | - | =C-H |
| - | 733 сл | - | - | =C-H |
| 785 сл | - | 790 сл | - | -C-H (аром) |
| 920 сл | 923 сл | 928 сл | - | -C-H (аром) |
| 1026 сильн | 1024 ср | 1020 ср | - | -C-O |

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------------|
| 1036 сильн | 1041 сильн | 1041 ср | - | -C-O |
| 1105 ср | 1105 сильн | 1100 ср | - | -C-O |
| - | - | - | 1204 ср | -C-O |
| 1261 сильн | 1273 ср | - | - | -C-O |
| 1394 ср | 1394 ср | 1394 сильн | 1396 ср | -C=O, -C-O |
| - | 1405 ср | - | - | -C=O, -C-O |
| 1459 ср | 1461 ср | - | 1452 сл | -C=O |
| 1595 сильн | - | 1596 сильн | - | -COO ⁻ |
| - | 1625 сильн | - | 1625 ср | -COO ⁻ |
| - | 1662 сильн | - | - | амид |
| 1718 сильн | 1716 ср | - | - | -COO ⁻ |
| - | - | - | 1742 сильн | алиф. -COOH |
| 2866 ср | 2888 ср | 2854 ср | - | -NH |
| 2940 ср | 2944 ср | 2933 ср | 2930 сл | -CH, NH, OH |
| 3424 ср | 3411 ср | 3415 ср | - | -OH (связ.) |
| 3621 сл | 3623 сл | 3621 сл | - | -OH |
| 3695 ср | 3696 сл | 3700 сл | | -OH |

Приведенные данные (Таблица 8) явно указывают на различия в структуре ГК угля и ФК вод; кроме того, видны некоторые различия в строении угольных препаратов, а также изменения, происходящие в структуре ГВ при конверсии карбоксильных групп в амидные в процессе модификации [95]. В угольных препаратах присутствуют полосы, отвечающие ароматическим фрагментам и кратным связям углерод – углерод, которые отсутствуют в спектре ФК. Положения полос, отвечающих спиртам и простым эфирам, также близки для угольных и сильно отличаются от речного препарата, что указывает на различное строение кислородсодержащих фрагментов. На спектрах пропускания всех препаратов хорошо видна полоса около 1395 см^{-1} , вероятно, отвечающая сложным эфирам [189]. Полоса около 1460 см^{-1} , отвечающая карбонильному кислороду, присутствует в спектрах всех природных препаратов и отсутствует в спектре модифицированного. Полоса 1595 см^{-1} , имеющаяся в спектре угольных препаратов, отвечает карбоксил-иону. Положение полосы, отвечающей карбоксил-иону, отличается у угольных препаратов от положения полосы у модифицированного и речного препаратов; у модифицированного препарата появляется сильная полоса 1662 см^{-1} , отвечающая амидной связи. На переход карбоксильных в амидные указывает уменьшение интенсивности полосы 1718 см^{-1} , отвечающей карбоксильным группам. Полоса 1742 см^{-1} , отвечающая алифатическим

карбонным кислотам, присутствует только в спектре ФК. Полоса около 2870 см^{-1} , вероятно, отвечающая аминогруппе, присутствует только в угольных препаратах, в то время, как полоса около 2940 см^{-1} , также, возможно, отвечающая аминному азоту, присутствует во всех полученных спектрах. На спектрах всех угольных препаратов видны полосы, отвечающие свободным и связанным водородными связями –ОН группам на широкой полосе, отвечающей, связанной воде, которая есть во всех ГВ.

Данные, полученные из анализа ИК-спектров (Рис. 9), свидетельствуют о том, что выбранные нами ГВ обладают типичным набором функциональных групп, причем все угольные препараты содержат гидрофильные кислородсодержащие и гидрофобные ароматические фрагменты, в то время как речные ФК содержат преимущественно алифатические фрагменты. Для создания железосодержащих препаратов самыми важными являются группы, обеспечивающие кислотные свойства ГВ, поэтому их содержание необходимо было определить количественно.

3.1.3 Определение содержания кислотных групп в препаратах ГВ

Реакционная способность ГВ по отношению к металлам зависит от количества присутствующих в ГВ кислотных групп, в основном, карбоксильных и фенольных [34], [35], [36]; [37], [38], [39], [40], [41]. Взаимодействие между ГВ и оксидами металлов также происходит при участии кислотных групп ГВ через гидроксильные группы на поверхности оксидов [190]. Вследствие этого определение содержания кислотных групп необходимо для оценки количества металл-связывающих центров в ГВ [164].

Так как на результаты определения содержания кислотных групп влияют любые кислотно-основные примеси, для проведения анализов гуматы калия обессоливали; полученные препараты получили шифры Н-СНР и Н-СНС для гуминовых кислот, выделенных, соответственно из препарата Powhumus и «Сахалинского гумата».

Основными способами определения содержания кислотных групп являются сочетание кальциево-ацетатного и баритового методов, подробный анализ и оценка которых приведены в работах [61], [62], [191], [192], [187], а также прямое потенциометрическое титрование [34], [54], [193]. При сравнении литературных

данных необходимо учитывать, что в некоторых источниках приводится содержание функциональных групп в ммоль на 1 грамм органического углерода, в то время, как в других – на 1 г образца. Как было показано в разделе 1.1.4.1, для определения содержания кислотных групп лучше использовать оба метода: прямое потенциометрическое титрование и сочетание кальциево-ацетатного и баритового методов. В данной работе были использованы оба подхода; результаты определения приведены в ммоль функциональных групп на 1 грамм образца. На Рис. 10 приведены кривые прямого потенциометрического титрования трех исследованных образцов.

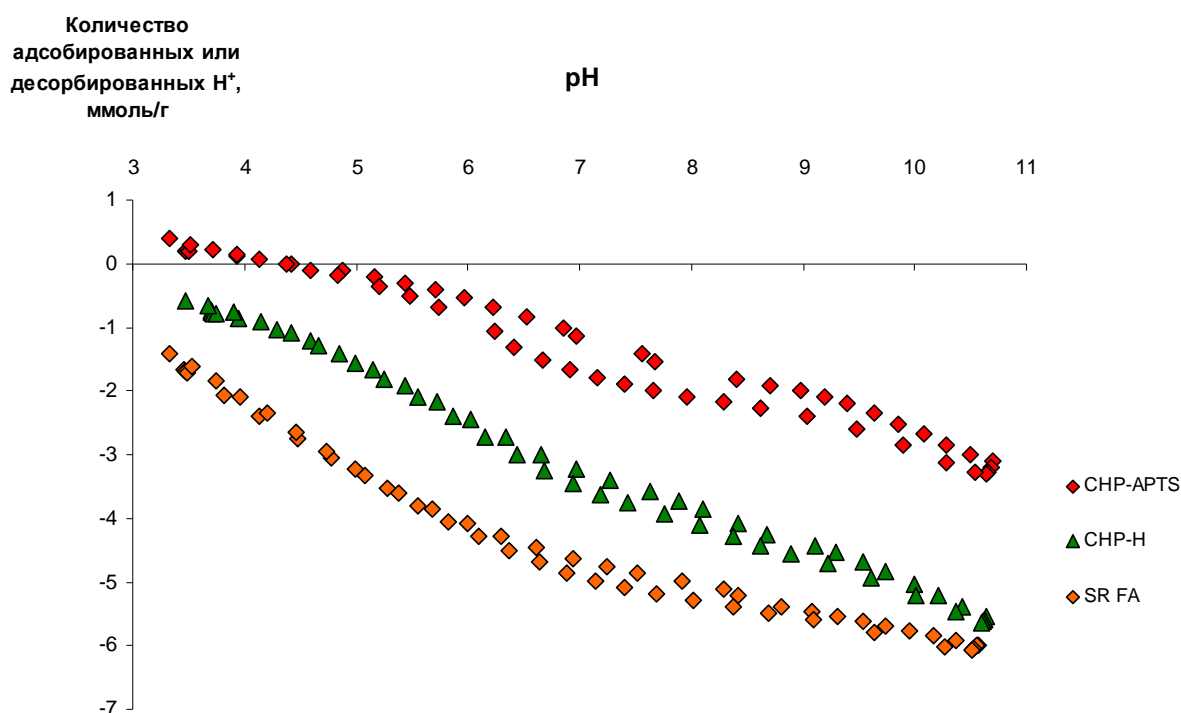


Рис. 10 Кривые потенциометрического титрования исследованных препаратов.

Отрицательные и положительные значения количества адсорбированных протонов указывают на присутствие при данных значениях pH отрицательно и положительно заряженных функциональных групп, как например, депротонированных COO^- и протонированных NH_3^+ , соответственно (Рис. 10). Значение количества адсорбированных протонов при pH 8 соответствуют содержанию карбоксильных групп, а удвоенная разность значений при pH 8 и 10 – содержанию фенольных групп.

Содержание карбоксильных и фенольных групп в исследованных препаратах, определенное обоими методами, приведено ниже (Таблица 9).

Таблица 9 Содержание кислотных групп в исследованных препаратах, определенное прямым потенциометрическим титрованием, кальциево-ацетатным и баритовым методами*.

| Препарат | COOH, ммоль/г | | Ar-OH, моль/г | |
|----------|---|----------------------|---|---------------------|
| | Прямое H ⁺ /OH ⁻ титрование | Ca(OAc) ₂ | Прямое H ⁺ /OH ⁻ титрование | Ba(OH) ₂ |
| CHS-H | - | 4,1 | - | 5,2 |
| CHP-H | 4,1 | 3,5 | 2,2 | 2,1 |
| CHP-APTS | 2,2 | 1,2 | 1,9 | 1,9 |
| SR-FA | 6,1 | 6,3 | 1,9 | - |

*Стандартное отклонение для содержания кислотных групп составляет менее 0,2 ммоль/г.

Данные о содержании кислотных групп в исследованных ГВ различного происхождения, полученные с помощью потенциометрического титрования, баритового и Са-ацетатного методов приведены в Таблице 9. На основании полученных данных было показано, что содержание кислотных групп в природных ГВ является типичным для своих источников происхождения, пониженное содержание карбоксильных групп в модифицированном препарате связано с конверсией карбоксильных групп в амидные, происходящей в процессе модификации. Из-за конверсии карбоксильных групп в амидные снижается растворимость препарата, что делает невозможным проведение синтезов в водной среде, а использование органических растворителей противоречит исходно выбранному принципу экологически безопасных методов получения. В связи с этим, от дальнейшего использования модифицированного препарата решено было отказаться.

Угольные препараты уступают ФК вод по величине карбоксильной кислотности, однако, согласно данным ИК спектроскопии, большая часть карбоксильных групп ФК соединена с алифатическими фрагментами, в то время как взаимодействие с металлами и их оксидами обеспечивается, в первую очередь, ароматическими кислородсодержащими фрагментами. Кроме того, выделение ФК – процесс очень трудоемкий и дорогостоящий, в связи с чем создание дешевого

препарата, производимого в промышленных масштабах для сельского хозяйства, из ФК невозможно.

Учитывая сказанное выше, в качестве наиболее подходящих для создания органо-неорганических соединений «железо – ГВ» нами были выбраны коммерчески доступные гуматы калия, обозначенные здесь как К-СНС и К-СНР. Наш выбор подтверждается данными, приведенными в работе [194], где показывается, что для удобрений оптимальными являются угольные ГВ. В работе было использовано два различных гумата калия, которые незначительно отличаются друг от друга по составу. Отечественный гумат калия «Сахалинский» отличается более высоким содержанием кислотных групп, а, главное, его производят из отечественного сырья в нашей стране, поэтому основным сырьем для получения гуматов железа был выбран именно этот препарат.

3.2 Получение и исследование свойств соединений Fe-ГВ

3.2.1 Получение растворимых в воде соединений Fe-ГВ

Перед нами стояла задача получить растворимые соединения, содержащие не менее 5% железа, обладающие стимулирующей биологической активностью по отношению к растениям, испытывающим дефицит железа. При этом необходимо было учитывать возможность дальнейшего масштабирования процесса для промышленного получения гумата железа, в связи с чем мы выбирали доступные и экологически безопасные реагенты и методы синтеза.

В основе синтеза лежал способ получения растворимых производных ГВ, описанный в работе [96]; основным отличием было использование реагентов, стабилизирующих железо (II), а также переход на гумат калия отечественного производства.

Синтез проводили в водной среде путем медленного введения раствора соли железа (II) в раствор гумата калия (5%, масс) при pH 9-11. В соответствии с рекомендациями, приведенными в литературе для получения коммерческих соединений Fe – ГВ [83], [84], в качестве исходного соединения железа мы использовали сульфат железа (II). Синтез проводили в щелочной среде, когда кислотные группы ГВ находятся в депротонированной форме, что обеспечивает их

максимальную реакционную способность. Однако при такой кислотности среды гидролиз и окисление железа (II) являются доминирующими процессами, и переход иона Fe^{2+} в гидратированные оксиды железа (III) может происходить до образования орвано-неорганических соединений ГВ с железом. Поэтому при проведении синтеза в реакционную среду вводили стабилизаторы, замедляющие процесс щелочного гидролиза. Были выбраны два стабилизирующих агента с различными механизмами действия: аскорбиновая кислота (гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты) $C_6H_8O_6$ и серная кислота H_2SO_4 . Аскорбиновая кислота (АК) является восстановителем, который наиболее часто используется для стабилизации формы железа (II) в составе железосодержащих пищевых добавок. К её достоинствам можно также отнести низкую токсичность и собственную стимулирующую биологическую активность, к недостаткам – высокую стоимость.

Орвано-неорганические соединения ГВ с железом, приготовленные на основе его солей, не являются солями с химической точки зрения, однако в литературе они получили название «гуматов», по аналогии с гуматами калия и натрия. Поэтому в данной работе для обозначения исследуемых орвано-неорганических соединений Fe-ГВ также будет использован термин **гуматы железа**. В Таблице 10 приведен список полученных в работе гуматов железа, условия их получения, растворимость в воде и элементный состав.

Таблица 10 Список полученных гуматов железа, условия их синтеза, растворимость в воде элементный состав (исходные данные)*.

| Шифр препарата | Стаб. агент | рН | Растворимость, г/л | Зола | С | Н | N | Fe |
|----------------|-------------|----------------|--------------------|----------|------|-----|-----|------|
| | | | | % , масс | | | | |
| Fe-СНР-01 | АК | $10,0 \pm 0,5$ | 135 | 55,5 | 23,2 | 2,1 | 0,7 | 9,0 |
| Fe-СНС-02 | АК | $11,5 \pm 0,5$ | <1 | 46,0 | 24,8 | 2,0 | 1,0 | 8,9 |
| Fe-СНС-03 | АК | $9,5 \pm 0,5$ | 125 | 50,1 | 22,2 | 2,1 | 1,2 | 8,7 |
| Fe-СНС-04 | - | $9,5 \pm 0,5$ | 55 | 49,0 | 25,1 | 2,1 | 1,4 | 8,7 |
| Fe-СНС-05 | H_2SO_4 | $10,0 \pm 0,5$ | 130 | 68,0 | 17,8 | 1,8 | 0,7 | 11,3 |

*Стандартные отклонения: растворимость - до 5 г/л, зольность и элементный состав - до 0,1% по массе.

Препарат Fe-СНР-01 был синтезирован из немецкого гумата калия для проверки воспроизводимости способа получения, описанного в литературе [96]. Когда было показано, что опыт воспроизводится и полученный препарат

характеризуется высокой растворимостью и высоким содержанием железа, дальнейшие синтезы проводились на основе отечественного гумата калия.

Как было показано в работе [96], стабильность значения pH синтеза имеет большое значение для получения растворимых производных. Образец Fe-CHS-02, полученный при pH $11,5 \pm 0,5$, оказался нерастворимым, в то время, как все образцы, полученные при pH 9,0-10,5, характеризовались высокой растворимостью (от 50 до 130 г/л). Основным отличием синтеза, проведенного в данной работе, является использование добавок, направленных на стабилизацию железа (II) в составе гуматов; их использование оказалось весьма эффективным для повышения растворимости.

Следует отметить, что введение восстановителя значительно повышало растворимость получаемых гуматов. Как видно из приведенных данных (Таблица 10), растворимость препарата, полученного с использованием аскорбиновой кислоты (Fe-CHS-03), превышала растворимость препарата, синтезированного без использования восстановителя (Fe-CHS-04), более, чем в 2 раза. Можно предположить, что в присутствии аскорбиновой кислоты происходит образование органо-неорганических соединений ГВ с железом со значительным содержанием металла в степени окисления +2, тогда как в отсутствие восстановителя получаемые гуматы содержат преимущественно железо (III). Для проверки высказанного предположения нами были проведены исследования, направленные на изучение форм существования железа в гуматах.

Содержание железа во всех синтезированных препаратах превышало 5% – минимальное значение, установленное для микроудобрений железа [120], и варьировалось в диапазоне от 8,7 до 11,3%.

Таким образом, нами разработана методика синтеза органо-неорганических соединений с ГВ, позволяющая получать гуматы железа с высоким содержанием железа и высокой растворимостью в воде. Далее было необходимо охарактеризовать полученные соединения.

3.2.2 Исследование соединений Fe-ГВ методами ИК-спектроскопии, РФА и просвечивающей электронной микроскопии

Так как образование связей «металл-лиганд» может отображаться на колебательных спектрах, для характеристики строения полученных гуматов использовали метод ИК-спектроскопии. На Рис. 11 приведены ИК спектры пропускания гуматов железа и спектр исходного препарата.

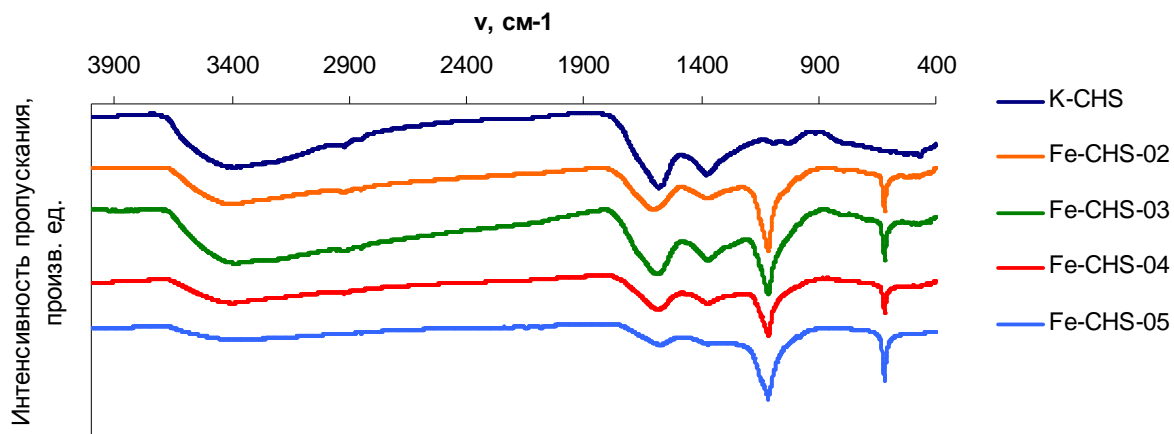


Рис. 11 ИК спектры пропускания гумата калия «Сахалинский» и гуматов железа, полученных на его основе.

Полученные ИК спектры гуматов железа (Рис. 11) свидетельствуют о том, что никаких изменений в углеродном скелете ГВ при таком способе модификации не происходит. В спектрах гуматов железа полосы, отвечающие кислородсодержащим группам, становятся менее выраженными, чем в исходном гумате калия, но однозначно интерпретировать эти данные как признаки образования связей Fe-O-C невозможно. Единственное существенное различие между спектрами гумата калия и гуматов железа заключается в присутствии в последних двух сильных полос поглощения 1120 см^{-1} и 630 см^{-1} , которые относятся к сульфат-иону [195].

Присутствие сульфат-иона согласуется с данными РФА (Рис. 12), показавшего наличие примеси сульфата калия в гуматах железа.

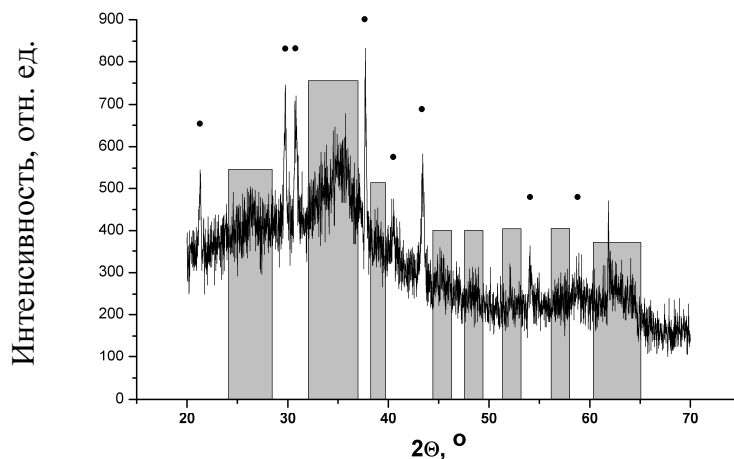
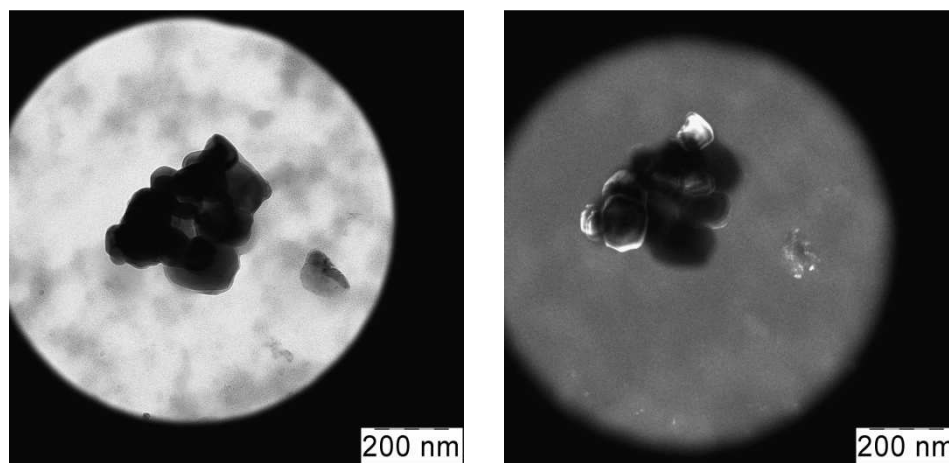


Рис. 12 Типичная зависимость интенсивности дифрагированных рентгеновских лучей от угла 2θ (дифрактограмма) гумата железа на примере препарата Fe-CHS-05. Точками обозначены рефлексы, отвечающие K_2SO_4 .

Гуматы железа, как и исходные ГВ, рентгеноаморфны, однако на дифрактограмме (Рис. 12), присутствуют рефлексы, соответствующие сульфату калия K_2SO_4 (карточка 83-681 базы данных ICSD PDF-2). Кроме того, наблюдаются уширенные области, отмеченные выделением, отвечающие нескольким слабо закристаллизованным фазам оксидов и гидроксидов железа (III). Таким образом, единственной кристаллической фазой в составе органо-неорганических соединений железа с ГВ является примесь сульфата калия. Необходимо отметить, что присутствие сульфата калия не препятствует практическому применению препарата, так как само это вещество является удобрением, используемым в сельском хозяйстве [93].

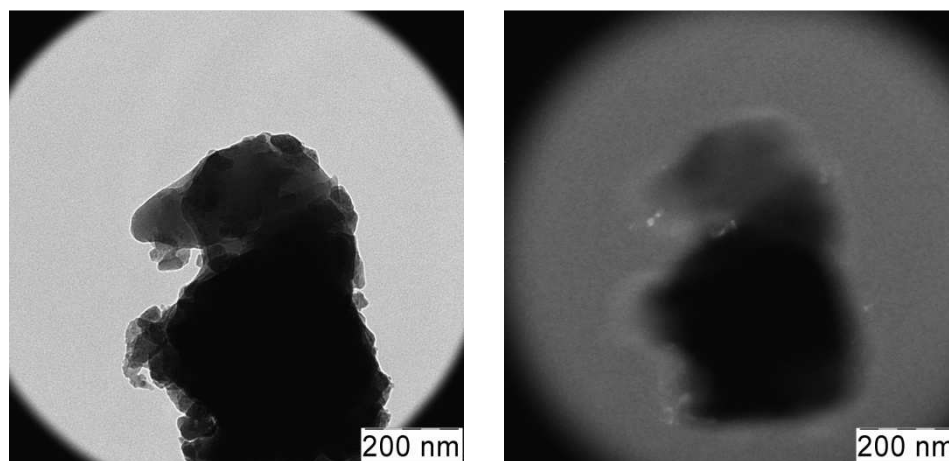
Для изучения морфологии мелкокристаллических включений в исследуемых органо-неорганических соединениях был использован метод **просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)**. Получение высококачественных снимков препаратов на основе ГВ – задача достаточно сложная, так как органическая часть препарата испаряется под пучком электронов в вакууме. На рисунках ниже приведены микрофотографии гуматов железа.



А

Б

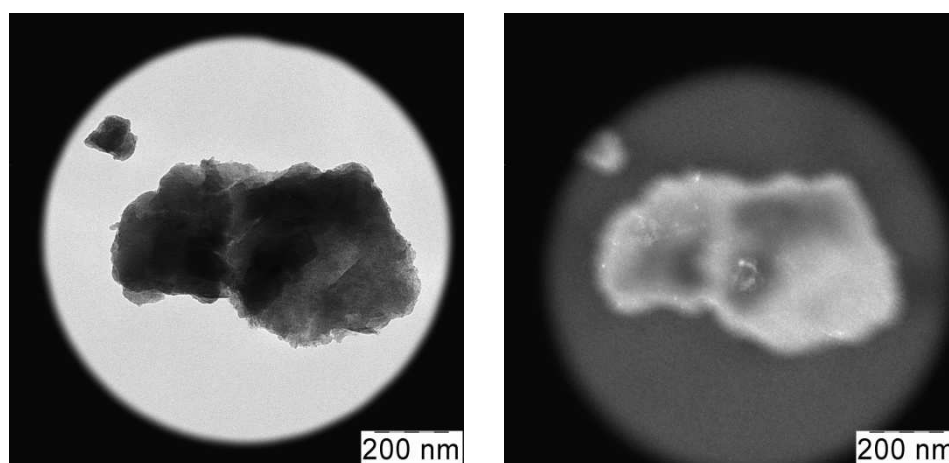
Рис. 13 Микрофотографии образца Fe-CHP-01. Общий вид частицы гумата железа (А); та же частица с подсвеченными кристаллическими включениями (Б).



