



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

На правах рукописи

УДК 632. 954: 631.417

Куликова Наталья Александровна

**СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГУМУСОВЫХ
КИСЛОТ ПО ОТНОШЕНИЮ К АТРАЗИНУ**

(Специальность 03.00.27-почвоведение)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук,
доцент Г.Ф. Лебедева

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
И.В. Перминова

Научные консультанты:

доктор биологических наук
Д.Н. Маторин

доктор биологических наук
П.С. Венедиктов

МОСКВА – 1999

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Строение и свойства гумусовых кислот.....	6
1.1.1. Общая характеристика гумусовых кислот.....	6
1.1.2. Взаимодействие гумусовых кислот с минералами.....	20
1.2. Взаимодействие гумусовых кислот с атразином.....	24
1.2.1. Поведение сим-триазиновых гербицидов в почве.....	24
1.2.2. Взаимодействие атразина с гумусовыми кислотами в почвенной среде.....	28
1.3. Детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к атразину.....	39
1.3.1. Гербицидная активность атразина.....	40
1.3.2. Физиологическая активность гумусовых кислот.....	41
1.3.3. Детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к сим- триазиновым гербицидам.....	45
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Отбор и характеристика почвенных образцов.....	51
2.2. Выделение препаратов гумусовых кислот.....	51
2.3. Характеристика гумусовых кислот.....	54
2.3.1. Элементный анализ.....	54
2.3.2. Методика ¹³ C ЯМР спектроскопического анализа.....	55
2.3.3. Методика гель-хроматографического определения молекулярных масс.....	56
2.3.4. Методика потенциометрического определения кислотных групп.....	58
2.4. Методика приготовления адсорбционных комплексов каолинит-гумусовые кислоты.....	59
2.5. Исследование связывания атразина гумусовыми кислотами.....	60
2.5.1. Методика определения связывающей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием ультрафильтрации.....	60
2.5.2. Техника экспериментов по определению связывающей способности адсорбционных комплексов гумусовых кислот по отношению к атразину.....	61
2.6. Постановка токсикологических экспериментов.....	62
2.6.1. Постановка лабораторно-вегетационных экспериментов.....	62
2.6.2. Проведение токсикологических экспериментов в водных средах.....	64
Глава 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	77

3.1. Характеристика исследованных почв	77
3.2. Выделение и характеристика препаратов гумусовых кислот	78
3.2.1. Элементный состав.....	78
3.2.2. Молекулярно-массовые характеристики исследованных препаратов гумусовых кислот	82
3.2.3. Распределение углерода в исследованных препаратах гумусовых кислот по данным ^{13}C ЯМР спектроскопии	90
3.2.4. Содержание кислотных групп в препаратах гумусовых кислот.....	92
3.2.5. Классификация исследованных препаратов гумусовых кислот с помощью кластерного анализа	93
3.3. Получение адсорбционных комплексов гумусовых кислот с каолинитом	94
3.4. Взаимодействие атразина с гумусовыми кислотами	102
3.4.1. Взаимодействие атразина с растворенными гумусовыми кислотами.....	102
3.4.2. Связывание атразина адсорбционными комплексами гумусовых кислот с каолинитом.....	107
3.5. Детоксицирующие свойства растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину	112
3.5.1. Количественная оценка детоксицирующих свойств гумусовых кислот	113
3.5.2. Исследование детоксицирующих свойств растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием растений мягкой пшеницы <i>Triticum aestivum</i>	115
3.5.3. Исследование детоксицирующих свойств растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием одноклеточной водоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	121
3.5.4. Исследование детоксицирующей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием хлоропластов.....	134
3.5.5. Сравнение результатов токсикологических экспериментов с использованием различных тест-объектов	138
3.6. Детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к атразину на дерново-подзолистых почвах	139
ВЫВОДЫ	144
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	145
ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ	164
ПРИЛОЖЕНИЯ	165

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность гербицидов в борьбе с сорной растительностью подтверждена отечественной и мировой практикой земледелия. Так, сокращение объема применения гербицидов в России за последние 7 лет с 32 до 17 млн. га привело к удвоению потерь от сорняков (Захаренко, 1998). В тоже время использование гербицидов имеет негативные последствия: накопление связанных остатков в почве, поступление в грунтовые и поверхностные воды. Особо опасно загрязнение персистентными гербицидами, одним из наиболее распространенных представителей которых является атразин (Захаренко, 1990). Время его жизни в почве составляет от нескольких недель до четырех лет и более. Атразин принадлежит к классу сим-триазиновых гербицидов - сильных специфических ингибиторов фотосинтеза. Согласно многочисленным исследованиям, основным фактором, определяющим закрепление атразина в почвенном профиле и уровень проявляемой им токсичности, является связывание с гумусовыми кислотами (Лебедева и др., 1990; Овчинникова, 1987). При этом в качестве единственного механизма детоксикации атразина в почве обычно предполагают образование нетоксичных комплексов с гумусовыми кислотами. Однако ввиду сложности и неоднозначности взаимодействий, которые могут происходить в системе минеральная матрица - гумусовые кислоты - гербицид - растение, данное предположение носит гипотетический характер. Его подтверждение требует постановки экспериментов, позволяющих оценить действие каждого из возможных факторов и их совокупности. Это определяет актуальность и важность проведения комплексных исследований, предусматривающих изучение собственного воздействия гумусовых кислот на фотосинтезирующие организмы, количественную оценку связывающей и детоксицирующей способности растворенных и иммобилизованных на минеральной матрице гумусовых кислот в отношении атразина и их последующее сопоставление. Указанные проблемы определили постановку цели и задач настоящей работы.

Цель работы: исследование связывающей способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выделить и охарактеризовать препараты гумусовых кислот и получить их адсорбционные комплексы с минералами;
- количественно охарактеризовать связывание атразина с гумусовыми кислотами в растворенном и адсорбированном состоянии;
- выявить взаимосвязь между строением гумусовых кислот и их связывающей способностью по отношению к атразину;
- количественно охарактеризовать детоксицирующие свойства препаратов гумусовых кислот по отношению к атразину и установить их взаимосвязь со строением гумусовых кислот;
- изучить собственное воздействие гумусовых кислот на тестируемые объекты;
- на основании комплекса данных по связывающей и детоксицирующей способности гумусовых кислот сделать вывод о механизме детоксикации атразина растворенными и адсорбированными гумусовыми кислотами.

1.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ**1.1.1. Общая характеристика гумусовых кислот**

Органическое вещество почвы играет значительную роль в почвообразовании и формировании почвенного плодородия (Орлов, 1992). В его состав входят как неспецифические (полисахариды, полифенолы, и т.д.), так и специфические (гуминовые) вещества. Гуминовые вещества - это совокупность соединений, образующихся в процессе разложения и трансформации растительных и животных остатков, не имеющих аналогов в живых организмах и характеризующихся темной окраской, полидисперсностью, высокими молекулярными массами и биотермодинамической устойчивостью (Орлов и др., 1996). Гуминовые вещества составляют 85-90% от общего содержания органического вещества почв (Кононова, 1963; Орлов, 1992). Наряду с почвой, гуминовые вещества присутствуют в других природных объектах, таких как торфа, угли, пресные и морские воды. Растворенное органическое вещество поверхностных вод на 60-80% состоит из гуминовых веществ (Орлов, 1993; Rashid, 1985). По данным Тишковича (1984) содержание гуминовых веществ в торфе составляет порядка 55% на сухое вещество и достигает 73% от органического вещества торфа (Белькевич и Чистова, 1979). Гуминовые вещества, входящие в состав органической массы углей, составляют от 5-15% блестящих бурых и до 60% в окисленных каменных углях (Аронов, 1988). Фракция гуминовых веществ кислотной природы получила общее название гумусовых кислот, к которым в настоящее время относят гуминовые (ГК), гиматомелановые и фульвокислоты (ФК) (Орлов, 1996). ГК - наиболее обширная группа гуминовых веществ - имеют темно-бурую, а в сухом состоянии - до черной, окраску. ГК извлекают из природных сред щелочными растворами, из которых они выпадают в осадок после подкисления до pH 1-2. Гиматомелановые кислоты извлекают из ГК этиловым спиртом; в котором они имеют темно-красную окраску (Глебова, 1985; Орлов, 1996). Под ФК в настоящее время понимают как всю совокупность кислоторастворимых органических веществ,

остающихся в растворе после осаждения ГК (Тюрин, 1965), так и их фракцию, сорбирующуюся из раствора на смолах Amberlite XAD (Swift, 1996).

По своей химической природе гумусовые кислоты представляют собой высокомолекулярные азотсодержащие ароматические карбоновые кислоты (Кононова, 1963; Александрова, 1980). Наличие ароматического каркаса, замещенного карбоксильными, карбонильными, гидроксильными и метоксильными функциональными группами и периферической части, представленной в основном фрагментами полисахаридов и полипептидов, обуславливает химическую гетерогенность и широкий спектр реакционной способности гумусовых кислот по отношению к веществам различных химических классов (Wershaw et al., 1977; Schnitzer, 1986; Орлов, 1992).

Среди важнейших характеристик гумусовых кислот, определяющих их свойства, можно выделить следующие:

- элементный состав;
- качественный и количественный состав структурных фрагментов;
- молекулярно-массовое распределение.

Элементный состав гумусовых кислот

Основными элементами, образующими молекулы гумусовых кислот, являются углерод, водород и кислород. Азот и сера содержатся в гумусовых кислотах на уровне 1-5% (Кононова, 1963; Орлов, 1992, 1993), обязательной составной частью гумусовых кислот являются микроэлементы и вода (Орлов, 1992). Брутто-формулу гумусовых кислот 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 (Perdue, 1984; Орлов, 1996). Эти параметры широко используют для характеристики особенностей генезиса гумусовых кислот различных источников происхождения (Stuermer et al., 1978; Visser, 1986; Орлов, 1992).

Согласно Орлову (1990), для объективной оценки окисленности гумусовых кислот необходимо учитывать количество всех электроотрицательных (N, O, C) и электроположительных (H) по отношению к углероду атомов. В связи с тем, что содержание азота и серы сравнительно невелико, автором была предложена следующая формула для расчета степени окисленности гумусовых кислот:

$$\omega = \frac{2Q_O - Q_H}{Q_C} \quad (1.1)$$

где Q_O , Q_H и Q_C - количество атомов кислорода, водорода и углерода, соответственно.

По данным того же автора степень окисленности гумусовых кислот невелика и колеблется в пределах $\pm 0,22$.

Таблица 1.1

Средний элементный состав ГК и ФК различного происхождения
(по данным Rice and MacCarthy, 1991)

Тип ГК	Содержание элементов, % (масс.) Среднее/диапазон значений					Степень окисленности* ω
	C	H	N	O	S	
Гуминовые кислоты						
Почвенные	55	4,8	3,6	36	0,8	-0,15
	37-64	1,6-8,0	0,5-7,0	27-52	0,1-4,9	
Торфяные	57	5,0	2,8	35	0,4	-0,11
	50-63	3,6-6,6	0,6-3,9	30-43	0,1-0,7	
Поверхностных вод	51	3,7	2,6	41	1,9	0,06
	43-56	3,5-6,5	0,6-8,0	31-48	0,3-4,3	
Морских вод	56	5,8	3,8	32	3,1	-0,21
	37-76	3,7-11,7	1,0-10,5	8-56	1,2-8,3	
Фульвокислоты						
Почвенные	45	5,0	3,6	46	1,3	0,16
	35-75	3,2-7,0	0,4-5,9	17-56	0,1-3,6	
Торфяные	54	5,3	2,0	38	0,8	-0,01
	47-61	4,2-7,2	1,2-2,6	31-44	0,2-1,9	
Поверхностных вод	47	4,2	2,3	46	1,2	0,48
	39-56	0,4-5,9	0,5-8,2	35-56	0,1-3,1	
Морских вод	45	5,9	4,1	45	2,1	-0,14
	38-50	4,3-6,8	1,0-6,8	37-55	-	

* Рассчитана из данных таблицы по формуле (1.1).

Данные по элементному составу ГК и ФК, полученные авторами обзора (Rice and MacCarthy, 1991) в результате усреднения опубликованных результатов элементного анализа более чем четырехсот образцов, приведены в табл. 1.1, где

для каждого элемента даны как средние значения, так и границы содержания элементов.

Как видно из табл. 1.1, несмотря на химическую гетерогенность и статистический принцип формирования молекул гумусовых кислот, изменению элементного состава в зависимости от источника происхождения и фракционного состава (ФК или ГК) присуща внутренняя закономерность. Содержание углерода в ГК в среднем выше, чем в ФК. Для содержания кислорода наблюдается обратная тенденция. Как следует из табл. 1.1, ГК и ФК различного происхождения могут существенно отличаться по своему элементному составу. Так, например, элементный состав ФК поверхностных вод существенно отличается от ФК почв, а почвенных ГК - от ГК торфа (Steelink, 1985). Элементный состав гумусовых кислот одинакового происхождения может варьировать в зависимости от конкретного источника: различного типа почв (Орлов, 1990), вод (Rashid, 1985) и т. д. Таким образом, определение элементного состава является одним из ключевых этапов в анализе структурных и генетических особенностей гумусовых кислот.

Характеристика структуры гумусовых кислот

Гумусовые кислоты являются природными полимерами переменного состава и нерегулярной структуры (Орлов, 1992). Одним из подходов к численному описанию таких объектов является расчет их фрагментного состава, под которым понимают содержание основных структурных единиц, образующих молекулы исследуемых соединений. Такой подход использован для характеристики структурных особенностей нефтей различных месторождений (Кушнарев, 1997) и был недавно успешно применен для исследования структуры гумусовых кислот (Ковалевский 1998).

Для выявления структурных фрагментов, составляющих молекулы гумусовых кислот, обычно используют методы деструкции: гидролиз, окисление, пиролиз. Методами гидролиза изучают так называемую периферическую часть гумусовых кислот, методом окисления - ядерную часть, или каркас (Орлов, 1992). Однако в результате деструкции получают видоизмененные, по сравнению с состоянием в молекулах гумусовых кислот, осколки молекул, что существенно затрудняет интерпретацию получаемых данных. Поэтому в

последнее время все большее распространение получает неdestructивный метод исследования структуры органических соединений - спектроскопия ЯМР.

