

УДК 631.417.2

А. В. ЖИГУНОВ, В. Н. СИМАКОВ

СОСТАВ И СВОЙСТВА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛАГАЮЩИХСЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ

Рассмотрены данные по изменению химического состава корневых остатков в результате обработки 0,1*n* NaOH, которая обычно применяется для выделения гумусовых кислот. Сравнение химического состава растительных остатков до и после щелочной обработки позволяет утверждать, что в щелочно-растворимую фракцию из свежих и слаборазложившихся остатков переходит более половины веществ, экстрагируемых спирто-бензолом, значительная часть гемицеллюлоз, протеинов, негидролизуемого остатка и только изменения в содержании находятся в пределах ошибки опыта. В процессе разложения растительных остатков наблюдается изменение признаков, определяющих наиболее существенные показатели гуминовых кислот (нарастание NO, ω, доли гетероциклического азота), что позволяет говорить о процессе их созревания.

Широко известно, что слабые растворы щелочи из свежих, еще негумифицированных растительных остатков извлекают некоторое количество органических веществ, осаждаемых кислотой (т. е. относимых к группе гуминовых кислот, хотя последние в свежих растительных остатках не содержатся) [1—3, 7, 15—17]. В составе реагирующих подобным образом соединений можно обнаружить некоторые представители белков, различных углеводов, фенольных соединений и др.; они осаждаются кислотой и их суммарный средний элементный состав иногда близок к таковому гуминовых кислот почв. Так как точная физическая и химическая характеристика гуминовых кислот в настоящее время затруднена, некоторые авторы [15 и др.] предлагают положить в основу работы с различными гуминовыми кислотами их происхождение и употребление в отношении препаратов, осаждаемых кислотой, выделенных щелочными вытяжками из растительных остатков, термин «растительные гуминовые кислоты». Другие авторы [14] выступили против этого термина, поскольку не доказана идентичность их с почвенными гуминовыми кислотами.

Так как в настоящее время публикуется много работ по изучению биохимии процесса гумусообразования и часто применяется именно щелочная обработка для извлечения новообразованных гумусовых кислот, исследования по проблеме «систематического положения» растительных гуминовых кислот представляются весьма актуальными.

Объектами наших исследований были корневые массы клевера и тимофеевки, условия компостирования которых описаны ранее [12]. Для выяснения вопроса о том, как отзывается на определении групп органических соединений обработка 0,1*n* раствором NaOH анализируемых корневых остатков, применяемая для выделения гумусовых соединений, были проведены следующие опыты. Свежие и компостированные в течение одного и трех месяцев корневые остатки размалывали и подвергали биохимическому анализу по схеме, предложенной Кизелем [7], до и после щелочной обработки 0,1*n* NaOH (настаивание в течение 12 час. при соотношении растительного материала и щелочи 1:20). Щелочную вытяжку центрифугировали, подкисляли до pH 1,

оставляли на ночь, осадок отделяли центрифугированием. Для обеззоливания препараты встряхивали с разбавленным раствором $\text{HCl} + \text{HF}$ [20]. Очищенные смесью $\text{HCl} + \text{HF}$ препараты подвергали диализу через целлофановую мембрану против воды до отрицательной реакции на Cl^- . Далее препараты высушивали под вентилятором, а затем в вакуумном шкафу при комнатной температуре над P_2O_5 . Сухие препараты растирали в агатовой ступке и в таком виде использовали для анализа.

