

ФОТОЛИЗ И ДЕФОРМАЦИЯ МОЛЕКУЛ ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОСВЕЩЕННОСТИ, ВЛАЖНОСТИ И ТЕМПЕРАТУРЫ

Н. П. ИЛЬИН, Г. И. ГЛЕБОВА, Д. С. ОРЛОВ

Положительное, а в некоторых случаях и отрицательное действие гумусовых веществ, включая гуминовые препараты, на условия питания и развития растений установлено многими исследователями [3, 11, 7, 1, 18, 12, 13, 17].

Природа явления и механизм взаимодействия гумусовых кислот (ГК) с растениями дискуссионны, но независимо от этого принципиальное значение приобретает вопрос: почему сравнительно малые дозы гуминовых удобрений могут быть эффективны на почвах, содержащих значительно более высокие количества тех же веществ. Общий ответ на этот вопрос дает аналогия с понятием доступности растениям элементов минерального питания и азота. Применительно к гумусовым кислотам это понятие значительно шире и включает, очевидно, их подвижность (растворимость) в почвах, взаимодействие с минеральными компонентами, размеры и конфигурацию молекул и, наконец, качество самих молекул: содержание функциональных групп, парамагнитных центров и т. п. Поэтому, характеризуя физиологическое действие гуминовых веществ, правильнее говорить не о доступности, а об их активности или об активных компонентах гумуса.

Одна из причин повышенной активности гуминовых препаратов, по сравнению с нативными гумусовыми кислотами почв, заключается, по нашему мнению, в изменениях, которые происходят в них в ходе приготовления препаратов. Кроме разрушения органо-минеральных связей, воздействие щелочных растворов и других факторов может вызвать гидролиз гумусовых кислот, их окисление, изменить характер молекулярно-весового распределения частиц, привести к изменению конфигурации и конформаций молекул. Явления такого рода, не меняющие принадлежности соединений к классу гумусовых кислот, но влияющие на детали строения, можно объединить термином «денатурация», понимая ее в более широком смысле слова, чем это имеет место в химии белка.

Нами были исследованы некоторые из процессов денатурации гумусовых кислот, происходящие под влиянием их высушивания, нагревания и освещения.

Различия в конфигурации молекул гуматов и гуминовых кислот во влажном (растворенном) состоянии и в сухом виде отчетливо видны при измерении относительных плотностей. Уменьшение молярных объемов белков при растворении в воде хорошо известно. Сухие гуминовые кислоты практически нерастворимы в воде, поэтому мы измеряли их плотность сначала в воде («сухой препарат»), а затем в слабых растворах NaOH. В разбавленных растворах NaOH удельные объемы ГК при увеличении концентрации щелочи уменьшаются, а плотности — увеличиваются (рис. 1). При дальнейшем увеличении концентрации щелочи, когда практически полностью нейтрализуются все карбоксильные и

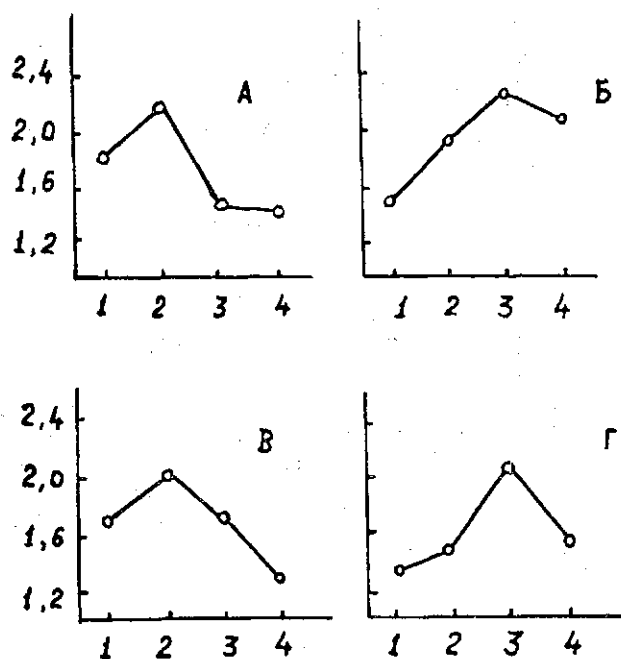


Рис. 1. Относительная плотность гуминовых кислот и гуматов: А — чернозем; Б — горно-луговая почва; В — сосново-сфагновый торф; Г — то же, после гидролиза; 1 — сухой препарат в дистиллированной воде; 2 — раствор в 0,001 н. NaOH; 3 — раствор в 0,01 н. NaOH; 4 — раствор в 0,1 н. NaOH.

все или большая часть фенольных групп, плотность уменьшается, достигая значений меньших, чем в сухом состоянии.