А

Б

Рис. 14 Микрофотографии образца Fe-CHS-02. Общий вид частицы гумата железа (А); та же частица с подсвеченными кристаллическими включениями (Б).



А

Б

Рис. 15 Микрофотографии образца Fe-CHS-03. Общий вид частицы гумата железа (А); та же частица с подсвеченными кристаллическими включениями (Б).

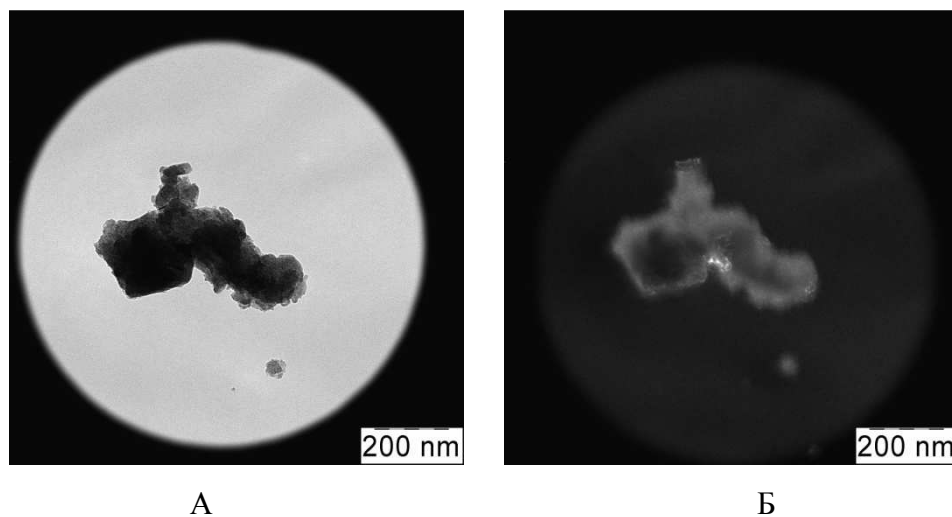


Рис. 16 Микрофотографии образца Fe-CHS-04. Общий вид частицы гюматата железа (А); та же частица с подсвеченными кристаллическими включениями (Б).

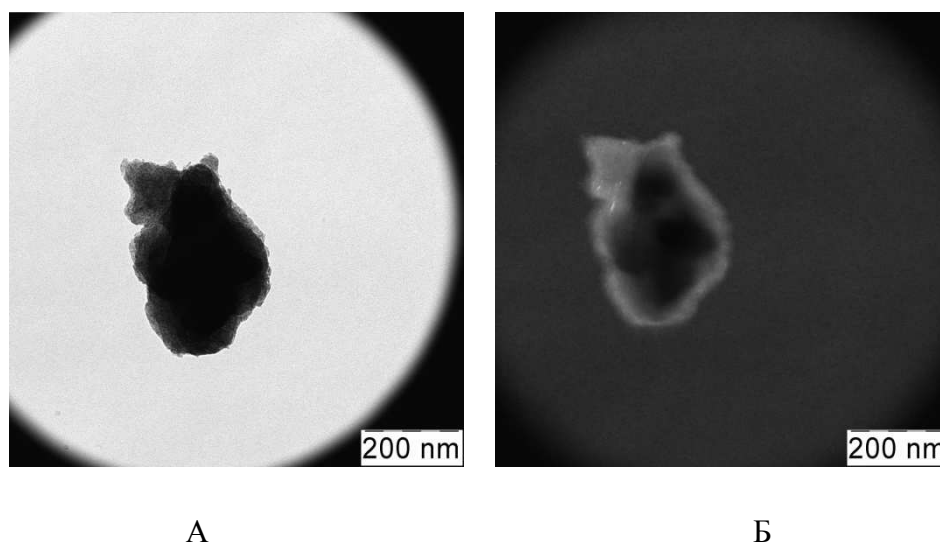


Рис. 17 Микрофотографии образца Fe-CHS-05. Общий вид частицы гюматата железа (А); та же частица с подсвеченными кристаллическими включениями (Б).

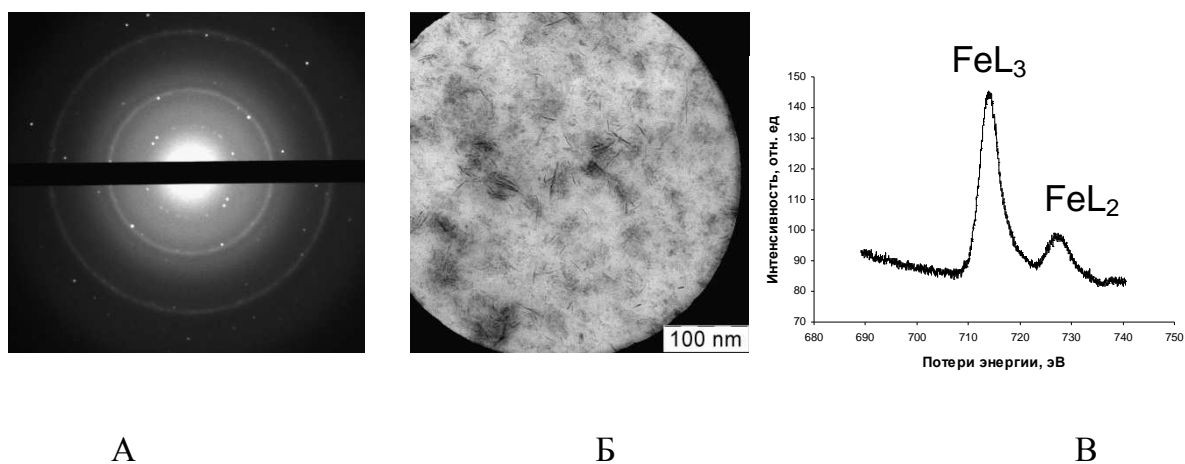


Рис. 18 Дифракции электронов (А), микрофотография ПЭМ (Б) и спектр ХПЭЭ (В) для препарата Fe CHS 05

Как показали результаты ПЭМ (Рис. 13-18), гуматы железа представляют собой неоднородные органо-неорганические вещества, содержащие кристаллические включения внутри органических фрагментов. Размер кристаллических включений варьируется от 20 до 100 нм в различных гуматах. Методом ХПЭЭ (Рис. 18 В) было показано, что данные включения представляют собой соединения железа. Наименьший размер (менее 30 нм) частиц был обнаружен в препаратах Fe-CHS-03 и Fe-CHS-05, которые были получены с использованием стабилизирующих агентов (аскорбиновой и серной кислот). Также методом ПЭМ был исследован образец коммерческого гумата железа Numiron, полученный на производственных мощностях компании Numintech (Германия). Микрофотографии этого препарата приведены на Рис. 19.

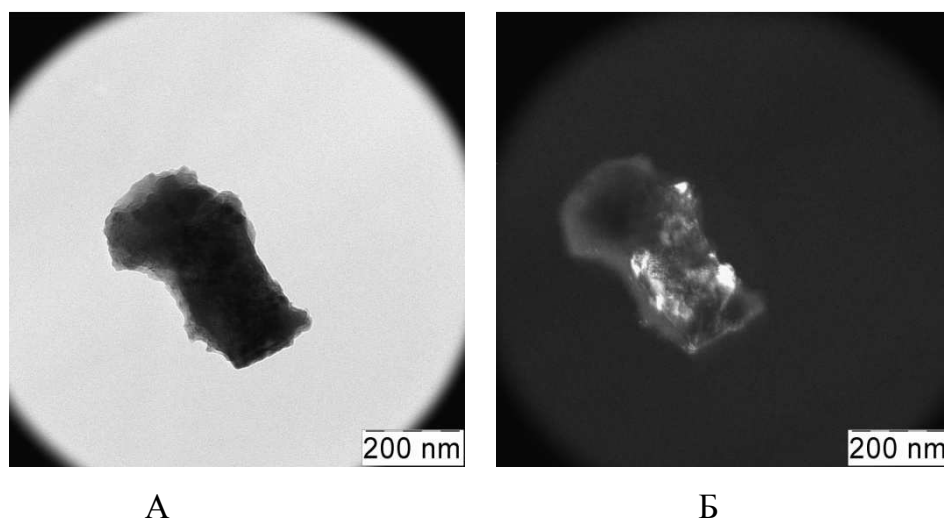


Рис. 19 Микрофотографии коммерческого препарата Numiron. Общий вид частицы гумата железа (А); та же частица с подсвеченными кристаллическими включениями (Б).

Как видно из микрофотографии, коммерческий гумат железа содержит крупные кристаллические включения (до 300 нм), однако, согласно описанию препарата, он обладает высокой растворимостью (99%). Полученные нами гуматы железа также хорошо растворимы в воде, что свидетельствует о том, что наличие кристаллических включений в составе органо-неорганических соединений железа – ГВ само по себе не является препятствием для высокой растворимости препаратов.

Для определения взаимосвязи химического окружения железа и его биологической активности с помощью комплекса физико-химических методов нами было изучено локальное окружение железа в составе гуматов железа.

3.2.3 Исследование соединений Fe-ГВ методами EXAFS/XANES

Для анализа сложных систем, в структуре которых отсутствует дальний порядок, то есть периодичность в расположении атомов или молекул на больших расстояниях [196], очень информативными являются методы исследования структуры с использованием синхротронного излучения (СИ) [197], [198].

Одним из наиболее распространенных методов, основанных на изучении тонкой структуры спектров поглощения рентгеновских лучей является XAFS спектроскопия. Термин XAFS (X-ray Absorption Fine Structure) переводится как тонкая структура спектров поглощения рентгеновских лучей. Название XAFS объединяет обозначения нескольких участков спектра вблизи скачка поглощения: область XANES (X-ray Absorption Near Edge fine Structure – околороговая тонкая структура рентгеновского спектра поглощения), ограниченную энергетическим интервалом $\pm(30-50)$ эВ относительно энергии порога возбуждения скачка, и область EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure – протяженная тонкая структура рентгеновского спектра поглощения), расположенную выше скачка поглощения и находящуюся в интервале от 30 эВ до (1500-2000) эВ относительно порога возбуждения. Условное деление спектра на эти области вызвано необходимостью использования разных физических приближений для их описания [198]. К сожалению, в научной литературе общепринятых русскоязычных эквивалентов для данных названий пока не существует.

В данной работе были использованы методы спектроскопии рентгеновского поглощения EXAFS/XANES для анализа локального окружения железа в составе органо-неорганических соединений железа с ГВ. На Рис. 20 приведены спектры XANES синтезированных гуматов и модельных соединений, а на Рисунке 21 производные XANES по энергии для исследованных препаратов.

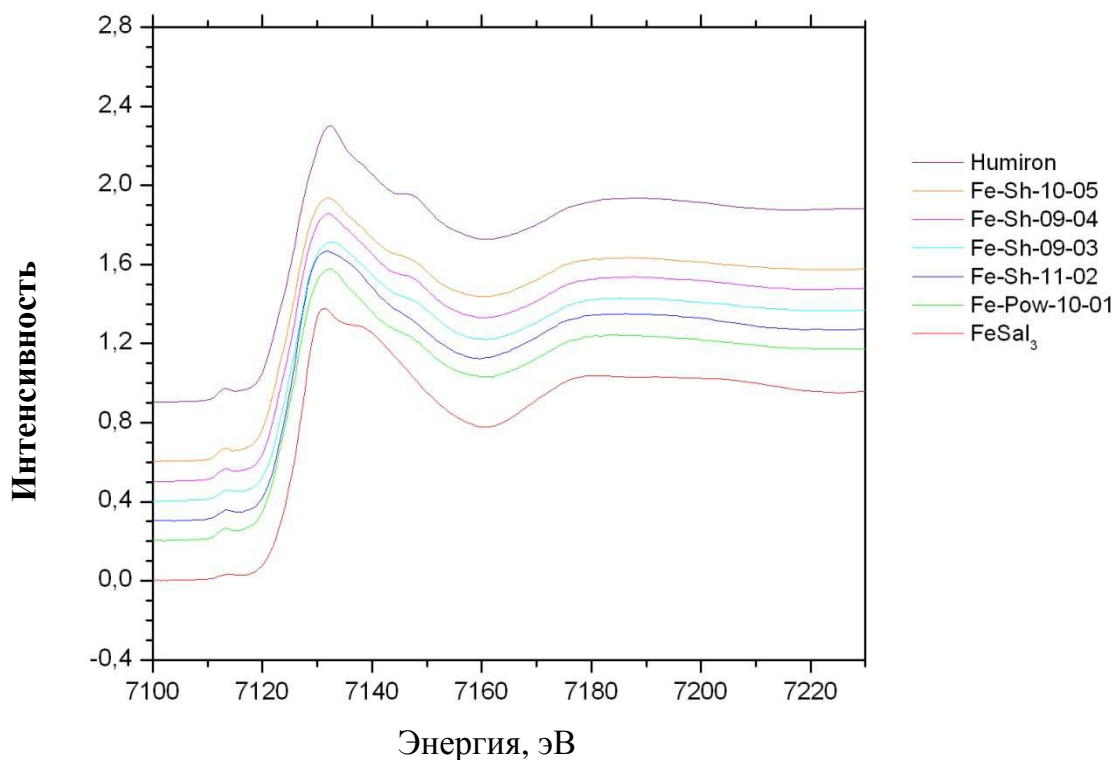


Рис. 20 Спектры XANES синтезированных гуматов железа, коммерческого препарата Humiron и трисалицилата железа FeSal_3 .

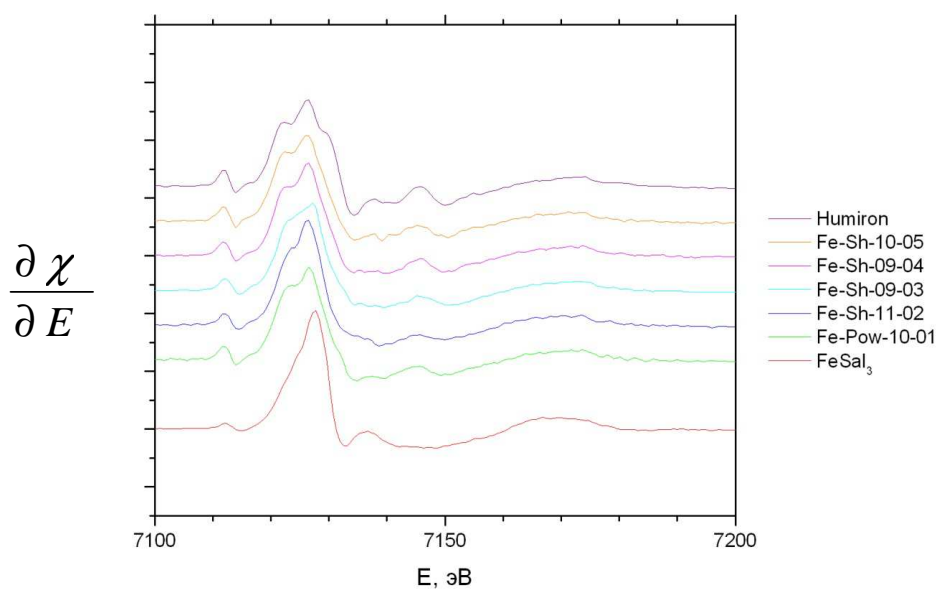


Рис. 21 Производные спектры XANES по энергии синтезированных гуматов железа, коммерческого препарата Humiron и трисалицилата железа FeSal_3 .

Энергетические положения края поглощения образцов свидетельствует о том, что железо в исследуемых соединениях имеет степень окисления +3. Наличие

предпика в спектре XANES указывает на искаженную форму октаэдрического окружения во всех исследованных гуматах железа, отсутствие данного пика у трисалицилата железа, используемого в качестве стандарта, указывает на его симметричное октаэдрическое окружение. Другие особенности в спектре XANES схожи для всех гуматов железа и заметно отличаются от используемых стандартов (FeSal₃ и Fe-ЭДДГА).

На Рис. 22 приведены графики фурье-преобразований спектров EXAFS, характеризующие локальное окружение атомов железа в синтезированных гуматах железа по сравнению с трисалицилатом FeSal₃ и органо-неорганическим соединением железа с ГВ Humiron.

Фурье-преобразование, произв.ед

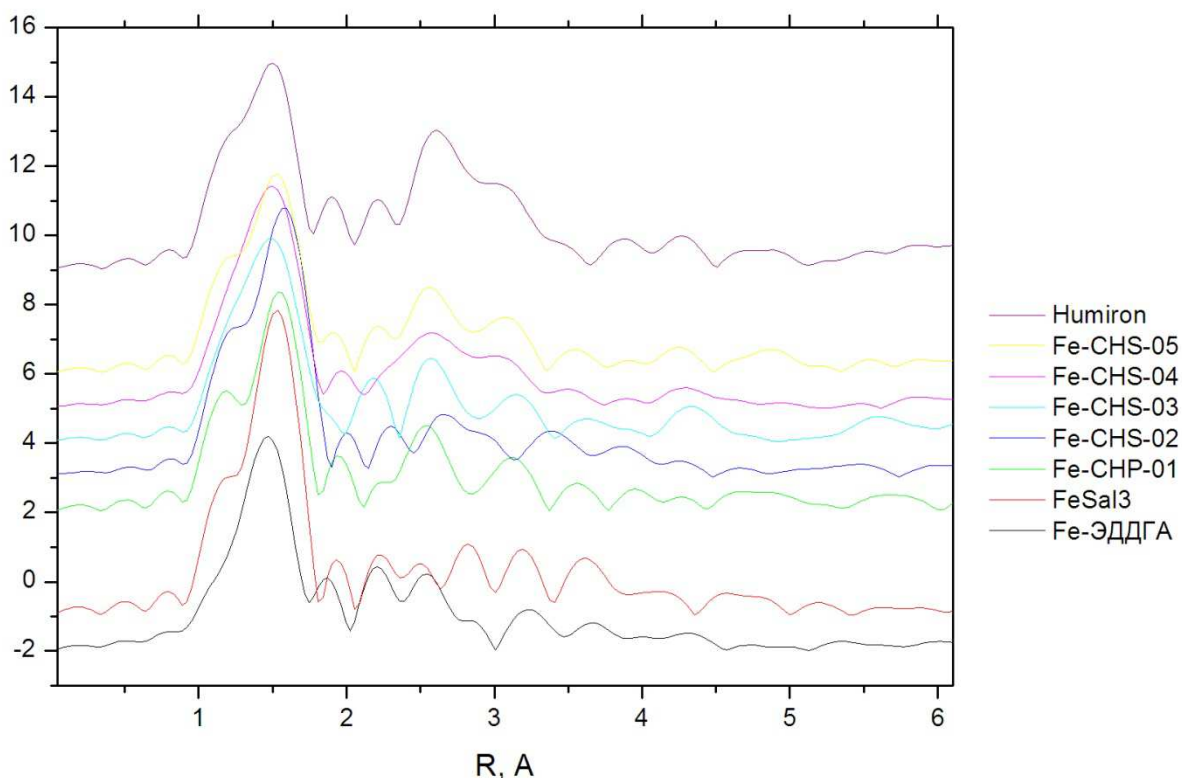


Рис. 22 Результаты фурье-преобразований спектров EXAFS железа в составе исследованных гуматов железа по сравнению с модельными соединениями: препаратами Humiron и Fe-ЭДДГА и трисалицилатом железа FeSal₃.

На приведенных спектрах EXAFS после преобразования Фурье (Рис. 22) видно, что общий вид зависимостей на участке, соответствующем расстоянию от центрального атома от 0 до 2,5 Å и характеризующего строение первой

координационной сферы, сходен для всех исследованных препаратов. На спектре препарата Humiron присутствуют пики, отвечающие второй координационной сфере; это обозначает, что образец лучше закристаллизован. Это согласуется с данными ПЭМ, согласно которым, размер кристаллических включений в данном препарате достигает 200-300 нм, что существенно выше, чем в синтезированных в работе гуматах железа (30-40 нм).

Для определения локального окружения железа из данных фурье-преобразований спектров EXAFS было произведено сравнение экспериментальных данных с результатами аппроксимации первой координационной сферы железа по односферной модели. Результаты аппроксимации гумата железа Fe-CHS-05 приведены на Рис. 23, трисалицилата железа FeSal_3 - на Рис. 24.

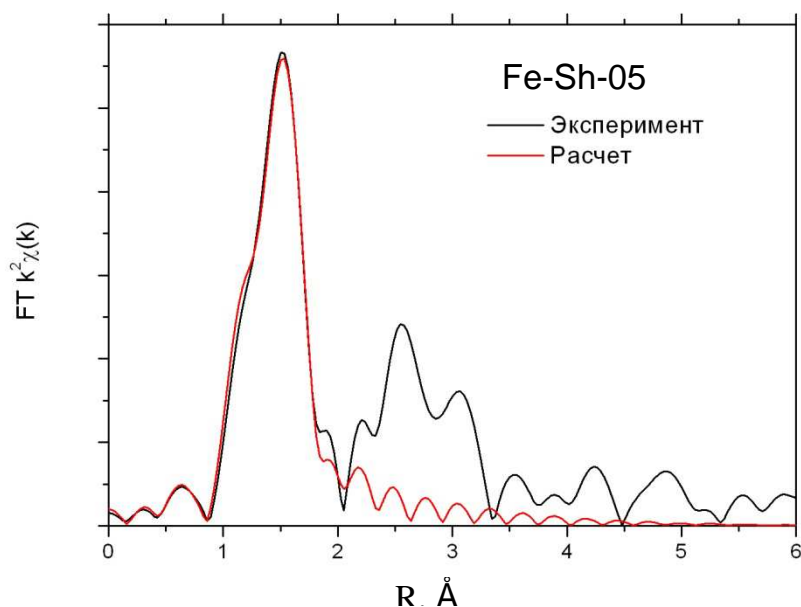


Рис. 23 Результаты фурье-преобразования спектров EXAFS железа в составе гумата Fe-CHS-05 по сравнению с расчетной кривой, полученной в результате аппроксимации.

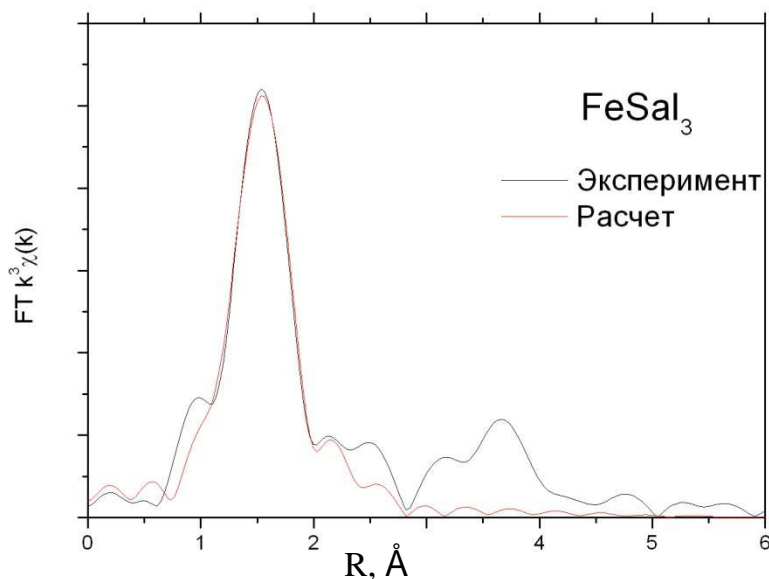


Рис. 24 Результаты фурье-преобразования спектров EXAFS железа в составе трисалицилата FeSal_3 по сравнению с расчетной кривой, полученной в результате аппроксимации

На Рис. 23 и 24 приведены кривые, полученные в результате фурье-преобразования экспериментальных спектров EXAFS и расчетного спектра, полученного путем аппроксимации первой координационной сферы гумата железа Fe-CHS-05 и трисалицилата железа. Из приведенных графиков видно, что расчетные модели удовлетворительно описывает экспериментальные графики. В связи с тем, что в органическом лиганде происходит быстрое поглощение рентгеновского излучения, осцилляции в их спектрах быстро затухают. Поэтому для анализа использовались интервалы $2-10 \text{\AA}^{-1}$ в k -пространстве и $1-2,5 \text{\AA}$ в R -пространстве. Для моделирования была выбрана односферная модель, включающая атомы кислорода на расстоянии около 2\AA от Fe. Варьировали расстояние до атомов кислорода, их количество, параметр Дебая-Валлера, характеризующий степень разупорядоченности, и положение уровня Ферми. Множитель интенсивности (амплитудный множитель) для всех образцов был фиксирован при значении 0,8. В Таблице 11 приведены параметры аппроксимации локального окружения атома железа в гуматах и трисалицилате железа.