Препараты анализировали на содержание С и Н микрометодом сухого сжигания в токе кислорода, а на содержание N — полумикрометодами Кьельдаля и Дюма — Прегля [6]. Содержание OCH_3 -групп определяли микрометодом Фибока — Цейзеля [6], количество кислых функциональных групп ($\text{COOH} + \text{OH}_f$) — адсорбционным методом с 0,25 *n* раствором $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и последующим автоматическим титрованием до рН 8,4; содержание карбоксильных групп (COOH) определяли хемосорбционным методом с 0,2 *n* раствором $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ с последующим потенциометрическим титрованием до рН 9,8 [19]. Кроме того, для характеристики соединений N-препараты подвергали гидролизу 6 *n* HCl [11]. Были сняты инфракрасные спектры препаратов (4 мг препарата в 500 мг КВг на приборе UR-20 в области 700—3800 cm^{-1}). Значения коэффициентов экстинкции и цветности были получены при измерении оптической плотности 0,005% раствора препаратов в 0,1 *n* растворе NaOH на ФЭК-М [11]. Исследование молекулярно-вещового распределения препаратов проводили методом гелевой хроматографии на сефадексе G-100 в колонке размерами 2,2×30 см; в качестве растворителя и элюирующего раствора использовали 1 М раствор трис-буфера [13]. На колонку наносили 5 мг препарата в 1 мл трис-буфера. Свободный объем колонки находили с помощью blue dextran и вычисляли обратное отношение площади пика, соответствующего на кривой молекулярно-вещового распределения выходу фракций в свободном объеме к суммарной площади пиков остальных фракций.

По изменению химического состава растительных остатков до и после их щелочной обработки судили о составе щелочно-растворимой фракции (табл. 1). Щелочно-растворимая фракция из свежих (неразложившихся) растительных остатков состояла преимущественно из веществ, экстрагируемых спирто-бензолом, гемицеллюлоз, белков и в меньшей степени щелочно-растворимой фракции лигнина. Однако если в процессе компостирования количество этих веществ в составе щелочно-растворимой фракции уменьшалось, то количество гуминовых кислот увеличивалось и абсолютно и относительно. Этот факт отмечен в литературе [2, 8] и связывается с наличием процесса образования веществ, растворимых в щелочах и осаждаемых кислотой (гуминовых кислот), уже на ранних стадиях разложения растительных остатков. В наших опытах к третьему месяцу разложения корневых остатков количество веществ щелочно-растворимой фракции резко уменьшалось, уменьшалось и содержание в ней гуминовых кислот, но не столь значительно. Это связано не только с процессами разложения, а и с процессами дальнейших превращений осаждаемых кислотой веществ в гуминовые кислоты, устойчивые к микробиологическому воздействию, что является необходимым условием стабильности гуминовых кислот в природных условиях [4, 5].

Из изложенного следует, что хотя более надежной характеристикой эффективности процесса гумификации растительных остатков является содержание фракции веществ, осаждаемой кислотой из щелочного экстракта, — гуминовые кислоты (табл. 1), однако и в эту фракцию кроме подлинно новообразованных кислот могут входить щелочно-растворимые фракции лигнина и продукты конденсации белков с фенольными соединениями, т. е. продукты, появившиеся в исследуемом материале лишь в процессе щелочной экстракции. Все это свидетельст-

Таблица 1

Изменение химического состава корней клевера и корней тимофеевки в процессе разложения