Типичный ^{13}C ЯМР спектр гумусовых кислот приведен на рис 1.1. Как видно из рисунка, полидисперсность и химическая гетерогенность гумусовых кислот приводит к тому, что их ^{13}C ЯМР спектры не содержат разрешенных индивидуальных пиков, представляя собой суперпозицию большого числа сигналов.

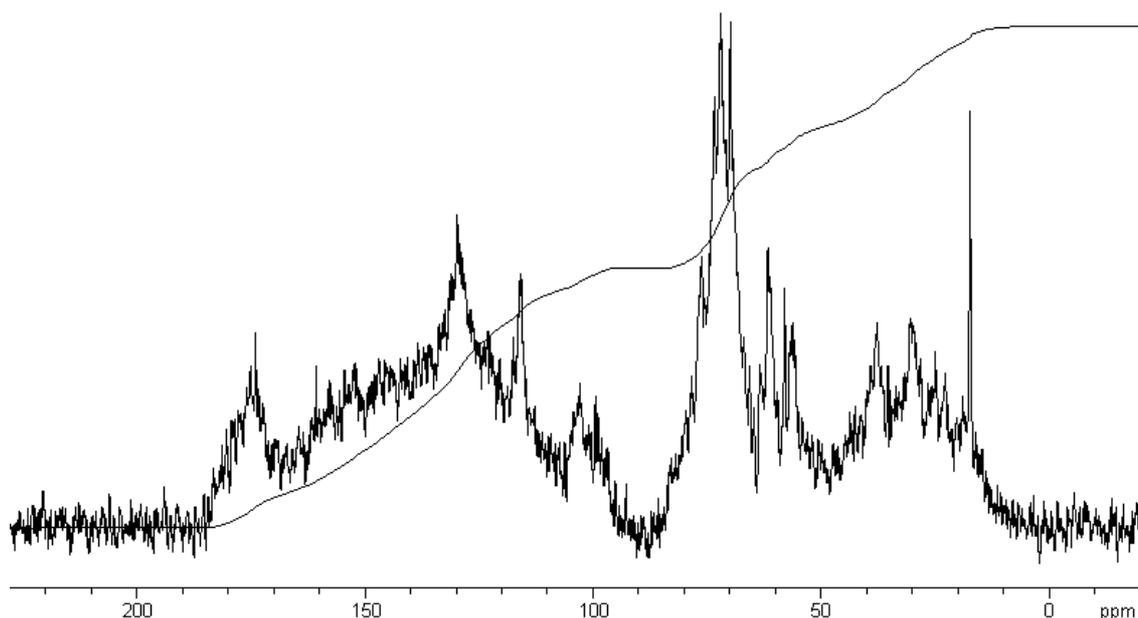


Рис. 1.1. Типичный ^{13}C ЯМР спектр ГК почв (Ковалевский, 1998)

Общим подходом к интерпретации получаемых ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот является разбиение на спектральные диапазоны, соответствующие сигналам атомов углерода со сходным химическим окружением (табл. 1.2).

Анализ данных ^{13}C ЯМР дает возможность установить различия в структуре ГК и ФК различных природных источников. Так, согласно данным исследования Хэтчера (Hatcher et al., 1980), ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв содержат примерно в два раза больше ароматических фрагментов по сравнению с ФК. Аналогичные данные получены в работе Престона и Блэквелла (Preston and Blackwell, 1985). Многими авторами (Shin and Moon, 1961; Михайленко и Михальчук, 1987; Preston and Schnitzer, 1987; Ricca and Severini, 1993; Conte et al., 1997; Cook and Langford, 1998) помимо этого

отмечается, что ФК почв характеризуются в целом более высоким (на 2-10% абс.) содержанием COOH групп, в то время как содержание алкильных фрагментов в них несколько ниже по сравнению с ГК. Для ГК и ФК черноземов наблюдаются сходные закономерности (Wilson et al., 1987). Согласно большей части опубликованных данных, содержание углеводных структур в ФК почв превышает таковое для ГК в 1,5-3 раза, однако в ряде работ (Ricca and Severini, 1993; Shin and Moon, 1996; Conte et al., 1997; Cook and Langford, 1998) приводятся результаты исследования, говорящие о том, что содержание углеводов в ГК и ФК почв практически идентично.

Таблица 1.2

Основные диапазоны сигналов в ^{13}C ЯМР спектре гумусовых кислот
(Ковалевский, 1998)

Диапазон химических сдвигов	Типы атомов углерода
5-48 м.д.	алифатические С- и Н-замещенные атомы углерода (C_{Alk});
48-90 м.д.	алифатические атомы углерода, связанные простой связью с гетероатомом (кислородом или азотом), в основном карбогидратного типа ($\text{C}_{\text{Alk-O}}$);
90-108 м.д.	ацетальные атомы углерода, связанные простыми связями с двумя атомами кислорода ($\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$);
108-145 м.д.	ароматические С- и Н-замещенные атомы углерода ($\text{C}_{\text{Ar-H,C}}$);
145-165 м.д.	ароматические О-замещенные атомы углерода ($\text{C}_{\text{Ar-O}}$);
165-187 м.д.	атомы углерода карбоксильных групп и их производных ($\text{C}_{\text{COOH(R)}}$);
187-220 м.д.	атомы углерода кетонных и хинонных групп ($\text{C}_{\text{C=O}}$).

Содержание углеводных структур в ФК природных вод находится на уровне такового в ГК или несколько ниже (Михайленко и Михальчук, 1975; Malcolm, 1990; Humic substances..., 1994; Knulst et al., 1998). В то же время прочие закономерности, обнаруженные для ГК и ФК почв, сохраняются для ГК и ФК природных вод. Так, содержание COOH групп в ФК природных вод выше, чем в ГК, а содержание ароматических фрагментов - ниже. Согласно (Malcolm, 1990; Humic substances..., 1994) ФК содержат больше алкильных фрагментов, однако данные некоторых исследователей (Михайленко и Михальчук, 1975; Knulst et al., 1998) находятся в противоречии с этим выводом.

В ряде работ было выполнено сопоставление фрагментного состава гумусовых кислот различного происхождения. Так, на основании сопоставления

результатов ^{13}C ЯМР исследования структуры препаратов ФК дерново-подзолистых почв и природных вод, в работе (Malcolm, 1990) показано, что последние характеризуются более высоким содержанием алифатических фрагментов, в то время как фрагментный состав ГК этих природных сред довольно близок. Сходные данные были получены в работе (Shin and Moon, 1996).

В работах (Wilson et al., 1983; Wilson and Goh, 1983) проводилось сопоставление гумусовых кислот торфа и дерново-подзолистых почв. Показано, что гумусовые кислоты торфа характеризуются более высоким содержанием ароматических и углеводных фрагментов, нежели гумусовых кислот почв, а содержание карбоксильных и алкильных групп в случае гумусовых кислот торфа несколько ниже.

Сравнительное исследование структуры ГК бурых углей, ФК и ГК дерново-подзолистых почв, выполненное в работах (Choudhry and Webster, 1989; Shin and Moon, 1996), показало, что содержание COOH групп в ГК угля ниже, чем в ФК почв, однако выше, нежели в ГК почв. По сравнению с гумусовыми кислотами почв ГК угля характеризуются значительно более высокой ароматичностью, и очень низким содержанием углеводных структур.

Таким образом, данные по количественному исследованию структурных фрагментов гумусовых кислот свидетельствуют о том, что все гумусовые кислоты независимо от источника происхождения обладают сходным набором основных структурных фрагментов. При этом количественное соотношение структурных фрагментов может варьировать в зависимости от источника.

Важная информация о строении углеродного скелета хорошо дополняется данными о распределении кислорода в структуре гумусовых кислот, получаемых с помощью функционального анализа. В настоящее время в гумусовых кислотах обнаружено более десяти различных типов функциональных групп: карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные, карбонильные, хинонные, метоксильные, сложноэфирные, енольные, амино-, амидо- и имидагруппы, сульфогруппы, тиольные и дисульфидные группы (Schnitzer and Khan, 1972). Поскольку суммарное содержание серы и азота в гумусовых кислотах обычно не превышает 5% (табл. 1.1), можно считать, что функциональные группы гумусовых кислот представлены, в основном,

кислородсодержащими функциональными группами. Обобщенные сведения о распределении кислорода по различным функциональным группам в гумусовых кислот приведены в табл. 1.3.

Таблица 1.3

Распределение кислорода между функциональными группами в молекулах почвенных гумусовых кислот
(по данным Schnitzer and Khan, 1972; Stevenson, 1982; Орлов, 1992)

Общее содержание кислорода, %	COOH	ArOH	ROH	C=O	Учтенный кислород, %
Почвенные гуминовые кислоты					
37,2	24	33	10	8	75
36,8	26	25	15	7	74
35,4	18	38	13	4	73
Почвенные фульвокислоты					
47,3	58	19	12	6	95
44,8	65	12	13	9	99
47,7	61	9	16	4	90

Как видно из табл. 1.3, около 75% кислорода в молекулах ГК и около 95% – в ФК распределено между четырьмя типами функциональных групп: карбоксильными, фенольными и спиртовыми гидроксильными, и карбонильными, причем вклад этих групп в общее содержание кислорода различен для гуминовых и фульвокислот. Доля кислорода, входящего в состав карбоксильных групп, существенно выше для фульвокислот.

Обращает внимание тот факт, что в ФК доля кислорода, входящего в состав перечисленных в таблице групп значительно выше, чем в ГК. Это может быть связано, с одной стороны, с наличием в структуре ГК большего количества других кислородсодержащих групп (главным образом, эфирных и сложноэфирных); с другой, – со значительными стерическими и конформационными эффектами, препятствующими полному определению карбоксильных и гидроксильных групп в гуминовых кислотах методами функционального анализа (Schnitzer and Khan, 1972). До настоящего времени однозначно не установлено, какая из указанных причин является основной.

Величины, приведенные в табл. 1.3 показывают, что преобладающими функциональными группами гумусовых кислот являются карбоксильные и

фенольные и спиртовые гидроксильные. Именно этими группами в основном обусловлены их кислотно-основные и комплексообразующие свойства (Орлов, 1992).

Согласно литературным данным (Драгунов, 1951; Stevenson, 1985; Perdue, 1985), содержание функциональных групп в гумусовых кислотах варьирует в зависимости от источника происхождения. Препараты водного происхождения, как правило, характеризуются повышенным содержанием карбоксильных групп (Ziechman, 1980). Однако более отчетливо прослеживается уже отмеченная тенденция: независимо от источника происхождения ФК характеризуются более высоким содержанием карбоксильных групп, чем ГК.

Молекулярно-массовые характеристики гумусовых кислот

Молекулярная масса (ММ) - фундаментальное свойство любого вещества, в том числе ГК и ФК. От размеров и конфигурации молекул гумусовых кислот зависят их растворимость, способность к миграции, сорбируемость почвенными минералами, возможность поглощения микроорганизмами и высшими растениями (Орлов, 1992). В отличие от простых органических веществ, характеризующихся единственным значением ММ, гумусовые кислоты полидисперсны, то есть обладают набором молекулярных масс. Поэтому их характеризуют молекулярно-массовым распределением (ММР), на основании которого рассчитывают среднюю ММ. В зависимости от способа усреднения получают три вида средних молекулярных масс: среднечисловую (\bar{M}_n), средневесовую (\bar{M}_w) и среднюю (\bar{M}_z) (Swift, 1989; Орлов, 1992).

Среднечисловая ММ - усреднение по числу молекул в полимере - рассчитывается как:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (1.2)$$

где n_i - число i -тых молекул с молекулярной массой M_i .

Средневесовая ММ - усреднение по массе молекул в полимере - может быть рассчитана в соответствии со следующей формулой:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (1.3)$$

Средняя ММ выражается уравнением:

$$\bar{M}_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} \quad (1.4)$$

Если в монодисперсных системах все способы усреднения приводят к получению одной и той же величины молекулярной массы, то в полидисперсных системах выполняется соотношение:

$$\bar{M}_z > \bar{M}_w > \bar{M}_n,$$

при этом отношение \bar{M}_w/\bar{M}_n используется как показатель степени полидисперсности. Для характеристики гумусовых кислот наиболее часто используют их средневесовую молекулярную массу (Орлов, 1992; Swift, 1989).

Вследствие нерегулярности строения, высокой полидисперсности и полиэлектролитных свойств гумусовых кислот, все существующие экспериментальные методы определения ММ лишь ограниченно применимы для анализа данных соединений. Поэтому опубликованные величины ММ гумусовых кислот колеблются в широких пределах. Так, методы определения ММ, основанные на измерении коллигативных свойств полимера (осмометрия, криоскопия, эбулиоскопия), чрезвычайно чувствительны к присутствию низкомолекулярных примесей в анализируемом образце. Поэтому их применение для анализа препаратов гумусовых кислот, которые практически всегда содержат низкомолекулярные зольные компоненты, может приводить к существенному занижению ММ (\bar{M}_n) (Aiken and Gillam, 1989). Использование метода скоростной седиментации, напротив, приводит к завышенным значениям ММ (\bar{M}_z) (Swift, 1989). На определяемые методом ультрафильтрации величины ММ (\bar{M}_w) большое значение оказывает взаимодействие гумусовых кислот с мембранами (De Nobili et al., 1989). При этом следует отметить, что все указанные методы позволяют определять либо среднюю молекулярную массу полидисперсного образца, либо распределение массы вещества по фракциям, соответствующим диапазонам пропускания фильтрующих мембран. В тоже время гораздо более фундаментальной молекулярно-массовой характеристикой полидисперсного вещества является кривая его молекулярно-массового распределения.

Наиболее доступным и широко распространенным способом исследования ММР полимеров и гумусовых кислот, в частности, является эксклюзионная гель-хроматография. Данный метод основан на различной способности молекул

разного размера проникать в поры неионогенного геля, который служит неподвижной фазой (Беленький, 1998). При этом эффективным размером молекулы в условиях гель-хроматографического анализа является ее гидродинамический радиус. Однако вследствие полиэлектролитной природы гумусовых кислот использование гель-хроматографического анализа для определения их ММ затрудняется наличием неэкслюзионных эффектов, а именно сверхэкслюзии и адсорбции (Беленький и Виленчик, 1978; De Nobili et al., 1989). Ряд гелей (декстрановые, полиакриламидные) содержат остаточные карбоксильные группы, ионизация которых приводит к образованию отрицательного заряда на частицах геля. Вследствие этого полианион гумусовых кислот исключается из пор по законам значительно более сильной ионной экслюзии. Поэтому при слабой ионной силе молекулы гумусовых кислот выходят из колонки раньше, чем этого можно было бы ожидать исходя из их размера (De Nobili et al., 1989). Этот эффект хорошо изучен для синтетических полиэлектролитов. Для его устранения гель-хроматографический анализ полиэлектролитов обычно проводят в среде низкомолекулярного электролита. Данный прием широко применяется и при анализе гумусовых кислот, однако использование солевых растворов в качестве элюентов приводит к адсорбции гумусовых кислот на геле (Posner, 1963, De Nobili et al., 1989). Величина указанного эффекта зависит от свойств геля и анализируемых гумусовых кислот.