Такое изменение плотности можно объяснить тем, что сухие препараты гуминовых кислот мало гидрофильны, а введение небольшого количества щелочи резко меняет состояние вещества. Появление отрицательных зарядов за счет появления карбоксилат-ионов вызывает растворение части препарата. Молекулы воды ориентируются и уплотняются вблизи ионогенных групп, что влечет за собой кажущееся уменьшение удельного объема; измеряемое значение плотности увеличивается. Связывание воды подтверждается степенью гидратации гуматов, которая по вискозиметрическим данным [9] составляет не менее 1,2—2,5 г воды на 1 г гуминовой кислоты.

При дальнейшей нейтрализации карбоксильных групп появляется большое число отрицательных зарядов; их взаимное отталкивание способствует распрямлению цепей молекулы и вещество стремится занять больший объем, чем в сухом состоянии. Подобное явление известно для РНК, молекула которой приобретает жесткую структуру «палки» под действием электростатического отталкивания соседних ионизированных групп.

К близким представлениям о скручивании молекул гуминовых кислот при коагуляции пришли Онг и Биск [16].

В соответствии с этими представлениями сложение гуминовых кислот, степень ориентированности молекул не могут быть одинаковы в сухом состоянии и в геле. В гелях («набухших» препаратах) молекулы ГК должны располагаться упорядоченнее, чем в сухих препаратах.

Чтобы проверить последнее предположение, нами были получены дифрактограммы гелей некоторых гуминовых кислот, а затем — дифрак-

гограммы тех же образцов после высушивания их на воздухе. Съемку проводили на дифрактометре УРС — 50 ИМ с медным излучением, при силе тока 12 ма и напряжении 35 кв. Сухие препараты гуминовых кислот не имеют четких рефлексов; дифракционная картина размыта, интенсивность отражений невелика: ее максимум приходится на область 3,5—3,7 Å (рис. 2). Эти результаты не отличаются от ранее полученных [5].

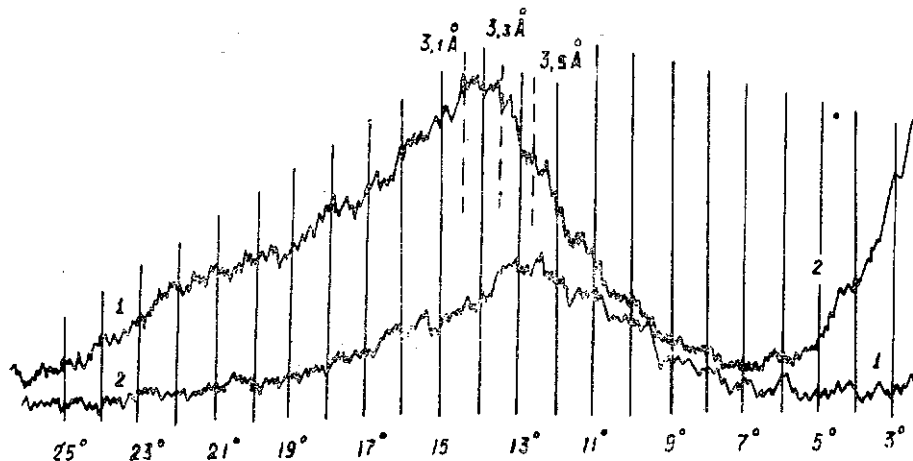


Рис. 2. Дифрактограммы гуминовой кислоты из лугово-черноземной почвы в состоянии геля (1) и после высушивания (2).

Интенсивности отражений у гелей резко повышаются, а дифрактограммы по характеру распределения интенсивностей отражения несколько отличаются от сухих препаратов (рис. 2). Повышение интенсивностей отражений, несомненно, обусловлено большей упорядоченностью расположения молекул. Упорядочению в сухом состоянии препятствуют как полидисперсность, так и деформированность молекул. Максимум интенсивности смещается с 3,5—3,7 Å до 3,3—3,1 Å, что позволяет думать о более высокой деформируемости элементов структуры с большими периодами повторяемости.

На деформируемость молекул гуминовых кислот указывают и другие данные. Обычно электронно-микроскопические снимки свидетельствуют об округлой форме частиц гуминовых кислот (2, 8, 12, 14, 15, 20, 19). Однако вискозиметрические определения указывают на эллипсоидальную конформацию частиц с соотношением осей 1:6 [9]. Вероятно, и при переходе от растворов гуматов, используемых в вискозиметрии, к сухим осадкам (электронная микроскопия) деформация молекул приводит к изменению формы частиц (или ассоциатов) от вытянутой к округлой.

Дополнительным подтверждением деформации гуминовых кислот и фульвокислот при высушивании могут служить снимки поверхности сухих препаратов, полученные с помощью сканирующего микроскопа модели HSM—2 фирмы «Хитачи» (Япония) (рис. 3). Для получения снимков использовали крупинки сухих препаратов гумусовых кислот. Перед съемкой поверхность частиц промывали слабым раствором щелочи, затем водой. На снимках хорошо видно слоистое сложение частиц. Глубокие трещины и разломы указывают на значительную деформацию молекул органического вещества при высушивании.