Образец		Степень разложения, %	Вещества, растворимые в спирто-бензоле, %		Гемицеллюлозы		Целлюлоза		Негидролизуемый остаток		Протенны (N × 6,26)		Вещества растворимые в 0,1 л NaOH	Гуминовые кислоты
			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
Корни тимофеевки	Исходный материал	0	100,0	$\frac{5,6}{1,8}$	100,0	$\frac{33,6}{20,3}$	100,0	$\frac{21,8}{16,7}$	100,0	$\frac{16,4}{12,6}$	100,0	$\frac{3,7}{2,4}$	15,8	2,3
	1 месяц компостирования	27,1	37,2	$\frac{2,8 \pm 0,1}{1,7 \pm 0,2}$	57,1	$\frac{26,3 \pm 0,9}{18,7 \pm 0,6}$	71,1	$\frac{21,2 \pm 0,6}{24,7 \pm 0,6}$	96,6	$\frac{21,7 \pm 0,9}{63,9}$	83,7	$\frac{4,3 \pm 0,4}{4,0}$	22,5	3,4
	3 месяца компостирования	40,4	16,1	$\frac{1,4 \pm 0,1}{1,2 \pm 0,1}$	40,7	$\frac{24,0 \pm 0,9}{16,5 \pm 0,7}$	58,4	$\frac{21,2 \pm 0,9}{18,5 \pm 0,3}$	97,4	$\frac{26,8 \pm 0,9}{41,1}$	91,9	$\frac{5,8 \pm 0,2}{4,7}$	19,9	3,1
Корни клевера	Исходный материал	0	100,0	$\frac{7,8}{2,5}$	100,0	$\frac{22,2}{14,9}$	100,0	$\frac{23,1}{19,7}$	100,0	$\frac{16,7}{14,4}$	100,0	$\frac{10,6}{6,3}$	17,3	3,7
	1 месяц компостирования	40	23,6	$\frac{3,1 \pm 0,2}{1,5 \pm 0,3}$	37,3	$\frac{13,8 \pm 0,1}{9,2 \pm 0,6}$	55,6	$\frac{21,4 \pm 0,9}{20,9 \pm 0,9}$	$\frac{119,1}{84,2}$	$\frac{33,2 \pm 0,5}{23,4 \pm 0,8}$	84,1	$\frac{14,9 \pm 0,2}{12,8}$	42,3	11,6
	3 месяца компостирования	60,6	6,5	$\frac{1,3 \pm 0,1}{1,3 \pm 0,1}$	26,7	$\frac{15,0 \pm 0,4}{10,7 \pm 0,6}$	24,3	$\frac{13,2 \pm 0,1}{12,8 \pm 0,3}$	$\frac{83,8}{70,5}$	$\frac{35,5 \pm 0,3}{30,2 \pm 0,3}$	58,6	$\frac{15,8 \pm 0,4}{12,1}$	37,8	10,5

Примечание. Числитель — до обработки 0,1 л NaOH, знаменатель — после обработки. 1—% к исходному, 2—% к навеске.

Таблица 2

Состав и свойства гуминовых кислот, выделенных из разлагающихся растительных остатков

Материал	Зольность, %	C	H	O	N_0^D	N_0^K	$N_{гетер.}$ % от N_0^D	C:H	C:O	C:N $_0^D$	ω	OCH ₃ %	COOH + OH _ф	COOH	OH _ф	$E_{0,001}^{ГВ}$ см ⁴⁶⁰	S ₂ :S ₁	НО:ГК	НО, %	НО·НО / НК·ГК %
		%			весовых атомных			весовых атомных					мг·экв/1 г ГК							
Корни клевера исходные	1,4	54,8	6,2	34,0	4,3	3,9	9,3	8,8	1,6	12,7	-0,043	2,43	4,02	1,39	2,63	0,017	2,18	49,7	1,32	16,7
		34,7	46,7	16,2	2,4	0,7		2,2	14,9											
То же, 1 месяц компостирования	0,7	53,4	5,3	35,9	5,2	4,3	20,3	10,1	1,5	9,9	-0,18	3,71	5,69	1,90	3,79	0,032	1,22	56,2	1,60	20,8
		36,1	42,6	18,2	3,1	0,8		2,0	11,5											
То же, 3 месяца	0,2	47,6	4,5	42,6	5,3	3,9	26,4	10,6	1,1	9,0	+0,21	3,34	5,92	1,75	4,17	0,026	2,35	54,4	1,69	23,3
		34,6	38,9	23,2	3,3	0,9		1,5	10,5											
Корни тимopheевки исходные	0,8	52,0	5,7	37,8	3,5	3,2	8,8	9,1	1,4	14,9	-0,22	5,36	5,11	2,15	2,96	0,021	3,00	55,4	1,16	20,1
		34,4	44,8	18,8	2,0	0,7		1,8	17,3											
То же, 1 месяц компостирования	2,6	51,0	5,7	39,5	3,9	3,4	12,8	9,0	1,3	13,1	-0,18	4,94	4,88	2,05	2,83	0,023	2,77	55,9	1,43	23,7
		33,7	44,7	19,4	2,2	0,8		1,7	15,3											
То же, 3 месяца компостирования	1,0	52,5	5,5	38,6	3,5	3,1	11,4	9,6	1,4	15,0	-0,15	5,80	4,72	2,10	2,62	0,023	3,49	61,3	1,32	23,3
		35,0	43,7	19,3	2,0	0,8		1,2	17,5											
Гор. А ₁ дерново-подзолистой почвы	3,5	51,5	5,3	39,9	3,3	2,6	20,0	9,7	1,3	15,6	-0,07	1,45	6,38	3,05	3,33	0,052	2,04	59,1	1,18	27,1
		35,0	42,8	20,2	2,0	0,8		1,7	18,2											