Таблица 11 Оценка параметров локального окружения атома железа по односферной модели для исследованных препаратов (К.Ч. – координационное число).

| Препарат | Фактор сходимости R_f , % | Межатомное расстояние R_{Fe-O} , Å | К.Ч. | Фактор Дебая-Валлера σ^2_o , Å ² | Положение уровня Ферми E_o , эВ |
|--|-----------------------------|--------------------------------------|---------|--|-----------------------------------|
| Fe-CHP-01 | 0,0144 | 1,961(4) | 5,3±0,2 | 0,0115(8) | 6,8±0,4 |
| Fe-CHS-02 | 0,0041 | 1,977(7) | 5,7±0,4 | 0,011(1) | 7,6±0,6 |
| Fe-CHS-03 | 0,0027 | 1,964(5) | 5,0±0,3 | 0,0096(9) | 7,1±0,6 |
| Fe-CHS-05 | 0,0065 | 1,975(5) | 4,8±0,9 | 0,011(1) | 3,1±2,3 |
| FeSal ₃ | 0,0153 | 1,964(9) | 6,0±0,6 | 0,009(1) | 7,8±1,0 |
| α -Fe ₂ O ₃ | 0,4 | 1,97(1) | 6,0 | 0,011(1) | 5,5± 1,8 |

В гумате железа наблюдается некоторое уменьшение координационного числа и незначительное увеличение фактора Дебая-Валлера, что свидетельствует о разупорядоченности локального окружения. Расстояние Fe-O в образцах незначительно варьируется, оставаясь для салицилата железа в удовлетворительном соответствии с литературными данными [199]. По результатам анализа приведенных спектров можно сделать вывод, что в гумате железо находится в искаженном октаэдрическом окружении из 6 атомов кислорода. Это может соответствовать, как трисалицилату железа (III) [200], так гидратированным оксидам железа, присутствие которых было выявлено методами ПЭМ и РФА. В пользу последнего предположения свидетельствует факт, что длина связи Fe-O, определенная из спектров EXAFS, соответствует аналогичному параметру для оксидов железа (III). В связи с этим был проведен сравнительный анализ фурье-преобразований спектров EXAFS указанного гумата железа и одного из наиболее устойчивых оксидов железа - гематита α -Fe₂O₃. На Рис. 25 приведены спектры EXAFS после фурье-преобразования гумата железа Fe-CHS-05 по сравнению со стандартным образцом гематита α -Fe₂O₃

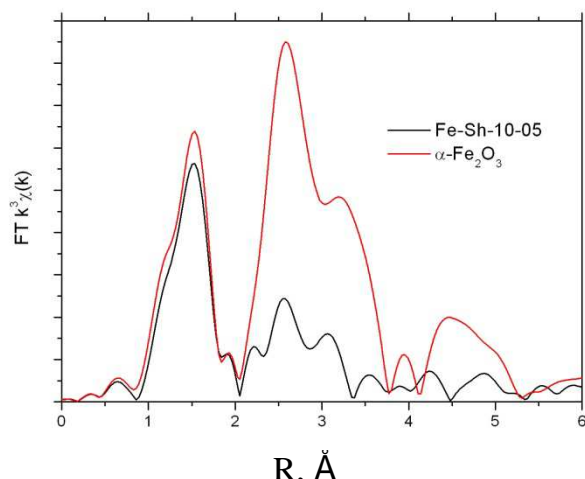


Рис. 25 Результаты фурье-преобразования спектров EXAFS железа в составе гумата Fe-CHS-05 по сравнению со стандартом $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$

На приведенных спектрах гумата и оксида железа (Рис. 25) видно, что пики, находящиеся на графике в области расстояний от атома железа от 0 до 2 Å, соответствующие первой координационной сфере железа, в составе гумата Fe-CHS-05, не отличаются от пиков гематита $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Отличие в интенсивности пиков, отвечающих второй координационной сфере (от 2 до 4 Å), вероятно, объясняется тем, что образец гематита находился в виде объемной фазы, в отличие от соединений железа в составе соединений с ГВ, находящихся в наноразмерном состоянии.

Таким образом, по результатам спектроскопии рентгеновского поглощения можно сделать вывод о том, что в составе органо-неорганических соединений железа с ГВ содержатся оксиды железа (III), что подтверждает данные, полученные методами РФА и ПЭМ. Однако данные, полученные указанными методами, не позволяют однозначно определить формы существования железа в составе гуматов, в связи с чем нами был использован метод, позволяющий более подробно исследовать соединения железа в составе органических матриц – мессбауэровская спектроскопия.

3.2.4 Исследование соединений Fe-ГВ методом спектроскопии ЯГР

Для получения информации о распределении железа по степеням окисления, о химическом окружении атомов железа и характере связи железа с окружающими атомами использовалась мессбауэровская спектроскопия, также называемая

спектроскопией ядерного гамма-резонанса (ЯГР). Мессбауэровские эксперименты на ядрах ^{57}Fe позволяют уточнить валентное и спиновое состояние железа, в том числе при исследовании фаз, содержащих этот элемент в разных степенях окисления; определить распределение катионов железа по неэквивалентным позициям и выявить особенности форм существования железа в аморфных образованиях [201].

3.2.4.1 Исследование соединений Fe-ГВ методом мессбауэровской спектроскопии при комнатной температуре

Первым этапом анализа химического окружения железа в составе органо-неорганических соединений железа с ГВ методом мессбауэровской спектроскопии были измерения при комнатной температуре. В рамках этого эксперимента были исследованы пять синтезированных гуматов железа, два исходных гумата калия K-CHS и K-Pow, а также салицилат железа FeSal₃ и Numigon – образец коммерческого гумата железа. Салицилат железа (III) был выбран в качестве образца сравнения, так как в работах [8], [11], [12] высказано предположение, что именно салицилатные фрагменты ГВ участвуют в образовании связи ГВ-металл. В Таблице 12 приведены мессбауэровские параметры исследованных препаратов, рассчитанные из спектров, полученных при комнатной температуре.

Таблица 12 Параметры исследованных препаратов железа, рассчитанные из мессбауэровских спектров, полученных при комнатной температуре¹⁴. I_S – изомерный сдвиг относительно $\alpha\text{-Fe}$, Q_S – квадрупольное расщепление, Γ_{exp} – полная ширина линии на полувысоте, $S_{\text{отн}}$, % - площадь, ограниченная подспектром

| Препарат | Степень окисления железа | Подспектр | I_S | Q_S | Γ_{exp} | $S_{\text{отн}}$, % |
|-----------|--------------------------|-----------|-------|-------|-----------------------|----------------------|
| | | | мм/с | | | |
| Fe-CHP-01 | +2 | Д1 | 1,13 | 2,56 | 0,29 | 6,71 |
| | +3 | Д2 | 0,37 | 0,54 | 0,36 | 32,76 |
| | | Д3 | 0,38 | 0,85 | 0,45 | 49,86 |
| Fe-CHS-02 | +2 | Д1 | 1,09 | 2,40 | 0,72 | 2,43 |
| | +3 | Д2 | 0,38 | 0,57 | 0,34 | 22,86 |
| | | Д3 | 0,38 | 0,90 | 0,55 | 74,71 |
| Fe-CHS-03 | +2 | Д1 | 1,19 | 2,25 | 0,43 | 4,98 |

¹⁴ Здесь и далее используются следующие обозначения подспектров: «Д» - дублет, «С» - секстет

| | | | | | | |
|--------------------|----|----|------|------|------|-------|
| | +3 | Д2 | 0,36 | 0,59 | 0,36 | 36,74 |
| | | Д3 | 0,36 | 0,92 | 0,51 | 58,28 |
| Fe-CHS-04 | +3 | Д1 | 0,35 | 0,57 | 0,36 | 40,85 |
| | | Д2 | 0,35 | 0,91 | 0,51 | 59,15 |
| Fe-CHS-05 | +2 | Д1 | 1,12 | 2,38 | 0,49 | 30 |
| | +3 | Д2 | 0,39 | 0,64 | 0,51 | 70 |
| FeSal ₃ | +3 | Д1 | 0,48 | 1,75 | 0,28 | 45 |
| | | Д2 | 0,41 | 1,60 | 0,33 | 55 |
| K-CHS | +3 | Д1 | 0,34 | 0,69 | 0,50 | 100 |
| K-CHP | +3 | Д1 | 0,28 | 0,60 | 0,56 | 73 |
| | | Д2 | 0,43 | 0,78 | 0,43 | 27 |
| Fe-ЭДДГА | +3 | Д1 | 0,38 | 1,05 | 0,76 | 52 |
| | +3 | Д2 | 0,36 | 0,67 | 0,41 | 48 |
| Humiron | +3 | Д1 | 0,35 | 0,54 | 0,35 | 33 |
| | | Д1 | 0,34 | 0,84 | 0,53 | 67 |

При анализе данных, приведенных в Таблице 12, было установлено, что большая часть атомов железа (от 70 до 100%) в составе гуматов имеет значения изомерного сдвига 0,28-0,43 мм/с, что соответствует степени окисления железа +3, однако в составе препаратов, полученных с использованием аскорбиновой и серной кислот, обнаружено железо (2-7 и 30% соответственно), со значениями изомерного сдвига 1,09-1,19 мм/с, что соответствует степени окисления железа +2 [201]. Для сравнительного анализа значений изомерных сдвигов железа (III) в составе различных препаратов был построен график, изображающий их взаимное расположение относительно друг друга (Рис. 26).

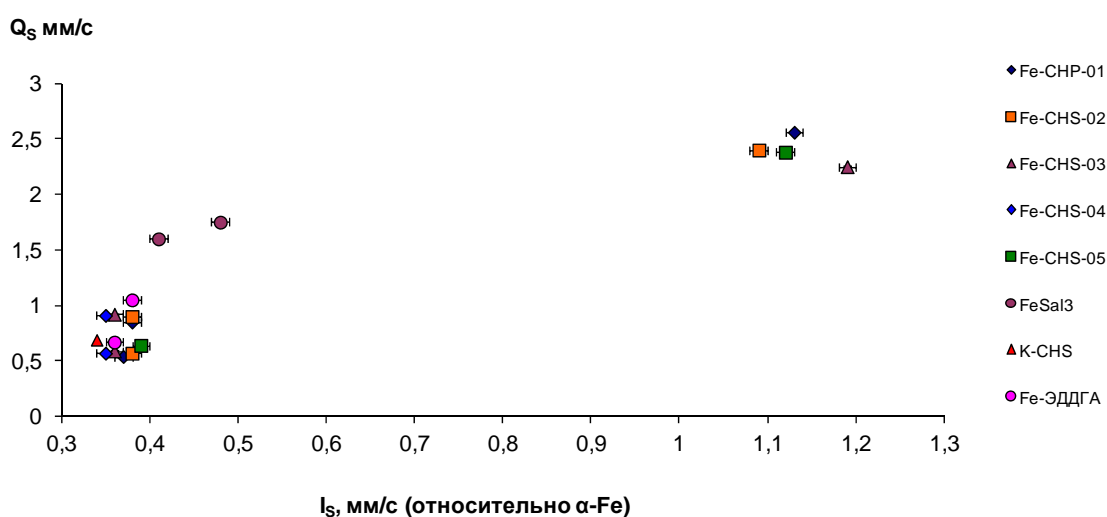


Рис. 26 Значения изомерных сдвигов и квадрупольного расщепления для различных форм железа в исследованных препаратах.

Мессбауэровские параметры атомов железа (III) в составе различных гуматов железа оказались близки между собой и значительно отличались от значения аналогичного параметра для салицилата железа (III) (Рис. 26). В трисалицилате железа $FeSal_3$ ион железа (III) окружен 6 атомами кислорода из трех салицилатных остатков, связанных с железом ковалентной полярной связью (Рис.27). На основании данных мессбауэровской спектроскопии можно сделать вывод о том, что химическое окружение железа в составе полученных гуматов отличается от химического окружения в составе салицилата, то есть в составе гуматов координация железа осуществляется иначе (другие лиганды, другой тип связи и прочее). Необходимо отметить, что полученные результаты не подтверждают ранее высказанное другими исследователями предположение о хелатировании ионов железа салицилатными фрагментами [8], [11], [12].

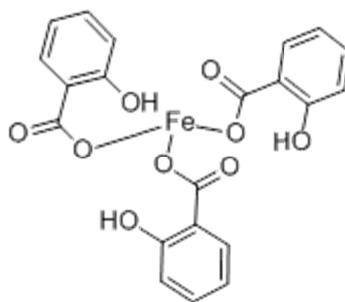


Рис. 27 Структурная формула трисалицилата железа.

При сравнении полученных результатов с данными, приведенными в литературе, было установлено, что значения мессбауэровских параметров железа (III) удовлетворительно согласуются с приведенными в работе данными для эндогенного железа в составе ГВ [162] ($I_s 0,35 \pm 0,1$, $Q_s 0,51 \pm 0,01$ мм/с). Значения параметров ($I_s 0,37$, $Q_s 0,76$ мм/с), близкие к полученным нами, приведены в работе [159], авторы которой рассматривают соединения Fe (III) - ГВ как высокоспиновые полядерные комплексы; аналогичные параметры ($I_s 0,38$, $Q_s 0,8$ мм/с) приводятся и в работе [202]. Полученные данные позволяют предположить, что искусственно внесенное в процессе синтеза железо имеет такое же химическое окружение, что и природное (эндогенное) железо в составе гуминовых веществ, которое, согласно общепринятому мнению, является биологически доступным.

В работе [167] приводятся данные о существовании несколько типов позиций Fe (III) в составе ГВ, в двух из которых железо образует устойчивые связи

с органической матрицей, при этом оно достаточно устойчиво к комплексообразованию и восстановлению и находится либо в тетраэдрическом (I_s 0,18, Q_s 0,67 мм/с), либо в октаэдрическом окружении (I_s 0,65, Q_s 0,68 мм/с). В третьей позиции Fe(III) адсорбируется на внешней поверхности ГВ и находится в октаэдрическом окружении (I_s 0,40, Q_s 0,60 мм/с), будучи слабо связанным с лигандом. Значения мессбауэровских параметров железа (III), полученные нами для гуматов, близки к приведенным для железа в третьей позиции, то есть атомы железа находятся в октаэдрическом окружении и слабо связаны с лигандом. При этом предположение о том, что они находятся на поверхности молекул ГВ, не подтверждается данными ПЭМ (см. раздел 3.2.2). Необходимо также отметить, что наши результаты лучше согласуются с предположением, высказанным в работе [162] о том, что непосредственной связи между атомом железа и молекулой ГВ не образуется. Согласно литературным данным, значения полученных параметров наиболее близко соответствуют гидратированным оксидам железа (III) [201], в первую очередь, лепидокрокиту γ -FeOОН [168]. Таким образом, нами было подтверждено ранее высказанное предположение о том, что железо (III) в составе гуматов существует в виде частиц гидратированных оксидов железа.

Кроме соединений железа в степени окисления +3 в составе препаратов, в синтезе которых использовали аскорбиновую или серную кислоту, присутствует также и железо в степени окисления +2. Доля железа (II) от общего содержания железа составляла от 2 до 7% для препаратов, полученных с использованием аскорбиновой кислоты, и до 30% - с использованием серной кислоты.

Как видно из Рис.26, изомерные сдвиги железа (II) в составе различных гуматов значимо отличаются друг от друга. Полученные нами значения изомерных сдвигов железа (II) (1,09-1,19 мм/с) меньше, чем значения аналогичных параметров для железа в составе гуматов и фульватов (I_s 1,34, Q_s 2,86 мм/с), приведенных в работе [159], что может обозначать, оно находится в другом химическом окружении. Авторы высказали предположение, что железо в составе гуматов и фульватов находится в виде аквакомплексов, аналогичных $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

Сравнительный анализ полученных и литературных данных показал, что значения мессбауэровских параметров железа (II) наиболее близко соответствуют аналогичным значениям для зеленых ржавчин, смешанных гидроксисульфатов

железа (II)/(III) [181], что согласуется с данными о формировании в почвах в присутствии ГВ минерала фужерита, содержащего зеленые ржавчины [203].

Следует иметь в виду, что спектр, полученный при комнатной температуре, может отвечать нескольким формам существования железа. В связи с тем, что анализ изменений в мессбауэровских спектрах, полученных при различных температурах, позволяет получить информацию о характере связи между железом и окружающими атомами и о распределении частиц по размерам, необходимо было провести аналогичные измерения при более низких температурах [204].

3.2.4.2 Исследование соединений Fe-ГВ методом мессбауэровской спектроскопии при низких температурах

Полученный с использованием серной кислоты гумат железа Fe-CHS-05 содержит как типичную для гуматов форму железа (III), так и железо (II), что позволяет на его примере исследовать изменения, наблюдаемые в мессбауэровских спектрах при понижении температуры. На Рис. 28 приведены спектры, полученные при трех различных температурах (298, 78 и 5 К).

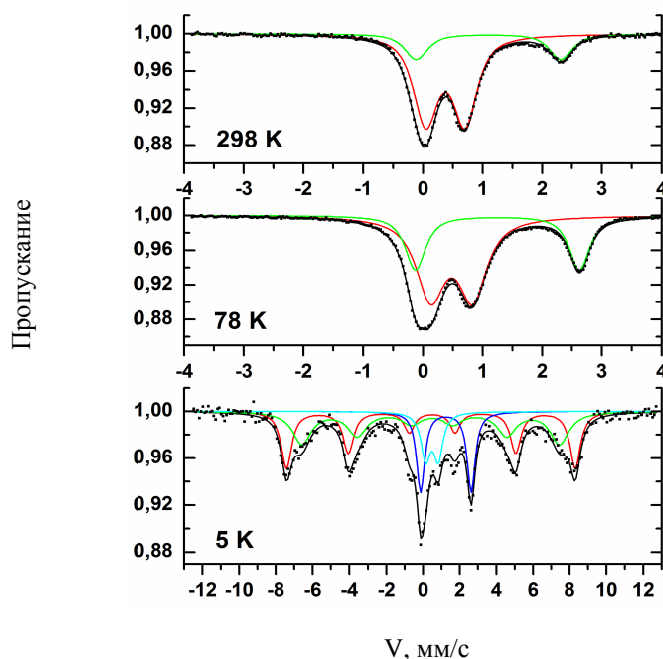


Рис. 28 Мессбауэровские спектры препарата Fe-CHS-05 при различных температурах: 298К (А), 78К (Б), 5К (В). Черным цветом помечены экспериментальные спектры, различными цветами показаны вписанные модельные подспектры.

Из спектров, приведенных на Рис. 28, видно, что величина резонансного поглощения атомов железа (II) (дублет зеленого цвета) заметно возрастает при понижении температуры с 298 до 78 К, в то время как аналогичный параметр для железа (III) (дублет красного цвета) не изменяется. Увеличение резонансного

поглощения при понижении температуры характерно для металлоорганических и аморфных неорганических соединений, которые при охлаждении переходят в более упорядоченное состояние. В то же время отсутствие значимого увеличения поглощения характерно для кристаллических соединений, которые при 298 К уже находятся в упорядоченном состоянии [201]. К таким соединениям относятся, например, ионные кислородные соединения железа, такие, как оксиды и гидроксиды.

При понижении температуры до 5 К на спектре гумата железа появляются два секстета, отвечающие магнитоупорядоченным фазам железа (III), при этом на спектре также видны два дублета, соответствующих железу (II) и железу (III). Для определения форм существования железа в составе гумата Fe-CHS-05 из полученных спектров были рассчитаны мессбауэровские параметры, которые приведены в Таблице 13.

Таблица 13 Параметры, рассчитанные из мессбауэровских спектров гумата железа Fe-CHS-05, полученных при температурах 298, 78 и 5 К. I_S – изомерный сдвиг относительно α -Fe, Q_S – квадрупольное расщепление, Γ_{exp} – полная ширина линии на полувысоте, H_{in} – сверхтонкое поле на ядре, $S_{\text{отн.}}$, % - площадь, ограниченная подспектром

| Т, К | Степень окисления железа | Подспектр | I_S | Q_S | Γ_{exp} | H_{in} , кЭ | $S_{\text{отн.}}$, % |
|------|--------------------------|-----------|-------|-------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | | мм/с | | | | |
| 298 | +2 | Д1 | 1,12 | 2,38 | 0,49 | - | 30 |
| | +3 | Д2 | 0,39 | 0,64 | 0,51 | - | 70 |
| 78 | +2 | Д1 | 1,25 | 2,75 | 0,41 | - | 33 |
| | +3 | Д2 | 0,48 | 0,71 | 0,58 | - | 67 |
| 5 | +3 | С1 | 0,47 | -0,06 | 0,67 | 488,1 | 35 |
| | | С2 | 0,46 | -0,05 | 1,23 | 436,1 | 35 |
| | | Д1 | 0,48 | 0,68 | 0,60 | - | 12 |
| | +2 | Д2 | 1,25 | 2,76 | 0,53 | - | 18 |

Сравнение полученных данных (Таблица 13) с мессбауэровскими параметрами, приведенными в литературе, показало, что железо (III) находится в составе гумата железа Fe-CHS-05 в виде высокодисперсных оксигидроксидов железа (III), а именно в виде гетита α -FeOOH, лепидокрокита γ -FeOOH и фероксигита δ' -FeOOH, а также в виде зеленых ржавчин, в составе которых находится и все железо (II) в исследованном гумате [181].

Таким образом, изменения, наблюдаемые в мессбауэровских спектрах при понижении температуры, свидетельствуют о том, что атомы железа (II) и (III) в гумате имеют принципиально разное химическое окружение. Анализ

мессбауэровских параметров подтвердил ранее высказанное предположение о том, что железо (III) находится в составе гидратированных оксидов, а железо (II), как и часть железа (III), содержится в виде смешанных гидроксисульфатов Fe (II)/Fe (III), называемых зелеными ржавчинами. При этом в литературе отсутствуют данные о том, что резонансное поглощение в мессбауэровских спектрах зеленых ржавчин увеличивается при понижении температуры, в связи с чем нами была предпринята попытка получения образца зеленых ржавчин для анализа их мессбауэровских спектров.

3.2.4.3 Исследование химического окружения железа в составе зеленых ржавчин методом мессбауэровской спектроскопии

Так как анализ полученных мессбауэровских спектров и их сопоставление с литературными данными не дало ясной картины о формах существования железа в составе органо-неорганических комплексов с ГВ, то следующий этап исследований был посвящен анализу форм существования железа в составе модельных соединений – низмолекулярных аналогов гуматов железа. Для этой цели были выбраны следующие соединения железа: салицилат железа $FeSal_3$ – хелатный комплекс железа (III), в котором атом железа находится в октаэдрической координации из 6 атомов кислорода; фероксигит $\delta-FeOOH$ – гидроксид железа (III), зеленая ржавчина – смешанный гидроксисульфат Fe(II)/Fe(III) $[Fe^{2+}_{1-x}Fe^{3+}_x(OH)_2]^{x+}[x/2SO_4^{2-}, mH_2O]^{x-}$, и Humiron – образец коммерческого гумата железа. Первые три из перечисленных модельных соединений были синтезированы в процессе выполнения работы. В Таблице 14 приведены мессбауэровские спектры полученных соединений и их параметры.

Таблица 14 Мессбауэровские спектры зел. ржавчины $[Fe^{2+}_{1-x}Fe^{3+}_x(OH)_2]^{x+}[x/2SO_4^{2-}, mH_2O]^{x-}$, полученные при комнатной температуре (298 К) и температуре жидкого азота (78 К), и их параметры. I_S – изомерный сдвиг относительно $\alpha-Fe$, Q_S – квадрупольное расщепление, Γ_{exp} – полная ширина линии на полувысоте, H_{in} – сверхтонкое поле на ядре

| Т, К | Степень окисления железа | Подспектр | I_S | Q_S | Γ_{exp} | H_{in} , кЭ |
|------|--------------------------|-----------|-------|-------|----------------|---------------|
| | | | мм/с | | | |
| 298 | +2 | Д1 | 1,16 | 2,62 | 0,28 | - |
| | +3 | Д2 | 0,36 | 0,50 | 0,34 | - |
| 78 | +2 | Д1 | 1,28 | 2,91 | 0,24 | - |
| | | Д2 | 1,42 | 3,34 | 0,36 | - |
| | +3 | Д3 | 0,46 | 0,50 | 0,34 | - |
| | | С1 | 0,53 | 0,25 | 0,40 | 489 |
| | | С2 | 0,56 | 0,29 | 0,55 | 462 |

Изменение площадей компонентов, отвечающих различным формам, при понижении температуры указывает на различное химическое окружение атомов железа. Согласно данным [201], тот факт, что при понижении температуры от 298 до 78 К площадь компоненты, отвечающей железу (III), не изменяется, свидетельствует о том, что железо входит в состав ионных кислородных соединений, таких как оксиды и гидроксиды железа (III). При этом площадь компоненты, отвечающей железу (II), заметно возрастает при понижении температуры, что характерно для аморфных соединений.

Результаты, полученные при анализе образца зеленой ржавчины, показали, что при охлаждении образца до температуры жидкого азота, величина резонансного поглощения для двухвалентного железа увеличивается почти в два раза, так же, как это происходит с образцом Fe-CHS-05. Вместе с соответствием мессбауэровских параметров это подтверждает предположение о том, что железо (II) стабилизируется в составе гуминовых веществ в виде фрагментов смешанных гидроксисульфатов Fe(II)/Fe(III).

3.2.5 Проведение направленного синтеза соединений Fe-ГВ

Способность ГВ стабилизировать высокодисперсные формы соединений железа может быть использована для создания функциональных производных, в составе которых наночастицы соединений железа защищены от агрегации матрицей ГВ. Основные параметры, влияющие на получение той или иной формы железа это – pH реакционной смеси, соотношение (Fe : ГВ), наличие окислительно-восстановительных агентов. В нашей работе была произведена попытка использования традиционных знаний по превращениям соединений железа в водных растворах для получения высокодисперсных форм заданных соединений железа, стабилизированных ГВ.

Для подробного анализа возможных направлений процессов нами была использована схема, приведенная в работе [168] (Рис. 29).