Полученные результаты позволяют предполагать, что максимальной активностью в почвах обладают те новообразованные гуминовые

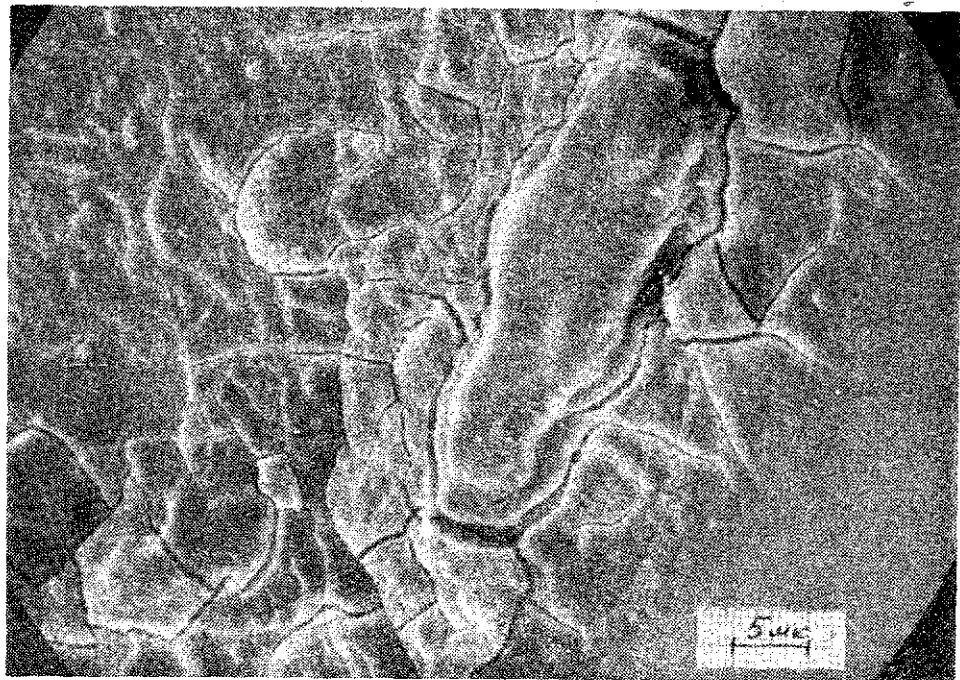
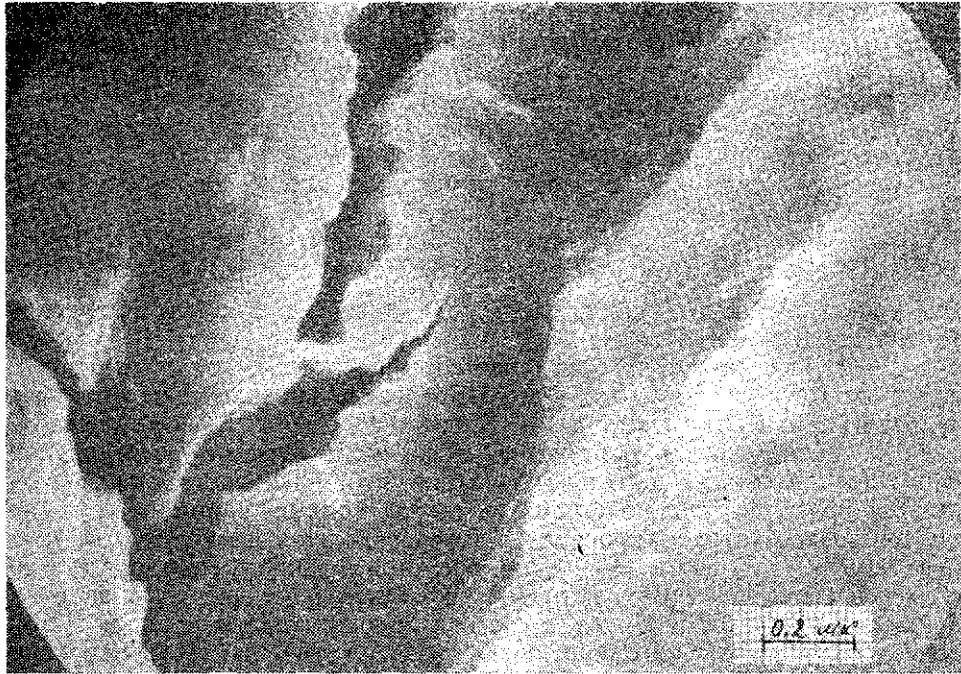


Рис. 3. Фотоснимки поверхности частиц гумусовых кислот, полученные на сканирующем микроскопе.
А, Б — фульвокислота серой лесной почвы.

кислоты, молекулы которых наиболее выпрямлены. Они более подвижны, энергично реагируют с минеральными и органическими компонентами и участвуют в структурообразовании. Старение гуминовых кислот, происходящее в результате высушивания, сопровождается деформацией молекул, потерей растворимости, внутримолекулярным блокированием части функциональных групп. Все это приводит к снижению их воздействия на растения.

Иное действие на растворы гумусовых кислот оказывает свет. В наших опытах использовалось излучение ртутно-кварцевых ламп БУВ—15 и ПРК—7 мощностью 15 и 1000 вт соответственно. Лампа БУВ—15 обладает практически монохроматическим излучением с длиной волны 2537Å. Лампа ПРК—7 дает дискретный спектр излучения в области 312—611 нм.