Примечание. N_0^D — азот, определяемый методом Дюма; N_0^K — азот, определяемый методом Кьельдаля; $N_{гетероцикл} = N_0^D - N_0^K$; $S_2 : S_1$ — обратное соотношение площадей пиков, соответствующих на кривых молекулярно-весового распределения выходу фракций в свободном объеме (S_1) к суммарной площади остальных фракций (S_2); НО негидролизующий 6 л HCl остаток гуминовой кислоты; $\omega = \frac{2Q_O - Q_H}{Q_C}$, где Q число грамм-атомов (С, Н, О).

вует о том, что при изучении процесса гумификации растительных остатков для правильного количественного учета и характеристики гуминовых кислот, образующихся при этом, необходимо проводить как можно более полную характеристику образовавшихся гуминовых кислот, чтобы можно было сопоставить их свойства со свойствами гуминовых кислот почв и изыскать приемы воздействия на эти свойства в желаемом для нас направлении.

Из данных по составу и свойствам гуминовых кислот, выделенных из разлагающихся растительных остатков (табл. 2), видно, что новообразованные гуминовые кислоты характеризуются специфическим составом, заметно изменяющимся в процессе разложения растительных остатков. Если по элементному составу эти гуминовые кислоты были близки к гуминовым кислотам дерново-подзолистых почв, то по ряду других диагностических признаков они заметно отличаются от последних. Количество кислых функциональных групп, особенно карбоксильных в них было заметно меньше, чем в гуминовых кислотах дерново-подзолистых почв. Аналогичный ход изменений в химическом составе гуминовых кислот, образующихся при разложении растительных остатков, наблюдали Александрова и Аршавская [3].

Из данных табл. 2 также видно, что для новообразованных гуминовых кислот характерно высокое содержание метоксильных групп. Метоксильные группы в составе гуминовых кислот обычно рассматриваются как остаточные [2]. Поэтому высокое содержание этих групп в новообразованных гуминовых кислотах свидетельствует об их «молодом возрасте».

Еще следует отметить, что гуминовые кислоты, выделенные из разлагающихся растительных остатков, менее устойчивы к кислотному гидролизу, поскольку доля их негидролизуемой части невелика (см. отношение $\text{НО} : \text{ГК}$ в табл. 2). Поэтому становится понятным то, что эти гуминовые кислоты обладают более низким коэффициентом экстинкции ($0,017 - 0,032$ вместо $0,049 \pm 0,004$ для гуминовых кислот дерново-подзолистых почв [10]) и что негидролизуемый азот составляет меньшую долю ($16,7 - 23,7\%$) от всего азота, содержащегося в них. Это согласуется также с тем, что количество гетероциклического азота в этих гуминовых кислотах меньше. В то же время следует отметить, что количество гетероциклического азота в гуминовых кислотах по мере разложения растительных остатков увеличивается, достигая величин, характерных для гуминовых кислот дерново-подзолистых почв.