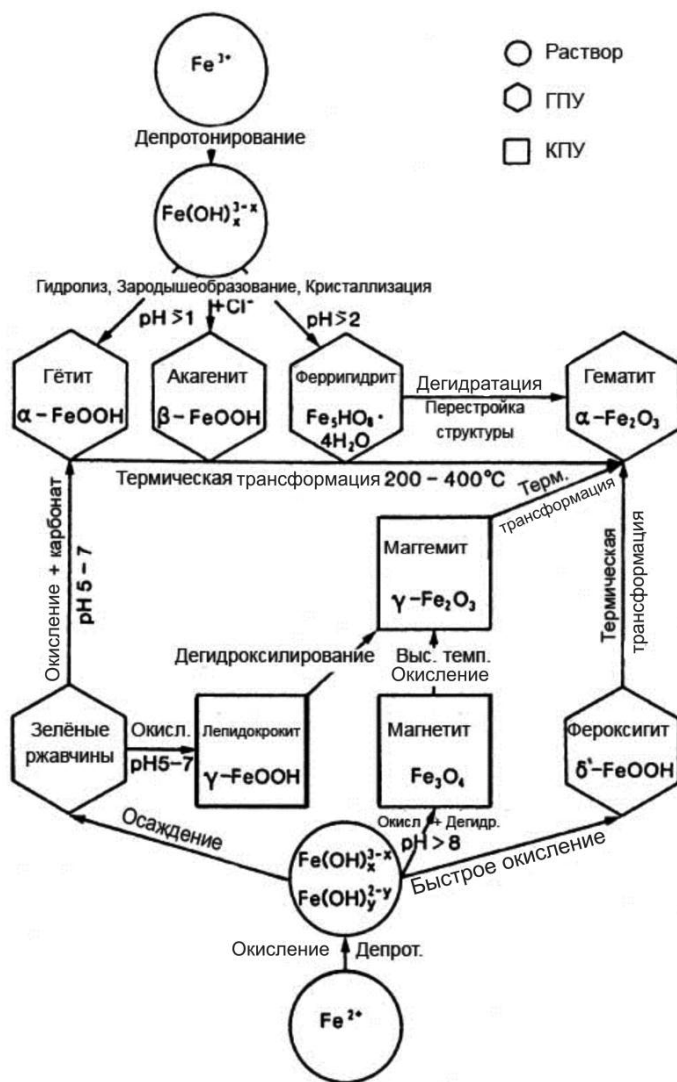


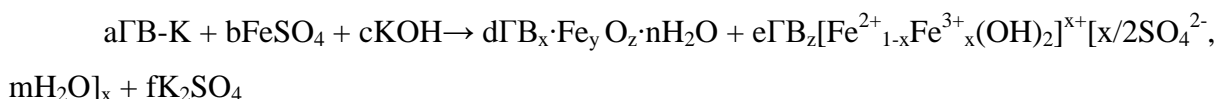
Рис. 29 Схематичное представление основных процессов и путей превращения соединений железа в водных растворах [168].

Согласно схеме, приведенной в работе [168], при внесении солей железа (II) в водные растворы сначала происходит гидролиз и окисление части ионов железа (II), после чего у полученной системы, содержащей растворенные гидроксиды железа (II)/(III), есть несколько возможных путей трансформации. В случае осаждения смешанных гидроксидов, образуются зеленые ржавчины, при окислении которых в нейтральной среде образуется лепидокрокит $\gamma-FeOOH$, а в присутствии карбоната - гетит $\alpha-FeOOH$; при быстром окислении исходного раствора смешанных гидроксидов образуется ферроксигит $\delta'-FeOOH$, а при их окислении в щелочной среде образуется магнетит Fe_2O_3 .

Теоретически, в условиях, в которых получают гуматы железа, наиболее вероятным процессом является образование магнетита (окисление в щелочной

среде) или зеленых ржавчин, которые дальше окисляются до лепидокрокита или гетита (осаждение с последующим окислением).

Как было показано методом мессбауэровской спектроскопии, магнетит в гуматах не образуется: ни в одном образце не было обнаружено параметров, отвечающих магнетиту [168]. В составе гумата железа, синтезированного с использованием серной кислоты, часть железа стабилизируется в виде зеленых ржавчин. Возможно, это объясняется тем, что восстановительные свойства ГВ препятствуют их окислению. При этом часть железа окисляется и переходит в более стабильные гидроксиды и оксиды железа (III). Таким образом, было установлено, что происходит не образование комплексных соединений железо – ГВ, а формирование органо-неорганических соединений железа с ГВ, содержащих как гидратированные оксиды, так и смешанные гидроксисульфаты железа (II)/(III) – зеленые ржавчины. В результате процессы, происходящие в реакционной смеси, могут быть описаны следующей схемой:



Третий путь, показанный на схеме, а именно образование фероксигита в процессе синтеза гуматов железа, сам по себе является менее вероятным, так как для образования фероксигита необходимо быстрое окисление, а присутствие зеленых ржавчин указывает на восстановительную среду. Вместе с тем, при использовании сильного окислителя этот путь тоже может быть реализован. Для проверки данной гипотезы решено было провести направленный синтез наночастиц фероксигита и лепидокрокита в растворах ГВ.

3.2.6 Получение соединений Fe – ГВ на основе γ - и δ -FeOОН

Синтез оксигидроксида железа лепидокрокита (γ -FeOОН) и фероксигита (δ -FeOОН) представлял собой контролируемое окисление хлорида железа (II) в водной среде. Для получения фероксигита проводили быстрое окисление перекисью водорода в щелочной среде, для получения лепидокрокита – медленное (в течение 2-3 часов) окисление кислородом воздуха в нейтральной среде [168]. В ходе предварительных экспериментов было показано, что чистота исходного

хлорида железа (II) имеет большое значение для получения однофазных оксигидроксидов железа и в случае отсутствия хлорида железа (II) высокой квалификации чистоты прекурсор можно получать растворением карбонильного железа в соляной кислоте в инертной атмосфере. Для фероксигита важным аспектом является проведение всех стадий синтеза в инертной атмосфере для предотвращения медленного окисления железа (II), которое приводит к образованию гетита и лепидокрокита (Рис. 30). Для фероксигита был определен оптимальный диапазон рН, в котором получались однофазные образцы, он составлял 8,0-12,0, при снижении рН до 6,0 основным продуктом синтеза оказывался акагенит.

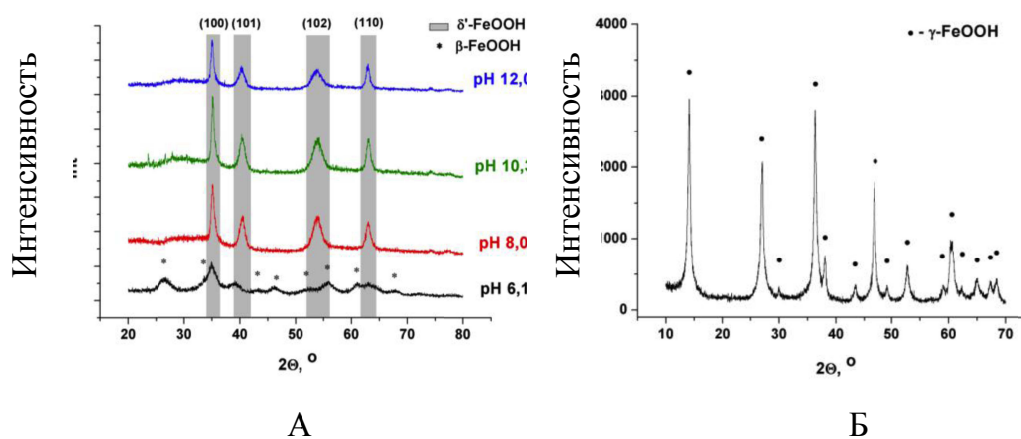


Рис. 30 Дифрактограммы гидратированных оксидов железа: А- наночастицы фероксигита, полученные при различных рН, Б – наночастицы лепидокрокита, полученные при значении рН 7.

Для оценки эффективности ГВ в качестве дисперсионных агентов проводили синтез наночастиц в водных растворах ГВ и сравнивали их характеристики с аналогичными характеристиками наночастиц, полученных в воде без использования стабилизатора. В качестве препарата ГВ был выбран отечественный гумат калия CHS-K, эффективность которого в качестве макролиганда была продемонстрирована ранее. По результатам рентгенофазового анализа было установлено, что присутствие в растворе гумата калия с концентрацией 100 мг/л не препятствует формированию указанных фаз оксигидроксидов железа. При этом ГВ даже в таких невысоких концентрациях выступают в качестве эффективного дисперсионного агента при синтезе

ферроксигита, снижая поперечный размер гексагональных частиц со 160 ± 100 до 20 ± 5 нм (Рис. 31).

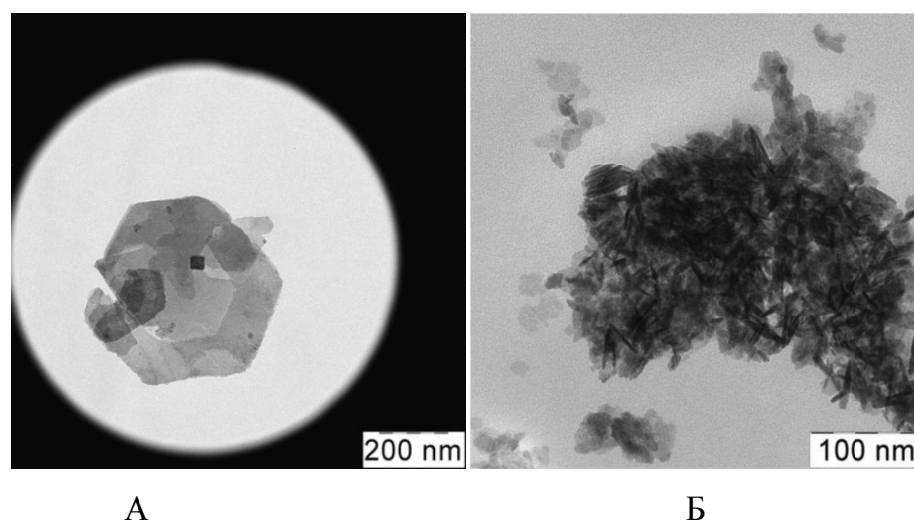


Рис. 31 Микрофотографии ПЭМ ферроксигита, полученного в воде без ГВ (А) и в присутствии ГВ (Б)

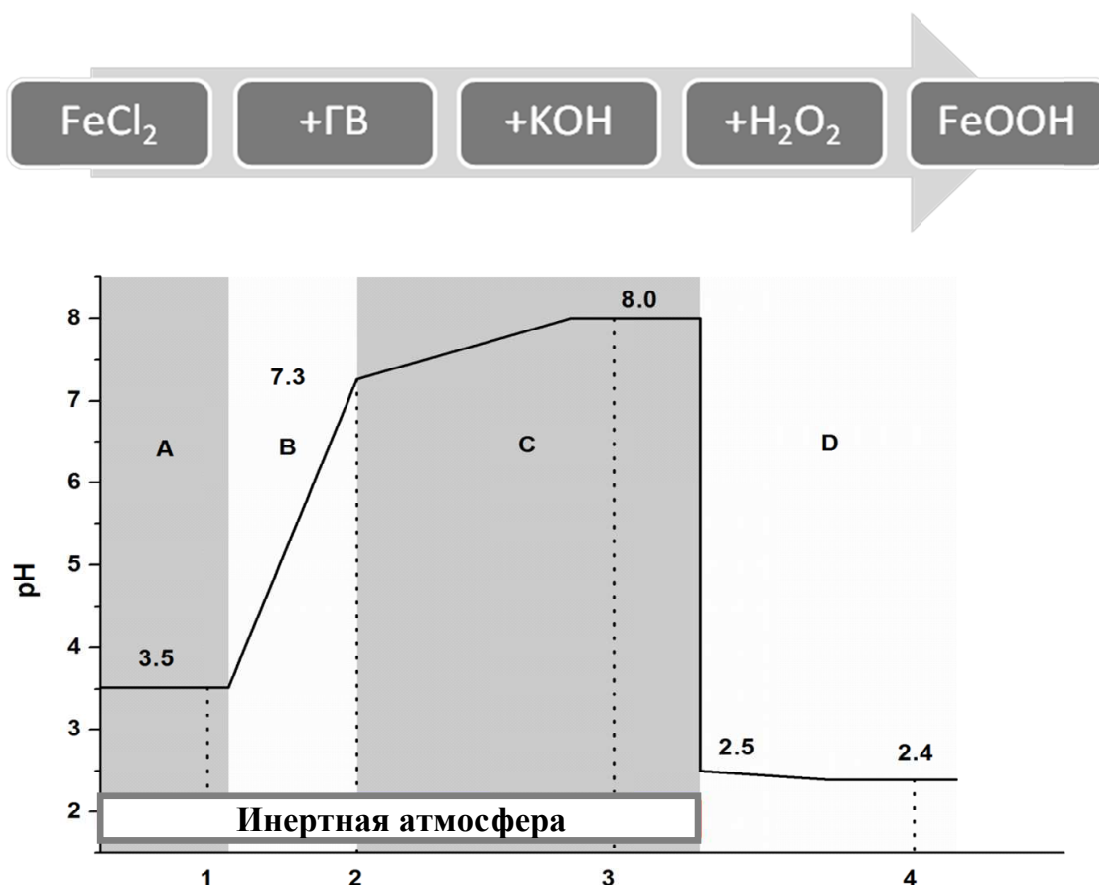
В то же время на размер частиц лепидокрокита, имеющих стержнеобразную морфологию, присутствие ГВ не оказывало заметного влияния. Их продольный размер снизился с 125 ± 70 нм до 110 ± 70 , а поперечный остался тем же - 4 ± 1 нм. Таким образом, было показано, что ГВ могут выступать в качестве эффективного дисперсионного агента при синтезе ферроксигита, но не обладают значимой эффективностью при синтезе оксидной фазы с другой морфологией. Нами было высказано предположение о возможном механизме действия ГВ на рост наночастиц гидратированных оксидов железа (III), согласно которому, присутствие в растворе гуминовых макролигандов затрудняет рост и агрегацию частиц за счет пространственного затруднения диффузии и компенсации положительного заряда на поверхности частиц гидроксидов железа. Первоначально адсорбция ГВ происходит на поверхности гексагональных частиц $\text{Fe}(\text{OH})_2$, и под действием перекиси водорода происходит быстрое окисление железа (II) без изменения пространственной структуры. При синтезе лепидокрокита окисление кислородом воздуха происходит медленнее и уже после агрегации частиц, в результате чего присутствие ГВ не оказывает стабилизирующего действия. Кроме того, имеет значение и щелочность среды, которая влияет как на макролигандные свойства ГВ, так и на скорость гидролиза и окисления ионов железа.

3.2.7 Изучение влияния ГВ на рост частиц ферроксигита с использованием мессбауэровской спектроскопии замороженных растворов

Ранее было показано, что проведение синтеза наночастиц ферроксигита с использованием ГВ в качестве стабилизирующих добавок приводит к снижению размера частиц данного оксидногидроксида железа (III). Чтобы изучить, за счет чего достигается указанный эффект, на каждом этапе синтеза отбирали пробы реакционной смеси, помещали их в пластиковые кюветы для мессбауэровской спектроскопии, замораживали путем погружения в жидкий азот, после чего снимали мессбауэровские спектры при температуре жидкого азота. Техника быстрого замораживания растворов позволяет стабилизировать промежуточные соединения и метастабильные фазы для дальнейшей идентификации.

В качестве контрольного (холостого) опыта была использована аналогичная реакционная смесь, в которую вносили все реагенты, кроме ГВ, в той же последовательности, что и в основном эксперименте.

Порядок внесения реагентов и обеспечение заданного значения рН на каждом отдельном этапе являлись необходимыми условиями для получения заданного конечного продукта. По мере внесения реагентов изменялся цвет и рН реакционной смеси, отражая происходящие в ней процессы. Схема синтеза, изменение рН, а также этапы, на которых проводили отбор аликвот из реакционной смеси, отражены на Рис. 32.



Ход реакции

Рис. 32 Схема, иллюстрирующая порядок внесения реагентов, изменение pH реакционной смеси в процессе синтеза и этапы, на которых производили отбор алиquot для замораживания растворов (алиquotы №№ 1-4)

В дистиллированную воду MQ, через которую пропускали ток аргона, вносили навеску хлорида железа (II) и перемешивали до полного растворения (Зона «А», Рис. 32), далее в реакционную смесь вносили щелочной раствор ГВ (Зона «В»), после чего добавляли KOH до pH 8,0 (Зона «С»), после чего вносили перекись водорода (Зона «D»). До внесения перекиси водорода синтез проводили в инертной атмосфере в потоке аргона. Далее колбу с реакционной смесью оставляли открытой до окончания выделения газа. Мессбаузовские спектры замороженных алиquot реакционной смеси из синтеза с ГВ приведены на Рис. 33 (а-г), спектры алиquot №№ 3 и 4 холостого опыта приведены на Рис. 33 (д, е).

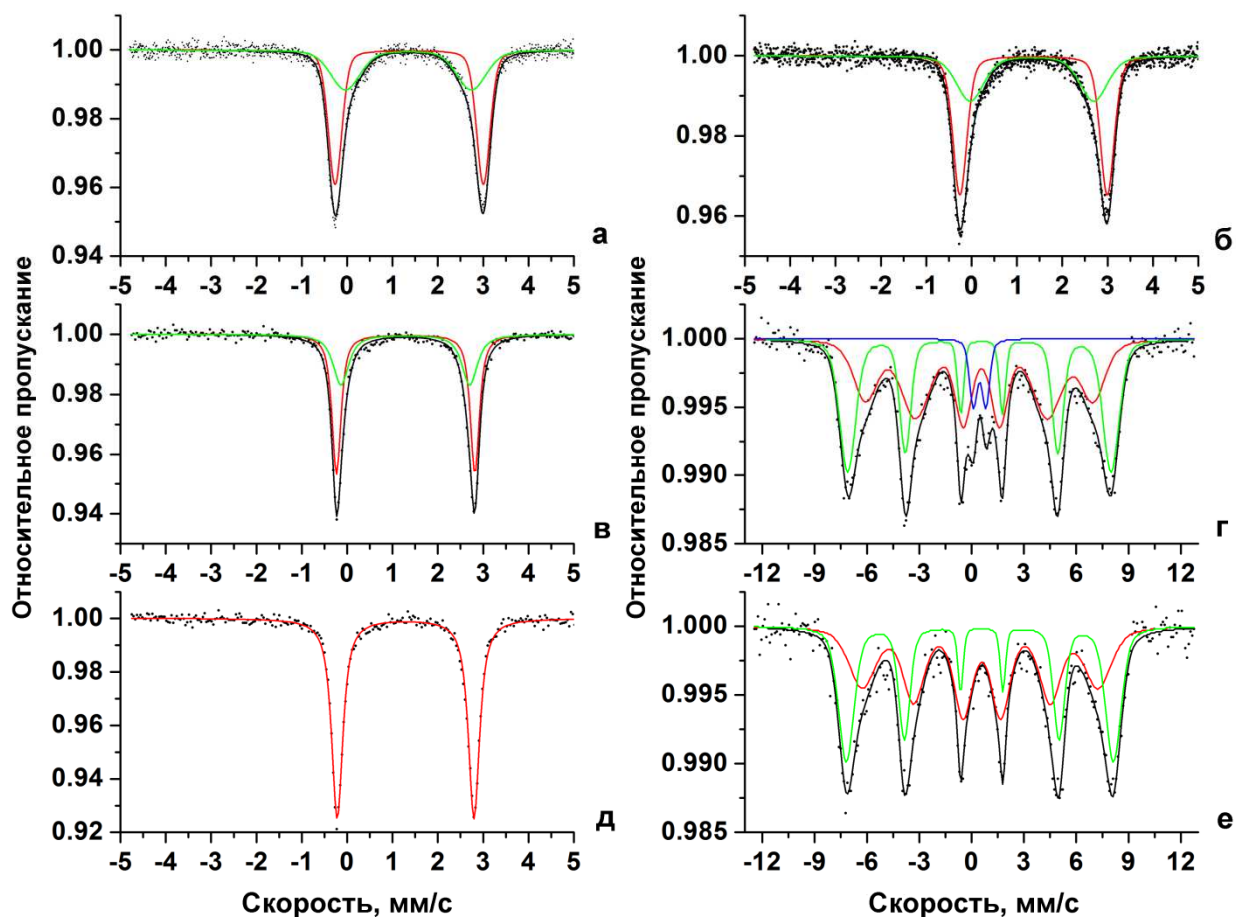


Рис. 33 Мёссбауэровские спектры (78 К) замороженных реакционных смесей: синтез с ГВ а – аликвота № 1, б – аликвота № 2, в – аликвота № 3, г – аликвота № 4, д – холостой опыт, аликвота № 3, е – холостой опыт, аликвота № 4. Чёрные точки – экспериментальный спектр, чёрные линии – расчётные спектры, цветные линии – компоненты расчётных спектров.

Исходный раствор FeCl_2 , приготовленный в инертной атмосфере, имел светло-зеленоватый цвет. Мессбауэровский спектр данного замороженного раствора (Рис. 33а) описывается двумя дублетами с изомерными сдвигами 1,37 мм/с и 1,35 мм/с и квадрупольным расщеплением 3,27 мм/с и 2,78 мм/с, соответственно (компоненты А1 и А2, Таблица 15). Компонент А1 соответствует ионам $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ в кубической фазе льда [205]. Компонент А2 может быть отнесен к гидратам хлорида железа (II) с искаженной октаэдрической структурой $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O}, \text{Cl}_5)^{3-}$, которые образуются при замораживании раствора [206].

После добавления щелочного раствора гумата калия цвет реакционной смеси изменялся на темно-коричневый, рН увеличивался до значения 7,3. Однако мессбауэровский спектр замороженной реакционной смеси (Рис. 33б) практически не отличался от предыдущего (Рис. 33а); параметры компонентов В1 и В2 близки к

параметрам A1 и A2 (Таблица 15), в связи с чем можно предположить, что ни взаимодействия между ГВ и ионами двухвалентного железа, ни образования твердых фаз на этой стадии синтеза не происходит.

Во время постепенного добавления NaOH pH медленно увеличивался, а в реакционной смеси появлялась светлоокрашенная взвесь. Мессбауэровский спектр аликвоты реакционной смеси, отобранной после того, как pH был доведен до 8,0 (Рис. 33в), описывается двумя дублетами с аналогичными параметрами (компоненты C1-C2, Таблица 15), которые близки к параметрам $\text{Fe}(\text{OH})_2$ [207]. При этом аналогичный спектр раствора, не содержащего гуминовых веществ (Рис. 33д), содержит только один компонент C1 с изомерным сдвигом 1,29 мм/с и квадрупольным расщеплением 3,01 мм/с, который был отнесен к образующейся объемной фазе $\text{Fe}(\text{OH})_2$, в то время как компонент C2, приписанный продукту взаимодействия ГВ с поверхностью $\text{Fe}(\text{OH})_2$, отсутствовал. Это указывает на различия в ходе процесса в присутствии и отсутствии ГВ.

После добавления 30% H_2O_2 реакционная смесь стала красновато-коричневого цвета, и её состав резко изменился. Мессбауэровский спектр замороженного образца, отобранного после прекращения интенсивного выделения газа (Рис. 33г), описывается суперпозицией двух секстетов (компоненты D1-D2, Таблица 15), соответствующих магнитоупорядоченному (ферримагнитному) состоянию наночастиц ферроксигита, и одним дуплетом (компонент D3, Таблица 15), который приписали остаточному суперпарамагнитному состоянию с более низкой температурой блокировки. В то же время, спектр образца, не содержащего ГВ (Рис. 33е), имеет только два секстета (компоненты D1-D2, Таблица 15), указывающие на ферримагнитное состояние наночастиц ферроксигита и отсутствие какого-либо остаточного суперпарамагнетизма. Таким образом, в реакционной смеси ГВ предотвращают чрезмерный рост наночастиц ферроксигита, что приводит к снижению температуры блокировки и позволяет сохранить их в суперпарамагнитном состоянии.

Таблица 15 Параметры сверхтонкого взаимодействия ядер железа в замороженных растворах; I_S – изомерный сдвиг относительно α -Fe, Q_S – квадрупольное расщепление, Γ_{exp} – полная ширина линии на полувысоте, H_{in} – сверхтонкое поле на ядре

| Образец/ Температура | Компоненты | I_S | Q_S | Γ_{exp} | H_{in} | S, % |
|-------------------------|------------|-----------------|-------|----------------|------------|-----------|
| | | мм/с | | | кЭ | |
| Эксперимент | | $\pm 0,03$ мм/с | | | ± 5 кЭ | $\pm 1\%$ |
| Аликвота 1 / 78 К | A1 | 1,37 | 3,27 | 0,36 | | 63 |
| | A2 | 1,35 | 2,76 | 0,78 | | 37 |
| Аликвота 2 / 78 К | B1 | 1,37 | 3,25 | 0,37 | | 61 |
| | B2 | 1,33 | 2,73 | 0,73 | | 39 |
| Аликвота 3/ 78 К | C1 | 1,29 | 3,02 | 0,24 | | 62 |
| | C2 | 1,28 | 2,83 | 0,41 | | 38 |
| Аликвота 4 / 78 К | D1 | 0,50 | -0,13 | 1,65 | 405 | 53 |
| | D2 | 0,51 | -0,13 | 1,11 | 470 | 41 |
| | D3 | 0,46 | 0,71 | 0,54 | | 6 |
| Бланк 3 / 78 К | C*1 | 1,29 | 3,01 | 0,30 | | 100 |
| Бланк 4 / 78 К | D*1 | 0,54 | -0,10 | 1,81 | 420 | 56 |
| | D*2 | 0,53 | -0,11 | 1,07 | 475 | 44 |

По результатам исследования форм существования железа в реакционной смеси с использованием мессбауэровской спектроскопии замороженных растворов было высказано предположение, что ГВ взаимодействуют с ультрадисперсным $Fe(OH)_2$ путем модификации поверхности образующихся частиц, сопровождающейся компенсацией поверхностного заряда, что затрудняет дальнейший рост частиц и является отправной точкой в механизме стабилизации ГВ наночастиц в водных растворах. Дальнейшее окисление ионов Fe (II) перекисью водорода происходит без структурных изменений (топотактически) и образующийся фероксигит δ -FeOOH изоструктурен гексагональному $Fe(OH)_2$.

3.2.8 Исследование коллоидной устойчивости суспензий Fe-ГВ

Для оценки возможности практического применения полученных соединений была охарактеризована их агрегативная устойчивость в физиологическом растворе. Суспензию наночастиц фероксигита, полученных в растворе гумата калия, помещали в физиологический раствор (рН 7, ионная сила 150 ммоль/л) и проводили определение содержания железа в суспензии и размер частиц в течение 9 дней. Для сравнения использовали аналогичную суспензию, полученную в воде без использования ГВ, которую также помещали в физиологический раствор.