Влияние рН пробы, вводимой в колонку, на результаты фракционирования гумусовых кислот, а именно, уменьшение объема экслюзии с возрастанием рН, также было отмечено рядом исследователей (Söchtig, 1972; Sapek, 1973). Наблюдаемый эффект объясняется, с одной стороны, изменением состояния молекул гумусовых кислот (например их ассоциацией в кислых условиях), а, с другой, вышеупомянутым влиянием ионной силы. Необходимо также отметить, что при несоответствии ионной силы вводимой пробы и используемого элюента вид получаемой гель-хроматограммы искажается из-за так называемого "солевого пика" (Posner, 1963).

Помимо описанного выше влияния неэкслюзионных эффектов на результаты фракционирования гумусовых кислот, не менее сложной проблемой является отсутствие адекватных стандартных веществ, необходимых для калибровки гель-хроматографической колонки. В идеальном случае

калибровочное вещество должно иметь такую же структуру, как и анализируемое. Однако для гумусовых кислот это условие невыполнимо, поэтому в качестве стандартов при анализе гумусовых кислот обычно используют набор полидекстранов (ПД) или полиэтиленгликолей с известными ММ (Perminova et al., 1998). Некоторые исследователи (Chin et al., 1994) рекомендуют для этих целей использование полистиролсульфоновых кислот (ПССК). Учитывая, что ПССК представляют собой синтетические полиэлектролиты, их гель-хроматографические характеристики могут также существенно меняться под влиянием неэксклюзионных эффектов. Поэтому нужно проявлять особую осторожность при сопоставлении абсолютных величин ММ, рассчитанных при использовании различных калибровочных веществ. Хорошей иллюстрацией данному тезису являются результаты исследования, предпринятого в работе Перминовой с сотр. (Perminova et al., 1998). Авторами показано, что абсолютные значения одного и того же препарата гумусовых кислот, определенные с использованием четырех наборов калибровочных веществ (полиакриловые, полиметакриловые и полистиролсульфоновые кислоты, а также полидекстраны) различались почти на порядок. При этом определяемая величина ММ непосредственно зависела от плотности удельного заряда полимеров, использованных в качестве калибровочных веществ. Так, использование калибровочной кривой, построенной по полиакриловым кислотам, имеющим максимальную плотность заряда, приводило к получению минимальных значений ММ. В то же время использование калибровки, построенной по неиногенным полидекстранам, приводило к получению максимальных значений ММ. Величины ММ, определенные по полиметакриловым и полистиролсульфоновым кислотам, занимали промежуточное положение. Как уже указывалось, максимальный диапазон различий составлял около одного порядка.

Поэтому приводимые в литературе величины ММ гумусовых кислот колеблются в широких пределах, причем наблюдаемые различия во многом связаны с условиями проведения гель-хроматографического анализа (табл. 1.4).

На основании данных табл. 1.4 можно сделать вывод о зависимости ММ гумусовых кислот от источника их происхождения. Согласно данным Перминовой и др. (Perminova et al., 1998), гумусовые кислоты можно

расположить в следующий ряд по возрастанию их ММ: ФК природных вод < ФК почв < ГК почв < ГК+ФК торфов. С другой стороны, обращает на себя внимание большой разброс приводимых различными исследователями величин ММ гумусовых кислот, выделенных из сходных источников. Например, по данным Анисимовой и др. (1998) ММ ГК черноземно-луговой почвы составила 15,5 КДа, тогда как Вишнякова и др. (1996) для аналогичных ГК в качестве ММ преобладающей фракции ГК указывает 100 КДа, то есть приводимые величины различаются в 6 раз. Указанные расхождения еще раз подтверждают существенную зависимость получаемых абсолютных значений ММ гумусовых кислот от условий проведения гель-хроматографического анализа, что делает их мало пригодными в целях сравнительного анализа.

Наиболее ярким примером низкой достоверности абсолютных величин ММ гумусовых кислот, получаемых методом гель-хроматографии, являются данные Карпухина и Фокина (1977), согласно которым ММ преобладающих фракций ФК чернозема и краснозема составили всего 170 Да. Очевидно, что данная величина существенно занижена, так как ММ глюкозы и фталевой кислоты - простейших строительных блоков гумусовых кислот - составляют 180 и 160 КДа, соответственно. Кроме того, согласно Орлову (1992), нижний предел \bar{M}_n , вычисленный на основе простейших формул гуминовых и фульвокислот в расчете на фрагмент, содержащий 1 атом азота, для ГК составляет 308, а для ФК - 381 Да.

Молекулярные массы гумусовых кислот различного происхождения, определенные методом гель-хроматографии

Гумусовые кислоты	ММ преобладающей фракции		Калибровочные вещества	Источник
	ММ, КДа	сод., %		
ФК природных вод				
Озерная вода	0,7-10	100	ПД	Ghassemi and Christman, 1968
Речная вода	5-10	48	ПД	Ishiwatari et al., 1980
Речная вода	0,7-5	68	ПД	Varney et al., 1981
Речная вода	>50	40	ПД	Gjessing, 1973
Болотные воды	0,4	21	ПД	Кауричев и др., 1977
Болотные воды	0,58	23	ПД	там же
Среднее по 15 образцам	7,5 ¹	100	ПД	Perminova et al., 1998
РОВ водных экстрактов почв				
Солонец	>10	не указ.	ПД	Khan, 1970
Дерново-подзолистая(гор.А1)	0,4	17	ПД	Кауричев и др., 1977
ФК почв				
Дерново-подзолистая	≤ 7	не указ.	ПД	Фокин и Карпухин, 1972
Дерново-подзолистая(гор.А1)	0,48	28	ПД	Карпухин и Фокин, 1977
Подзолистая(гор. А0/А1)	2,04	31	ПД	там же
Подзолистая (гор. В)	0,48	43	ПД	там же
Чернозем (гор. А1)	0,17	43	ПД	там же
Краснозем (гор. А1)	0,17	32	ПД	там же
Торфяная	4-22	100	ПД	Piccolo and Mirabella, 1987
Торфяная	1-60	100	ПД	там же
Среднее по 9 образцам	10 ¹	100	ПД	Perminova et al., 1998
ГК почв				
Подзолистая (гор. А)	10-20	52	ПД	Аммосова и Балаганская, 1991
Подзолистая (гор. Е)	100-700	47	ПД	там же
Подзолистая (гор. В _{тн})	10-20	47	ПД	там же
Подзолистая(гор.А _{тн})	100-700	63	ПД	там же
Дерново-подзолистая	>100	31	ПД	Назарова, 1978
Дерново-подзолистая(гор.А)	17,9 ¹	100	ПД	Анисимова и др., 1998
Серая лесная	50-70	45	ПД	Вишнякова и др., 1996
Серая лесная (гор. А)	24,3 ¹	100	ПД	Анисимова и др., 1998
Каштановая	50-70	45	ПД	Вишнякова и др., 1996
Черноземно-луговая	100	57	ПД	там же
Черноземно-луговая(гор.А)	15,5 ¹	100	ПД	Анисимова и др., 1998
не указ.	100-200	62	ПД	Dell'Agnola et al., 1964
Среднее по 9 образцам	15 ¹	100	ПД	Perminova et al., 1998
Гумусовые кислоты торфа				
ФК торфа	5,0 ¹	100	ПД	Mantoura and Riley, 1975
ГК+ФК торфа (среднее по 10 образцам)	17 ¹	100	ПД	Perminova et al., 1998
Гумусовые кислоты угля				
ФК угля	2,33 ¹	100	ПССК	Chin et al., 1994
ГК (Aldrich)	4,1 ¹	100	ПССК	там же

¹ - в работе приведены значения среднепиковых ММ.

Таким образом, данные гель-хроматографического анализа гумусовых кислот характеризуются не только низкой достоверностью абсолютных значений

ММ, но и являются малопригодными для сравнительного анализа в случае, когда были использованы различные условия проведения экспериментов. Обобщая существующие данные по гель-хроматографическому определению \bar{M}_w гумусовых кислот, Д.С. Орлов (1992) для ГК и ФК почв приводит диапазоны 5-650 и 4-15 КДа, соответственно.

1.1.2. Взаимодействие гумусовых кислот с минералами

Органическое вещество почвы активно взаимодействует с минеральными компонентами почвы. Образование органоминеральных соединений (в частности, минералорганических) - характерная и неотъемлемая черта почвообразования. (Орлов, 1992). Исследования ряда авторов (Greenland, 1971; Davis and Glour, 1981; Sibanda and Young, 1986) показали, что растворенные гумусовые кислоты могут быть иммобилизованы минеральными поверхностями. Дэвис (Davis, 1980) продемонстрировал способность гиббсита адсорбировать ГК и ФК, выделенных из донных отложений. Различные синтетические минералы оксидов и гидроксидов железа также могут адсорбировать значительные количества растворенного органического вещества (Schwertmann, 1966; Sibanda and Young, 1986).

Количественно поглощение минералами гумусовых кислот может быть описано изотермой Лэнгмюра:

$$S = \frac{K \times C \times b}{1 + K \times C} \quad (1.5)$$

где S - количество адсорбированных гумусовых кислот; C - равновесная концентрация гумусовых кислот в растворе; b - максимальная адсорбция; K - параметр, характеризующий силу связывания. Величина K имеет размерность л/кг ОС.

По данным различных авторов максимальная адсорбция гумусовых кислот (b) составляет десятки-сотни граммов на килограмм минерала (табл. 1.5)

Максимальная адсорбция (b) гумусовых кислот на почвенных минералах

Минерал	Адсорбция (b)	Источник
ФК почвы		
бентонит ¹	12,5 г ОС/кг	Evans and Russell, 1959
Са-бентонит ¹	158,0 г ОС/кг	там же
гетит ²	45,1 г ОС/кг	там же
Na-гетит ²	87,0 г/кг*	Parfitt et al., 1977
лепидокрокит ²	48,9 г ОС/кг	Evans and Russell, 1959
гиббсит ²	34,2 г ОС/кг	там же
Na-гиббсит ²	150,0 г/кг*	Parfitt et al., 1977
Na-монтмориллонит ¹	1100 г/кг	Schnitzer and Kodama, 1967
имоголит ¹	590,0 г/кг*	Parfitt et al., 1977
ГК почвы		
бентонит ¹	15,0 г ОС/кг	Evans and Russell, 1959
Са-бентонит ¹	184,0 г ОС/кг	там же
гетит ²	45,9 г ОС/кг	там же
лепидокрокит ²	49,2 г ОС/кг	там же
гиббсит ²	34,8 г ОС/кг	там же
Na-каолинит ¹	7,0 г ОС/кг*	Kretzschmar et al., 1997
ГК торфа		
бентонит ¹	12,5 г ОС/кг	Jung, 1943 (цит. по Evans and Russel, 1959)
ГК угля		
гематит ³	78,0 г/кг*	Vermeer and Koopal, 1998

* - цифры получены автором диссертации из графического материала, представленного в работе.

¹ - минералы подкласса гидроксидов

² - глинистые минералы подкласса слоистых алюмосиликатов

³ - минерал подкласса простых оксидов

Механизм адсорбции гумусовых кислот на минералах к настоящему времени еще до конца не изучен. Так, для минералов подкласса гидроксидов (гетит, гиббсит, лепидокрокит и др.) рядом исследователей (Inoue and Wada, 1968; Greenland, 1971) в качестве основного механизма их взаимодействия с гумусовыми кислотами был предложен анионный обмен: анионы гумусовых кислот замещают ОН-группы минерала. Парфитт (Parfitt et al., 1977) также высказал предположение, что карбоксильные группы гумусовых кислот могут замещать поверхностные ОН-группы гиббсита, гетита и имоголита. Возможность участия в лигандном обмене координированных ОН-групп также была отмечена Типпингом (Tipping, 1981). Адсорбция гумусовых кислот по данному механизму должна являться легко обратимой, а образующиеся

минералорганические соединения легко разрушаться при увеличении pH выше 8, когда положительный заряд гидроксида алюминия или железа полностью нейтрализуется. Однако, как свидетельствует сам автор, невозможность полной экстракции гумусовых кислот из почв говорит о том, что связывание гумусовых кислот минералами может протекать также и по иным механизмам.

Для взаимодействия гумусовых кислот с глинистыми минералами предложено несколько механизмов. Ряд исследователей (Evans and Russell, 1959; Kodama and Schnitzer, 1974) полагают, что органическое вещество может адсорбироваться по механизму неионного гидрофобного связывания. Эванс и Расселл (Evans and Russell, 1959) отмечают однако незначительный вклад гидрофобного механизма во взаимодействия гумусовых кислот. Гринлэнд (Greenland, 1971) предположил, что адсорбция гумусовых кислот на глинах происходит путем образования связей через поливалентные металлы на поверхности минерала. Подобное взаимодействие может осуществляться как по механизму "лигандного обмена", так и путем анионного обмена. Дэвис (Davis, 1982) высказал предположение, что последний механизм преобладает при адсорбции ФК и ГК на положительно заряженных сколах каолинита. Александрова (1980) в качестве вероятных форм связи между гумусовыми кислотами и минералами указывает хемосорбцию и адгезию (рис. 1.2).