Действию света подвергали растворы гумусовых кислот, помещенные в герметически закрытые цилиндрические кварцевые кюветы так, чтобы толщина слоя раствора не превышала 0,5 см. Кюветы располагали на расстоянии 10 см от лампы. В качестве объектов исследования использовали гуматы и фульваты натрия, щелочные экстракты из различных почв, опада и подстилок, а также водные растворы фульвокислот после центрифугирования в течение 20 мин, на малой роторной центрифуге ЦУЛ—1 при 8—10 тыс. оборотов в минуту. Растворителями служили 0,1 н. и 0,01 н. растворы едкого натра и дистиллированная вода. Все растворы разбавляли соответствующим растворителем до той концентрации, при которой оптическая плотность растворов при 465 нм (кювета 1 см) не превышала 2,5. Контроль за действием света вели по электронным спектрам поглощения.

Во всех вариантах опытов обнаружено значительное падение оптической плотности уже через 10—15 мин непрерывного облучения, а через 15—25 часов в ряде случаев растворы обесцвечивались практически нацело (до 1,5—2% исходной оптической плотности) — рис. 4.

Характер спектров при этом почти не изменялся (рис. 5). Было отмечено лишь изменение наклона кривых поглощения, а на спектрах

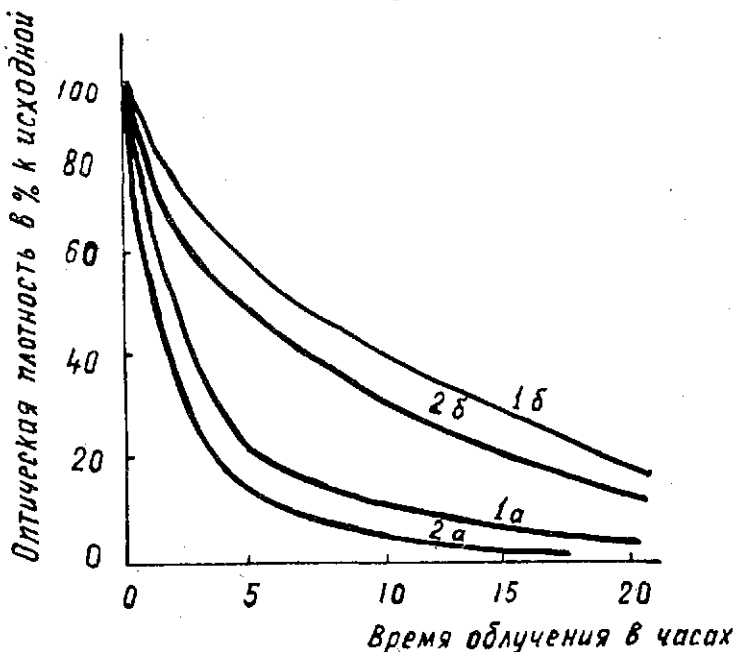


Рис. 4. Оптические плотности облученных гумусовых веществ в % к плотности необлученного препарата:

1 — типичный мощный чернозем; 2 — каштановая почва; а — гуминовая кислота; б — вещества кислого фильтрата при рН 12—13.

гуминовых кислот, содержащих P_g -фракцию, наблюдалось вначале некоторое усиление максимумов при 465 и 620 нм на общем фоне падения оптической плотности, а затем полное их исчезновение.

В ходе опытов проводили контроль температуры. При облучении

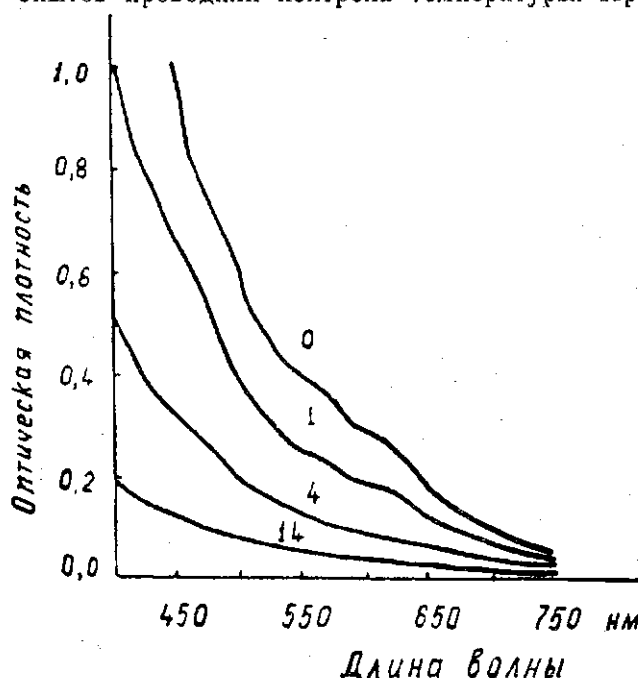


Рис. 5. Электронные спектры поглощения гуминовой кислоты дерново-подзолистой почвы (Московская обл.) после облучения ультрафиолетовым светом лампы БУВ-15:
0, 1, 4, 14 — время облучения в часах.