Результаты исследования коллоидной устойчивости показали: за первые сутки в суспензии устанавливается равновесие, после чего концентрация не изменяется и в течение 9 дней остается на уровне ~ 80% от изначально введенной, в то время как в отсутствие стабилизатора частицы ферроксигита практически полностью осаждаются ко второму дню измерений. Таким образом, было показано, что ГВ значительно повышают агрегативную устойчивость водных суспензий наночастиц ферроксигита при уровне рН и ионной силы, соответствующих физиологическим условиям.

В результате экспериментов по определению стабильности суспензий в присутствии фонового электролита (NaCl) было установлено, что критическая концентрация электролита, при которой фаза медленного осаждения сменяется фазой быстрого осаждения, также называемая *критической концентрацией коагуляции*, составляет 180 ммоль/л, в то время как в отсутствие ГВ аналогичный показатель составлял 30 ммоль/л.

Таким образом, была подтверждена эффективность ГВ в качестве стабилизирующих агентов, определены ключевые стадии процесса, влияющие на получение заданных соединений железа, стабилизированных ГВ, а также показана способность ГВ повышать агрегативную устойчивость водных суспензий наночастиц оксидов железа. Следующим этапом работы была оценка эффективности соединений железа, стабилизированных ГВ, в качестве источников биодоступного железа для растений.

3.3 Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ по отношению к растениям

Для оценки биологической активности веществ, обладающих как угнетающим, так и стимулирующим действием на растения, используют различные методы биотестирования. Одним из наиболее распространенных является *вегетационный* метод, применяемый в растениеводстве, физиологии, селекции, земледелии, почвоведении, агрохимии и экологии [208]. При проведении биотестирования данным способом тест-культуры помещают в небольшие вегетационные сосуды, а далее проводят выращивание растений, продолжительность которого варьируется от нескольких дней до полного

вызревания растений и зависит от целей эксперимента. Вегетационный метод, в отличие от полевого, позволяет выявлять значение отдельных факторов роста в жизни растений и поддерживать одинаковые внешние условия, такие как освещение, температуру, корневое питание и обеспечение растений влагой.

К достоинствам вегетационного метода можно также отнести возможность непрерывного проведения работ вне зависимости от сезона и относительную простоту аппаратного оформления. К недостаткам – ограничения, связанные с невозможностью прямой экстраполяции результатов на природные условия с их изменчивостью, не поддающейся регулированию. В этом смысле полевой метод исследования оказывается вне конкуренции. Вместе с тем, поскольку погодные условия сильно меняются год от года, нельзя ограничиваться данными полевых опытов, относящихся только к одному сезону. Один и тот же полевой опыт необходимо повторять несколько лет подряд, чтобы получить характерные для данных условий результаты, тогда как достоверные результаты при помощи вегетационного метода можно получить за один-два года.

В данной работе нами был использован вегетационный метод в варианте как водных, так и почвенных культур. Водные культуры обычно широко используются для самых разнообразных физиологических исследований, в том числе, для изучения основных процессов поглощения минеральных элементов растениями. Эта разновидность вегетационного метода дает возможность строго контролировать состав питательной среды, что позволяет исследовать процессы поглощения веществ, пути и способы их передвижения в растениях. С другой стороны, почвенные культуры ближе всего к естественным условиям и в этом отношении приближаются к полевому опыту.

Как уже говорилось выше, у растений существует два основных способа поглощения железа, обычно называемые стратегиями I и II [114]. Растения со стратегией I, к которым относятся все двудольные и однодольные, кроме мятликовых [104], способны снижать значение pH в области ризосферы, что способствует восстановлению железа из Fe(III) до Fe(II). Поступление в клетку осуществляется путём связывания с железовосстанавливающими белками, ассоциированными с клеточными мембранами. Растения со стратегией II

(мятликовые) выделяют фитосидерофоры – органические вещества, которые образуют хелатные комплексы с Fe(III).

Влияние стратегии на возможность усваивать железо из различных соединений было наглядно продемонстрировано результатами работы [124]. Было установлено, что при дефиците железа огурцы (стратегия I) наиболее эффективно поглощают его из комплекса с синтетическим хелатами (Fe-ЭДДОА), тогда как ячмень (стратегия II) в таких же условиях поглощал Fe преимущественно из комплексов с сидерофорами [124]. Так как способ поглощения железа может в значительной степени определять эффективность этого процесса, для оценки биологической доступности препаратов необходимо проводить эксперименты с растениями – представителями обеих стратегий.

В нашей работе в качестве тест-объектов использовали растения огурца и мягкой пшеницы, которые являются представителями двух различных стратегий поглощения железа. Растения огурца были выбраны в качестве тест-объекта со стратегией I, а растения пшеницы – в качестве тест-объекта со стратегией II. Обе выбранные культуры имеют важное сельскохозяйственное значение.

Так как в данной работе изучали биологическую доступность железа в составе различных препаратов, необходимо было создать условия, в которых растения испытывали бы дефицит данного микроэлемента. В экспериментах с водными культурами (гидропоникой) контрольные варианты выращивали на питательной среде, содержащей все компоненты, кроме железа, а в остальных вариантах в питательные среды железо вносили в виде исследуемых препаратов. Для предотвращения попадания соединений железа из других источников, питательные среды готовили на высокоочищенной воде MQ с использованием в качестве источников макро- и микроэлементов солей с квалификацией чистоты «х.ч.» и «ч.д.а.».

В почвенной культуре в качестве субстрата использовали аридные почвы, которые характеризовались высокими значениями рН почвенного раствора ($8,5 \pm 0,1$), высоким содержанием карбонатов (вскипание), что обусловило отсутствие в них биодоступных форм железа. При проведении экспериментов контрольный вариант поливали дистиллированной водой MQ, а остальные варианты – растворами исследуемых препаратов.

В качестве контроля при проведении опытов с водными культурами использовали питательную среду без соединений железа, на почве – дистиллированную воду MQ; в качестве положительного контроля – коммерческий хелат Fe(III) Fe-ЭДДГА. При проведении оценки биологической активности органо-неорганических комплексов железа с ГВ необходимо отделить стимулирующее действие биологически доступных форм железа, которое в условиях эксперимента является лимитирующим фактором для развития растений, от защитного действия ГВ, которое проявляется в стрессовых условиях [74]. Для этой цели в схему эксперимента вводили дополнительно вариант с использованием гумата калия.

Исследование биологической активности по отношению к растениям, испытывающим дефицит железа, проводили для препаратов Fe-CHS-03, Fe-CHS-04 и Fe-CHS-05, так как они были приготовлены на основе отечественного сырья и обладали высокой растворимостью, то есть удовлетворяли всем требованиям для дальнейшего масштабирования.

В качестве показателей, характеризующих эффективность исследуемых препаратов железа, использовали длину и массу корней и побегов. Для характеристики функционального состояния растений использовались такие параметры, как содержание хлорофилла в листьях и эффективность фотосинтеза. О биодоступности железа судили по содержанию железа в листьях. Совокупность выбранных нами характеристик позволяла сделать вывод, насколько эффективно исследуемые препараты устраняют дефицит железа, и оценить возможность их использования в качестве корректоров железодефицитного хлороза.

3.3.1 Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ методом водных культур на растениях огурца

Растения огурца использовали в качестве тест-культуры со стратегией I для оценки биологической доступности железа, стабилизированного в составе соединений с ГВ.

Результаты экспериментов показали, что в выбранных условиях наблюдалось выраженное угнетение контрольных растений, обусловленное отсутствием железа в питательной среде. Все растения характеризовались

пожелтением побегов, нормальная зеленая окраска наблюдалась только у семядолей. Общий вид растений огурца, выращенных методом водной культуры, приведен на Рис. 34.

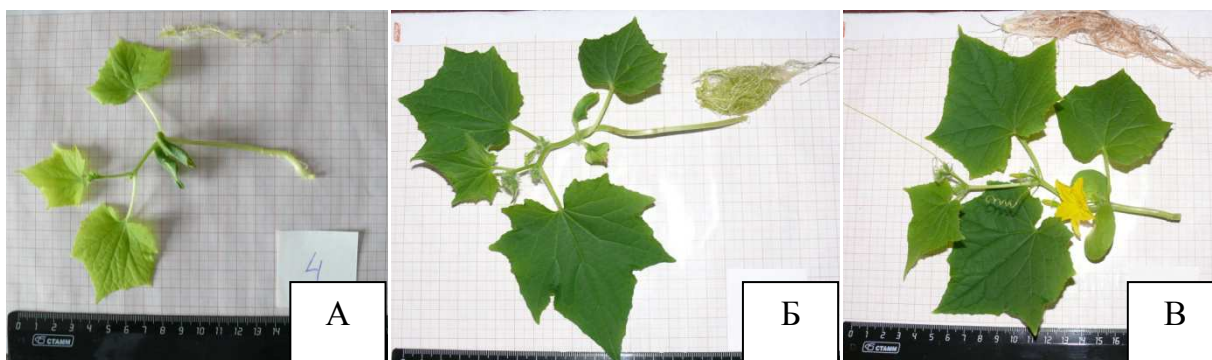


Рис. 34 Общий вид растений огурца контрольного варианта (А), после обработки хелатом Fe-ЭДДГА (Б) и гуматом железа Fe-CHS-04 (В).

Как видно из приведенных фотографий (Рис. 34), внесение исследованных препаратов приводило к выраженному улучшению состояния растений, которое проявлялось в более эффективном накоплении биомассы и быстром развитии, появлении усов и цветов.

Для количественной оценки влияния исследуемых препаратов на накопление биомассы были измерены длина и масса побегов и корней растений. В Таблицах 16 и 17 приведены результаты, демонстрирующие влияние органо-неорганических соединений железа с ГВ на длину и массу побегов и корней огурца в условиях железодефицитного хлороза.

Таблица 16 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, исследованных органо-неорганических соединений железа с ГВ и гумата калия К-CHS на длину и массу побегов огурца

| Вариант | Длина побега | | | Масса побега | | |
|-----------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| | мм | σ , мм | % от контроля | г | σ , г | % от контроля |
| Контроль | 123 | 15 | 100 | 2,42 | 0,43 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 159 | 37 | 129 | 4,24 | 0,56 | 175 |
| Fe-CHS-03 | 137 | 15 | 111 | 4,05 | 0,77 | 167 |
| Fe-CHS-04 | 142 | 20 | 115 | 4,56 | 0,68 | 167 |
| Fe-CHS-05 | 139 | 41 | 113 | 4,29 | 0,57 | 177 |
| К-CHS | 138 | 21 | 112 | 3,94 | 0,73 | 163 |

Таблица 17 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, исследованных соединений железа с ГВ и гумата калия К-CHS на длину и массу корней огурца

| Вариант | Длина корня | | | Масса корня | | |
|-----------|-------------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| | мм | σ , мм | % от контроля | мг | σ , мг | % от контроля |
| Контроль | 113 | 15 | 100 | 0,38 | 0,23 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 215 | 23 | 190 | 1,53 | 0,45 | 399 |
| Fe-CHS-03 | 262 | 45 | 231 | 1,41 | 0,34 | 367 |
| Fe-CHS-04 | 270 | 54 | 239 | 1,73 | 0,44 | 450 |
| Fe-CHS-05 | 291 | 63 | 257 | 1,44 | 0,38 | 375 |
| К-CHS | 175 | 43 | 155 | 1,71 | 0,41 | 445 |

Как видно из приведенных данных, в присутствии исследованных веществ происходило незначительное увеличение длины побегов растений. При этом все исследованные вещества положительно влияли на накопление растениями биомассы. Наиболее сильно это влияние было выражено в варианте с внесением Fe-ЭДДГА и Fe-CHS-05. В присутствии этих препаратов масса побегов составила 175% и 177% от аналогичного показателя для контрольного варианта ¹⁵, тогда как при использовании других органо-неорганических соединений железа с ГВ этот показатель был несколько ниже и составил 167%. Следует отметить, что внесение исходного препарата ГВ, использованного для синтеза органо-неорганических соединений, также оказывало положительное влияние на накопление огурцами биомассы, которая в этом варианте составила 163% от контроля. Это наблюдение хорошо согласуется с данными других авторов, которые обнаружили положительное действие ГВ на растения в условиях недостатка микроэлементов [133].

Кроме того, согласно данным элементного анализа (Таблица 6), препарат К-CHS также содержал незначительное количество железа (1%, масс.), он мог также быть источником биологически доступного железа, поэтому на основании полученных данных трудно сделать однозначный вывод о природе действующего начала ГВ в данном случае. Более корректное обсуждение результатов будет

¹⁵ Здесь и далее: % от значения, полученного для контрольного варианта - % от контроля

σ – стандартное отклонение.

возможно только с учетом данных о накоплении железа тканями растений (см. ниже).

Особое внимание следует обратить на установленное нами положительное влияние исследованных препаратов на развитие корневой системы растений (Таблица 17). Как видно из представленных данных, максимальное положительное влияние на длину корней растений было установлено в варианте с внесением органо-неорганических соединений железа с ГВ, где этот показатель варьировался в диапазоне 231-257% от контроля. Аналогичная величина для варианта с внесением коммерческого хелата железа была несколько ниже и составила 190%. Наименее выраженное влияние на рост корней было отмечено при использовании ГВ, где этот показатель составил 155%. В последнем случае полученные нами данные хорошо согласуются с результатами других исследователей, также отмечавших усиление роста корней в присутствии ГВ.

Увеличение длины корней растений не всегда является признаком, характеризующим улучшение состояния растений. В частности, интенсивный рост корневой системы может быть связан с низкой концентрацией питательных элементов в среде, в связи с чем растения стремятся максимально увеличить площадь корневой поверхности для увеличения поступления питательных элементов. Поэтому при рассмотрении влияния исследуемых веществ на развитие корневой системы следует учитывать также биомассу корней (Таблица 17). Как видно из представленных данных, при использовании синтезированных нами органо-неорганических соединений железа биомасса корней варьировалась в пределах 367-450% от значений, полученных для контрольного варианта, превышая аналогичный показатель для Fe-ЭДДГА (399%) только в случае Fe-CHS-04. При этом сопоставимое значение биомассы корней было также отмечено в варианте с внесением ГВ (455%). Таким образом, полученные результаты являются трудно интерпретируемыми и указывают на необходимость более детального изучения влияния препаратов корректоров-хлороза на функциональное состояние растений, а также способность аккумулировать железо. Растения относятся к фотоавтотрофным организмам, так как они для своей жизнедеятельности используют углекислый газ как основной источник углерода и преобразуют его в органические соединения с помощью фотосинтеза. В связи с

этим оценку функционального состояния растений проводят на основании содержания в них хлорофиллов – основных пигментов, отвечающих за протекание фотосинтеза, а также путем измерения индукции флуоресценции.

Влияние исследованных препаратов на содержание хлорофиллов в растениях огурцов приведено в таблице ниже (Таблица 18).

Таблица 18 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, исследованных органо-неорганических соединений железа с ГВ и гумата калия K-CHS на накопление хлорофиллов *a* и *b* в листьях огурца и их соотношение

| Вариант | Содержание хлорофилла <i>a</i> | | | Содержание хлорофилла <i>b</i> | | | a/b |
|-----------|--------------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|-----------------|---------------|-----|
| | мг/г | σ , мг/г | % от контроля | мг/г | σ , мг/г | % от контроля | |
| Контроль | 0,38 | 0,03 | 100 | 0,22 | 0,01 | 100 | 1,7 |
| Fe-ЭДДГА | 1,40 | 0,19 | 369 | 0,54 | 0,08 | 246 | 2,6 |
| Fe-CHS-03 | 1,03 | 0,61 | 261 | 0,41 | 0,21 | 188 | 2,5 |
| Fe-CHS-04 | 1,36 | 0,16 | 358 | 0,57 | 0,10 | 259 | 2,4 |
| Fe-CHS-05 | 1,58 | 0,06 | 415 | 0,65 | 0,02 | 292 | 2,4 |
| K-CHS | 1,25 | 0,01 | 329 | 0,51 | 0,03 | 231 | 2,5 |

Данные, представленные в таблице (Таблица 18) указывают на то, что все исследованные препараты приводили к увеличению содержания хлорофилла *a* в 2,6-4,2 раза, а хлорофилла *b* в 1,9-2,9 раза. Максимальное влияние на содержание хлорофилла *a* было отмечено для препарата Fe-CHS-10-05 (415%), что превышало эффект действия коммерческого хелата, в присутствии которого содержание хлорофилла *a* возросло до 369% от контроля. Так как среди растительных хлорофиллов именно хлорофилл *a* отвечает за преобразование энергии [209], то полученные результаты указывают на высокую эффективность Fe-CHS-10-05 как корректора хлороза. Следует также отметить, что в присутствии Fe-CHS-10-05 было отмечено также максимальное увеличение содержания хлорофилла *b*, основная функция которого состоит в сборе энергии в составе светособирающего комплекса (ССК) и доставке его к реакционным центрам (РЦ) ЭТЦ.

Следует отметить также выраженное положительное влияние исходного препарата ГВ K-CHS на содержание хлорофилла в растениях, в ряде случаев превосходящее таковое от органо-неорганических соединений железа с ГВ и приближающееся к эффективности коммерческого хелата. Так, содержание хлорофилла *a* в присутствии K-CHS составило 329% от контроля и было лишь

немного ниже, чем в варианте с внесением Fe-ЭДДГА (369%). Принимая во внимание, что содержание железа в ГВ (1% масс) было значительно ниже, чем в коммерческом хелате (6% масс), можно сделать вывод о собственном положительном действии ГВ на растения огурцов в условиях железодефицитного хлороза. Полученные данные хорошо согласуются с результатами предыдущих исследователей, также отмечавших стимулирующее действие гуминовых веществ на растения, особенно, находящиеся в состоянии стресса.

Как видно из приведенных данных, в условиях железодефицитного хлороза растения огурцов обладали крайне низким отношением хлорофиллов a/b – значение этого показателя в контрольном варианте составило 1,7, что значительно ниже его оптимального значения, обычно указываемо в литературе – 3 [210]. Внесение в питательную среду исследованных железосодержащих препаратов приводило к росту соотношения хлорофиллов a/b до значений 2,4-2,6, что также ниже 3; это может указывать на то, что в условиях проведенных экспериментов железодефицитный хлороз снимался лишь частично. Максимальное соотношение хлорофиллов a/b , наблюдалось у растений огурца после применения хелата Fe-ЭДДГА (2,6). Значимых различий между растениями, обработанными гуматами железа (2,4-2,5) и гуматом калия (2,5) выявлено не было, что указывает на роль органической части органо-неорганических соединений в нормализации функционального состояния растений.

Так как именно соотношение хлорофиллов a/b характеризует состояние фотосинтетической системы, можно высказать предположение, что среди исследуемых железосодержащих препаратов максимальная эффективность фотосинтеза будет наблюдаться также в присутствии препарата Fe-ЭДДГА.

Оценку эффективности фотосинтеза растений проводили на основании количественной характеристики флуоресценции хлорофилла, характеризующей скорость нециклического транспорта электронов в ЭТЦ. Результаты представлены в таблице ниже (Таблица 19).

Таблица 19 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, исследованных органо-неорганических соединений железа с ГВ и гумата калия K-CHS на переменную флуоресценцию хлорофилла листьев огурцов в условиях железодефицитного хлороза; водная культура

| Вариант | Fv/Fm | σ , стандартное отклонение | % от контроля |
|-----------|-------|-----------------------------------|---------------|
| Контроль | 0,46 | 0,01 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 0,79 | 0,01 | 171 |
| Fe-CHS-03 | 0,77 | 0,01 | 167 |
| Fe-CHS-04 | 0,78 | 0,01 | 169 |
| Fe-CHS-05 | 0,70 | 0,01 | 156 |
| K-CHS | 0,67 | 0,02 | 146 |

Все исследованные вещества приводили к повышению эффективности фотосинтеза, выраженной в виде квантового выхода флуоресценции – отношения Fv/Fm. По эффективности исследованные препараты можно расположить в следующий ряд:

Fe-ЭДДГА > Fe-CHS-04 > Fe-CHS-03 > Fe-CHS-05 > K-CHS.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что внесение исследуемых препаратов в условиях железодефицитного хлороза приводит к значимому повышению содержанию хлорофилла и эффективности фотосинтеза. Эффективность ГВ и органо-неорганических соединений на их основе по этим показателям не отличалась значимо от хелата железа (III).

На фоне общего стимулирующего действия гуматов железа на растения необходимо было оценить биодоступность железа, содержащегося в этих препаратах. Для этого по окончании эксперимента проводили определение содержания железа в тканях растений (Таблица 20).

Таблица 20 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, исследованных органо-неорганических соединений железа с ГВ и гумата калия K-CHS на накопление железа в листьях огурцов в условиях железодефицитного хлороза; водная культура

| Вариант | Содержание железа | | |
|-----------|-------------------|------------------|---------------|
| | мкг/г | σ , мкг/г | % от контроля |
| Контроль | 67 | 10 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 504 | 30 | 755 |
| Fe-CHS-03 | 270 | 24 | 405 |
| Fe-CHS-04 | 180 | 32 | 269 |
| Fe-CHS-05 | 243 | 31 | 364 |
| K-CHS | 120 | 28 | 180 |

Как видно из данных, представленных в таблице (Таблица 20), максимальное содержание железа было обнаружено в варианте с внесением Fe-ЭДДА (755% от контроля), а минимальное – при внесении гумата калия K-CHS (180% от контроля). Повышение содержания железа в тканях растений при использовании K-CHS свидетельствует о биодоступности эндогенного железа ГВ. Полученные результаты подтверждают данные предыдущих исследователей о возможности поглощения растениями эндогенного железа из ГВ [131], [132].

Препараты Fe-CHS-05 и Fe-CHS-03 приводили к сходному накоплению железа в тканях растений (243-270 мг/г), а наименее эффективным с этой точки зрения оказался препарат Fe-CHS-04 (180 мг/г). При его использовании содержание железа составило 269% от контрольных значений.

Таким образом, на основании полученных результатов трудно дать однозначную сравнительную оценку эффективности синтезированных в работе органо-неорганических соединений железа с ГВ при использовании их в качестве корректоров хлороза. В целом можно говорить, что биологическая эффективность железосодержащих препаратов количественно характеризуется следующими основными показателями: масса корней (МК) и побегов (МП), содержание хлорофилла (Хла и Хлб), отношение хлорофиллов a/b , эффективность квантового выхода флуоресценции (F_v/F_m) и содержание железа в тканях растений (Fe-раст). Кроме того, указанный список должен быть также расширен за счет таких показателей, как растворимость препарата (P) и содержание в нем железа (Fe).

Чем выше значения этих показателей, тем большей эффективностью и перспективностью применения характеризуются те или иные железосодержащие препараты. Поскольку вышеперечисленные параметры имеют отличные друг от друга размерности и не могут подвергаться простому суммированию, то для совокупного учета этих критериев был проведено преобразование их начальных значений в безразмерные [211]. Максимальным значениям показателей были присвоены новые значения, равные единице, а минимальным – ноль. Далее для каждого препарата были рассчитаны новые безразмерные параметры, укладываемые в диапазон от 0 до 1. Суммарный индекс, отражающий эффективность органо-неорганических соединений железа с ГВ, вычисляли на основании следующего уравнения:

$$I = \sqrt{МП_i^2 + ДП_i^2 + МК_i^2 + ДП_i^2 + Хла_i^2 + Хлб_i^2 + (a/b)_i^2 + (Fv/Fm)_i^2 + P_i^2 + Fe_i^2}$$

Полученные результаты по анализу эффективности представлены в таблице ниже (Таблица 21).

Таблица 21 Эффективность соединений железа, стабилизированных ГВ, в качестве корректоров хлороза

| Препарат | I |
|-----------|------|
| Fe-CHS-03 | 1,32 |
| Fe-CHS-04 | 1,85 |
| Fe-CHS-05 | 2,09 |

Таким образом, полученные результаты позволяют расположить исследованные органо-неорганические соединения железа с ГВ в следующий ряд по их эффективности при использовании в качестве корректоров железодефицитного хлороза:

Fe-CHS-10-05 > Fe-CHS-09-04 > Fe-CHS-09-03.

3.3.2 Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ методом водных культур на растениях пшеницы

Для исследования биологической активности органо-неорганических комплексов железа с ГВ был выбран препарат Fe-CHS-10-05, так как он оказался наиболее эффективным препаратом по результатам лабораторно-вегетационных экспериментов с растениями огурцов. Аналогично опытам с огурцами, в качестве контроля использовали приготовленную на MQ питательную среду Кнопа без железа, в качестве положительного контроля – Fe-ЭДДА.

В таблице (Таблица 22) приведены результаты, демонстрирующие влияние хелата железа (III) и гумата железа на длину и массу побегов пшеницы в условиях железодефицитного хлороза, а в следующей таблице (Таблица 23) – аналогичные данные для корней.

Таблица 22 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-10-05 и гумата калия K-CHS на длину и массу побегов пшеницы

| Вариант | Длина побега | | | Масса побега | | |
|-----------|--------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|
| | мм | σ, мм | % от контроля | мг | σ, мг | % от контроля |
| Контроль | 220 | 29 | 100 | 344 | 28 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 268 | 34 | 122 | 557 | 23 | 162 |
| Fe-CHS-05 | 270 | 33 | 122 | 641 | 41 | 187 |

Таблица 23 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-10-05 и гумата калия K-CHS на длину и массу корней пшеницы

| Вариант | Длина корня | | | Масса корня | | |
|-----------|-------------|-------|---------------|-------------|-------|---------------|
| | мм | σ, мм | % от контроля | мг | σ, мг | % от контроля |
| Контроль | 246 | 46 | 100 | 234 | 22 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 233 | 56 | 95 | 160 | 41 | 68 |
| Fe-CHS-05 | 228 | 78 | 91 | 336 | 38 | 143 |

Как видно из представленных данных (Таблица 22, Таблица 23), влияние исследуемых препаратов на длину побегов было незначительным, тогда как масса побегов увеличивалась в 1,6-1,9 раза, что хорошо согласуется с данными, полученными нами ранее для огурцов (Таблица 16). Однако, в отличие от экспериментов с растениями огурцов, влияние железосодержащих препаратов на корневую систему пшеницы было значительно менее выраженным: значение длины корней не отличалось от контрольных вариантов, а выраженную стимуляцию накопления биомассы корней наблюдали только в варианте с внесением Fe-CHS-05.