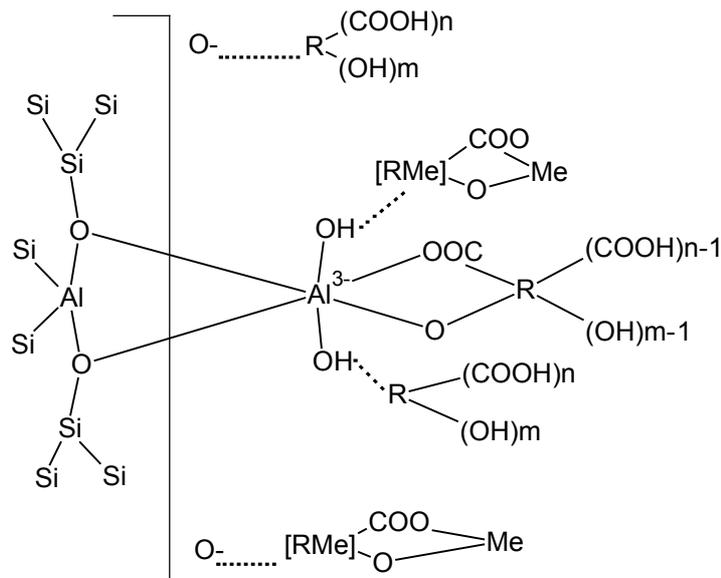


Рис. 1.2. Схема строения глиногумусового комплекса алюмосиликатов (Александрова, 1980).

В работе (Murphy and Zachara, 1995) приводятся следующие механизмы адсорбции гумусовых кислот на минеральных поверхностях:

– электростатическое притяжение;

- специфическая адсорбция путем лигандного обмена с протонированными поверхностными ОН-группами;
- образование катионных мостиков;
- образование водных мостиков в присутствии на поверхности минерала гидратированных катионов;
- гидрофобное взаимодействие.

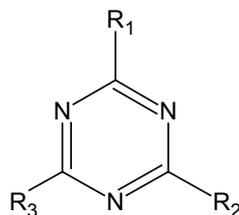
Орлов (Орлов, 1992) особое внимание уделяет роли катиона, насыщающего глинистый минерал. Он приводит результаты опыта по сравнительной адсорбции гуминовых кислот на монтмориллоните, насыщенном катионами различной валентности. При смене насыщающего катиона с одно- (Na^+) на двухвалентный количество связанных с минералом ГК возрастает в 8-10 раз, а при насыщении Fe^{3+} и Al^{3+} в 15-20 раз и более. Эванс и Расселл (Evans and Russell, 1959) также показали, что эффективность адсорбции гумусовых кислот на бентоните была больше при насыщении глины Ca^{2+} , чем Na^+ .

В результате адсорбции гумусовых кислот на почвенных минералах происходит образование органоминеральных коллоидов, при этом конформационное состояние гумусовых кислот существенно изменяется. Так, Шнитцер и Кодама (Snitzer and Kodama, 1967) при изучении комплексов фульвокислот с монтмориллонитом методом ИК-спектроскопии показали, что в комплексе фульвокислоты существуют главным образом в недиссоциированной или слабо диссоциированной формах, что приводит к гидрофобизации глинистой поверхности (Murphy et al., 1992). В результате, адсорбционная емкость образующегося минералорганического комплекса по отношению к гидрофобным органическим веществам значительно превышает суммарную адсорбционную емкость исходных компонентов (глинистого минерала и гумусовых кислот) (Murphy et al., 1990). Таким образом, при перенесении результатов исследований взаимодействия гумусовых кислот с экотоксикантами на реальные системы необходимо учитывать не только содержание, но и форму существования гумусовых кислот в природе.

1.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ С АТРАЗИНОМ

1.2.1. Поведение сим-триазиновых гербицидов в почве

Атразин является типичным представителем класса триазиновых гербицидов (табл. 1.6), имеющих следующую структурную формулу:



Они различаются по своей фитотоксичности, персистентности и особенностями поведения в почве, что обусловлено, прежде всего, различиями в заместителях в положении 2 триазинового кольца. Так, сим-триазины, имеющие в положении 2 атом хлора (атразин), являются наиболее устойчивыми в почве: срок их последствия в зависимости от дозы и условий применения может колебаться от нескольких недель (8-10) до 4 лет, тогда как эта величина для метилтиотриазинов составляет всего 3-10 недель (Майер-Боде, 1972).

Таблица 1.6

Триазиновые гербициды

Гербицид	Заместители		
	R1	R2	R3
симазин	Cl	NH(C ₂ H ₅)	NH(C ₂ H ₅)
атразин	Cl	NH(C ₂ H ₅)	NH(изо-C ₃ H ₇)
пропазин	Cl	NH(изо-C ₃ H ₇)	NH(изо-C ₃ H ₇)
прометрон	OCH ₃	NH(изо-C ₃ H ₇)	NH(изо-C ₃ H ₇)
аметрин	SCH ₃	NH(C ₂ H ₅)	NH(изо-C ₃ H ₇)
прометрин	SCH ₃	NH(изо-C ₃ H ₇)	NH(изо-C ₃ H ₇)
десметрин	SCH ₃	NH(CH ₃)	NH(изо-C ₃ H ₇)

Способность сим-триазинов к сорбции в большой мере обусловлена степенью их основности и распределением электронной плотности в молекуле. Присутствие метокси- и особенно метилтиогруппы, увеличение числа алкильных групп при атоме азота в боковых цепях повышает основность молекул и, соответственно, степень их поглощения органическими адсорбентами. Кроме того, наличие метилтиогруппы влияет на электронную плотность триазинового

кольца, обуславливая более прочную связь между гербицидом и почвенным коллоидом.

При попадании в почву сим-триазины, как и другие гербициды, могут претерпевать различные превращения: разлагаться химически и биологически, вымываться, испаряться и т.п. (рис. 1.3).

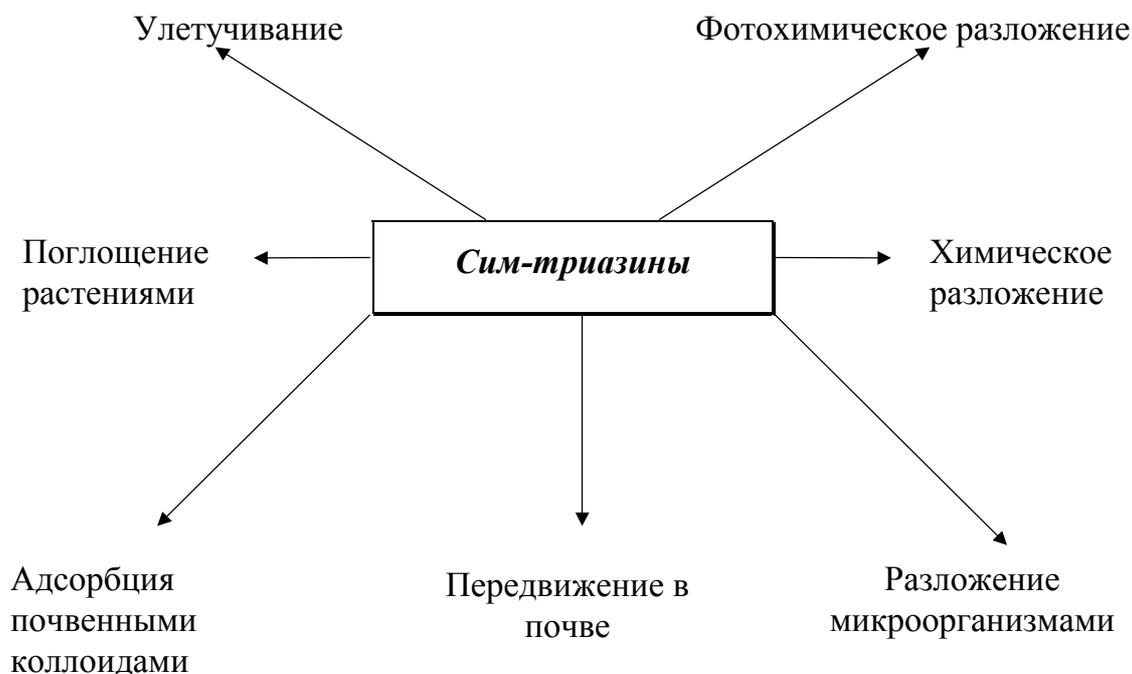


Рис. 1.3. Процессы, происходящие при попадании сим-триазиновых гербицидов в почву.

Сим-триазиновые гербициды прежде всего сорбируются почвой, причем в большинстве случаев - ее органической частью (Лебедева, 1990). Бэйли и Уайт (Bailey and White, 1964) приводят данные о том, что 77% вариации ED_{50} симазина (дозы гербицида, снижающей накопление сухой биомассы на 50%) предсказуемо по содержанию органического вещества, причем с учетом содержания глины, рН и ЕКО процент предсказуемой вариации составляет 87%. Пайа-Перец и др. (Paya-Perez et al., 1992) установили, что коэффициент распределения атразина (K_d) между почвенной и водной фазами в наибольшей степени определяется содержанием почвенного органического вещества, в то время как ЕКО, содержание глины, оксидов алюминия и марганца не оказывают существенного влияния. Этими же авторами на основании исследования поведения атразина в 24 почвенных профилях было высказано предположение о том, что не только общее количество органического вещества в почве, но и его состав играют существенную роль в сорбции атразина почвой. Раман и др.

(Raman et al., 1988) также обнаружили значимую корреляцию между степенью сорбции атразина почвой и содержанием в ней органического вещества. Барриусо и Калвет (Barriuso and Calvet, 1992) установили, что содержание органического вещества в почве является основным показателем, определяющим K_d атразина. По мнению Хана (Khan, 1980), образование связанных остатков сим-триазинов в почве обусловлено их взаимодействием с гумусовыми веществами.

Наряду с сорбцией, в почве происходит также и разложение сим-триазинов. В отличие от большинства гербицидов, для атразина характерна преимущественно химическая деградация, главным образом, гидролиз (Сюняев, 1984; Лунев, 1992). При этом атразин переходит в нефитотоксичный гидроксиатразин. Гидролиз атразина ускоряется с повышением температуры и влажности почвы (Лунев, 1992). Повышение уровня кислотности, как правило, также приводит к увеличению скорости гидролиза (там же). В качестве катализаторов гидролиза атразина могут выступать некоторые неорганические катионы (например Al^{3+}), а также гумусовые кислоты почв (Khan, 1978; Овчинникова, 1987).

Биологическое разложение атразина происходит при наличии в почве микроорганизмов, способных метаболизировать атразин. В настоящее время показано, что атразин разлагается с участием ряда грибов, таких как *Aspergillus fumigatus*, *A. flavipes*, *A. ustus*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium decumbens*, *P. rugulosum*, *P. luteum* (Круглов, 1984; Рэуце и Кырстя, 1986), и бактерий *Arthrobacter* spp., *Microbacterium* spp., *Pseudomonas* spp. (Papilloud et al., 1996). По мнению Круглова (1984), биологическая деградация сим-триазинов начинается с деалкилирования боковых цепей, затем следует раскрытие триазинового кольца и минерализация молекулы сим-триазина с выделением CO_2 . Бактериальное разложение может играть значительную роль при нейтральных значениях pH; низкий уровень pH способствует разложению гербицида почвенными грибами (Kaufman and Kearny, 1969).

Связывание гербицида с почвенными коллоидами заметно снижает скорость его разложения. В экспериментах с меченым атразином 83% метки ^{14}C через девять лет после внесения все еще находилось в почве, а 50% этого остатка, включая исходное соединение, представляло собой связанное вещество

(Capriel et al., 1985). Показано, что сорбированный атразин становится менее доступным для микроорганизмов (Соколов и Галиулин, 1987).

Соколов и Галиулин (1987) указывают на неоднозначное влияние гумуса на разложение пестицидов в почве:

- вблизи органоминеральных почвенных частиц наблюдается локальное повышение концентрации микроорганизмов, что способствует разложению пестицида;
- гумусовые кислоты могут выступать в качестве катализаторов химического гидролиза пестицида;
- гумусовые кислоты могут выступать в качестве косубстратов при биодegradации пестицидов;
- связывание пестицида гуминовыми веществами приводит к снижению доли доступного для микроорганизмов пестицида, то есть к снижению скорости биологического разложения;
- химическая трансформация пестицида не происходит, если он адсорбирован органическим веществом;
- комплекс гумус-пестицид может быть более устойчив в окружающей среде, чем свободная форма пестицида.

Овчинникова (1987) также отмечает двойственную роль почвенного гумуса в разложении пестицидов: если на первоначальных стадиях он способствует ускорению дegradации, то впоследствии - замедлению.

Передвижение сим-триазинов в почве, как и их разложение, зависит от сорбции гербицидов почвенными коллоидами. Согласно современным представлениям гербициды класса сим-триазинов характеризуются ограниченной миграцией по почвенному профилю. Основная масса сим-триазинов обычно содержится в верхнем слое 0-5 см. Опытами Лебедевой и Шустровой (1975), изучавших влияние свойств почв на перемещение симазина, было показано, что в торфе и глине гербицид не перемещался ниже 5 см даже в условиях интенсивного промывания. В дерново-подзолистой суглинистой хорошо окультуренной почве максимальная концентрация гербицида наблюдалась в слое 0-15 см, а в песке самым токсичным оказался слой 15-20 см. Таким образом, утяжеление механического состава и увеличение содержания органического вещества способствовало адсорбционному закреплению

токсиканта и ограничению его перемещения. Данный вывод можно отнести ко всем гербицидам группы сим-триазинов. Некоторыми авторами, однако, было показано, что миграция сим-триазиновых гербицидов не ограничивается только верхним слоем почвы, а может распространяться на весь пахотный слой и глубже. Глубина миграции атразина при многолетнем применении может составлять до 30-60 см и более (Лунев, 1992). Отмечается, что в определенных условиях симазин может мигрировать с капиллярной водой из нижних слоев в верхние, вследствие чего содержание гербицида в этих слоях повышается и на кривых динамики наблюдаются локальные максимумы (там же). В целом, сим-триазиновые гербициды относят к классу среднеподвижных в почве (Khan, 1980).

Таким образом, адсорбция атразина на органическом веществе почвы, главным образом на гумусовых кислотах, определяет его поведение в почвенном профиле. Поэтому далее нами будет рассмотрено взаимодействие атразина с гумусовыми кислотами.

1.2.2. Взаимодействие атразина с гумусовыми кислотами в почвенной среде

Как уже упоминалось, при попадании в почву атразин связывается ее органической частью, а именно, гумусовыми кислотами, находящимися как в растворенной, так и иммобилизованной формах. При этом как количество связанного атразина, так и механизм образования комплекса атразин-гумусовые кислоты будет определяться, главным образом, формой существования гумусовых кислот. Поэтому для более полной оценки взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами в реальных условиях необходимо рассматривать процессы взаимодействия гербицида как с растворенными гумусовыми кислотами, так и с их адсорбционными комплексами с глинистыми минералами.