растворов ультрафиолетовым светом лампы БУВ-15 изменения температуры отмечено не было. В опытах с лампой ПРК-7, обладающей сильным тепловым излучением, температура растворов поднималась до 40—50°C. Такое нагревание лишь незначительно влияло на интенсивность окраски, что подтверждают опыты, в которых растворы гуматов натрия нагревали 4 часа в ультратермостате в мерных колбах при температуре от 25° до 95°C. После охлаждения объемы растворов в колбах доводили до метки. Повышенные температуры снижали оптические плотности растворов (табл. 1), но не настолько, чтобы с этим эффектом можно было связать потерю интенсивности окраски при облучении.

Использование ультрафиолетового излучения не исключает возможности окисления гумусовых молекул под влиянием образующегося
Таблица 1. Изменение оптической плотности (D_{465}) растворов гумусовых веществ при нагревании

Температура, °C	Гуматы натрия, рН 12—13			Фульвокислоты		
	образец 1	образец 2	образец 3	образец 3; рН 12	образец 3; рН 2,5	образец 2; рН 2,5
20	0,351	0,572	0,765	0,510	0,294	0,214
40	0,340	0,560	0,750	0,508	0,306	0,216
60	0,334	0,560	0,741	0,489	0,380	0,218
80	0,327	0,548	0,725	0,482	0,398	0,238
95	0,316	0,508	0,737	0,466	0,408	0,253

Образец 1 — препарат гуминовой кислоты Мерка; образец 2 — дерново-сильно-подзолистая почва Московской области, гор. А₁; образец 3 — выщелоченный (горный) чернозем Армянской ССР, гор. А₁.

озона. Чтобы устранить это возражение, мы провели серию опытов с облучением водного раствора фульвокислоты обыкновенного чернозема (Тамбовская обл.) и гумата натрия типичного мощного чернозема (Курская обл.) лампой ПРК—7, дающей излучение в видимой и ближней ультрафиолетовой областях. Монохроматорами излучения служили стеклянные светофильтры Ленинградского оптического завода. Чистота выделения линий достигала 90% для длин волн 313, 365, 405 и 436 нм и 99% для 546 и 579 нм. Расстояние от лампы до кювет с растворами (R) было равно 10 см.

Растворы облучали в плоских кварцевых кюветах с шлифованными крышками. Толщина слоя раствора в кювете — 1 см.

Для получения сравнимых результатов дозу облучения (D) рассчитывали по формуле

$$D = \frac{N}{211300 \pi R l} \sum_{i=1}^n I_k (1-T),$$

где N — количество электроэнергии, расходуемое лампой в час, вт;

l — длина лампы;

I — энергия выделяемой линии по отношению к дублету 3650/3663 Å, излучение которого принято за 100;

k — коэффициент пропускания светофильтра для данной линии;

1-T — поглощение света раствором;

$\sum_{i=1}^n$ — знак суммы, т. к. каждый светофильтр пропускает несколько линий;

211300 — расчетная величина, учитывающая долю расходуемой энергии, идущей на излучение, суммарную энергию всех линий по отношению к дублету 3650/3663 Å и коэффициент 2 при определении поверхности, на которой распределено излучение на расстоянии R от лампы.

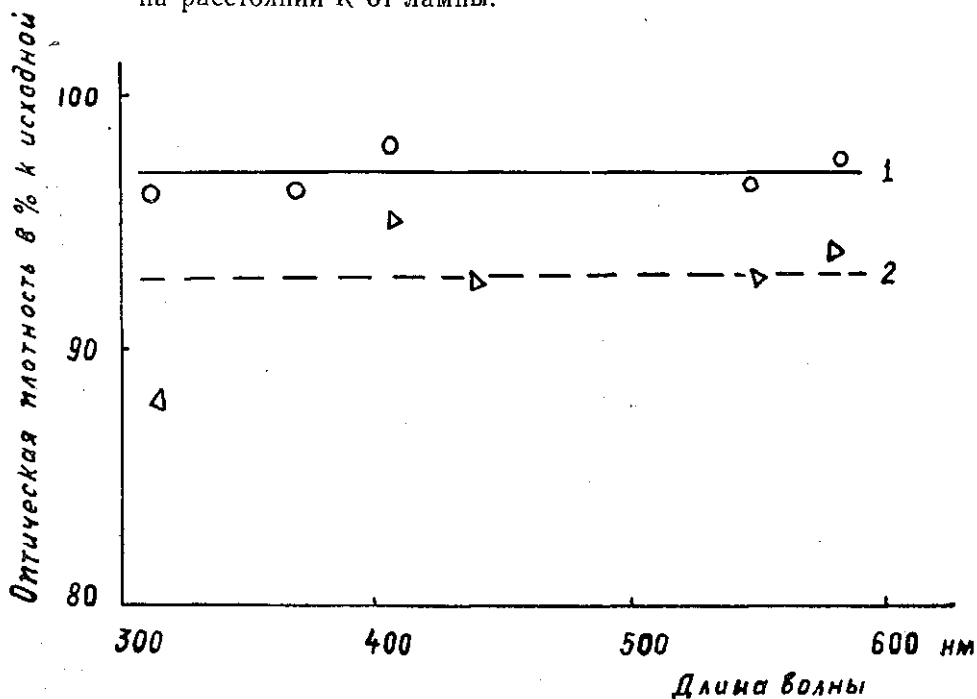


Рис. 6. Оптическая плотность облученных гумусовых веществ в % к оптической плотности необлученного препарата, рассчитанная на равные дозы поглощенной энергии:

1 — гуминовая кислота; 2 — фульвокислота.

Полную дозу облучения рассчитывали таким образом, чтобы время облучения в каждом случае не было слишком велико (не более 8 час). Последнее позволяет избежать ошибки за счет испарения растворителя. Результаты опытов показаны на рис. 6, где на оси абсцисс отложены значения длин волн, а на оси ординат оптическая плотность, выраженная в процентах к исходной величине в расчете на равные дозы поглощенной энергии. Из рисунка следует, что при равных дозах поглощенной энергии оптическая плотность гумусовых веществ изменяется одинаково под действием излучения с любой изученной длиной волны.

Опыты подтверждают, что действие озона, как и нагревание, может быть лишь сопутствующим, особенно если учесть, что озон образуется только под действием излучения с длиной волны менее 280 нм. Излучение в области 300—330 нм способствует разрушению озона, его превращению в молекулярный кислород.

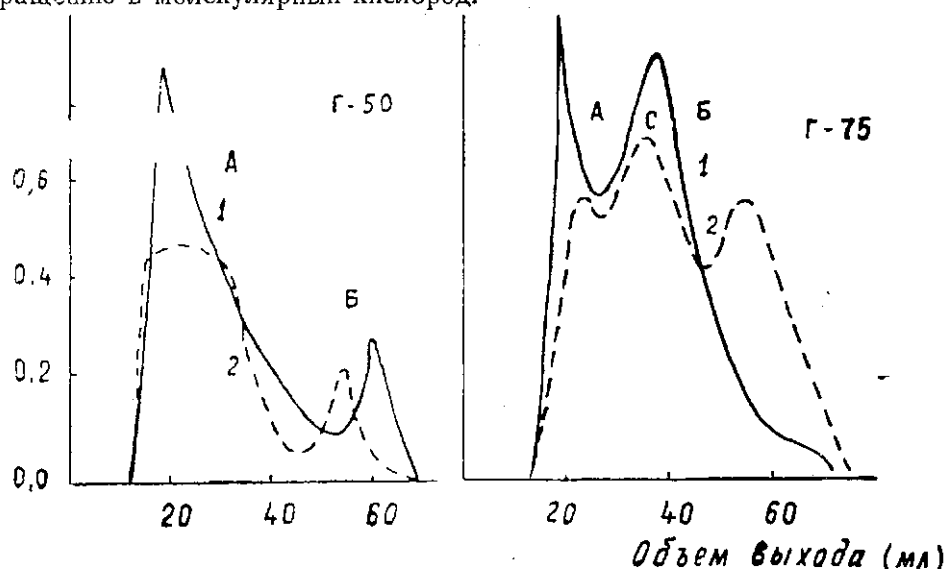


Рис. 7. Кривые элюирования гуминовой кислоты типичного мощного чернозема (Курской обл.) на сефадексах Г-50 и Г-75 до облучения (1) и после него (2).

Главная причина изменения оптических характеристик гумусовых веществ при облучении — реакции фотолиза, фотохимической деструкции.

Обесцвечивание растворов гумусовых веществ при облучении сопровождается, как показывают наши опыты, изменением молекулярно-вещевого распределения частиц.

Для получения молекулярно-вещевой характеристики использовали раствор гумата натрия типичного мощного чернозема в концентрации 1 мг/мл. Раствор облучали 20 часов ультрафиолетовым светом (2537Å) в миллиметровом слое. Затем растворы фракционировали на колонках, заполненных на высоту 20 см сефадексами Г—50, Г—75, или Г—100. Элюат собирали порциями по 5 мл и измеряли оптические плотности при 250 нм на однолучевом кварцевом спектрофотометре «Спектротом—203» (рис. 7).

Кривые гельфилтрации гуматов натрия на сефадексах Г—50 и Г—75 имеют два максимума. Максимум А соответствует выходу высокомолекулярной фракции, максимум Б — низкомолекулярной. После облучения увеличивается выход фракции Б по сравнению с А в случае фракционирования на Г—50. Кривые элюирования облученного раствора на Г—75 показывают смещение максимума и относительное увеличение выхода фракции Б.

Средневесовой молекулярный вес низкомолекулярной фракции, рассчитанный по формулам, выведенным для глобулярных белков (для Г—75), уменьшается после облучения с 13800 до 2975. Кроме того, на кривой элюирования через сефадекс Г—75 появляется новая фракция С, молекулярный вес которой 15600.