Установленная меньшая отзывчивость пшеницы к внесению железосодержащих препаратов по сравнению с огурцами может быть связана, прежде всего, с особенностями поступления в них железа. Кроме того, наблюдаемая низкая отзывчивость растений пшеницы к железосодержащим препаратам может быть обусловлена также более медленным переходом пшеницы от гетеротрофного (за счет запасных веществ в зерновке) к автотрофному питанию по сравнению с огурцами. Так как запас питательных веществ в эндосперме однодольных растений (пшеница) значительно выше, чем у двудольных (огурцы), первые могут в течение достаточно продолжительного времени, 10-14 дней, питаться веществами, накопленными в зерновке. Наконец, растения огурца и

пшеницы отличаются также типом прорастания. Для огурцов характерен надземный тип прорастания, при котором растения быстро переходят на автотрофный тип питания, а для пшеницы – подземный, при котором растения в течение длительного времени могут питаться запасом из зерновки [212], что делает их гораздо менее чувствительными к недостатку в среде питательных элементов вообще и железа в частности.

Рассчитанное значение отношения хлорофиллов *a/b* для пшеницы в контрольном варианте составило 2,6 (Таблица 24), в то время как для контрольных растений огурцов – 1,7 (Таблица 18). Это свидетельствует о гораздо меньшем угнетении пшеницы, чем огурцов, в условиях железодефицитного хлороза. Следовательно, отзывчивость растений пшеницы также должна быть меньше. Действительно, при внесении железосодержащих препаратов содержание хлорофилла *a* в растениях огурцов выросло в 3,7-4,2 раза, тогда как при добавлении аналогичных препаратов в питательную среду пшеницы наблюдали рост этого показателя всего в 2,2-2,3 раза. При этом, в связи с более низкой отзывчивостью пшеницы, статистически достоверной разницы между эффективностью коммерческого хелата железа и синтезированным органо-неорганическим соединением обнаружено не было.

Таблица 24 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-05 и гумата калия K-CHS на содержание хлорофиллов *a* и *b* в растениях пшеницы и их соотношение

| Вариант | Содержание хлорофилла <i>a</i> | | | Содержание хлорофилла <i>b</i> | | | <i>a/b</i> |
|-----------|--------------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|-----------------|---------------|------------|
| | мг/г | σ , мг/г | % от контроля | мг/г | σ , мг/г | % от контроля | |
| Контроль | 0,60 | 0,04 | 100 | 0,23 | 0,03 | 100 | 2,6 |
| Fe-ЭДДГА | 1,34 | 0,03 | 225 | 0,48 | 0,01 | 221 | 2,8 |
| Fe-CHS-05 | 1,30 | 0,08 | 216 | 0,47 | 0,01 | 212 | 2,8 |

Таблица 25 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-05 и гумата калия K-CHS на переменную флуоресценцию хлорофилла листьев пшеницы в условиях железодефицитного хлороза; водная культура

| Вариант | Fv/Fm | σ , стандартное отклонение | % от контроля |
|-----------|-------|-----------------------------------|---------------|
| Контроль | 0,68 | 0,04 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 0,78 | 0,01 | 113 |
| Fe-CHS-05 | 0,785 | 0,007 | 114 |

Данные по влиянию исследованных препаратов на накопление железа растениями пшеницы представлены ниже (Таблица 26).

Таблица 26 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-05 и гумата калия K-CHS на накопление железа в растениях пшеницы в условиях железодефицитного хлороза; водная культура

| Вариант | Содержание железа | | |
|-----------|-------------------|------------------|---------------|
| | мкг/г | σ , мкг/г | % от контроля |
| Контроль | 68 | 10 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 122 | 16 | 180 |
| Fe-CHS-05 | 105 | 12 | 157 |
| K-CHS | 80 | 5 | 118 |

Как видно из данных (Таблица 26), внесение обоих исследуемых препаратов привело к увеличению содержания железа в тканях растений. Использование Fe-ЭДДГА вызывало повышение количества железа до 180% от контроля, аналогичный показатель для Fe-CHS-10-05 составил 157%. При сравнении полученных результатов с данными, приведенными в Таблице 20, видно, что эффективность исследуемых препаратов в случае с огурцами была значительно выше. При внесении хелата железа наблюдали увеличение содержания железа в тканях огурца до 755%, а при использовании гумата – до 364%. При этом содержание железа в тканях контрольных растений практически не различалось и составляло 67 мг/кг для огурцов и 68 мг/кг для пшеницы. Следовательно, полученные нами результаты указывают также на гораздо меньшую потребность пшеницы, чем огурцов, в железе.

На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что пшеница характеризуется гораздо меньшей, чем огурцы, отзывчивостью к железосодержащим препаратам в условиях железодефицитного хлороза, что обусловлено биологическими особенностями пшеницы, такими как большая продолжительность стадии гетеротрофного питания, меньшая потребность в железе и пр. Так как целью следующего этапа работ было исследование действия органо-неорганических соединений железа с ГВ в условиях почвы, где в силу возможных сорбционных процессов эффективность железосодержащих препаратов

может значительно снижаться, то для проведения лабораторно-вегетационных экспериментов в варианте почвенной культуры в качестве тест-растения нами были использованы огурцы. Следует отметить, что испытаниям гуматов железа в качестве корректоров хлороза на почве посвящены лишь единичные работы [124].

3.3.3 Исследование биологической активности соединений Fe-ГВ методом почвенных культур

Эксперименты на почвенном субстрате проводили с использованием аридных пустынных почв. Усредненный почвенный субстрат характеризовался неоднородной окраской с преобладающим очень бледно-коричневым 10YR7/3 цветом фона и разнообразными вкраплениями белого, розового, серого, палевого цвета (вкрапления составляли около 15% по площади). Гранулометрический состав: средний песчанистый суглинок. Структура: средне-, крупно- и мелкоореховатая, с включениями неясно выраженных призм и плит и содержанием пыли более 50%. Сложение: рыхлое, с включениями камней неправильной формы размером до 50 мм. Вскипание: вскипает; рН $8,5 \pm 0,1$, электропроводность 0,7 мСм/см. Данные по влиянию исследованных препаратов на длину и массу побегов приведены ниже (Таблица 27).

Таблица 27 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-05 и гумата калия K-CHS на длину и массу побегов огурца, почвенная культура

| Вариант | Длина побегов | | | Масса побегов | | |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | мм | σ , мм | % от контроля | г | σ , г | % от контроля |
| Контроль | 56 | 16 | 100 | 1,350 | 0,238 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 68 | 14 | 122 | 1,219 | 0,653 | 90 |
| Fe-CHS-05 | 65 | 9 | 117 | 1,122 | 0,081 | 83 |
| K-CHS | 72 | 8 | 130 | 1,453 | 0,428 | 108 |

Как видно из Таблицы 27 в условиях почвенной культуры ни один из исследованных препаратов не оказывал значимого влияния на длину и биомассу растений огурцов. Кроме того, длина побегов (56-72) мм и накопленная биомасса: (1,12-1,45) г значительно уступали таковым для растений, выращенных методом водной культуры (123-159) мм, и (2,42-4,56) г, соответственно. По-видимому, это связано с общим угнетенным состоянием растений, которое может быть вызвано общим недостатком элементов питания, а не только железа.

Для оценки функционального состояния растений было проведено определение содержания хлорофиллов *a* и *b* и их отношения. Данные по влиянию исследованных препаратов на накопление хлорофиллов *a* и *b* и их отношение приведены в Таблице 28.

Таблица 28 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-05 и гумата калия K-CHS на содержание хлорофиллов *a* и *b* в растениях огурца и их соотношение, почвенная культура

| Вариант | Содержание хлорофилла <i>a</i> | | | Содержание хлорофилла <i>b</i> | | | a/b |
|-----------|--------------------------------|---------|---------------|--------------------------------|---------|---------------|-----|
| | мг/г | σ, мг/г | % от контроля | мг/г | σ, мг/г | % от контроля | |
| Контроль | 0,38 | 0,01 | 100 | 0,24 | 0,02 | 100 | 1,6 |
| Fe-ЭДДГА | 0,51 | 0,08 | 136 | 0,26 | 0,04 | 109 | 2,0 |
| Fe-CHS-05 | 0,39 | 0,05 | 103 | 0,21 | 0,04 | 87 | 1,9 |
| K-CHS | 0,46 | 0,08 | 123 | 0,22 | 0,02 | 94 | 2,1 |

Как видно из представленных данных (Таблица 28), из исследованных препаратов выраженное влияние было отмечено только для Fe-ЭДДГА в присутствии которого происходило увеличение содержания хлорофилла *a* до 136% от контрольной величины, при этом в абсолютных значениях содержание хлорофилла *a* составило 0,51 мг/г. При этом содержание хлорофилла в растениях, выращенных на почвенной культуре, значительно ниже такового для водной культуры. Следует отметить, однако, что использование исследуемых препаратов привело к возрастанию такой характеристики функционального состояния растений как отношение хлорофиллов *a/b* с 1,6 до 1,9-2,0. Это свидетельствует о наличии положительного влияния исследуемых препаратов на огурцы при железодефицитном хлорозе в условиях почвенной культуры и о необходимости проведения дополнительных исследований в этом направлении. Функциональное состояние растений, оцениваемое на основании показателя отношения хлорофиллов *a/b*, в условиях водных культур даже при более низком содержании железа было лучше. Этот показатель при использовании Fe-ЭДДГА в водной культуре составил 2,6 (Таблица 18), а в почвенной – 1,9 (Таблица 28).

Таблица 29 Влияние хелата Fe-ЭДДГА, гумата железа Fe-CHS-10-05 и гумата калия K-CHS на переменную флуоресценцию хлорофилла листьев огурца в условиях железодефицитного хлороза; почвенная культура

| Вариант | Fv/Fm | σ , стандартное отклонение | % от контроля |
|-----------|-------|-----------------------------------|---------------|
| Контроль | 0,71 | 0,03 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 0,67 | 0,03 | 95 |
| Fe-CHS-05 | 0,68 | 0,04 | 96 |
| K-CHS | 0,71 | 0,03 | 100 |

О перспективности дальнейшего изучения железосодержащих препаратов на основе ГВ свидетельствуют также приведенные ниже данные по содержанию железа в тканях растений (Таблица 30).

Таблица 30 Влияние хелата, гумата железа на содержание железа в растениях огурца, почвенная культура.

| Вариант | Содержание железа | | |
|-----------|-------------------|------------------|---------------|
| | мкг/г | σ , мкг/г | % от контроля |
| Контроль | 94, | 0,3 | 100 |
| Fe-ЭДДГА | 1350 | 55,1 | 1435 |
| Fe-CHS-05 | 143 | 23,0 | 152 |
| K-CHS | 107 | 8,9 | 113 |

Данные, представленные в приведенной выше Таблице 30, указывают на относительно высокую эффективность Fe-ЭДДГА в условиях проводимого эксперимента. При его почвенном использовании содержание железа в тканях огурцов составило 1435% от контроля, или 1350 мг/кг в абсолютном значении. Следует отметить, что при проведении экспериментов в водных культурах аналогичный показатель для хелата составлял всего 504 мг/кг, т.е. почти в 3 раза ниже. Кроме того, данный уровень заметно превышает физиологически нормальный уровень содержания железа в растениях огурца, составляющий около 70 мг/кг. Наблюдаемое избыточное поглощение железа может быть вызвано недостатком других микроэлементов, таких как фосфор, калий и цинк в питании растений, наблюдается избыточное поглощение железа с превышением содержания железа до трех раз. Также одним из возможных объяснений высокого содержания железа в растениях, обработанных хелатом Fe-ЭДДГА, может быть усиление фитоэкстракции железа из почвы. Согласно механизму, предложенному в работах [213], [214], [215], под воздействием синтетических хелатирующих агентов, таких как ЭДТА, ЭДГГА и других происходит переход в биологически доступную форму

содержащихся в почве металлов. Препарат Fe-ЭДДГА, как и большая часть аналогичных комплексонов является нестехиометрическими хелатами [118], в которых часть металлсвязывающих центров (карбоксильных и аминогрупп) свободна или занята ионами натрия, в связи с чем он может оказывать действие, сходное с исходным комплексоном ЭДДГА.

Усиление фитоэкстракции металлов из почв может быть эффективно использовано при рекультивации территорий, загрязненных тяжелыми металлами, однако может быть опасным при выращивании растений, предназначенных для употребления в пищу, так как перевод в биологически доступную форму с последующим накоплением в растениях происходит также и для токсичных металлов. С другой стороны, избыточное поглощение железа в условиях дефицита по другим микроэлементам может быть использовано для создания пищи, искусственно обогащенной данным микроэлементом, как предложено в работе [112].

В отличие от Fe-ЭДДГА усиленного поглощения железа растениями огурцов в присутствии Fe-CHS-05 установлено не было. Однако проведенные эксперименты с почвенной культурой указывают на значительное снижение биодоступности железа в условиях выбранных почв. Так, в условиях гидропоники в присутствии этого гумата концентрация железа в тканях огурца составляла 243 мг/кг, а при внесении в почву эта величина составила 143 мг/кг, что составило 364 и 152% соответственно. Также необходимо отметить, что содержание железа в растениях контрольной группы (94 мкг/г) в условиях почвенной культуры выше такового для растений огурца контрольной группы водной культуры (67 мкг/г). Это свидетельствует о том, что дефицит железа у растений, выращиваемых на данных почвах, не так выражен, как при вегетации на водной культуре. Наблюдаемая низкая эффективность железосодержащих препаратов обусловлена ещё и тем, что использованные нами почвы являются также дефицитными по еще одному или более микроэлементам.

Таким образом, проведенные эксперименты в условиях железodefицитного хлороза на почве показали незначительную эффективность как синтезированного гумата железа, так и коммерческого хелата железа, что обусловлено, по-видимому, недостатком других микроэлементов в доступной для растений форме в данной

почве. Тем не менее, сравнительная оценка функционального состояния контрольных и обработанных железосодержащими препаратами растений указывает на необходимость продолжения дальнейших исследований, направленных на получение, характеристику и оценку эффективности органо-неорганических соединений на основе ГВ и комплекса необходимых микроэлементов.

3.3.4 Исследование цитотоксичности соединений Fe - ГВ

3.3.4.1 Оценка цитотоксичности соединений железа, стабилизированных гуминовыми веществами с использованием МТТ-теста

Для выявления цитотоксичности веществ в последнее время все шире применяют различные методы, основанные на окрашивании клеток определенными красителями, с последующей экстракцией красителя из клеток органическим растворителем и дальнейшим определением его концентрации с помощью спектрофотометрических методов. На этом принципе основан так называемый МТТ-тест, ставший в настоящее время стандартным в цитотоксических исследованиях и позволяющий с большой точностью и в короткие сроки определять количество жизнеспособных клеток [216].

МТТ-тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ (в частности, сукцинатдегидрогеназы) восстанавливать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) до водонерастворимого темноокрашенного формазана, который кристаллизуется внутри клетки. Далее формазан может быть элюирован из клеток с помощью органических растворителей. Перевод формазана в растворенное состояние может быть осуществлен с помощью органических растворителей (изопропанол, ДМСО, ДМФА). Так как только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять реакцию восстановления МТТ до формазана, то интенсивность окраски получаемого элюата прямо связана со степенью неповрежденности митохондрий. Установлено, что оптическая плотность элюатов при длине волны излучения 570 нм (максимум поглощения формазана) пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в образце. Таким образом, данный метод позволяет по оптической плотности солюбилизированного красителя в элюате оценивать

количество жизнеспособных клеток в исследуемом образце. Вывод о цитотоксичности исследуемого вещества делают на основании сопоставления изменения оптической плотности элюата из обработанных исследуемым веществом клеток по отношению к элюату из контрольных клеток [217]. МТТ-тест технически прост, чувствителен и воспроизводим, однако для решения каждой конкретной экспериментальной или клинико-диагностической задачи в ряде случаев требуется его оптимизация.

В нашей работе для оценки цитотоксичности органо-неорганических соединений железа с ГВ использовали клон-пролиферирующие эпителиальные клетки карциномы гортани человека линии HEp-2. Выбор этого типа клеток был обусловлен тем, что они характеризуются большим размером ядра, что обеспечивает возможность легкой визуализации клеточной морфологии и повышает оценочные параметры [218].

Исследование цитотоксичности проводили для трех препаратов органо-неорганических соединений железа с ГВ:

- Fe-CHS-05 как наиболее биологически активное органо-неорганическое соединение ГВ с железом в виде «зеленой ржавчины»;
- Numiron как коммерчески доступное органо-неорганическое соединение ГВ с железом в виде гидроксидов железа (III);
- δ FeOОН в ГВ (1000) как органо-неорганическое соединение ГВ с железом в виде ферроксигита.

В качестве дополнительных контрольных вариантов в схему эксперимента вводили также исходный препарат ГК и ферроксигит δ FeOОН.

Культуры клеток линии HEp-2 высевали в лунки 96-и луночного планшета и через 3 ч вносили исследуемые органо-неорганические соединения. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в среде ДМЕМ/F12, содержащей 0,5% FBS. Затем клетки инкубировали в течение 24 и 72 ч, и по окончании инкубирования проводили МТТ-тест. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм в лунках 96 луночного планшета с помощью фотометра 680 BIO-RAD (США).

Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунке (Рис. 35).

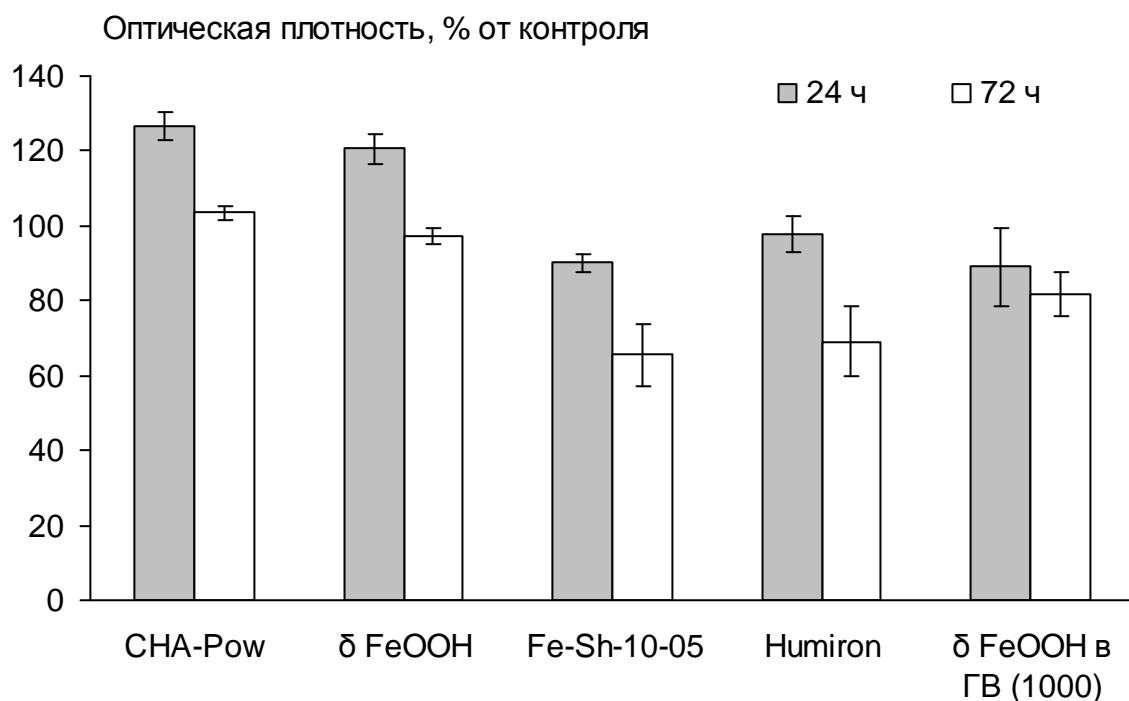
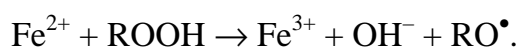
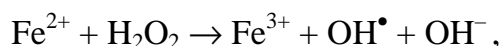
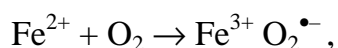


Рис. 35 Влияние ГК, δ FeOON и соединений Fe-ГВ на оптическую плотность элюатов в МТТ-тесте.

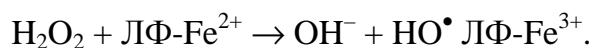
Как видно из полученных данных, через 24 ч инкубирования ни одно из исследованных органо-неорганических соединений не влияло на жизнеспособность эпителиальных клеток, что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности. Оптическая плотность элюатов при обработке клеток варьировалась в диапазоне $(90 \pm 10)\%$ – $(98 \pm 5)\%$ от контроля и значимо не отличалась от него. При увеличении периода инкубирования до 72 ч было отмечено, что внесение Fe-CHS-10-05 и Humiron приводило к значимому снижению оптической плотности элюата до $(66 \pm 8)\%$ и $(69 \pm 9)\%$ от контроля соответственно, что указывает на снижение жизнеспособности клеток в присутствии этих соединений. Для препарата δ FeOON в ГВ (1000) по результатам МТТ-теста цитотоксичность была выражена несколько ниже: оптическая плотность в присутствии этого препарата составила $(80 \pm 10)\%$ от контроля. Влияния ГК и гидроксида железа δ -FeOON на жизнеспособность клеток через 72 ч после инкубации отмечено не было.

Полученные результаты могут указывать на увеличение биодоступности железа в составе органо-неорганических соединениях железа в ГВ. Можно предположить, что повышение концентрации железа в эпителиальных клетках сопровождается ингибированием сукцинатдегидрогеназы, ответственной за

восстановление МТТ до формазана. В настоящее время известно, что железо, особенно железо (II), является индуктором перекисного окисления липидов (ПОЛ) за счет участия железа в активации и регуляции свободнорадикальных процессов в биологических системах, причем для инициации реакций свободнорадикального окисления необходимо присутствие как кислородных радикалов, так и ионов железа [219]. Непосредственным цитотоксическим эффектом обладают ионы Fe^{2+} , которые могут вызывать образование свободных радикалов по одной из следующих реакций [219]:



Однако избыточная концентрация Fe^{3+} также может влиять на свободнорадикальные процессы, происходящие в клетке. В частности, одним из переносчиков железа в клетке наряду с апотрансферрином является лактоферрин (ЛФ) – белок с молекулярной массой 78 кДа, связывающий два иона Fe^{3+} . В связи с тем, что в составе комплекса с ЛФ железо способно к переходу Fe^{3+}/Fe^{2+} , то особенностью ЛФ является его участие в качестве катализатора в образовании такой активной формы кислорода (АФК) как гидроксильной радикал [219]:



Механизм этого процесса аналогичен реакции Фентона. Однако процесс, катализируемый ЛФ, характеризуется 5000-кратным увеличением константы скорости продукции HO^{\bullet} .

Таким образом, увеличение содержания железа в клетках может сопровождаться усиленной продукцией АФК. АФК, в свою очередь, являются выраженными ингибиторами сукцинатдегидрогеназы [220]. Следовательно, наблюдаемый эффект снижения жизнеспособности эпителиальных клеток в присутствии органо-неорганических соединений железа и ГВ может быть обусловлен биодоступностью железа в составе этих соединений. Однако окончательная проверка высказанной гипотезы требует проведения дополнительных экспериментов, направленных, с одной стороны, на изучение

концентрационной зависимости наблюдаемого цитотоксического эффекта, а, с другой – на выявление его механизма.

Особое внимание следует обратить на обнаруженную стимулирующую активность ГВ и δ -FeOОН по отношению к клеткам эпителия. Оптическая плотность в присутствии ГК и δ FeOОН через 24 ч инкубирования составила $(127\pm 4)\%$ и $(121\pm 4)\%$ от контроля, соответственно, что указывает на выраженную стимулирующую активность этих препаратов в данных условиях. Можно предположить, что ГК и δ -FeOОН либо способствуют выживаемости клеток при проведении эксперимента, либо способствуют их усиленной пролиферации. Чтобы оценить влияние исследуемых препаратов на пролиферацию клеток, нами было рассчитано увеличение количества жизнеспособных клеток в течение опыта. Так как оптическая плотность элюата соответствует количеству жизнеспособных клеток в образце, то увеличение количества клеток за 48 ч рассчитывали на основании отношения оптических плотностей элюатов через 24 и 72 ч (Таблица 31).

Таблица 31 Увеличение количества эпителиальных клеток в присутствии ГК, δ FeOОН и соединений Fe-ГВ за 48 ч по результатам МТТ-теста

| Вариант | Увеличение количества клеток, разы | σ |
|----------------------------|------------------------------------|----------|
| Контроль | 2,3 | 0,1 |
| H-CHS | 1,92 | 0,06 |
| δ FeOОН | 1,89 | 0,07 |
| Fe-CHS-05 | 1,7 | 0,1 |
| Humiron | 1,7 | 0,2 |
| δ FeOОН в ГВ (1000) | 2,2 | 0,2 |

σ – стандартное отклонение

Данные таблицы (Таблица 31) показывают, что внесение как препарата ГК, так и δ FeOОН не приводило к усилению пролиферации клеток, а, наоборот, снижало скорость роста клеток. Следовательно, можно высказать предположение, что установленная стимулирующая активность ГК и δ FeOОН обусловлена их положительным влиянием на выживаемости клеток.

Данные, представленные в Таблице 31, могут служить косвенным подтверждением высказанного нами ранее предположения о биодоступности железа в исследуемых органо-неорганических соединений железа с ГВ: внесение этих препаратов приводило к снижению скорости роста эпителиальных клеток.

Исключение составил препарат δ FeOОН в ГВ (1000), который не влиял значимо на скорость роста клеток.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что внесение исследуемых органо-неорганических соединений железа приводит к снижению оптической плотности элюатов, обусловленной, по-видимому, биологической доступностью железа в составе этих соединений. Показано, что наблюдаемый эффект приводит к снижению скорости роста эпителиальных клеток. Однако, наряду с этим можно ожидать также и уменьшения количества жизнеспособных клеток в популяции в присутствии исследуемых соединений. Для проверки этого предположения далее нами были проведены эксперименты, направленные на оценку относительного содержания живых клеток методом прижизненного окрашивания.