Интересно отметить, что доля высокомолекулярных фракций (мол. в. $> 150\,000$) выше в гуминовых кислотах, выделенных из разлагающихся растительных остатков в первые сроки (1 месяц) разложения, а затем их доля уменьшается (см. $S_2 : S_1$ табл. 2).

Кроме того, можно указать и на то, что доля высокомолекулярных фракций в гуминовых кислотах, выделенных из свежих растительных остатков, ниже, чем в гуминовых кислотах первого месяца разложения, т. е. при образовании гуминовых кислот можно предполагать реакции полимеризации и конденсации, в которые вступают крупные звенья некоторых компонентов растительных остатков (лигнина) по схеме, предложенной Манской и Кодиной [9].

Следует также отметить, что полученные нами данные свидетельствуют о том, что в процессах превращения растительных остатков происходят изменения в составе и свойствах гуминовых кислот. Так, при увеличении срока разложения растительных остатков гуминовые кислоты, выделенные из них, по своим свойствам постепенно приближаются к свойствам гуминовых кислот, выделенных из почв, что выражается в их карбонизации (увеличение отношения $\text{C} : \text{H}$), карбоксилировании, ароматизации (увеличение отношений $\text{НО} : \text{ГК}$, $\text{N}_{\text{НО}} \cdot \text{НО} : \text{N}_{\text{ГК}} \cdot \text{ГК}$, увеличение содержания гетероциклического азота, увеличение коэффи-

циента экстинкции). Однако по ряду свойств (функциональный состав, величины коэффициента экстинкции) они все еще далеки от свойств почвенных гуминовых кислот. Особенно эти различия заметны у гуминовых кислот, выделенных из растительных остатков, находящихся на ранних стадиях разложения.

Различия обнаруживаются и в инфракрасных спектрах поглощения гуминовых кислот, поскольку для гуминовых кислот, выделенных из растительных остатков, характерно наличие большого количества дополнительных полос поглощения в интервале $1160-1400\text{ см}^{-1}$, тогда как в ИК-спектрах поглощения гуминовых кислот почв в этих интервалах наблюдается более однообразная структура. Нивелирование особенностей, характеризующих наличие исходных компонентов растительного материала, указывает, что происходит формирование молекулы гуминовой кислоты и что это является одной из важнейших особенностей в процессе их созревания [16].

Выводы

1. Изучение динамики компонентов, входящих в состав растительных остатков и новообразованных форм гуминовых кислот, показало, что необходимо внести некоторые изменения в ход анализа разлагающихся растительных остатков, а именно: необходимо дополнительно проводить определение их состава и после экстракции щелочными растворами. Такое дополнение к существующей методике позволило наблюдать в некоторых случаях абсолютное увеличение негидролизующего остатка объяснить новообразованием гумусовых кислот.

2. Сравнительное изучение состава и свойств гуминоподобных веществ, образующихся в результате разложения растительных остатков, и гуминовых кислот дерново-подзолистой почвы показало, что новообразованные гуминоподобные вещества можно отнести к молодым формам гуминовых кислот, признаками которых являются: высокая степень гидролиземости, низкие величины коэффициента экстинкции, низкое содержание карбоксильных и высокое содержание метоксильных групп, большая доля высокомолекулярных фракций. По мере увеличения срока разложения растительных остатков отмечается все более увеличивающаяся конденсированность и уменьшение молекулярного веса макромолекул гуминовых кислот.

