

Глава 2. ФОРМИРОВАНИЕ ВЫБОРОК ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Принцип формирования рабочих выборок препаратов гумусовых кислот был ориентирован на выявление возможных корреляций между строением и свойствами гумусовых кислот. Поэтому при создании каждой выборки стремились к максимальному разнообразию строения и свойств гумусовых кислот за счет включения препаратов различного происхождения (уголь, торф, почва, природные воды) и фракционного состава (нефракционированная смесь гуминовых и фульвокислот – ГФК, фракции гуминовых кислот – ГК и фульвокислот – ФК). Принимая во внимание стохастический характер объекта, нижний предел размера выборки устанавливали на уровне 20 препаратов. При этом для повышения прогностической способности получаемых корреляционных соотношений в каждую группу гумусовых кислот определенного типа (сходный источник происхождения и/или фракционный состав) включали, по возможности, не меньше шести препаратов.

Всего в работе для исследования было использовано около ста препаратов гумусовых кислот, выделенных из всех основных источников их происхождения – торфов, почв, природных вод и углей. При этом выделение гумусовых кислот из всех источников, за исключением угля, было проведено студентами, аспирантами и сотрудниками рабочей группы согласно стандартным методикам, краткое описание которых приводится далее.

2.1 Выделение препаратов гумусовых кислот из природных объектов

Гумусовые кислоты торфа. Препараты торфяных гумусовых кислот выделяли щелочной экстракцией из торфа согласно [Lowe, 1992]. С целью сохранения водорастворимой фракции ГФК была опущена начальная стадия обработки торфа горячей водой. Согласно выбранной методике измельченный торф несколько раз обрабатывали смесью бензол-этанол (1:1) в соотношении торф:экстрагент 1:3. Обработку проводили до тех пор, пока экстрагируемый раствор не становился почти бесцветным. После экстракции торф высушивали при температуре 40-60°C в течение ~8 часов до исчезновения запаха бензола. Затем торф заливали раствором 0.1 М NaOH в соотношении 1:3 и оставляли на ночь. Щелочной раствор сливали и отфильтровывали, экстракцию повторяли несколько раз до тех пор пока экстракт не становился слабо окрашенным. Порции щелочного экстракта объединяли и обессоливали пропусканием через катионит КУ-23 в Н-форме (рН полученных таким образом растворов составлял 2.95-3.4). Для разделения полученного водного

концентрата на ГК и ФК его подкисляли с помощью HCl до pH 2 и оставляли на ночь. Затем декантированием отделяли раствор ФК от осадка ГК. Осадок ГК растворяли в 0.1 М КОН и добавляли твердый KCl из расчета получить суммарную концентрацию 0.3 М [K⁺]. Полученный раствор фильтровали и снова подкисляли до pH 2, отделяли осадок ГК центрифугированием и очищали при помощи электродиализа, используя целлофановые мембраны. Фракцию ФК сорбировали на смоле Амберлит XAD-2, промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции выходящего с колонки элюата на ионы Cl⁻, а затем элюировали ФК 0.1 М раствором NaOH. Полученный щелочной экстракт обессоливали пропусканием через катионит КУ-2-8 в Н-форме.

РОВ торфа. Тщательно перетертый воздушно-сухой торф, просеянный через сито 2-мм, заливали дистиллированной водой (1:30; масс.) и оставляли на ночь. Затем вытяжку отфильтровывали через фильтр "синяя лента". Процедуру обработки навески торфа дистиллированной водой повторяли дважды. Отфильтрованные вытяжки объединяли и обессоливали на катионообменнике КУ-23, предварительно переведенном в Н-форму пропусканием 30-ти объемов 1 М HCl. Обессоленный экстракт концентрировали на роторном испарителе при 600°C.

Гумусовые кислоты почв. Из почвенного образца отбирали крупные корни, затем почву растирали и пропускали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Экстракцию гумусовых кислот, включающую предварительное декальцирование почвы, проводили согласно [Орлов и Гришина, 1981]. Для декальцирования навеску почвы заливали 0.05 М H₂SO₄ или 2.7 М HCl (в случае карбонатных почв, т.е. черноземов) в отношении почва:раствор 1:5. После отстаивания суспензии раствор сливали и операцию повторяли, пока качественная проба на кальций не обнаруживала только следы последнего в растворе. После декальцирования почву промывали 1-2 раза дистиллированной водой и приливали 0.1 М раствор NaOH в соотношении почва:раствор 1:6. Щелочной раствор гумусовых кислот сливали и отфильтровывали; экстракцию повторяли до заметного осветления щелочного экстракта. В полученный раствор гумусовых кислот почвы добавляли NaCl для коагулирования минеральных примесей. После отстаивания раствор центрифугировали для отделения минеральных коллоидов. Для выделения препаратов ГФК почвы проводили обессоливание полученного супернатанта на катионообменнике КУ-23, предварительно переведенном в Н-форму. Для осаждения гуминовых кислот к супернатанту при осторожном перемешивании добавляли 1 М H₂SO₄ из расчета 20-25 мл на литр экстракта до появления первых признаков коагуляции (значение pH устанавливалось в пределах 1-2). После отстаивания осадка ГК надосадочную жидкость,