3.3.4.2 Оценка цитотоксичности соединений Fe-ГВ методом прижизненного окрашивания

Для оценки количества живых клеток в популяции в настоящее время применяют различные методы, основанные на использовании флюорохромов – специфических красителей, связывающихся с различными компонентами клеток (целевыми биомолекулами). Одним из наиболее широко используемых маркеров жизнеспособности, определяемых с помощью флюорохромов, является мембранная целостность [221], [222], [209], [223]. Для определения мембранной целостности используется свойство некоторых флюорохромов проникать выборочно только через поврежденные мембраны клеток, окрашивая внутриклеточные структуры в соответствующий цвет. Так, проникновение ряда нуклеоидных красителей, таких как йодид пропидия или бромид этидия, внутрь клетки происходит только при поврежденной клеточной мембране, при этом связанные с ними нуклеиновые кислоты дают эмиссию флюоресценции красного цвета. Это свойство используется для выявления жизнеспособных клеток в гетерогенных популяциях, для чего применяется дополнительная окраска красителями типа Syto. На этой основе работает LIVE/DEAD (живой/мертвый) краситель BacLight, представляющий собой смесь красок, с помощью которых можно отличать жизнеспособные клетки от мертвых [224]. Краситель содержит два окрашивающих нуклеоид компонента. Зеленый низкомолекулярный флюорохром

(Syto 9) может проникать как в живые клетки с неповрежденной плазмалеммой, так и в мертвые клетки с нарушенными плазматическими мембранами. После поступления Syto 9 в клетки он связывается с нуклеиновыми кислотами с образованием зеленого флуоресцирующего комплекса. Высокомолекулярный красный флюорохром йодид пропидия, в свою очередь, проникает только через поврежденные мембраны. После поступления он также связывается с нуклеиновыми кислотами, что приводит к снижению флуоресценции в зеленой области, обусловленной комплексами Syto 9 с нуклеиновыми кислотами, и появлению флуоресценции в красной области, вызываемой комплексами йодида пропидия. Таким образом, клетки, проинкубированные в присутствии этих красок одновременно, будут флуоресцировать зеленым (жизнеспособные) или красным (мертвые) в зависимости от их жизнеспособности [225]. Далее можно провести подсчет живых и мертвых клеток с использованием флуоресцентного микроскопа.

В нашей работе оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием метода флуоресцентного окрашивания клеток набором L-7007 (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen). Культивирование эпителиальных клеток линии HEp-2 проводили на поверхности или в объеме исследуемых материалов. После 24 ч и 72 ч культивирования учитывали количество живых и мертвых клеток с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200, возбуждение флуоресценции проводили при $\lambda_{ex} = 470$ нм. Наряду с учетом количества жизнеспособных клеток оценивали также морфологию клеток, их способность к адгезии и распластыванию. Характерный вид клеток, культивируемых в среде с добавлением препаратов железа, представлен на микрофотографиях на Рисунках 36 и 37.

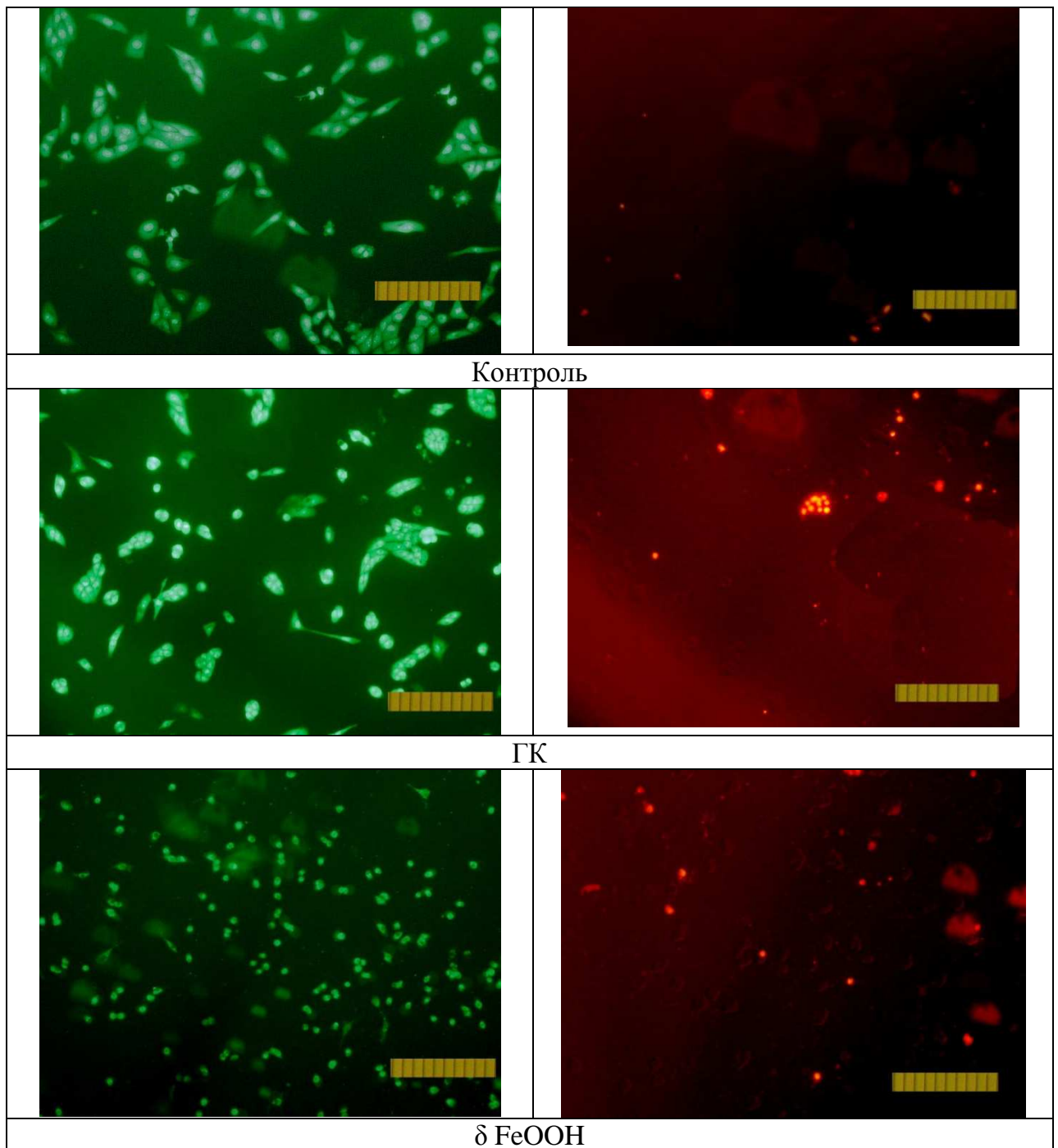


Рис. 36 Внешний вид эпителиальных клеток линии HEp-2, культивируемых в контроле, среде с добавлением ГК и δ FeOOH. Флуоресцентное окрашивание SYTO 9 (слева) и иодидом пропидия (справа). Увеличение 200х. Линейка 100 мкм.

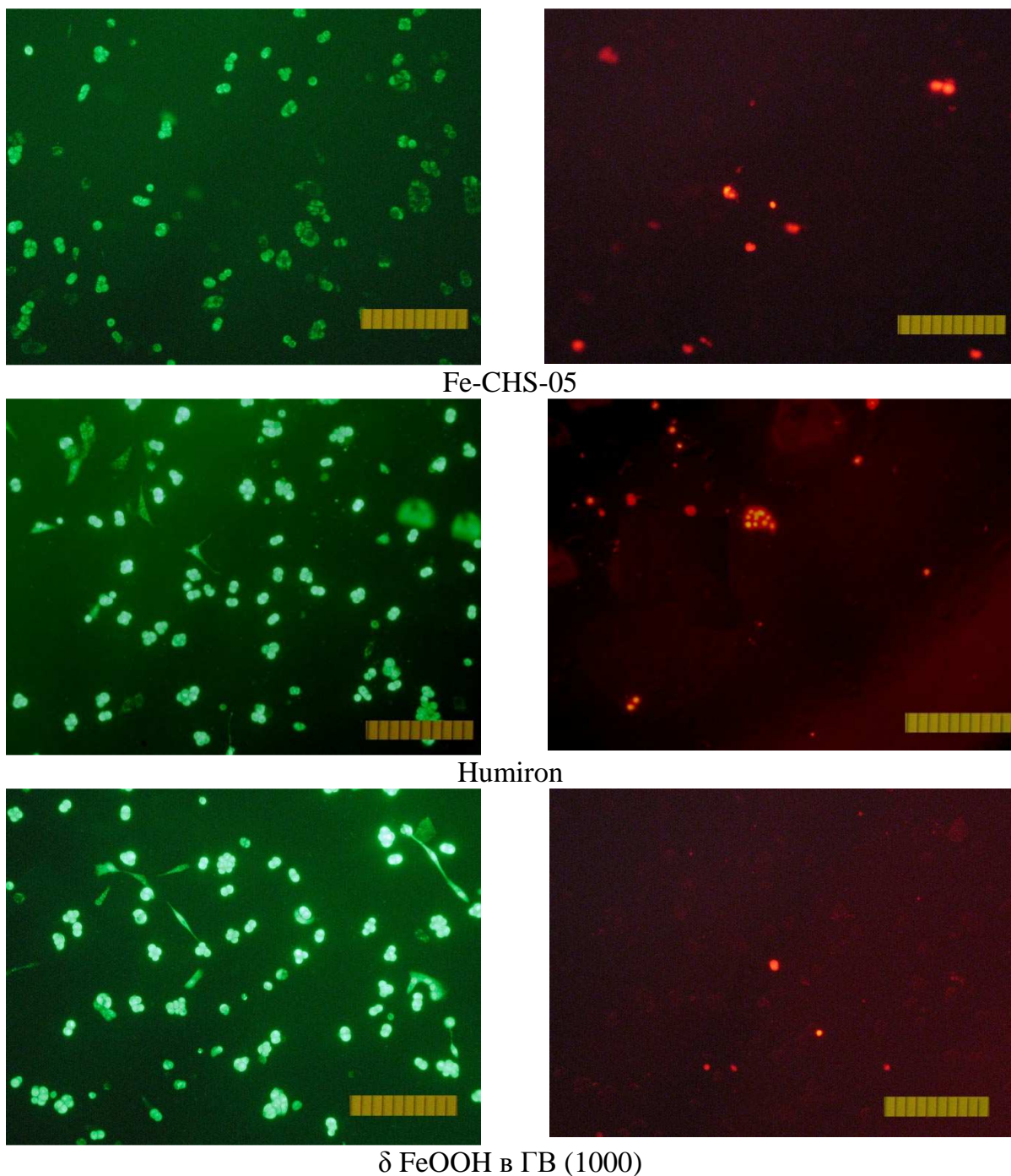


Рис. 37 Внешний вид эпителиальных клеток линии HEp-2, культивируемых в среде с добавлением Fe-CHS-05, Humiron и ГК и δ FeOOH в ГВ (1000). Флуоресцентное окрашивание SYTO 9 (слева) и иодидом пропидия (справа). Увеличение 200х. Линейка 100 мкм.

Результаты исследований показали, что внешний вид клеточного монослоя, степень распластывания и жизнеспособность клеток, культивируемых в присутствии исследуемых материалов, не отличался от такового в контроле. Таким образом, исследуемые образцы в данных концентрациях не влияли негативно относительно содержание живых клеток в популяции, адгезию и распластывание активность эпителиальных клеток в течение 24 ч.

Выводы

1. Разработаны способы получения биологически доступных соединений железа, стабилизированных гуминовыми веществами (ГВ), для использования вместо небезопасных для окружающей среды хелатов железа.
2. Установлено, что ГВ могут быть использованы в качестве стабилизирующих агентов при получении высокодисперсных форм оксидных соединений железа.
3. Установлено, что применение препаратов Fe-ГВ позволяет эффективно устранить дефицит железа, содержание железа в листьях возрастает до 360% от контроля, а хлорофилла - до 400% от контроля.
4. Установлено, что полученные препараты Fe-ГВ образуют устойчивые суспензии в водных растворах при концентрации фонового электролита более 150 ммоль/л, что подтверждает возможность их практического применения в виде коллоидных растворов.
5. Установлено, что препараты Fe-ГВ не обладают цитотоксичностью по отношению к клеточной линии НЕр-2 (выживаемость клеток составляет 90%), что подтверждает их безопасность для окружающей среды.

Список сокращений

- АК – аскорбиновая кислота
АПТС – 3-аминопропилтриметоксисилан
АФК – активные формы кислорода
ГВ – гуминовые вещества
ГК – гуминовые кислоты
ГФК – гуминовые и фульвокислоты
ГСО – государственный стандартный образец
ДМФА – N,N – диметилформамид
ДСР – динамическое светорассеяние
ИК – инфракрасная (спектроскопия)
МЖ – магнитные жидкости
МГО – Международное Гуминовое Общество (IHSS)
МНК – метод наименьших квадратов
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
ПАВ – поверхностно-активные вещества
ПАУ – полиароматические углеводороды
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
РФА – рентгенофазовый анализ
РОВ – растворенное органическое вещество
ТНЗ – точка нулевого заряда
ФК – фульвокислоты
ХПЭЭ – (спектроскопия) химических потерь энергии электронов
ЭТЦ – электронтранспортная цепь
ЯГР – ядерный гамма-резонанс (эффект Мессбауэра)
Fe-ЭДДГА – этилендиамин-N,N'-ди (2-гидроксифенилацетат) железа
ДТПА – диэтилентриамин-N,N,N',N'',N'''-пентаацетат железа
Fe-ЭДТА – этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат железа
Fe-ЭДДГМА – этилендиамин-N,N'-ди (2-гидрокси-4-метилфенилацетат) железа
Fe-ЭДДГСА – этилендиамин-ди (2-гидрокси-5-сульфофенилацетат) железа
Fe-ЭДДОА – этилендиаминдиоксифенилацетат железа
MQ – вода высокой степени очистки, полученная с помощью систем Millipore
масс. – массовые (проценты)

Список использованной литературы

1. Орлов Д.С. Химия почв. — Москва : Изд-во МГУ, 1992. — 259 с.
2. Thurman E.M. Organic geochemistry of natural waters. — Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1985. — P. 497-503.
3. Stevenson F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. — New York : John Wiley&Sons, 1982. — p. 443.
4. Kleinhempel D. Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes. // Albrecht-Thaer-Archiv. 1970. V. 14. № 3.
5. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. — Москва : Изд-во МГУ, 1990. — 325 с.
6. Ziechmann W. Huminstoffe – Probleme, Methoden, Ergebnisse. — Weinheim – Deerfield Beach/Florida – Basel : Verlag Chemie, 1980. — 408 s.
7. Bollag J.-M., Mayers K. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances // Sci. Total Environ. 1992. V. 117/118.
8. Stevenson F.J. Geochemistry of soil humic substances // In Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation, and Characterization Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. — New York : John Wiley & Sons, 1985. — P. 13-19.
9. Harvey G.R., Boran D.A., Tokar J.M. The structure of marine fulvic and humic acids // Mar. Chem. 1983. V. 12. — P. 119-125.
10. Кононова М.М. Органическое вещество почвы. — М. : Изд-во МГУ, 1963.
11. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ // Гуминовые вещества в биосфере. 1993.

12. Perdue E.M. Analytical constraints on the structural features of humic substances // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1984. V. 48. № 7. — P. 1435-1442.
13. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И. Органическое вещество почв Российской Федерации. — М.: : Наука, 1996. — 256 с.
14. Stuermer D.H., Payne J.R. Investigation of seawater and terrestrial humic substances with carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance // *Geochim. Cosmochim. Acta* 1976. 40. — 1109-1114.
15. Visser S.A. Effects Of Humic Substances On Plant Growth. — Reda, Italy 1986.
16. Rice J.A., MacCarthy P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances // *Org. Geochem.* 1991. V. 17. — P. 635-640.
17. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв. — Москва : Изд-во МГУ, 1974. — 177 с.
18. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот. Дисс. док. хим. наук. — Москва, 2000. — 359 с.
19. Senesi N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals Part I. The electron spin resonance approach. // *Analit. Chim. Acta*. 1990. V. 232. — P. 51-56.
20. Lovley D.R., Woodward J., Blunt-Harris E., Hayes L., Phillips E., Coates J. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1998. V. 26. — P. 152-157.
21. Szilagyi M. Valency changes of metal ions in the interaction with humic acids. // *Fuel*. 1974. V. 53. — P. 26-31.
22. Szilagyi M. Reduction of Fe³⁺ ion by humic acid preparations // *Soil Sci.* 1971. V. 111. — P. 233-238.
23. Alberts J.J., Schindler J.E., Miller R.W. Elemental mercury evolution mediated by humic acid // *Science*. 1974. V. 184.

24. Skogerboe R.K., Wilson S.A. Reduction of ionic species by fulvic acid // *Anal. Chem.* 1981. V. 53. № 2. — P. 228-232.
25. Sunda W.G., Kieber D.J. Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates // *Nature*. 1994. V. 367. — P. 62-67.
26. Lu X., Johnson W.D., Hook J. Reaction of vanadate with aquatic humic substances // *Environ. Sci. Technol.* 1998. V. 32. — P. 2257-2262.
27. Struyk Z., Sposito G. Redox properties of standard humic acids // *Geoderma*. 2001. V. 102. — P. 329-334.
28. Gu B., Chen J. Enhanced microbial reduction of Cr(VI) and U(VI) by different natural organic matter fractions // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2003. P. 67.
29. Stumm W., Morgan J.J. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. — New York : Wiley-Interscience, 1996.
30. Visser S.A. Oxidation-reduction potentials and capillary activities of humic acids // *Nature*. 1964. V. 204. — P. 581-587.
31. Szilagyi M. The redox properties and the determination of the normal potential of the peat-water system // *Soil Sci.* 1973. V. 115. — P. 434-439.
32. Matthiessen A. Determining the redox capacity of humic substances // *Vom Vasser*. 1995. V. 84. — P. 229-234.
33. Зефиоров Н.С. *Химическая энциклопедия в 5 т. в 5 томах.4* — Москва : "Большая российская энциклопедия", 1995. — 639 с.
34. Ritchie J.D., Perdue E.M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2003. V. 67. № 1. — P. 85–96.
35. Randhawa N.S., Broadbent F.E. Soil organic matter-metal complexes: 6. Stability constants of zinc-humic acid complexes at different pH values. // *Soil Sci.* . 1965. V. 99. — P. 362-366.
36. Dijk H.V. Cation binding of humic acids // *Geoderma*. 1971. 5. — 53-67.

37. Sposito G., Holtzclaw K.M., LeVesque-Madore S. Calcium ion complexation by fulvic acid extracted from sewage sludge-soil mixtures // *Soil Sci. Soc. Am. J.* . 1978. V. 42. — P. 600-606.
38. Sposito G., Holtzclaw K.M. Copper(II) complexation by fulvic acid extracted from sewage sludge as influenced by nitrate versus perchlorate background ionic media. // *Soil Sci. Soc. Am. J.* . 1979. V. 43. — P. 47-51.
39. Perdue E.M., Lytle C.R. Distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances // *Environ. Sci. Technol.* 1983. V. 17. — P. 654-660.
40. Marinsky J.A., Ephraim J. A unified chemical description of the protonation and metal ion complexation equilibria of natural organic acids (humic and fulvic acids). 1. Analysis of the influence of polyelectrolyte properties on protonation equilibria in ionic media: Fundamental concepts. // *Environ. Sci. Technol.* . 1986. V. 20. — P. 349-354.
41. Cabaniss S.E., Shuman M.S. Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee River fulvic acid equilibria. // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1988. V. 52. — P. 185-193.
42. Benedetti M.F., Milne C.J., Kinniburgh D.G., Riemsdijk W.H.V., Koopal L.K. Metal ion binding to humic substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption model. // *Environ. Sci. Technol.* 1995. V. 29. — P. 446-457.
43. Koopal L.K., Riemsdijk W.H.V., Wit J.C.M.d., Benedetti M.F. Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces // *J. Colloid Interface Sci.* . 1994. V. 166. — P. 51-60.
44. Benedetti M.F., Riemsdijk W.H.V., Koopal L.K. Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase // *Environ. Sci. Technol.* . 1996. V. 30. — P. 1804-1813.
45. Milne C.J., Kinniburgh D.G., Tipping E. Generic NICADonnan model parameters for proton binding by humic substances // *Environ. Sci. Technol.* 2001. V. 35. — P. 2049-2059.

46. Tipping E., Hurley M.A. A unifying model of cation binding by humic substances // *Geochim. Cosmochim. Acta* 1992. V. 56. — P. 3627-3641.
47. Tipping E. Humic ion-binding Model VI: An improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. // *Aquatic Geochem.* 1998. V. 4. — P. 3-48.
48. Perdue E.M., Parrish R.S. Fitting multisite binding equilibria to statistical distribution models: Turbo Pascal program for Gaussian models // *Computers Geosci.* 1987. V. 13. — P. 587-601.
49. Dobbs J.C., Susetyo W., Carreira L.A., Azarraga L.V. Competitive binding of protons and metal ions in humic substances by lanthanide ion probe spectroscopy // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. — P. 1519-1524.
50. Perdue E.M. Acidic Functional Groups of Humic Substances // In: *Humic substances in soil, sediment and water* Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. — N.Y., 1985. — 493-525.
51. Скуг Д., Уэст Д. Основы аналитической химии. т.1 — М. : Мир, 1979.
52. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М. : Химия, 1965.
53. Моравец Г. Макромолекулы в растворе. — М. : Мир, 1967.
54. Сиггиа С., Ханна Д.Г. Количественный органический анализ по функциональным группам. — М. : Химия, 1983.
55. Buffle J., Delooney M.D., Haerdi L. The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters // *Anal. Chim. Acta.* 1978. V. 101. — P. 339-350.
56. Davis J.A. Adsorption of natural dissolved organic matter at the oxide/water interface // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1982. V. 46. — P. 2381-2393.
57. Herbert B.E., Bortsch M., Novak J.M. Pyrene sorption by water-soluble organic carbon // *Environ. Sci. Technol.* 1993. V. 27. — P. 398-403.
58. Piccolo A., Camici L. A comparison of two methods for the determination of total acidity of humic substances // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1990. V. 41. — P. 65-69.

59. Frimmel F.H., Hopp W., Quentin K.-E. Basic characterization of reference NOM from Central Europe — Similarities and differences // *Z. Wasser Abwasser-Forsch.* . 1985. V. 18. — P. 259-262.
60. Pettersson C., Arsenie I., Ephraim J.P., Boren H., Allard B. Properties of fulvic acids from deep groundwaters // *Sci. Total Environ.* 1989. V. 81/82. — P. 287-296.
61. Schnitzer M., Khan S.U. Humic substances in the environment. — N.Y. : Marcel Decker, 1972.
62. Кухаренко Т.А. Реакции гуминовых кислот с нейтральными солями // *Хим. Тверд. Топл.* 1937. Т. 8. № 9. — С. 803-813.
63. Imbufe A.U., Patti A.F., Burrow D., Surapaneni A., Jackson W.R., Milner A.D. Effects of potassium humate on aggregate stability of two soils from Victoria, Australia // *Geoderma.* 2005. V. 125. — P. 321-330.
64. John B., Yamashita T., Ludwig B., Flessa H. Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use // *Geoderma.* 2005. V. 128. — P. 63-79.
65. Devevre O.C., Horwath W.R. Stabilization of fertilizer nitrogen-15 into humic substances in aerobic vs. waterlogged soil following straw incorporation // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2001. V. 65 — P. 499-510.
66. García-Mina J.M., Antolín M.C., Sanchez-Diaz M. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types // *Plant and Soil.* 2004. V. 258. — P. 57-68.
67. Agbenin J.O., Olojo L.A. 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 // *Geoderma.* 2004. V. 119. — P. 85-95.
68. Khwaja A.R., Bloom P.R., Brezonik P.L. Binding constants of divalent mercury [Hg²⁺] in soil humic acids and soil organic matter // *Environ. Sci. Technol.* 2006. V. 40.
69. Pegoraro R.F., Silva I.R., Novais R.F., Mendonca E.S., Alvarez V.H., Nunes F.N., Fonseca F.M., Smyth T.J. Diffusive flux of cationic micronutrients in

- two Oxisols as affected by low-molecular-weight organic acids and cover-crop residue // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2005. V. 168. — P. 334-341.
70. Senesi N., G. Calderoni , pp. . Structural and chemical characterization of copper, iron and manganese complexes formed by paleosol humic acids // *Organic Geochemistry.* 1988. V. 13. № 4-6. — P. 1145-1152.
71. Illes E., E.Tombacz. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles // *J Colloid Interface Sci.* 2006. V. 295. — P. 115-123.
72. Cesco S., Roemheld V., Varanini Z., Pinton R. Solubilization of iron by water-extractable humic substances // *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 2000. V. 163. — P. 285-290.
73. Kulikova N.A., Perminova I.V., Badun G.A., M.G.Chernysheva, Koroleva O.V., E.A.Tsvetkova. Estimation of uptake of humic substances from different sources by *Escherichia coli* cells under optimum and salt stress conditions by use of tritium-labeled humic materials // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 18. — P. 6223-6230.
74. Куликова Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов. Дисс. докт. биол. наук. — М. : МГУ, 2008.
75. Schwartz D.L. Solid waste and emergency response // EPA 542-N-99-002. 1999. 31. № 1.
76. Sanjay H.G., Srivastava K.C., Walia D.S. Mixed Waste Remediation Using HUMASORB-CSTM – an Adsorbent to Remove Organic and Inorganic Contaminants. : ARCTECH, Inc., 1997.
77. Fukushima M., Tatsumi K. Functionalities of Humic Acid for the Remedial Processes of Organic Pollutants // *Analyt. Sci.* 2001. V. 17. — i821.
78. Lesage S., Novakowski K.S., Brown S., Millar K. Humic acids enhanced removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers: developing a sustainable technology // *J. Environ. Sci. Health A.* 2001. V. 36. № 8. — P. 1515-1533.