Сравнение кривых элюации на геле Г—100 также указывает на уменьшение молекулярного веса гуминовой кислоты после облучения: максимумы на кривых элюации смещаются в сторону меньших молекулярных весов по сравнению с кривой элюации необлученного образца.

Под действием света меняется и состав гумусовых веществ, на что указывают ИК — спектры, которые снимали на приборе ИКС — 14 методом КВг — техники. Больших качественных различий в спектрах облученных и необлученных препаратов не обнаружено (рис. 8). В результате облучения наблюдаются тенденции к относительному усилению интенсивности полосы 1620—1630 $см^{-1}$, по сравнению с полосой — СООН (1715 $см^{-1}$). Полоса 1620—1630 $см^{-1}$ обусловлена колебаниями

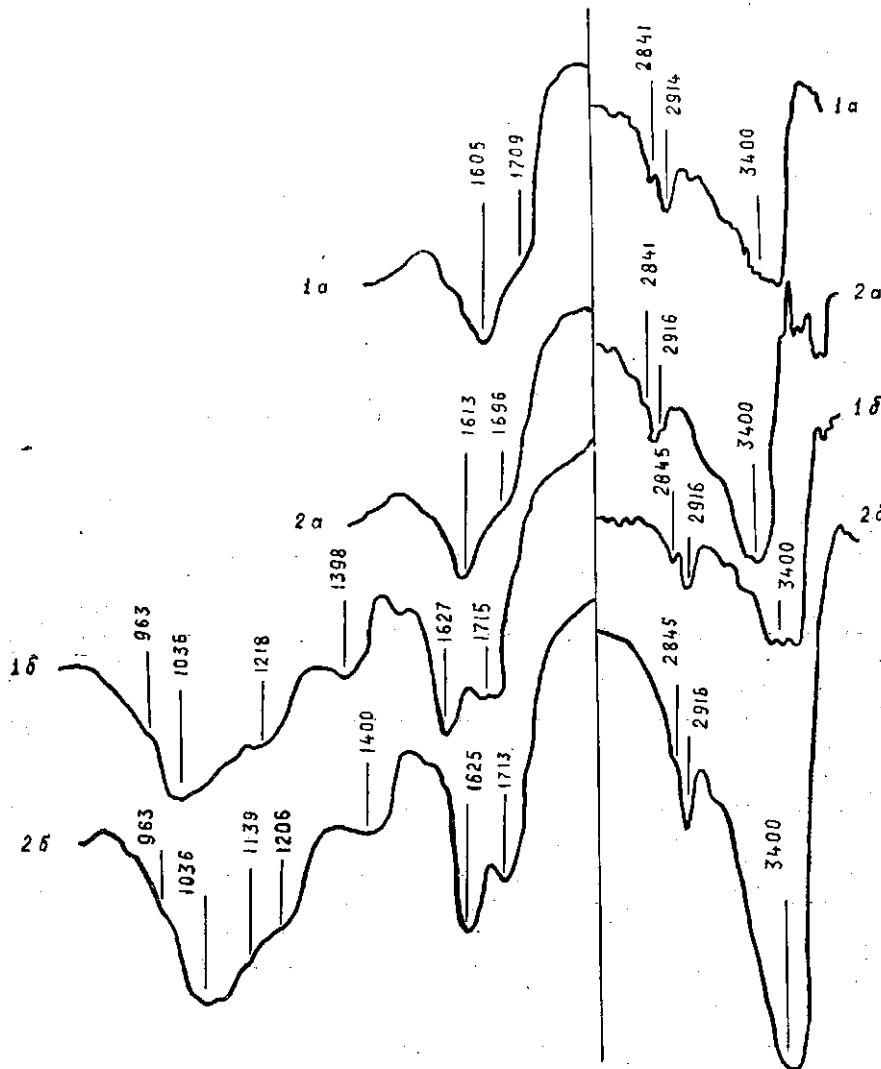


Рис. 8. Инфракрасные спектры необлученных (1) и облученных (2) гумусовых веществ:

а—гуминовая кислота типичного мощного чернозема; б—фульвокислота обыкновенного чернозема.

карбонильных групп и частично — С=С — связями алифатических, сопряженных и гетероциклических систем.

Несколько возрастает также поглощение в области $1000\text{--}1100\text{ см}^{-1}$ и 3400 см^{-1} , что можно отнести за счет деформационных колебаний спиртовых и фенольных гидроксидов.

По-видимому, действие света приводит к существенным изменениям гумусовых веществ: уменьшается размер их молекул, увеличивается окисленность за счет увеличения числа карбонильных групп (возможно хинонов), гидроксильных групп спиртов и фенолов, уменьшается длина цепей сопряжения — С=С — связей.

Наряду с перечисленными процессами, интенсивное освещение гумусовых кислот вызывает резкое увеличение в них парамагнитных центров (свободных радикалов), что уже было показано для сухих препаратов гумусовых веществ [18]. В наших опытах концентрация ПМЦ после облучения щелочных растворов гуматов увеличивалась от $0,53 \times 10^{17}$ с/г до $1,5 \times 10^{17}$ с/г, при сопутствующем снижении оптических плотностей.