содержащую ФК, сливали, а рыхлый осадок ГК центрифугировали для полного отделения от надосадочной жидкости. Обессоливание препаратов ГК проводили методом электродиализа до отсутствия положительной реакции на Cl^- и SO_4^{2-} во внешнем растворе. Выделение ФК из полученного после отделения ГК кислого раствора проводили аналогично ФК торфа, описанному выше.

Гумусовые кислоты почвенного раствора. Выделение данной группы препаратов гумусовых кислот проводили по оригинальной методике, разработанной в нашей рабочей группе и основанной на классических методах получения почвенного РОВ [Когут, 1996] и выделения препаратов ГФК из природных вод [Mantoura and Riley, 1975]. Навеску воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с размером ячеек 1 мм, заливали дистиллированной водой в соотношении почва:вода 1:2, тщательно взбалтывали и оставляли на ночь. Полученную водную вытяжку отфильтровывали через бумажный фильтр “синяя лента” и мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм для отделения истинно растворенного органического вещества от коллоидного. Отфильтрованные вытяжки подкисляли до pH 1-2 с помощью 0.1 М HCl и пропускали через стеклянную колонку, заполненную смолой XAD-2, для осаждения ГФК. Процедуры элюирования препарата ГФК почвенного раствора с колонки и последующего обессоливания были аналогичны описанным для выделения ФК торфов и почв.

Гумусовые кислоты природных вод. Препараты водных ГФК выделяли согласно методике [Mantoura and Riley, 1975]. Природную воду фильтровали через сложенную в несколько слоев стеклоткань (предварительно тщательно промытую метанолом) или пропускали через фильтр 0.45 мкм и подкисляли до pH 2 конц. HCl. После этого раствор пропускали через колонку, заполненную макроситовой смолой Amberlite XAD-2 или XAD-8 до насыщенно-желтого окрашивания смолы (в отдельных случаях использовали ДЭАЭ-целлюлозу согласно [Першина и др., 1989]). Затем колонку промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на ионы Cl^- . ГФК десорбировали с колонки 0.1 М NaOH до обесцвечивания элюата. Щелочной концентрат ГФК природных вод обессоливали аналогично препаратам ГФК торфа и почв.

Выделение всех препаратов в твердом виде осуществляли выпариванием (препараты 1994 г.) или методом лиофильной сушки. Лиофильную сушку проводили на установке Института фундаментальных проблем биологии (г. Пущино), любезно предоставляемой нам в течение многих лет проф. А.А. Поздновским. Твердые препараты ГФК использовали для элементного анализа и ЯМР-спектроскопии; для проведения гель-хроматографического

анализа, титрования и токсикологических экспериментов – обессоленные растворы, точный титр которых определяли упариванием аликвотной части раствора и высушиванием над P_2O_5 до постоянного веса.

2.2 Описание использованных в работе препаратов

Шифры всех выделенных препаратов приведены в табл. 2.2. В основу названия препаратов был положен источник их происхождения (торф, уголь, почва, поверхностные воды, донные отложения) и фракционный состав. Под фракциями понимали ГК и ФК. Сумму ГК и ФК обозначали ГФК, а нефракционированное растворенное органическое вещество природных вод и почвенного раствора – РОВ. Во избежание разночтений при публикации результатов в русско- и англоязычной литературе, для составления шифров использовали латинские аббревиатуры. **Шифр** состоит из **классификационной части**, которая включает в себя обозначение **источника происхождения** и **фракционного состава** препарата, и **специальной части**, состоящей из обозначения **конкретного источника** и (в большинстве случаев) **года выделения препарата**. Классификационная часть отделяется от специальной части дефисом. Схема образования классификационной части шифра:

- **первая буква** (*A, B, C, P, S*) обозначает **источник происхождения** (*aqua/вода, bottom sediments/донные отложения, coal/уголь, peat/торф, soil/почва*, соответственно);
- **две (три) последующие буквы** (*DOM, FA, HA, HF*) обозначают **фракционный состав** (*dissolved organic matter/РОВ, fulvic acids/ФК, humic acids/ГК, sum of humic and fulvic acids/ГФК*, соответственно).