Количественная оценка взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами

Для количественной оценки взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами используют два показателя: адсорбционную емкость гумусовых кислот по отношению к атразину и константу связывания (K_{OC}). Адсорбционная

емкость характеризует максимальное количество атразина, которое может быть связано гумусовыми кислотами, а K_{OC} характеризует силу этого взаимодействия.

Для описания адсорбции атразина гумусовыми кислотами в большинстве случаев используют уравнение адсорбции Фрейндлиха (Khan, 1978):

$$\frac{A_{ads}}{HS} = K \times [A]^n \quad (1.6)$$

где A_{ads} - количество адсорбированного вещества при его равновесной концентрации $[A]$; HS - масса гумусовых кислот; K - константа равновесия и n - степень нелинейности изотермы. В связи с тем, что концентрация гумусовых кислот не может быть выражена в молях, в отличие от индивидуальных вещества, константа имеет размерность л/кг.

Величину n в выражении Фрейндлиха часто принимают равной 1, что отвечает линейной зависимости между количеством адсорбированного вещества и равновесной концентрацией в растворе (Тинсли, 1982). Поэтому распределение вещества между раствором и адсорбентом описывается с помощью коэффициента пропорциональности:

$$\frac{A_{ads}}{HS} = K_d \times [A] \quad (1.7)$$

где K_d (л/кг) - коэффициент распределения атразина между двумя фазами (раствором и гумусовыми кислотами).

Для расчета адсорбции вещества на гумусовых кислотах используют соотношение

$$\frac{A_{ads}}{HS} = K_{OC} \times [A] \quad (1.8)$$

в котором количество адсорбированного вещества рассчитывается на органический углерод (OC). Константа K_{OC} имеет размерность л/кг OC. Принимая, что

$$A_{ads} = (C_A - [A]) \times V \quad (1.9)$$

и

$$HS = C_{HS} \times V \quad (1.10)$$

где C_A и $[A]$ - начальная и равновесная концентрации атразина, соответственно; C_{HS} - концентрация гумусовых кислот и V - объем раствора, выражение (1.8) можно преобразовать как:

$$\frac{A_{\text{ads}}}{\text{HS}} = \frac{(C_A - [A]) \times V}{C_{\text{HS}} \times V} = \frac{C_A - [A]}{C_{\text{HS}}} = K_{\text{OC}} \times [A] \quad (1.11)$$

Следовательно

$$C_A - [A] = K_{\text{OC}} \times [A] \times C_{\text{HS}} \quad (1.12)$$

и далее

$$\frac{C_A}{[A]} - 1 = K_{\text{OC}} \times C_{\text{HS}} \quad (1.13)$$

Таким образом, K_{OC} может быть рассчитана как тангенс угла наклона экспериментально получаемой зависимости $(\frac{C_A}{[A]} - 1)$ от C_{HS} .

Следует также отметить, что рассчитываемая таким способом константа взаимодействия соответствует константе равновесия реакции:



Константа равновесия в данном случае запишется как:

$$K_{\text{OC}} = \frac{[A\text{-HS}]}{[A] \times [\text{HS}]} \quad (1.15)$$

где K_{OC} - константа связывания гумусовых кислот с атразином, $[A\text{-HS}]$ и $[A]$ - концентрация связанной и несвязанной форм атразина, соответственно; $[\text{HS}]$ - концентрация гумусовых кислот в кг ОС/л.

Ввиду того, что в условиях эксперимента общая концентрация гумусовых кислот (C_{HS}) намного больше таковой атразина (C_A), можно принять $[\text{HS}] = C_{\text{HS}}$. Учитывая, что $[A\text{-HS}] = C_A - [A]$, выражение (1.15) можно преобразовать в следующее:

$$\frac{C_A}{[A]} - 1 = K_{\text{OC}} \times C_{\text{HS}} \quad (1.16)$$

Основной проблемой, возникающей при определении K_{OC} и адсорбционной емкости гумусовых кислот по отношению к атразину является разделение образующегося комплекса атразин-гумусовые кислоты и свободного атразина. Для этого в настоящее время используют ультрафильтрацию (Wang et al., 1989) или равновесный диализ (Hesketh et al., 1996; Devitt and Weisner, 1998). Оба метода основаны на предположении, что молекулы гумусовых кислот, обладающие большими молекулярными массами, не могут проникать через мембранные фильтры. Таким образом, мембраны являются непроницаемыми для связанного с гумусовыми кислотами атразина и проницаемыми - для свободного атразина. В ряде случаев, когда концентрация гумусовых кислот достаточно

большая, возможно разделение свободного и связанного атразина центрифугированием (Celis et. al., 1997), при этом связанный атразин осаждается вместе с гумусовыми кислотами, а свободный остается в растворе.

Значения адсорбционной емкости гумусовых кислот по отношению к атразину, приводимые в литературе, составляют десятки-сотни мкмоль атразина на грамм гумусовых кислот (табл. 7).

Таблица 7

Адсорбционная емкость (S) гумусовых кислот по отношению к атразину

Гумусовые кислоты	S, мкмоль/г	Метод разделения свободного и связанного атразина	Источник
ФК почвы	9	ультрафильтрация	Wang et al., 1990
	32	ультрафильтрация	Gamble, 1986
ГК почвы	15	ультрафильтрация	Wang et al., 1991
ГК угля	227	не указан	Andreux et al., 1992

К сожалению, крайне небольшой объем данных не позволяет делать на их основе выводы о зависимости адсорбционной емкости гумусовых кислот по отношению к атразину от их происхождения или свойств. Тем не менее, можно заключить, что почвенные ГК и ФК обладают сходной адсорбционной емкостью, в то время как угольные ГК характеризуются на порядок большей адсорбционной емкостью по отношению к атразину, чем почвенные.

Таблица 1.8

Константы связывания (K_{OC}) атразина гумусовыми кислотами

Гумусовые кислоты	K_{OC} , л/кг ОС	Метод разделения свободного и связанного атразина	Источник
ГК+ФК почвы	41	центрифугирование	Grover and Hance, 1970
ГК+ФК седиментов	216	центрифугирование	Brown and Flagg, 1981
ФК почвы	25*	ультрафильтрация	Wang et al., 1990
ГК почвы	175	ультрафильтрация	Gamble and Khan, 1988
	130*	диализ	Clapp et al., 1997
	310	центрифугирование	Celis et. al., 1997
Fluka ГК	600	центрифугирование	там же

* - K_{OC} рассчитана автором диссертации на основании графического материала, представленного в работе.

Значения K_{OC} , приводимые в литературе, составляют от 25 до 600 л/кг (табл. 1.8).

Как показывает табл. 1.8, величины K_{OC} для взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами не превышают $n \times 10^2$ л/кг. Их сравнение с многочисленными данными по константам взаимодействия гумусовых кислот с

ПАУ (10^4 - 10^5 л/кг ОС) (Gauthier et al., 1987, Schlautman and Morgan, 1993, Perminova et al., 1999) показывает, что сродство гумусовых кислот к атразину весьма незначительно. Принимая во внимание низкую концентрацию водорастворимых гумусовых кислот в почве (Когут, 1996), можно сделать вывод о том, что связывание с растворенными гумусовыми кислотами не может вносить существенного вклада в распределение атразина по формам существования в почвенной среде.

Механизм взаимодействия атразина с растворенными гумусовыми кислотами

Единого мнения о механизме взаимодействия гумусовых кислот с атразином не существует. В качестве возможных механизмов рассматривают физическую сорбцию за счет Ван-дер-Ваальсова и гидрофобного взаимодействий (Hayes, 1970), хемосорбцию за счет ионного обмена (Gilmour and Coleman, 1971), водородное связывание (Sullivan and Felbeck, 1968), лигандный обмен и донорно-акцепторное взаимодействие (Hayes, 1970). При этом доминирующими механизмами взаимодействия по мнению различных исследователей являются ионный обмен и водородное связывание (Gilmour and Coleman, 1971) или образование комплексов с переносом заряда (Piccolo et al., 1992).

Процесс ионного обмена возникает при протонировании триазинового гербицида в почвенном растворе:



где T - триазиновый гербицид. Далее может идти реакция:



где R-COOX - гипотетическая молекула гумусовых кислот, а X - обменный катион (например H^+ или Ca^{2+}).

Водородное связывание может осуществляться в результате взаимодействия между:

- карбонильными группами органических кислот и аминогруппами триазинов (органическое вещество - донор электронной пары)

- фенольными или гидроксильными группами гумусовых кислот и кислородом, хлором или серой в положении 2 триазинового кольца (органическое вещество - акцептор электронной пары).

Специальное исследование, предпринятое Ли и Фелбеком (Li and Felbeck, 1972), по выявлению роли различных функциональных групп гумусовых кислот в связывании атразина, показало ведущую роль карбоксильных и/или фенольных групп. Салливан и Фелбек (Sullivan and Felbeck, 1968) отмечают также вклад в данное взаимодействие карбонильных и спиртовых гидроксильных групп в составе органического вещества. Гилмор и Колеман (Gilmour and Coleman, 1971) указывают на связь между константой сорбции сим-триазинов гуминовыми кислотами и насыщенностью последних Са, который, с одной стороны, конкурирует с гербицидом за места адсорбции на гуминовых кислотах, а с другой, увеличивает количество мест возможного обмена. В целом, с увеличением насыщенности гуминовых кислот Са количество адсорбированного гербицида уменьшается (там же). Кроме того, в зависимости от содержания Са меняется тип адсорбции гербицида: если при низкой насыщенности адсорбция хорошо описывается уравнением обмена, то при высокой степени насыщенности ионный обмен играет незначительную роль (Hayes, 1970).

Уеллхауз и Блим (Welhouse and Bleam, 1993) при помощи ^{13}C ЯМР спектроскопии обнаружили, что молекула атразина существует в виде смеси четырех таутомерных форм. При этом электронная пара азота в триазиновом кольце делокализована, поляризуя при этом молекулу атразина (кислые цепочечные NH-группы и основные атомы N в кольце) и способствуя гидрофобному связыванию. Таким образом, относительно устойчивые комплексы атразин-гуминовые вещества (ГВ) могут образовываться при участии амидных или карбоксильных функциональных групп ГВ.

Образование комплексов с переносом заряда (КПЗ) может происходить путем переноса электрона от азота в боковой цепочке молекулы гербицида (триазин - донор) к хинону молекулы ГВ (ГВ - акцептор) (Sposito et al., 1996). Другой возможный механизм - образование так называемых π - π комплексов, когда заряд делокализуется между ароматическим кольцом ГВ и триазиновым кольцом гербицида (Clapp et al., 1997; Senesi et al., 1995). Общая схема возможных взаимодействий приведена на рис. 1.4.

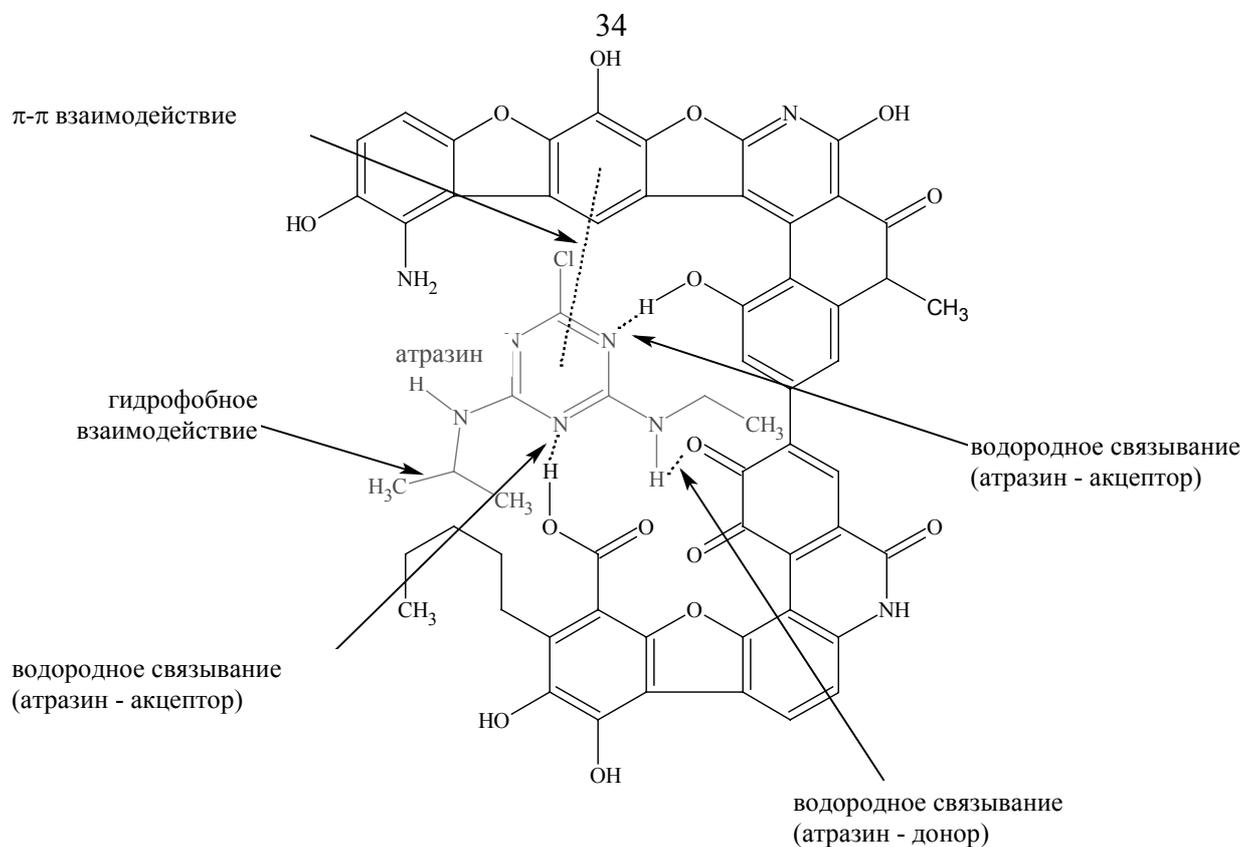


Рис. 1.4. Схема взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами (Clapp et al., 1997)

Вследствие специфики описанных механизмов связывания гумусовых кислот с триазиновыми гербицидами, взаимодействие данных соединений в существенной степени зависит от условий проведения реакции. При этом наиболее важными факторами являются pH, ионная сила и концентрация реагентов. Их значимость для протекания взаимодействия в системе почвенные ГК (ФК) - атразин наглядно демонстрируется Уангом и др. (Wang et al., 1990, 1991). При возрастании концентрации ФК происходит уменьшение адсорбции на них атразина (Wang et al., 1990), (рис. 1.5), а увеличение концентрации ГК приводит к увеличению адсорбции гербицида (Wang et al., 1991), (рис. 1.6).