Следует подчеркнуть, что фотохимическая деструкция гумусовых кислот осуществляется не только под воздействием сравнительно мощных источников излучения. Если облучение лампами БУВ-15 и ЦРК-7, снижает оптическую плотность гуматов на 50—70% за 15—20 час., то при дневном освещении тот же эффект достигается за 4—8 месяцев [4].

Экспериментальные данные согласованно указывают на фотохимическую деструкцию гумусовых кислот, протекающую по типу окислительных процессов с участием свободных радикалов. Тот же процесс неизбежно должен иметь место при извлечении гумусовых веществ щелочными растворами из почв, торфов, углей и дальнейшем приготовлении гумусовых препаратов.

Таким образом, можно полагать, что в ходе приготовления гуминовых препаратов происходит активация гумусовых веществ, которая включает изменение конформации их молекул, высвобождение функциональных групп, частичный распад наиболее высокомолекулярных фракций на составляющие фрагменты с меньшим МВ, частичное окисление с накоплением карбонильных (возможно хиноновых) групп и увеличение концентрации парамагнитных центров. Активированные таким образом молекулы более энергично влияют на развитие растений и условия их питания.

Те же факторы: освещенность, температура, периодичность и степень высушивания неизбежно должны привести и к различиям многих свойств гумусовых кислот зональных типов почв.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Александрова. О физиологической активности гумусовых веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов. Сб. «Органическое вещество целинных и освоённых почв». Изд. «Наука», 1972.
2. Г. И. Глебова. Определение размеров и формы частиц гумусовых кислот с помощью электронной микроскопии. Ж. «Почвоведение», № 7, 1972.
3. Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Ч. 1, Харьков, 1957; ч. 2, Киев, 1962; ч. 3, Киев, 1968.
4. Н. П. Ильин, Д. С. Орлов. Фотохимическая деструкция гумусовых кислот. «Почвоведение», № 1, 1973.
5. В. И. Касаточкин, М. М. Кононова, Н. К. Ларина, О. И. Егорова. Спектральное и рентгеновское исследование химического строения гумусовых веществ почвы. «Физика, химия, биология и минералогия почв СССР», докл. к VIII межд. конгр. почвоведов. АН СССР, М., 1964.
6. М. М. Кононова. Гумус почвы и жизнь растения. Агрохимия, № 1, 1965.
7. М. М. Кононова. Проблемы органического вещества почвы на современном этапе. Сб. «Органическое вещество целинных и освоённых почв». «Наука», 1972.
8. Д. С. Орлов, Г. И. Глебова. Электронно-микроскопическое исследование гумусовых кислот. «Агрохимия», № 7, 1972.

9. Д. С. Орлов, Е. И. Горикова. Размеры и форма частиц гуминовых кислот из чернозема и дерново-подзолистой почвы. Научн. докл. высшей шк., сер. «Биол. науки», № 1, 1965.
10. Э. Ренно. Пикнометрический анализ почв и грунтов. Таллин, Валгус, 1968.
11. Теоретические основы действия физиологически активных веществ и эффективность удобрений, их содержащих. «Промінь», Днепропетровск, 1969.
12. W. Flaig. Chemical composition and physical properties of humic substances. «Studies about gnmus. Transact. of the Intern. symp. «Humus et planta, IV», Prague, 81—112, 1967.
13. W. Flaig. Über die Stoffwechselaktivität von Humusbestandteilen. *Qualitas Plantarum et Material Vegetables*, v. 20, N. 1—2, 113—136, 1970.
14. W. Flaig, H. Beutelspacher. Zur Kenntniss der Huminsäuren. 2. Elektronen-mikro-Bodenkunde: Optik, B. 7, 237—240, 1950.
15. W. Flaig, H. Beutelspacher. Zur Kenntniss der Huminsäuren. 2. Elektronen-mikroskopische Untersuchungen an natürlichen und syntetischen Huminsäuren. *Ztschr. Pflanz. Düng., Bodenkunde*, B. 52, s. 1—21, 1951.
16. H. L. Ong, R. E. Bisque. Coagulation of humic colloids by metal ions. *S. Sci.*, v. 106, N. 3, 220—224, 1968.
17. M. Schnitzer, P. A. Poapst. Effect of a soil humis compound on root initiation. *Nature*, v. 213, N. 5076, 598—599, 1967.
18. V. Tichy. Biological activiti of ultraviolet irradiated humic acids. *Studies about humus. Transact. Intern. symp. «Humus et planta, V», Prague, 1971, 553—560.*
19. S. A. Visser. Elektron-microscopie and elektron—diffraction patterns of humic acids. *S. Sci.*, v. 96, N. 5, 353—356, 1963.
20. W. Wiesemüller. Untersuchungeu über die Fraktionierung der organischen Substanz. *Albrecht—Thaer—Archiv*, B. 9, H. 5, 419—436, 1965.