Литература

1. *Александрова И. В.* Приемы извлечения гумусовых веществ из гумифицирующих растительных остатков. Почвоведение, 1972, № 7.
2. *Александрова Л. Н. и др.* Гумусовые вещества почвы (их образование, состав, свойства и значение в почвообразовании и плодородии). Зап. ЛСХИ, т. 142, 1970.
3. *Александрова Л. Н., Аршавская В. Ф.* Изменение состава гуминовых кислот в процессе гумификации растительных остатков. Зап. ЛСХИ, т. 117, 1968.
4. *Александров Л. Н., Румянцева Э. А.* Изменение новообразованных гуминовых кислот в процессе их дальнейшей гумификации. Зап. ЛСХИ, т. 137, 1970.
5. *Александрова Л. Н., Румянцева Э. А.* О процессах дальнейших превращений новообразованных гуминовых кислот. Зап. ЛСХИ, т. 237, 1974.
6. *Климова В. А.* Основные микрометоды анализа органических соединений. «Химия», 1967.
7. *Кононова М. М.* Проблема почвенного гумуса и современные задачи его изучения. Изд. АН СССР, 1951.
8. *Люжин М. Ф.* Минерализация и гумификация растительных остатков в почве. Зап. ЛСХИ, т. 117, 1968.
9. *Манская С. М., Кодина Л. Г.* Ароматические структуры лигнина и их роль в образовании гуминовых кислот. Почвоведение, 1968, № 8.
10. *Орлов Д. С.* Гумусовые кислоты почвы. Изд. МГУ, 1974.
11. *Орлов Д. С., Гришина Л. А., Ерошичева Н. Л.* Практикум по биохимии гумуса. Изд. МГУ, 1969.

12. *Симаков В. Н., Жигунов А. В.* Динамика состава и свойств водно-растворимого органического вещества при компостировании корней клевера и тимopheевки. Вестн. ЛГУ, № 3, Сер. биол., вып. 1, 1975.
13. *Cameron R. S., Swift R. S., Thornton B. K., Posner A. M.* Colibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acid. Soil Sci., v. 23, № 3, 1972.
14. *Davies R. J., Coulson C. B.* Humic acid. Soil and Fertiliser, v. 23, 1959.
15. *Kleinhempel D.* Über Pflanzenhuminsäuren. Albr. Thaer-Archiv, Bd 11, H. 1, 1967.
16. *Kononova M. M., Alexandrova I. V.* Formation of humic acids during plants residue humification and their nature. Geoderma, v. 9, № 3, 1973.
17. *Mucke D., Obenaus R.* Neuere Untersuchungen zur Chemie and Biologie der Huminsäuren. Wiss. Z. Univ. Rostock, math.-natur.-wiss. R., Bd 12, 1963.
18. *Sauerbech D., Fuhr F.* Alkali extraction and fractionation of labelled plant material before and after decomposition. A contribution of the technical problems in humification studies. Isotopes and radiation in soil organic matter studies. Vienna, Intern. Atom. Ener. Agency, 1968.
19. *Schnitzer M., Umesh G. Gupta.* Determination of acidity in soil organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 29, № 3, 1965.
20. *De Serra Ortiz M. J., Schnitzer M.* Extraction of humic acid by alkali and chelating resin. Canad. J. Soil Sci., v. 52, № 3, 1972.

Биолого-почвенный факультет ЛГУ
Кафедра почвоведения и географии почв

Дата поступления
28.XII.1976 г.

A. V. ZHIGUNOV, V. N. SIMAKOV

COMPOSITION AND PROPERTIES OF HUMIC ACIDS EXTRACTED FROM DECOMPOSING PLANT RESIDUES

Data are presented on the changes in chemical composition of root residues after the treatment with 0,1 N NaOH used for humus acid extraction. The comparison of the plant residue chemical composition before and after alkaline treatment has shown that more than half substances, extracted with alcohol-benzole, an appreciable portion of hemicelluloses, proteins and nonhydrolyzed residue pass into the alkali-soluble fraction from fresh and slightly decomposed residues. Only the changes of cellulose content are within the limits of experimental error. During the decomposition of plant residues, changes in most important characteristics of humic acids (the increase of HO, ω , and of heterocyclic nitrogen) are observed, what is an evidence of their becoming mature.