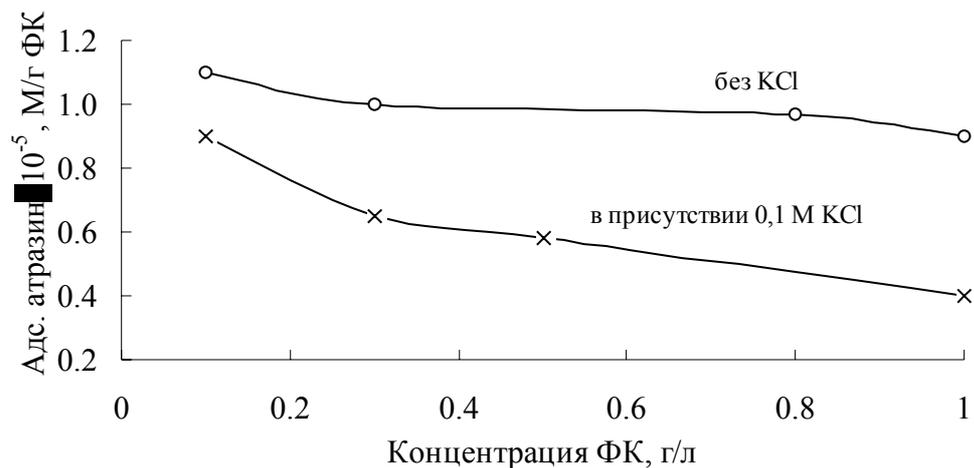


Рис. 1.5. Концентрационная зависимость связывания атразина ФК (Wang et al., 1990)

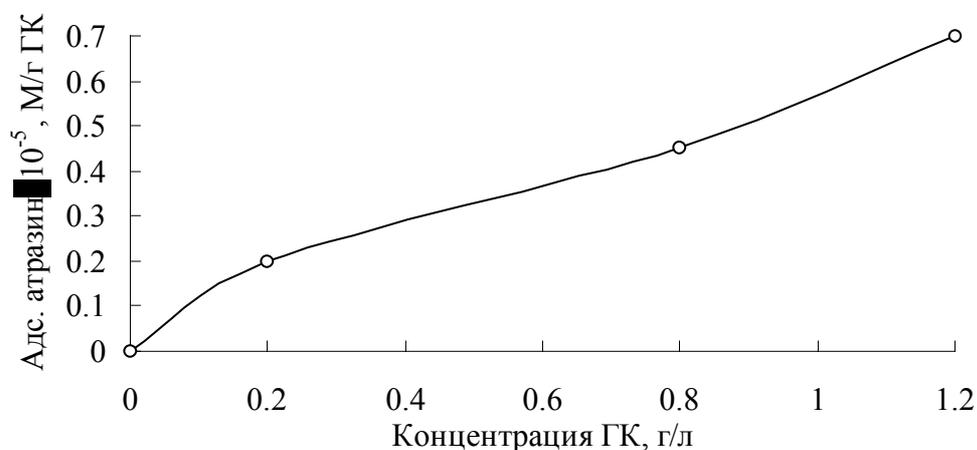


Рис. 1.6. Концентрационная зависимость связывания атразина ГК (Wang et al., 1991)

Авторы объясняют наблюдаемый эффект агрегированием ФК при высоких концентрациях, т.е. уменьшением количества центров возможного взаимодействия. При этом агрегирования ГК при сходных концентрациях не происходит. Теми же авторами отмечается зависимость адсорбции атразина от кислотности среды: максимальное связывание атразина с ГК происходит при рН 3,05 (Wang et al., 1991), а с ФК при рН 1,40, причем при рН > 5,5 связывание атразина с ФК практически не происходит (Wang et al., 1990), (рис. 1.7 и 1.8). В тоже время Ладонин и Алиев (1991) указывают на противоречивость данных о влиянии кислотности среды на степень адсорбции сим-триазинов органическим веществом.

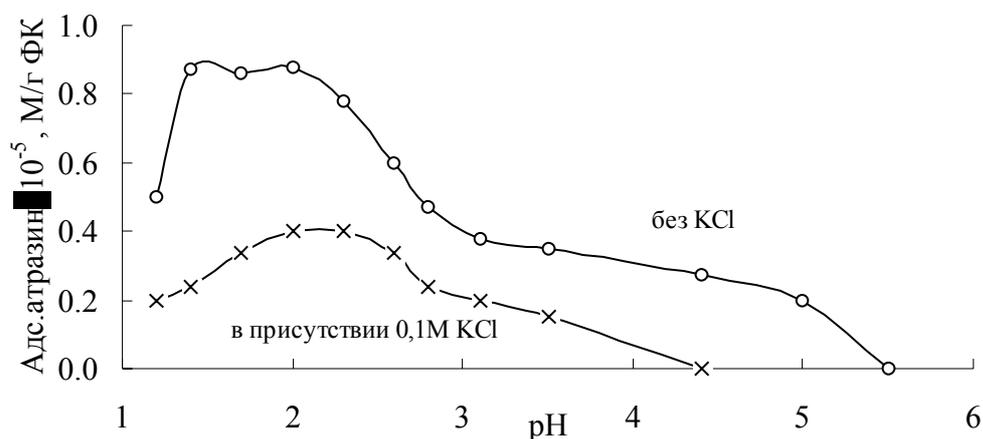


Рис. 1.7. Зависимость связывания атразина ФК от рН среды (Wang et al., 1990)

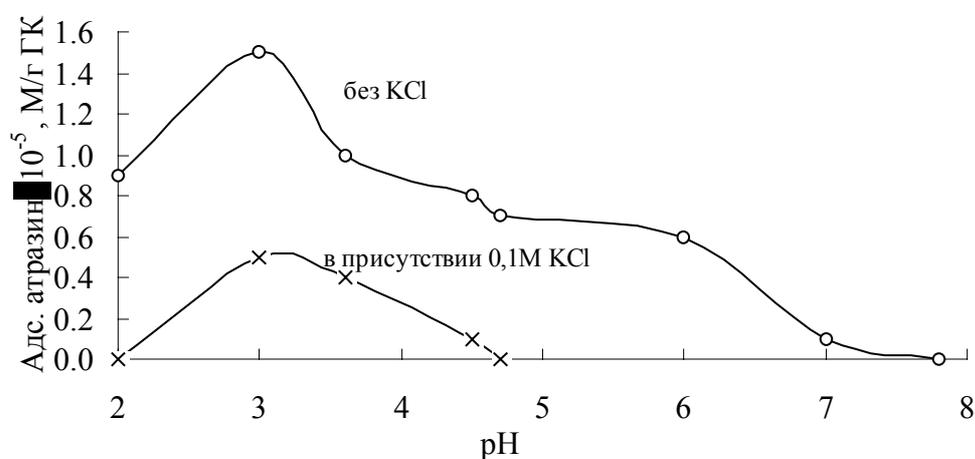


Рис. 1.8. Зависимость связывания атразина ГК от рН среды (Wang et al., 1990)

Исходя из приведенных выше механизмов, можно сделать вывод о зависимости этого взаимодействия не только от условий среды, но и от свойств органического вещества, таких как состав и количество функциональных групп, насыщенность Са, молекулярная масса и т.п. Так как органическое вещество не является однородным по этим свойствам, то можно ожидать, что сорбционная емкость различных фракций органического вещества по отношению к симтриазиновым гербицидам должна быть разной. Действительно, в работе (Овчинникова, 1987) показано, что атразин сорбируется преимущественно гумином и ФК, тогда как симазин - ГК и ФК. Существуют также данные о том, что пестициды сорбируются в первую очередь мобильными ФК и лишь затем - остальными фракциями органического вещества (Сизов и др., 1990). Однако Уанг с соавт. (Wang et al., 1990) в своих исследованиях пришли к прямо противоположному выводу: ведущую роль в связывании гербицида атразина играет высокомолекулярная фракция гумусовых кислот. Стюарт (Stewart, 1984),

отмечая быстрое связывание сим-триазинов высокомолекулярной коллоидной фракцией водорастворимых гумусовых кислот, также указывает на различия в характере образующихся связей между высокомолекулярной и низкомолекулярной фракциями гумусовых кислот: в первом случае идет низкоэнергетическое взаимодействие (адсорбция), а во втором - высокоэнергетическое (ковалентное связывание).

Связывание атразина адсорбционными комплексами гумусовых кислот с минералами

Почвенные коллоиды являются органоминеральными образованиями различных почвенных компонентов. В большинстве случаев это глинисто-органический комплекс, в котором глина покрыта пленкой органических веществ (Greenland, 1965; Ahlrichs, 1972). Разделение комплекса без нарушения адсорбционных свойств входящих в него глины и органического вещества практически невозможно (Edwards and Bremner, 1967). Таким образом, при исследовании свойств отдельных почвенных компонентов результаты не могут быть использованы для оценки реальных объектов. В связи с этим в последнее время стали появляться работы, посвященные изучению адсорбционных свойств модельных коллоидов или непосредственно полученных из почвы минералорганических фракций по отношению к загрязняющим веществам. Получение модельных минералорганических комплексов в большинстве случаев подразумевает предварительное насыщение выбранного глинистого минерала ионом какого-либо металла (например Na^+ , Ca^+) для того чтобы снять отрицательный заряд поверхности минерала и тем самым повысить его адсорбционную емкость по отношению к гумусовым кислотам (Murphy et al., 1990).

Адсорбцию атразина на почвенных и модельных коллоидах обычно характеризуют коэффициентом распределения K_d (Celis et al., 1998):

$$K_d = \frac{A_{ads}}{[A]} \quad (1.19)$$

где A_{ads} - количество адсорбированного на сорбенте атразина; $[A]$ - равновесная концентрация гербицида.

Для расчета константы связывания атразина адсорбированными на минерале гумусовыми кислотами K_{OC} пользуются уравнением (Celis et al., 1998):

$$K_{OC} = \frac{K_d}{OC, \%} \times 100 \quad (1.20)$$

где $OC, \%$ - содержание органического углерода в сорбенте.

Исследованию адсорбции атразина и симазина на моделях почвенных коллоидов посвящена работа Селиса и др. (Celis et al., 1998). В качестве моделей были использованы адсорбционные комплексы почвенных ГК с монтмориллонитом и гидроксидом железа (III). Авторами было установлено, что K_{OC} для растворенных ГК составляет 310, а для адсорбированных на монтмориллоните - 1475 л/кг, т.е. константа связывания возросла в три раза. Аналогичное увеличение констант связывания было установлено при исследовании сорбции ПАУ на иммобилизованных на каолините и гематите торфяных ГК и ФК (Murphy et al., 1990).

Приводимые в литературе значения констант связывания атразина реальными почвенными частицами значительно ниже. Так, вычисленные нами на основании данных Хлебниковой (1975) значения K_{OC} атразина для дерново-подзолистой почвы, чернозема и краснозема составили, соответственно, 161, 104 и 152 л/кг ОС. Максимальная сорбция атразина, наблюдавшаяся для чернозема, была 37,1 мкг/кг почвы. Лайрд и др. (Laird et al., 1994) получили сходные величины сорбции атразина почвенными глинистыми частицами разного размера: 9,75-21,38 мкг/кг почвы. Обработка изученных глинистых фракций перекисью водорода с целью разложения органического вещества приводила к снижению показателей сорбции в 1,2-16,0 раз. Согласно оценкам, приводимым в цитируемой выше работе, вклад органического вещества в определение сорбционной способности почвенных частиц по отношению к атразину составил 68%.

Интересные результаты приводят Березовский и Немова (1973): коэффициент распределения атразина (K_d) в торфяной и дерново-подзолистой

почвах составил 26,1 и 1,4 л/кг почвы, при этом вычисленные автором диссертации на основе их данных K_{OC} составили 85 и 103 л/кг ОС, соответственно. Это свидетельствует о предпочтительной сорбции атразина на минералорганических комплексах по сравнению с чистым органическим веществом.

Сета и Каратанасис (Seta and Karathanasis, 1997) также установили наличие статистически значимой корреляции между содержанием органического вещества в почвенных коллоидах и их способностью адсорбировать атразин. В качестве главных механизмов взаимодействия атразина с адсорбированным органическим веществом авторами были предложены физическая адсорбция и гидрофобное связывание. Другими исследователями (Laird et al., 1994), однако, отмечается возможность хемосорбции атразина на минералорганических комплексах в случаях, когда в состав комплекса входит грубодисперсная (>2 мкм) глинистая фракция. Авторы объясняют этот факт относительной обогащенностью сорбированных на грубодисперсной глинистой фракции гумусовых кислот функциональными группами по сравнению с сорбированными на тонкодисперсной фракции.

Адсорбция атразина почвенными минералорганическим адсорбционными комплексами приводит к снижению его концентрации в почвенном растворе, и, как следствие, к снижению его токсичности. Таким образом, гумусовые кислоты и их минералорганические комплексы выступают как природные детоксиканты. Более подробно детоксицирующая способность гумусовых кислот будет рассмотрена в следующем разделе.

1.3. ДЕТОКСИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПО ОТНОШЕНИЮ К АТРАЗИНУ

В результате взаимодействия атразина с растворенными и связанными в адсорбционные комплексы гумусовыми кислотами, в почве атразин может находиться в нескольких формах:

- свободный атразин;
- атразин, связанный с растворенными гумусовыми кислотами;

– атразин, сорбированный на минералорганических комплексах гумусовых кислотах.

(Вследствие образования минералорганических комплексов гумусовых кислот с почвенными минералами поверхность последних практически недоступна для молекул гербицидов (Hance, 1969)).