Например, шифр *PHF-T198* означает, что это препарат ГФК, выделенный из торфа **T1** в **1998** г., *SHA-Pw96* – препарат ГК почв, выделенный из дерново-подзолистой почвы (*Podzol*), участок под лесом (*woods*) в **1996** г., *ADOM-SwMu4* – препарат нефракционированного РОВ болота (*Swamp* – болото), расположенного на острове Мудьюг (*Mudyug*), станция отбора **4**.

В состав природных объектов, из которых осуществлялось выделение препаратов гумусовых кислот, вошли верховые и низинные торфа различного геоботанического состава (группы моховая, травяная, древесная, древесно-травяная), почвы различной зональности (дерново-подзолистые, серые лесные и черноземы) и вида использования (лесные, пахотные и огородные участки), поверхностные воды (болота и реки). Помимо выделенных в нашей группе, в работе было использовано 6 препаратов ГК угля, 3 из которых были предоставлены доц. Пономаренко (КазГУ, Казахстан) и 3 коммерческих препарата ГК угля. В работе использовался также 1 коммерческий препарат

ГК торфа (РНА-НТО), водные препараты – ГК и ФК болотных вод, ГК грунтовых вод и ФК почвенного раствора были любезно предоставлены Др. G. Abbt-Braun (кафедра водной химии, Университет Карлсруэ, ФРГ).

Краткая сводка препаратов, использованных в работе, приведена в табл. 2.1, их полное перечисление и наименование источников дано в табл. 2.2.

Таблица 2.1

Источники происхождения и количество использованных
препаратов гумусовых кислот

Источник происхождения	Фракционный состав					ВСЕГО
	ГФК (HF)	ГК (HA)	ФК (FA)	РОВ (DOM)	РГФК (DHF)	
Торфа (P)						
верховые	11	4	3	1	–	19
низинные	5	3	4	1	–	13
другое	2	–	–	–	–	2
Почвы (S)						
дерново-подзолистые	9	8	3	–	3	23
серые лесные	3	3	–	–	–	6
черноземы	3	6	5	–	–	13
другое	1	1	1	–	1	4
Угли (C)	6	–	–	–	–	6
Природные воды (A)	11	1	2	2	–	16
Донные отложения (B)	3	–	–	–	–	3
ВСЕГО	54	26	18	4	4	106

Таблица 2.2.

Шифры и описание использованных в работе препаратов
гумусовых кислот

Препарат	Описание	Год выделения
ГФК торфа (PHF)		
Верховые торфа		
PHF-T1H94	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
PHF-T4H94	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
PHF-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
PHF-T5H94	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
PHF-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998

Препарат	Описание	Год выделения
RHF-T6H94	Пушицево-сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-T6H98	Пушицево-сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RHF-T7L94	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-T7L98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
RHF-TНH94	Сосново-пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-TНMи4	Сфагновый торф (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1994
Низинные торфа		
RHF-T3L98	Осоковый торф (Твеская обл.)	1998
RHF-T10L94	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-T10L98	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1998
RHF-TTL94	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-TTL98	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1998
ГК торфа (РНА)		
Верховые торфа		
RНА-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T6H98	Пушицево-сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T7H98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
Низинные торфа		
RНА-T3L98	Осоковый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T10L98	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-TTL98	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1998
Другое		
RНА-TНТО	ГК торфа, коммерческий препарат НПО Биолар	
RНА-TН8	ГК торфа UFZ (ФРГ)	
ФК торфа (peat FA => PFA)		
Верховые торфа		
PFA-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.) “–“	1998
PFA-T6H98	Пушицево-сфагновый торфа (Тверская обл.)	1998
PFA-T7H98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
Низинные торфа		
PFA-T3L98	Осоковый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-T10L94	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-TTL98	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1998