79. Molson J.W., Frind E.O., Stempvoort D.R.V., Lesage S.J. Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in groundwater: Part 2. Numerical model development and application // *J. Contam. Hydrol.* 2001. P. 54. — P. 277-305.
80. Салем К.М., Перминова И.В., Гречищева Н.Ю., Мурыгина В.П., Мещеряков С.В. Биорекультивация нефтезагрязненных почв гуминовыми препаратами // *Экология и промышленность России.* 2003. № 4. — С. 19-21.
81. Stempvoort D.R.V., Lesage S., Novakowski K.S., Millar K., Brown S., Lawrence J.R. Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in groundwater. 1. Laboratory-based pilot scale test // *Journal of Contaminant Hydrology.* 2002. V. 54. — P. 249– 276.
82. Панина О.П., Касимова Л.В., Жилиякова Т.П. Способ получения железосодержащего препарата для лечения и профилактики железодефицитной анемии у животных. — Рос. Федерация : Сибирский научно-исследовательский институт торфа СО РАСХН, 1999. — 1-6.
83. Левинский Б.В. Способ получения комплексных гуминовых удобрений. — Рос. Федерация, 2002.
84. Lawrence N. Herjsted, St. Louis M. Process for preparing preferred iron humates. : Kemiron, St. Louis, Mo., 1991.
85. Безуглова О.С. Удобрения, биодобавки и стимуляторы роста для вашего урожая. — Ростов на Дону : Феникс, 2007. — 254 с.
86. Безуглова О.С., И.С.Тверьянович. Влияние гуматов железа на флоральную продуктивность rosa 'Red velvet' и их устойчивость к патогенам на карбонатных черноземах // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки.* 2004. № 3. — С. 96-99.
87. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе «почва-растение». — Новосибирск : Наука, 1991. — 151 с.

88. Sawada A., Tanaka S., Fukushima M., Tatsumi K.J. Electrokinetic remediation of clayey soils containing copper(II)-oxinate using humic acid as a surfactant // Hazard. Mater. 2003. V. B96. — P. 145-154.
89. Кочкина Н.Е., Ю.Вашурина И., Калинин Ю.А. Влияние гуминовых кислот на свойства крахмальных шликтующих композиций // Изв. вузов. Технол. текстил. пром-сти. 2004. № 1. — С. 41-43.
90. Zhilin D.M., Schmitt-Kopplin P., Perminova I.V. Reduction of Cr(VI) by peat and coal humic substance // Environ Chem Lett. 2004. V. 2. — P. 141–145.
91. Shcherbina N.S., Kalmykov S.N., Perminova I.V., Kovalenko A.N. Reduction of actinides in higher oxidation states by hydroquinone-enriched humic derivatives // Journal of Alloys and Compounds. 2007. V. 444-445. — P. 518-521.
92. Arancon N.Q., Edwards C.A., Lee S., Byrne R. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth // European Journal of Soil Biology. 2006. V. 42. — P. S65–S69.
93. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, Издание официальное. — М. : Минсельхоз России, 2011.
94. Goodwin B. Foliarly applicable silicon nutrition compositions & methods. — Соединенные Штаты Америки, 2009.
95. Карпюк Л.А., Калакин А.А., Перминова И.В., Пономаренко С.А. Получение метоксисилильных производных гуминовых кислот с использованием 3-изоцианатопропилтриметоксисилана // Вестн. МГУ. Сер.2. Химия. 2008. Т. 49 №6. — С. 395-402.
96. Humic acids metallic compound: preparation thereof, composition, preparation containing same and use of said compounds., 2005.
97. Youdov M.V., Perminova I.V., Pankova A.P., Zhilin D.M., Gantman M. Synthesis of sulfoderivatives of humic acids and their complexing properties towards Fe(III) and Hg(II). . — Zvenigorod, Russia., 2002. — P. 34-35.

98. Перминова И.В., Жилин Д.М. Гуминовые вещества в контексте зеленой химии // Зеленая химия в России В.В. Лунин, П. Тундо, Локтева Е.С. — Москва : Изд-во Моск. Ун-та, 2004. — С. 146-162.
99. Perminova I.V., Karpouk L.A., Shcherbina N.S., Ponomarenko S.A., Kalmykov S.N., Hatfield K. Preparation and use of humic coatings covalently bound to silica gel for Np(V) and Pu(V) sequestration // J. Alloys and Compounds. 2007. V. 444-445. — P. 512-517.
100. Степин Б.Д., Цветков А.А. Неорганическая химия: Учеб. для хим. и химико-технол. спец. вузов. — М.: : Высш. шк., 1994. — 608 с.
101. Спицын В.И., Л.И. Мартыненко. Неорганическая химия. Ч. II: Учебник. — М.: : Изд-во МГУ, 1994. — 624 с.
102. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология: В 3-х т. Т. 1 3 — М. : Мир, 2004. — 454 с.
103. Бобылев С.Н. Воздействие изменения климата на сельское хозяйство и водные ресурсы России. — М. : Фонд "Защита природы", 2003. — 36 с.
104. Битюцкий Н.П. Необходимые микроэлементы растений. Учебник. — СПб. : Издательство ДЕАН, 2005.
105. Bitcover E.H., Sieling D.H. Effect of various factors on the utilization of nitrogen and iron by *Spirodela Polyrhiza* (L.) Schleid.1 // Plant Physiol. . 1951. V. 26. — P. 290-303.
106. Водяницкий Ю.Н. Химия и минералогия почвенного железа. — М. : Почвенный ин-т, 2003. — 236 с.
107. Клечковский В.М., Петербургский А.В., eds. Агрохимия. 1964, изд-во «Колос» : М. 527 с.
108. Martinez-Navarrete M.M.C., Martinez-Lahuerta J., Martinez-Monzo P.F.J. Iron deficiency and iron fortified foods-a review // Food Research International 2002. V. 35. — P. 225-231.
109. Идельсон Л.И. Гипохромные анемии. — М. : Медицина, 1981.
110. Jeong J., Guerinot M.L. Homing in on iron homeostasis in plants // Trends in Plants Science. 2009. V. 14. № 5. — P. 280-285.

111. Welch R.M., Graham R.D. Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2005. V. 18. — P. 299-307.
112. Golan-Goldhirsh A. Plant tolerance to heavy metals, a risk for food toxicity or a means for food fortification with essential metals: the *Allium Schoenoprasum* model // *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation* V. 69. Twardowska I., Allen H.E., Haggblom M.M. — Dordrecht, The Netherlands : Springer, 2006.
113. Кауричев С., Панов И.П. Почвоведение. 4-е издание — М. : Агропромиздат, 1989.
114. Островская Л.К. Железо в растительном мире и карбонатный хлороз. — Киев : Наукова думка, 1993.
115. Саидов А.К. Опустынивание почв водно-аккумулятивных равнин аридных областей на примере почв Кизлярских пастбищ Дагестана. Дисс. докт.биол. наук. — Москва, 2009.
116. Alvarez-Fernandez A., Garcia-Marco S., Lucena J.J. Evaluation of synthetic iron(III)-chelates (EDDHA/Fe³⁺, EDDHMA/Fe³⁺ and the novel EDDHSA/Fe³⁺) to correct iron chlorosis // *Europ. J. Agronomy*. 2005. V. 22. — P. 119–130.
117. List of authorised organic chelating agents for micro-nutrients pursuant to Annex I, paragraph E.3.1. of Regulation (EC) N° 2003/2003 relating to fertilizers. 2003.
118. Дятлова Н.М., Темкина В.Я., Попов К.И. Комплексоны и комплексонаты металлов. — М. : Химия, 1988. — 544 с.
119. Kroll H. The chemistry of metal chelates in agriculture. — Palo Alto, California : The Natl. Press., 1956. — P. 28-35.
120. Regulation (EC) of the European Parliament and of the Council relating to fertilisers № 2003/2003. L 304/1. 2003.
121. Bell R.W., Dell B., eds. Micronutrients for Sustainable Food, Feed, Fibre and Bioenergy Production. *Micronutrients for Sustainable Food, Feed, Fibre*

- and Bioenergy Production. 2008, International Fertilizer Industry Association (IFA) : Paris.
122. Anderson C.A. The effect of FeEDDHA on the development of lime-chlorosis in two seedling populations of *Eucalyptus obliqua* L'Herit. // *Plant and Soil*. 1983. V. 70. — P. 299-302.
 123. Antonopoulou C., Dimassi K., Therios I., Chatzissavvidis C., Papadakis I. The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on in vitro rooting of the peach rootstock GF-677 explants // *Acta Physiol Plant* 2007. V. 29. — P. 559–561.
 124. Romheld V., Merschner H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses // *Plant Physiol*. 1986. V. 80. № 1. — P. 175-180.
 125. Inaba S., Takenaka C. Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts / // *Environ. Int.* . 2005. V. 31. № 4. — P. 603-608.
 126. Bar-Ness E., Chen Y. Manure and peat based iron-organo complexes // *Plant and Soil*. 1991. V. 130. — P. 35-43.
 127. Chassapis K., Roulia M., Nika G. Fe(III)–humate complexes from Megalopolis peaty lignite: A novel eco-friendly fertilizer // *Fuel*. 2010. V. 89. — P. 1480–1484.
 128. Cerdan M., Alcaniz S., Juarez M., Jorda J.D., Bermudez D. Kinetic Behavior of Fe(o,o-EDDHA)–Humic Substance Mixtures in Several Soil Components and in Calcareous Soils // *J. Agric. Food Chem*. 2007. V. 55. — P. 9159–9169.
 129. Pinton R., Cesco S., Santi S., Agnolon F., Varanini Z. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants // *Plant and Soil*. 1999. V. 210. — P. 145–157.
 130. Lobartini J.C., Orioli G.A. Absorption of iron Fe-humate in nutrient solutions by plants // *Plant and Soil*. 1988. V. 106. — P. 153-157

131. Aguirre E., Lemenager D., Bacaicoa E., Fuentes M., Baigorri R., Zamarreno A.M., Garcia-Mina J.M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009. V. 47. — P. 215-223.
132. Chen Y., Clapp C.E., Magen H. Mechanisms of Plant Growth Stimulation by Humic Substances: The Role of Organo-Iron Complexes // *Soil Sci Plant Nutr*. 2004. V. 50. № 7. — P. 1089-1095.
133. Mackowiak C.L., Grossl P.R., Bugbee B.G. Beneficial Effects of Humic Acid on Micronutrient Availability to Wheat // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2001. V. 65. — P. 1744–1750.
134. Водяницкий Ю.Н. Соединения железа и их роль в охране почв. — М.: : ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии, 2010. — 154 с.
135. Глазовская М.А. Природные ландшафтно-геохимические процессы и их проявление на территории СССР // *Вестн. МГУ. Сер. География*. 1988. № 5. — С. 3-6.
136. Зонн С.В. Железо в почвах. — М. : Наука, 1982. — 206 с.
137. Воробьева Л.А. Химический анализ почв. — М. : Изд-во МГУ, 1998. — 272 с.
138. Беус А.А. Геохимия литосферы. — М. : Недра, 1972. — 296 с.
139. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. — Л. : Гидрометеиздат, 1986. — 268 с.
140. Bowen H.J.M. *Environmental chemistry of the elements*. — London : Acad. Press, 1979. — 333.
141. Алекин О.А. Основы гидрохимии. — Л. : Гидрометеиздат, 1970. — 444 с.
142. Третьяков Ю.Д. Неорганическая химия: В 3-х т.Т. 3, Кн. 1: Химия переходных элементов : Издательский центр "Академия", 2007. — 352 с.

143. Theis T.L., Singer P.C. The stabilization of ferrous iron by organic compounds in natural waters // Trace metals and metal-organic interactions in natural waters P. C. Singer e. — Michigan : Ann Arbor. Sci., 1973. — P. 303-320.
144. Theis T.L., C.Singer P. Complexation of iron (II) by organic matter and its effect on iron (II) oxygenation // Environ. Sci. Technol. 1974. V. 8. № 6. — P. 569-573.
145. Глаголева М.А. Формы миграции элементов в речных водах // ДАН СССР. 1958. Т. 121. № 6. — С. 1052-1055.
146. Florence T.M. The speciation of trace elements in waters // Talanta. 1982. V. 29. № 5. — P. 345-364.
147. Florence T.M., Balley G.E. Chemical speciation in natural waters // CRC Critical Rev. Anal. Chem. 1980. V. 9. № 3. — P. 219-296.
148. Moore R.M., Burton J.D., Williams P.J., Le B., Young M.L. The behaviour of dissolved organic material, iron and manganese in estuarine mixing // Geochim. Cosmochim. Acta. 1979. V. 43. № 6. — P. 919-926.
149. Manning P.G., Ramamoorthy S. Equilibrium studies of metal ion complexes of Interest to natural waters. // J. Inorg. Nucl. Chem. 1973. V. 35. № 5. — P. 1577-1585.
150. Ephraim J.H., Boren H., Arsenie I., Pettersson C., Allard B. A combination of acid-base titrations and derivation for functional group determinations of an aquatic fulvic acid // Sci. Total Environ. 1989. V. 81/82. — P. 615-624.
151. Ephraim J. Europium binding by an aquatic fulvic acid. Interaction functions for the “average” sites in the fulvic acid molecule // Sci. Total Environ. 1991. V. 108. — P. 261-273.
152. Dudal Y., Gerard F. Accounting for natural organic matter in aqueous chemical equilibrium models: a review of the theories and applications // Earth Sci. Rev. 2004. 66. — 199-216.
153. Croue J.-P., Benedetti M.F., Violleau D., Leenheer J. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the

- South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site // Environ. Sci. Technol. 2003. V. 37. № 2. — P. 328-336.
154. Merdy P., Huclier S., Koopal L.K. Modeling metal-particle interactions with an emphasis on natural organic matter // Environ. Sci. Technol. 2006. — P. 7954-7466.
155. Goodman B.A., Cheshire M.V. The occurrence of copper porphyrin complexes in soil humic acids // J. Soil Sci. . 1976. V. 27. — P. 337-347.
156. Premovic P.I., Nikolic N.D., Tonsa I.R., Pavlovic M.S., Premovic M.P., Dulanovic D.T. Copper and copper(II) porphyrins of the Cretaceous-Tertiary boundary at Stevns Klint (Denmark) // Earth Planet. Sci. Lett. . 2000. V. 177. — P. 105-118.
157. Lobartini J.C., Tan K.H., Pape C. Dissolution of aluminum and iron phosphates by humic acids // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 1998. V. 29. № 5-6. — P. 535-544.
158. Помогайло А.Д., Уфлянд И.Е. Макромолекулярные металлохелаты. — М. : Химия, 1991. — 304 с.
159. Lakatos B., Korecz L., Meisel J. Comparative study on the mossbauer parameters of iron humates and polyuronates // Geoderma. 1977. V. 19. — P. 149-157.
160. Kallianou C.S., Yassoglou N.J. Bonding and oxidation state of iron in humic complexes extracted from some greek soils // Geoderma. 1985. V. 35. — P. 209-211.
161. Lippold H., Evans N.D.M., Warwick P., Kupsch H. Competitive effect of iron(III) on metal complexation by humic substances: Characterisation of ageing processe // Chemosphere. 2007. V. 67. — P. 1050–1056.
162. Dickson D.P.E., Heller-Kallai L., Rozenson I. Mossbauer spectroscopic studies of humic acid and fulvic acids soil fractions // Journal de Physique Colloque C1 1980. V. 41. — P. 409-410.

163. Perez-Sanz A., Lucena J.J., Graham M.C. Characterization of Fe–humic complexes in an Fe-enriched biosolid by-product of water treatment // *Chemosphere*. 2006. V. 65. — P. 2045–2053.
164. Жилин Д.М. Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II). — М. : МГУ, 1998. — 202 с.
165. Dickson D.P.E., Heller-Kallai L., Rozenson I. Mössbauer spectroscopic studies of iron in organic material from natural sedimentary environments // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1979. V. 43. № 9. — P. 1449-1453
166. Senesi N. Spectroscopic evidence on organically-bound iron in natural and synthetic complexes with humic substances // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1981. V. 45. № 2. — P. 269-272.
167. Senesi N., Griffith S.M., Schnitzer M., Townsend M.G. Binding of Fe³⁺ by humic materials // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1977. V. 41. № 7. — P. 969-976
168. Cornell R.M., Schwertmann U. *The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions Occurrences and Uses.* — Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
169. Cameron A.J., Liss P.S. The stabilization of "dissolved" iron in freshwaters. // *Water Res.* 1984. V.18. № 2. — P. 179-185.
170. Ghosh M.M., O'Connor J.T., Engelbrecht R.S. Removal of iron from ground water by filtration // *Journ. Amer. Wat. Works Assoc.* 1967. V. 59. № 7. — P. 878-896.
171. Miles C.J., Brezonik P.L. Oxygen consumption in humic-colored waters by a photochemical ferrous-ferric catalytic cycle // *Environ. Sci. Technol.* 1981. 15. № 9. — 1089-1095.
172. Никитина И.Б. Геохимия ультрапресных вод мерзлотных ландшафтов. — М. : Наука, 1977. — 148 с.
173. Gjessing E.T. Ferrous iron in water // *Limnology and Oceanography* 1964. V. 9. № 2. — P. 272-274.

174. Shapiro J. On the measurement of ferrous iron in natural waters // *Limnol. Oceanogr.* 1966. V. 11. № 2. — P. 293-298.
175. Akiyama T. Interactions of ferric and ferrous irons and organic matter in water environment // *Geochem. Journ.* 1973. V. 7. № 1. — P. 167-177.
176. Baoshen W. Chelated iron for preventing and controlling yellow leaf disease and its production method. — CN, 2005.
177. ГОСТ Р 54221-2010. Гуминовые препараты из бурых и окисленных углей. Методы испытаний. — М. : Стандартинформ, 2012. — 15 с.
178. Мокроносов А.Т. Малый практикум по физиологии растений. : МГУ, 1994. — 183 с.
179. Марченко З., Бальцежак М. Методы спектрофотометрии в УФ и видимой областях в неорганическом анализе. — М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2007. — 712 с.
180. Третьяков Ю.Д., Мартыненко Л.И., Григорьев А.Н., Цивадзе А.Ю. Неорганическая химия. Т. I — М.:, 2001.
181. Gehin A., Ruby C. Synthesis of Fe(II-III) hydroxysulphate green rust by coprecipitation // *Solid State Sciences.* 2002. V. 4. — P. 61-66.
182. Kovacs K., Kuzmann E., Fodor F., Kamnev A.V.a.A.A. Mössbauer study of iron uptake in cucumber root // *Hyperfine Interactions.* 2005. V. 165. № 1-4. — P. 289-294.
183. Munsell A. Munsell Soil Color Charts. : Revised Washable Edition, 2000.
184. Newville M. IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting // *J. Synchrotron Rad.* 2001. V. 8. № 2. — P. 322--324.
185. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. — Киев : “Альтерпрес”, 2002.
186. Водяницкий Ю.Н. Диагностика переувлажненных минеральных почв. — Москва : ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева РАСХН, 2008.
187. Данченко Н.Н., Гармаш А.В., Перминова И.В. Моделирование взаимодействия гумусовых кислот с ацетатом кальция. 1. Модель

- ионного обмена. // Вестник Московского университета, серия 2 (Химия). 1999. Т. 40. — С. 183-187.
188. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Опеделение строения органических соединений. — М. : Мир, 2006. — 438 с.
189. Браун Д., Флойд А., Сейнзбери М. Спектроскопия органических веществ. — М. : Мир, 1992. — 300 с.
190. Hajdu A., Tombacz E., Illes E., Bica D., Vekas L. Magnetite Nanoparticles Stabilized Under Physiological Conditions for Biomedical Application // *Progr Colloid Polym Sci.* 2008. V. 135. — P. 29–37.
191. Кухаренко. Т.А. Реакции гуминовых кислот с нейтральными солями. Сообщение II // *Хим. Тверд. Топл.* 1937. Т. 8. № 12. — С. 1064-1072.
192. Данченко Н.Н. Функциональный состав гумусовых кислот: определение и взаимосвязь с реакционной способностью. Дисс. канд. хим. наук. — М. : МГУ, 1997. — 135 с.
193. Fernandez J.M., Plaza C., Senesi N., Polo A. Acid–base properties of humic substances from composted and thermally-dried sewage sludges and amended soils as determined by potentiometric titration and the NICA-Donnan model // *Chemosphere.* 2007 V. 69. — P. 630-635.
194. Dick D.P., Mangrich A.S., Menezes S.M.C., Pereira B.F. Chemical and Spectroscopical Characterization of Humic Acids from two South Brazilian Coals of Different Ranks // *J. Braz. Chem. Soc.* 2002. V. 13. № 2. — P. 177-182.
195. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений. — Москва : Мир, 1966. — 411 с.
196. Бонч-Бруевич В.Л. Электронная теория неупорядоченных полупроводников. — М. : Наука, 1981. — 383 с.
197. Chernyshov A.A., Veligzhanin A.A., Zubavichus Y.V. Structural Materials Science end-station at the Kurchatov Synchrotron Radiation Source: Recent instrumentation upgrades and experimental results // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 2009. V. 603. — P. 95–98.

198. Фетисов Г.В. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ. — М. : Физматлит, 2007.
199. Горинчой В.В., Туртэ К.И., Симонов Ю.А., Шова С.Г., Липковский Я., Шофрански В.Н. Гетероядерные {Fe-Ba, Fe-Sr} салицилатные комплексы. Синтез, строение и физико-химические свойства // Координационная химия. 2009. Т. 35. № 4. — С. 283-290.
200. Alvarez-Ros M.C., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J.V. Molecular and Biomolecular Spectroscopy // Spectrochimica Acta, Part A. 2000. V. 56. — P. 2471 - 2478.
201. Гольданский В.И., Крижановского Л.И., Храпова В.В. Химические применения мессбауэровской спектроскопии. — М. : Мир, 1970. — 500 с.
202. Hansen E.H., Mosbaek H. Mossbauer studies of an iron(III)-fulvic acid complex // Acta Chem. Scand. 1970. V. 24. — P. 3083-3084.
203. Genin J.-M.R., Aïssa R., Géhin A., Abdelmoula M., Benali O., Ernstsén V., Ona-Nguema G., Upadhyay C., Ruby C. Fougerite and FeII–III hydroxycarbonate green rust; ordering, deprotonation and/or cation substitution; structure of hydrotalcite-like compounds and mythic ferrosic hydroxide $\text{Fe}(\text{OH})(2+x)$ // Solid State Sciences. 2005. V. 7. — P. 545–572.
204. Фабричный П.Б., Похолок К.В. Мессбауэровская спектроскопия и её применение для химической диагностики неорганических материалов. — М. : МГУ, 2008. — 260 с.
205. Nozik A.J., Kaplan M. Mossbauer Resonance Studies of Ferrous Ions in Ice // J. Chem. Phys. 1967. V. 47. — 2960-2977.
206. Hazony Y., Axtmann R.C., Hurley J.W. Covalency effects from Mossbauer experiments on the hydrates of FeCl_2 // Chem. Phys. Lett. 1968. V. 2. — 440-444.
207. Genin A., Greneche J.-M. Reversible surface-sorption-induced electron-transfer oxidation of Fe(II) at reactive sites on a synthetic clay mineral // Geochim. Cosmochim. Ac. 2007. V. 71. — 863–876.

208. Журбицкий З.И. теория и практика вегетационного эксперимента. — М. : Наука, 1968. — 260 с.
209. Walsh S., Lappin-Scott H.M., Stockdale H., Herbert B.N. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes // *J. Microbiol. Methods*. 1995. V. 24. — P. 1-9.
210. Willstater, Stoll. *Investigations on Chlorophyll*. : Science Press, 1928.
211. Дэвис Д.С. Статистический анализ данных в геологии.1 — М. : Недра, 1990. — 319 с.
212. Кузнецов В.В. Физиология растений. — М. : Высш.шк., 2006. — 742 с.
213. Chen Y.H., Mao Y. Heat stress increases the efficiency of EDTA in phytoextraction of heavy metals // *Chemosphere*. 2007. V. 67. — P. 1511-1517.
214. Lestan D., Luo C.I. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review // *Environmental Pollution*. 2008. V. 153. — P. 3-13.
215. Evangelou M.W.H., Bauer U., Ebel M., Schaeffer A. The influence of EDDS and EDTA on the uptake of heavy metals of Cd and Cu from soil with tobacco *Nicotiana tabacum* // *Chemosphere*. 2007. V. 68 — P. 345–353.
216. Niu Q.-x., Zhao C.-y., Jing Z.-a. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity // *J. Immunol. Meth.* 2001. V. 251. № 1-2. — P. 11-19.
217. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. № 1-2. — P. 55-63.
218. Титов Л.П., Тарасюк В.В., Андреева О.Т., Новохатько Т.С., Трусевич М.О., Левченя М.В. Антинуклеарные антитела: характеристика, методы выявления, диагностическая значимость // *Здравоохранение*. 2009. Т. 10. — С. 27-33.

219. Путилина Ф.Е., Галкина О.В., Ещенко Н.Д., Диге Г.П., Красовская И.Е. Свободнорадикальное окисление. — СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2008. — 161 с.
220. Кашапова И.Ю., Попов В.Н., Амерханов З.Г. Изучение разобщающего действия активных форм кислорода на митохондрии печени и почек при окислении сукцината // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Воронеж. 2006. . № 8. — С. 93-99.
221. Shapiro H.M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques // J. Microbiol. Methods. . 2000. V. 42. — P. 3-16.
222. Rudi K., Moen B., Dromtorp S., Holck A. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. — P. 1018-1024.
223. Юдин И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности // Доклады института им. И. Мечникова. 2007. 3. — С. 8-16.
224. Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenman H.-U., Egli T. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry // Applied and environmental microbiology. 2007. — P. 3283–3290.
225. Alonso J.L., Mascellaro S., Moreno Y., Ferrus M.A., Hernandez J. Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. — P. 5151-5154.