Токсичность атразина для растений в этом случае может быть обусловлена только теми его формами, которые находятся в растворе, то есть свободным атразином и атразином, связанным с растворенными гумусовыми кислотами. Оценка уровня токсичности в подобной системе осложняется присутствием растворенных гумусовых кислот, которые могут непосредственно влиять на состояние растений. Поэтому для корректной оценки воздействия такой системы на растение необходимо предварительно определить действие каждого компонента, а именно: свободного атразина, гумусовых кислот и атразина в присутствии гумусовых кислот.

1.3.1. Гербицидная активность атразина

Как уже указывалось ранее, атразин относится к классу сим-триазинов, гербицидная активность которых установлена еще в 1952 году (Майер-Боден, 1972). Поступление этих гербицидов в растения происходит через корневую систему, они являются гербицидами системного действия. В настоящее время доказано, что сим-триазины ингибируют реакцию фотолиза воды (реакция Хилла) в процессе фотосинтеза растений, блокируя отток электронов от акцепторной части фотосистемы II (ФС II) (Гольдфельд и Карапетян, 1989), т.е. нарушают нециклический транспорт электронов. Являясь ингибиторами транспорта электронов, они действуют исключительно на мембранные стадии их переноса между двумя ФС при участии пластохинонного подвижного переносчика.

Так как триазины угнетают световую стадию фотосинтеза, то на степень проявления их фитотоксичности оказывает влияние освещенность: чем она выше, тем сильнее действие гербицидов. Кроме того, для проявления токсичности сим-триазинов необходимо наличие у растения сформировавшегося фотосинтетического аппарата. Гербицидная активность сим-триазинов в почве теряется при их гидролизе, когда они переходят в гидрокситриазины, у которых

заместителем в положении 2 является ОН-группа. В растениях инактивация симтриазинов может происходить двумя путями: во-первых, за счет образования нетоксичного комплекса гербицида с фенольными соединениями и, во-вторых, в результате разрушения триазинового кольца полифенолоксидазной системой растения (Зинченко, 1971).

1.3.2. Физиологическая активность гумусовых кислот

Принципиальная возможность поступления гумусовых кислот в растение была показана в работах Христовой (1951), Прата (Prat, 1963; Prat and Pospisil, 1959) и Фокина (Фокин и др., 1975). Коллективом авторов под руководством Фокина (1975) установлено, что гуминовые кислоты могут проникать непосредственно в клетки растений, достигая их важнейших органелл - ядра, митохондрий, хлоропластов. Согласно исследованиям Христовой (1951), гумусовые кислоты могут выступать в качестве питательных веществ для растений или же играть роль физиологически активных веществ (ФАВ), причем большей физиологической активностью обладают наиболее низкомолекулярные фракции гумуса. Кроме того, было показано, что физиологическое действие присуще лишь истинным растворам гумусовых кислот; при их осаждении исчезает как положительный эффект на растения (проявляющийся при малых концентрациях), так и негативный (проявляется при высоких концентрациях).

Физиологической активности гумусовых кислот посвящен обзор Виссера (Visser, 1986), где приводятся следующие возможные механизмы влияния гумусовых кислот на рост и развитие растений:

- увеличение количества доступного железа за счет образования железо-гумусовых комплексов;
- изменение поглощения 2-х и 3-х валентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+});
- облегчение ионного обмена между протоплазмой и почвенным раствором;
- влияние на вязкость и коллоидную структуру протоплазмы;
- влияние на проницаемость клеточной мембраны: в высоких концентрациях гумусовые кислоты могут повреждать клеточную мембрану;
- непосредственное поглощение гумусовых кислот клетками; ФК могут поглощаться в большей степени, нежели ГК;

– взаимодействие с ферментами: ферменты могут встраиваться в молекулы гумуса, придавая им ферментативную активность; ФК в этом отношении активнее, чем ГК.

В качестве механизмов влияния гумусовых кислот на рост и развитие растений чаще всего предлагаются две гипотезы из выше перечисленных. Прежде всего, гумусовые кислоты могут действовать как растительные гормоны (Müller-Wegener, 1988; Раковский и Пигулевская, 1978). Несмотря на то, что некоторые авторы (Phuong and Tichy, 1976) избегают проводить прямые аналогии между гумусовыми кислотами и растительными гормонами, такими как ауксин, гиббереллин и цитокинин, физиологическая активность гумусовых кислот в настоящее время достоверно установлена (Пивоваров, 1962; Христева, 1952; Христева, 1968; Христева и др., 1968).

Другое возможное объяснение - действие гумусовых кислот как высокодисперсного золя, увеличивающего проницаемость плазмалеммы и способствующего поступлению питательных веществ в растения (Баталкин и др., 1983, Вахмистров и др., 1987).

Кроме перечисленных, Христева (1951, 1957, 1962) предлагает еще один возможный механизм физиологической активности гумусовых кислот - их действие как промежуточных катализаторов процесса дыхания. Данный механизм обусловлен наличием в структуре гумусовых кислот полифенольных и хинонных фрагментов, которые используются растением для усиления фенолазной окислительной системы, следствием чего является активизация дыхания и обмена веществ в целом. Кроме того, по мнению Христевой, часть полифенольных групп гуминовых кислот может функционировать как донор водорода для промежуточных акцепторов дыхательной цепи, благодаря чему активизация кислородного обмена может происходить и без участия полифенолоксидазы Христева, 1967).

Никлевский с сотрудниками (1971) (цит. по Христевой, 1973), касаясь природы биологической активности препаратов гуминовых веществ, отмечает, что гуматы в основном затрагивают в растениях процессы дыхания и фотосинтеза. Подробное исследование влияния гумусовых кислот на отдельные стадии фотосинтеза было проведено Бобырем (1980). Было установлено, что внесение гуматов натрия при выращивании культуры гороха активируют

скорость транспорта электронов в электрон-транспортной цепи выделенных из них хлоропластов, циклическое и нециклическое фотофосфорилирование. При добавлении гуматов натрия непосредственно в среду инкубации хлоропластов гороха наблюдали снятие трансмембранного протонного градиента, начиная с определенной концентрации препарата. Это свидетельствует о том, что в больших концентрациях гуматы натрия разобщают транспорт электронов и фотофосфорилирование. Автор приходит к выводу, что влияние гумусовых кислот на фотосинтез не является специфическим, а обусловлено их воздействием на мембранную, фитогормональную, белоксинтезирующую и др. системы, приводящим к структурным изменениям в растительном организме.

В силу полидисперсности гумусовых кислот их различные фракции могут оказывать действие на растение, различное как по силе, так и по направленности. В связи с этим целый ряд работ посвящен выявлению наиболее активной части гумусовых кислот, а также зависимости действия органического вещества почвы от его свойств. Так, Виссер (Visser, 1986) приводит данные о большей степени поглощения растениями ФК, чем ГК. Кроме того, указывается на зависимость степени поглощения от молекулярной массы и состава функциональных групп гумусовых кислот. Алиев (1987), изучая действие гумусовых кислот как ФАВ, пришел к выводу о том, что наиболее активными являются самые низкомолекулярные фракции гумусовых кислот, характеризующиеся наибольшим содержанием функциональных групп и свободных радикалов. Фуонг и Тиши (Phuong and Tichy, 1976) при рассмотрении ауксинового, гиббереллинового и цитокининового действия ГК, гиматомелановой кислоты и ФК из торфа получили результаты, свидетельствующие о наибольшей активности ФК. Интересные исследования, посвященные связи поверхностно-активных свойств ГК с их физиологической активностью, были проведены Вахмистровым с соавт. (1987). Авторы обнаружили, что при снижении поверхностного натяжения раствора ГК (за счет увеличения их концентрации) с 72 до 65 дин/см происходит стимуляция роста корней огурцов. При дальнейшем снижении поверхностного натяжения до 61 дин/см наблюдали резкое угнетение роста. Проведенные опыты с модельным ПАВ Твин 20 не показали аналогичного эффекта: при поверхностном натяжении 65-61 дин/см наблюдали лишь выход на некоторое постоянное значение, но не угнетение. Авторы пришли к выводу о

связи физиологической и поверхностной активности ГК и наличии специфического действия ГК на клеточные мембраны растений.

Физиологическая активность растворенного органического вещества (РОВ) исследовалась, в основном, по отношению к одноклеточным организмам и бактериям. По-видимому, это связано с тем, что в данных исследованиях использовался РОВ рек и озер, хотя существуют исследования, проведенные с почвенным РОВ (Stewart, 1984). Прежде всего необходимо отметить, что РОВ поверхностных вод представлен гумусовыми кислотами на 50-80% (Rashid, 1985; Petersen, 1991), почвенный - на 60% (Easthouse et al., 1992). Кроме того, в состав РОВ могут входить витамины, растительные гормоны (Орлов и др., 1985). В целом, авторы отмечают угнетающее действие наиболее низкомолекулярной части РОВ при одновременном стимулирующем воздействии высокомолекулярных фракций. Петерсен (Petersen, 1991) отмечает, что при внесении водорастворимых гумусовых веществ скорость роста *Daphnia magna* снижалась и объясняет наблюдаемый эффект поверхностно-активными свойствами гумусовых кислот. Тулонен с соавт. (Tulonen et al., 1992), изучая зависимость действия РОВ на бактерии и одноклеточные водоросли, обнаружили уменьшение скорости роста и биомассы бактерий и водорослей в присутствии наиболее низкомолекулярной (<1000 дальтон) фракции, в то время как при возрастании концентрации РОВ с большими молекулярными массами наблюдалась стимуляция роста.

Таким образом, на основании рассмотренных выше работ, можно сделать вывод о том, что основными факторами, определяющими физиологическую активность гумусовых кислот и РОВ, являются их молекулярно-массовое распределение и поверхностно-активные свойства.

1.3.3. Детоксицирующая способность гумусовых кислот по отношению к сим-триазиновым гербицидам

Изучение влияния гумусовых кислот на поведение различных типов экотоксикантов в природных средах является одним из наиболее динамично развивающихся современных направлений химии окружающей среды. Способность гумусовых кислот нивелировать отрицательное действие целого

ряда экотоксикантов, включая тяжелые металлы (ТМ), ПАУ и пестициды различных классов, показана многими авторами (Bender et al., 1970; Gachrer et al., 1978; Fisher and Frood, 1980; Luoma, 1983; Landrum et al., 1985; McCarthy and Jimenez, 1985; Pommery et al., 1985; Winner, 1985; Perminova et al., 1996; Анисимова, 1997; Ковалевский, 1998).

Существует также ряд работ, показывающий зависимость уровня токсичности сим-триазиновых гербицидов в почве от содержания в ней органического вещества почв (Rahman, 1976; McCarthy et al., 1979; Сосновая и др., 1983; Захаренко, 1990). Эффект снятия ингибирующего действия симазина при непосредственном внесении гумата натрия в среду выращивания поврежденных гербицидом растений был отмечен Куликом и Горовой (1980). Сухой вес корней растений ячменя в варианте с внесением гумата натрия и симазина составил 87% от контроля, тогда как внесение симазина приводило к 50% угнетению растений. Теми же авторами было показано, что внесение гумата натрия в почвенную среду, загрязненную симазином, привело не только к полному снятию токсичности гербицида по отношению к растениям гороха, но и к значительной стимуляции роста культуры. Сухой вес корней растений гороха в варианте с внесением симазина составил 86, а с внесением симазина и гумата натрия - 166% от контроля.

Приходько и др. (1980) исследовали возможность применения гуминовых и минеральных удобрений для снижения токсического действия и последствия атразина в почве по отношению к культурам овса, ячменя и кукурузы. Результаты проведенных экспериментов показали эффективность предлагаемых авторами способов очистки почвы (табл. 1.10)

Как видно из табл. 1.10, гумофос оказался более эффективным детоксикантом атразина, чем минеральные удобрения. Высота и сухой вес надземной биомассы растений овса при его внесении превысили как показатели варианта с внесением атразина, так и контрольные. Авторы отмечают, что даже в случаях, когда внесение гуминовых удобрений не изменяло величину урожая (ячмень), поступление остаточных количеств гербицида в растения было значительно ниже, чем в вариантах без удобрений. Например, в варианте с гумофосом в листьях ячменя было обнаружено 595 мкг/кг остаточного количества атразина, а в варианте без удобрений - 3533 мкг/кг сухого вещества.

Таблица 1.10

Влияние гумофоса и его минерального эквивалента
на рост культуры овса (1-ый год последствий)
(Приходько и др., 1980)

Варианты опыта	Высота растений, см	Сухой вес, г на сосуд	
		надземной массы	корней
Почва (контроль)	26,3	0,212	0,142
Почва+атразин	20,7	0,049	0,013
Почва+атразин+гумофос 20 т/га	27,4	0,228	0,100
Почва+атразин+минеральный эквивалент к 20 т/га гумофоса	25,9	0,215	0,089

Результаты полевых опытов Булгаковой и Приходько (1983) показали эффективность применения гуминовых удобрений и предварительной обработки семян 2,5% раствором гумата натрия для снижения последствий атразина при выращивании ячменя. Внесение в почву гуминовых удобрений (гумофоса) нормализовало рост ячменя почти до уровня контроля, а совместное применение предварительной обработки семян гуматом натрия с последующим внесением гумофоса привело не только к снятию токсического действия гербицида, но и превышению урожая контрольных вариантов.

Детоксицирующие свойства гуминовых удобрений по отношению к атразину были продемонстрированы также и с помощью лабораторных опытов (Приходько и др., 1980). Результаты показали, что добавление в среду гумата натрия нивелировало отрицательное действие атразина на растения ячменя и кукурузы и значительно уменьшало поступление гербицида в ткани проростков культур (табл. 1.11).

Женевини и др. (Genevini et al., 1994) установили, что токсичность атразина по отношению к растениям огурцов снижается при внесении ГК угля. Внесение ГК совместно с гербицидом привело к увеличению времени жизни растений и полному восстановлению их фотосинтетической активности.

Таблица 1.11

Влияние гумата натрия на накопление вегетативной массы и содержание в ней атразина растениями ячменя и кукурузы
(Приходько и др., 1980)

Вариант	Вегетативная масса, г		Количество атразина, мкг/кг	
	надземная масса	корни	надземная масса	корни
Ячмень				
Вода	2,70	1,55	0	0
Вода+атразин	1,70	1,40	3,67	27,9
Вода+атразин+гумат натрия	3,17	1,51	2,12	15,0
Кукуруза				
Вода	4,33	4,24	0	0
Вода+атразин	4,31	3,75	0,66	16,5
Вода+атразин+гумат натрия	4,44	4,60	0,44	7,0

Примечание. Концентрация атразина 10 мг/л; гумата натрия - 0,005%.