Препарат	Описание	Год выделения
РОВ торфа (peat dissolved organic matter => PDOM)		
PDOM-TНН	Верх. сосново-пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
PDOM-TTL	Низ. тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1994
ГФК почв (soil HF => SHF)		
SHF-Co94	Чернозем обыкновенный (Ставропольский кр.)	1994
SHF-Cm98	Чернозем луговой (Ставропольский кр.)	1998
SHF-PMu9	Лугово-глеевая почва (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	
SHF-TMu12	Торфяная почва (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	
ГК почв (soil HA => SHA)		
Дерново-подзолистые почвы		
SHA-Pw94	Целинная (Московский обл.)	1994
SHA-Pw96	Целинная (Московский обл.)	1996
SHA-Pw98	Целинная (Московский обл.)	1998
SHA-PwN	Целинная (Новгородская обл.)	
SHA-Pp94	Окультуренная (Московская обл.)	1994
SHA-Pp96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
SHA-Pg94	Культурная (Московская обл.)	1994
SHA-Pg96	Культурная (Московская обл.)	1996
SHA-Pg98	Культурная (Московская обл.)	1998
Серые лесные почвы		
SHA-Gw94	Целинная (Тульская обл.)	1994
SHA-Gp94	Окультуренная (Тульская обл.)	1994
Черноземы		
SHA-Cm94	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1994
SHA-Cm98	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1998
SHA-CtV94	Чернозем типичный (Воронежская обл.)	1994
ФК почв (soil FA => SFA)		
Дерново-подзолистые почвы		
SFA-Pw94	Целинная (Московская обл.)	1994
SFA-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996
SFA-Pw98	Целинная (Московская обл.)	1998
SFA-Pp94	Культурная (Московская обл.)	1994
SFA-Pp96	Культурная (Московская обл.)	1996
SFA-Pg94	Окультуренная (Московская обл.)	1994
SFA-Pg96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
SFA-Pg98	Окультуренная (Московская обл.)	1998

Препарат	Описание	Год выделения
Серые лесные почвы		
SFA-Gw94	Целинная (Тульская обл.)	1994
SFA-Gp94	Культурная (Тульская обл.)	1994
Черноземы		
SFA-Cm94	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1994
SFA-CtV94	Чернозем типичный (Воронежская обл.)	1994
ГФК почвенного раствора (soil dissolved HF => SDHF)		
Дерново-подзолистые почвы		
SDHF-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996
SDHF-Pp96	Культурная (Московская обл.)	1996
SDHF-Pg96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
ГК углей (coal HA => CHA)		
CHA-K1	Карагандинская обл.	
CHA-K2	Джезказганская обл.	
CHA-K3	Павлодарская обл.	
CHA-AGK	Коммерческий препарат АО Спецбиотех (Россия)	
CHA-ALD	Коммерческий препарат Aldrich (ФРГ)	
CHA-RO	Коммерческий препарат (ФРГ) UFZ	
ГФК природных вод (aquatic HF=> AHF)		
AHF- RMX8	р. Москва (XAD-8) (Московская обл.)	1995
AHF- RMX2	р. Москва (XAD-2) (Московская обл.)	1995
AHF-RMX	р. Москва (XAD-2/8) (Московская обл.)	1997
AHF-RMC	р. Москва (DEAE-целлюлоза) (Московская обл.)	1996
AHF- RI	р. Истра (XAD-8) (Московская обл.)	1997
AHF- RND3	р. Сев. Двина (XAD-2) (Архангельская обл.)	1995
AHF-RND11	р. Сев. Двина (XAD-2) (Архангельская обл.)	1995
AHF-RND14	р. Сев. Двина (XAD-2) (Архангельская обл.)	1995
AHF-MMu7	Белое море (XAD-2) (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
AHF-MMu8	Белое море (XAD-2) (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
AHF-SSh1	Болотные воды (XAD-2) (Московская обл.)	1994
ГК природных вод (aquatic HA => АНА)		
АНА-SHo13	Болотные воды (XAD-8) (оз. Hohlosee, ФРГ), EBI	
ФК природных вод (aquatic FA => АФА)		
АФА-SHo10	Болотные воды (XAD-8) (оз. Hohlosee, ФРГ), EBI	
АФА-GFg1	Грунтовые воды (XAD-8) (Fuhrberg, ФРГ), EBI	

Препарат	Описание	Год выделения
РОВ природных вод (aquatic DOM => ADOM)		
ADOM-SMu4	Болотные воды (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
ADOM-SMu8	Болотные воды (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
ГФК донных отложений (bottom sediments HF => BHF)		
BHF-SMu2	Озеро на о. Мудьюг (Архангельская обл.)	1995
BHF-RND13	Эстуарий Сев. Двина (Архангельская обл.)	1995
BHF-RLuh	р. Лух (Владимирская обл.)	1995