В качестве непосредственной причины наблюдаемого снижения эффективности действия ТМ, ПАУ и пестицидов в присутствии гумусовых кислот большинством авторов высказывается гипотеза о связывании токсикантов гумусовыми кислотами (Khan, 1978; Giesy et al., 1983; Vymazal, 1984; Landrum et al., 1985; McCarthy and Jimenez, 1985; Линник и Набиванец, 1986; Oris et al., 1990). В настоящее время общепринятым является положение о недоступности комплекса токсикант-гумусовые кислоты, что объясняется невозможностью проникновения в живые организмы молекул столь большого размера. Данное предположение подтверждается работами по снижению биоаккумуляции ПАУ водными организмами в присутствии гумусовых кислот (McCarthy and Bartell, 1988; Servos et al., 1989; Landrum et al., 1985). Авторами была продемонстрирована прямая взаимосвязь между реакционной способностью гумусовых кислот по отношению к исследованным ПАУ и их детоксицирующей способностью. Аналогичные эффекты также зарегистрированы для ТМ (Bender et al., 1970, Gachrer et al., 1979).

Однако положение о недоступности комплекса гумусовые кислоты-токсикант в последнее время стало подвергаться сомнению. Рядом исследователей было установлено, что гумусовые кислоты, по крайней мере их фракция с ММ меньше 500 Да, могут проникать через биологические мембраны (Логинов и Комиссаров, 1971; Dell'Agnola and Nardi, 1986). Это свидетельствует о возможности поступления связанного с гумусовыми кислотами токсиканта в организмы. В частности, Сюняев (1984) указывает на симазин в составе

растительных остатков и гумуса как возможную причину последствий симазина, то есть связанный симазин сохраняет свою токсичность. Соколов и Галиулин (1987) также считают, что образование комплекса пестицид-гумус приводит к увеличению персистентности и сохранению токсических свойств препарата. Кузнецова с соавторами (1987) установили возможность трансформации гумат-симазинового комплекса в культуре почвенных актиномицетов. Анализ ИК-спектров поглощения препаратов до и после взаимодействия с микроорганизмами показал, что ни симазин, ни гуминовые кислоты, ни гумат-симазиновый комплекс в первоначальном виде не обнаруживаются. Круглов (1991) также приводит данные о сохранении фитотоксичности некоторых гербицидов в составе гумуса. В работе Стюарта (Stewart, 1984) показано увеличение токсичности о-крезола, 2,4-динитрофенола и 2,3,6-тринитрофенола в присутствии низкомолекулярных водорастворимых гумусовых кислот (при этом использовались ФК из дерново-подзолистой почвы). Однако в целом, несмотря на вышеприведенные данные, можно утверждать, что связывание гумусовых кислот с токсикантами обычно приводит к снижению эффективности последних.

Тем не менее, до сих пор остается нерешенным вопрос о природе детоксицирующего действия гумусовых кислот в случаях, когда значительного взаимодействия гумусовых кислот с токсикантом не происходит. Христовой (1973) была высказана гипотеза, что "физиологически активные гуминовые кислоты повышают сопротивляемость растений не к каким-то определенным факторам внешней среды, а поднимают их общую резистентность. Или другими словами - физиологически активные гуминовые вещества повышают общую неспецифическую сопротивляемость организма". Основой такого представления послужили экспериментальные данные о том, что стимулирующее действие гуминовых веществ на жизнедеятельность растений эффективнее проявляется в экстремальных условиях. В дальнейшем были опубликованы многочисленные работы, подтверждающие эту гипотезу (Христева и др., 1974; Христева, 1977; Ткаченко и др., 1977). Разрабатывая свою гипотезу, Христева (1973) отмечает, что действие гумусовых кислот должно быть направлено на нормализацию и стимуляцию тех же ведущих процессов метаболизма, которые тормозятся или блокируются ингибирующими факторами среды. На основании многочисленных

экспериментов Л.А. Христева приходит к выводу, что под воздействием гумусовых кислот растительный организм приобретает повышенную способность к репарационным процессам на уровне клетки, чем и объясняется повышение неспецифической резистентности растений в целом. Известно, что угнетение роста растений в целом (торможение белкового синтеза, увеличение концентрации фитогормонов ингибирующего характера, подавление деления и растяжения клеток) является следствием первичных нарушений при стрессе, среди которых одним из важнейших является изменения в биоэнергетических процессах (Удовенко, 1979). Основываясь на способности гуминовых веществ участвовать в окислительно-восстановительных реакциях (Бобырь и Епишина, 1975; Епишина и Бобырь, 1979), Бобырь (1980) высказал предположение, что гуминовые вещества, шунтируя различные участки цепи переноса электронов в электрон-транспортных цепях хлоропластов или митохондрий, могут оказывать влияние на биоэнергетические процессы. Так как окислительно-восстановительный потенциал гуминовых веществ изменяется при изменении рН среды, они могут включаться в транспорт электронов на различных участках цепи. При блокировании (в условиях экстремальных воздействий) различных участков электрон-транспортной цепи гуминовые вещества их шунтируют и в какой-то мере снимают вызванное экстремальным воздействием ингибирование энергетических процессов.

Таким образом, процесс детоксикации гумусовыми кислотами обусловлен по крайней мере двумя причинами: непосредственное связывание токсиканта и повышение общей сопротивляемости организмов в присутствии гумусовых кислот. Опосредованное влияние гумусовых кислот на процесс детоксикации может проявляться в ускорении разложения органических экотоксикантов. Для грамотного и наиболее эффективного использования препаратов гуминовой природы в качестве детоксикантов необходимо детальное исследование природы детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к конкретному экотоксиканту.

В связи с этим целью данной работы было комплексное исследование влияния гумусовых кислот на поведение атразина в системе почва-растение, включающее в себя химические и токсикологические аспекты наблюдаемых

эффектов, а также установление природы детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. ОТБОР И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ

Для выделения препаратов гумусовых кислот и проведения токсикологических экспериментов были использованы три дерново-подзолистые почвы, расположенные на участках с различной степенью окультуренности территории УОПЭЦ "Чашниково": целинном под лесом ($\text{П}_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$), пахотном ($\text{П}_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$) и огородном ($\text{П}_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$). Индивидуальные пробы (каждая проба составляла около 20 кг) отбирали с почвенного участка площадью примерно 10 м² из верхнего гумусированного горизонта на глубине 0-5 см. В целинном варианте $\text{П}_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ предварительно удаляли слой подстилки. Отобранные образцы почвы сушили до воздушно-сухого состояния и затем просеивали через сито с диаметром ячеек 1 мм. Из подготовленной таким образом почвы составляли средний образец, который использовали для биотестирования, химических анализов и выделения препаратов гумусовых кислот.

В отобранных почвенных образцах были определены $\text{pH}_{\text{водн}}$, $\text{pH}_{\text{сол}}$, гидролитическая кислотность по Каппену, сумма обменных оснований по Каппену-Гильковицу, содержание подвижного алюминия по Соколову и содержание свободного кальция методом пламенной фотометрии (Аринушкина, 1970). Общее содержание органического углерода было определено по методу Тюрина (Орлов и Гришина, 1981) и методом органического полумикроанализа на элементном анализаторе модели 1106 фирмы Carlo Erba Strumentazione (Италия) в лаборатории микроанализа Химического факультета МГУ.

2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Из каждого образца почвы ($\text{П}_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$, $\text{П}_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$, $\text{П}_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$) были выделены препараты ГК, ФК и суммы ГК и ФК водного экстракта. Из двух образцов торфов (низинный древесный и верховой сосново-пушицевый) были получены препараты нефракционированных гумусовых кислот (сумма ГК и ФК) и водорастворимого органического вещества.

Выделение препаратов ГК и ФК из отобранных почвенных образцов проводили согласно Орлову и Гришиной (1981). Предварительная пробоподготовка включала в себя отбор средней пробы, отделение корней и просеивание почвенного образца через сито с диаметром отверстий 1 мм.

Выделение препаратов суммы ГК и ФК из образцов торфа проводили согласно общепринятой методике (Lowe, 1992). Предварительная пробоподготовка включала в себя отбор средней пробы и просеивание образца через сито с диаметром отверстий 2 мм.

Выделение гуминовых кислот почв. К предварительно подготовленной почвенной пробе массой 500 г приливали 4 л 0,1 М NaOH. После перемешивания и отстаивания суспензии темноокрашенный раствор, содержащий гуматы и фульваты натрия, сливали в приемную бутылку. Обработку почвы щелочью проводили до заметного осветления щелочного экстракта (3-4 раза). В полученный раствор добавляли NaCl (устанавливая концентрацию 0,8 М) для коагуляции минеральных примесей. После отстаивания раствор подвергли центрифугированию для отделения минеральных коллоидов. Отцентрифугированную жидкость собирали в приемную бутылку. Для осаждения гуминовых кислот к жидкости при осторожном перемешивании добавляли 10%-ную серную кислоту из расчета 20-25 мл на литр экстракта до появления первых признаков коагуляции (значение рН устанавливали в пределах 1-2). После отстаивания осадка гуминовых кислот надосадочную жидкость (содержащую ФК) осторожно сливали в бутылку, а аморфный рыхлый осадок центрифугировали (с промыванием дистиллированной водой в центрифужных стаканах) для полного отделения от надосадочной жидкости. Очистку осажденных ГК проводили с помощью электродиализа.

Выделение почвенных фульвокислот проводили путем подкисления собранной надосадочной жидкости 0,1 М раствором соляной кислоты с последующей сорбцией на смоле Amberlite XAD-2. Скорость пропускания подкисленной надосадочной жидкости через стеклянную колонку (60×1,7 см), заполненную смолой, составляла приблизительно 1 мл/мин. Элюирование сорбированных ФК проводили 0,1 М раствором NaOH. Обессоливание полученного щелочного раствора ФК проводили на катионообменнике КУ-2-8, предварительно переведенном в Н-форму пропусканием 30-ти объемов 1 М HCl.

Выделение суммы гуминовых и фульвокислот водного экстракта почв.

Навеску (1 кг) воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с размером ячеек 1 мм, заливали двумя литрами дистиллированной воды, 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. Процедуру проводили для 10 кг каждой из использованных почв. Отфильтрованные вытяжки объединяли, подкисляли до рН 1-2 с помощью 0,1 М HCl и пропускали через стеклянную колонку, заполненную смолой XAD-2, для осаждения ФК. Процедуры элюирования препарата водорастворимых ФК с колонки и последующего обессоливания были аналогичны описанным для выделения ФК.

Выделение гумусовых кислот торфов. Навеску воздушно-сухого торфа 50 г дважды обрабатывали в течение часа при взбалтывании 250 мл смеси бензол-этанол (1:1) для удаления битумов. Экстракт отделяли фильтрованием, а обработанную навеску высушивали на воздухе в течение приблизительно двух недель (до отсутствия запаха бензола). Экстракцию гумусовых кислот из торфа проводили трехкратной обработкой 0,1 М раствором NaOH: к обработанной бензол-этанольной смесью навеске приливали по 1 л щелочи, взбалтывали и оставляли на ночь. Полученный экстракт гумусовых кислот отфильтровывали через фильтр "синяя лента" и обессоливали на катионообменнике КУ-2-8. Для получения более концентрированного раствора гумусовых кислот после прохождения через катионообменник собирали лишь первые, наиболее концентрированные порции.

Выделение водорастворимого органического вещества торфов. 100 г воздушно-сухого торфа, просеянного через сито 2-мм, заливали тремя литрами дистиллированной воды 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-2-8, предварительно переведенном в Н-форму пропусканием 30-ти объемов 1 М HCl. Обессоленный экстракт концентрировали на ротормном испарителе при 600°C.

Выделение всех препаратов в твердом виде (ГК и ФК почв, сумма ГК и ФК торфов, сумма ГК и ФК водных экстрактов почв, водорастворимое органическое вещество торфов) осуществляли методом лиофильной сушки.

Помимо описанных выше двенадцати препаратов гумусовых кислот, выделенных автором самостоятельно из трех образцов почв и двух образцов торфов, в работе было использовано еще 22 препарата гумусовых кислот различного происхождения (почвы, торфа, угли и поверхностные воды), любезно предоставленных научной группой И.В. Перминовой (Химический факультет МГУ) и Г.У. Бальке (UFZ, Германия). Полный список исследованных препаратов гумусовых кислот и их химические характеристики приведены в табл. 3.2.

2.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

2.3.1. Элементный анализ

C,H,N-анализ был выполнен на элементном анализаторе модели 1106 фирмы Carlo Erba Strumentazione (Италия) в лаборатории микроанализа Химического факультета МГУ. Содержание кислорода рассчитывали по разности между массой беззольной навески и суммарным содержанием C, H, N.

Зольность выделенных препаратов гумусовых кислот была определена в лаборатории микроанализа кафедры органической химии Химического факультета МГУ методом сжигания в кварцевых трубках в атмосфере кислорода при температуре 750°C в течение 40 мин.

Состав золы определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с атомизацией образца в индукционно-связанной плазме (АЭС ИСП). Определение элементов (Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Si, Ti, Zn) проводили в обессоленных растворах гумусовых кислот, использованных для получения твердых препаратов или в растворах, приготовленных путем растворения навески гумусовых кислот в 0,1 М КОН. Результаты анализов приведены в Приложении 1.

2.3.2. Методика ^{13}C ЯМР спектроскопического анализа

^{13}C ЯМР спектры гумусовых кислот регистрировали на спектрометре VXR-400. Образцы готовили растворением навески (100 мг) в 3 мл NaOD/D₂O. Пропорциональность спектральных интенсивностей сигналов атомов углерода различных типов их реальным содержаниям в образце обеспечивалась использованием времени задержки 4 с, достаточного для релаксации всех типов атомов углерода. Влияние ядерного эффекта Оверхаузера устраняли с помощью импульсной последовательности INVGATE (генератор развязки от протонов включен при считывании сигнала и выключен на период релаксационной задержки) (Ковалевский, 1998). Содержание углерода (C) различных типов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м. д.): 220-187 - кетонных и хинонных групп ($\text{C}_{\text{C=O}}$); 187-165 - карбоксильных и сложноэфирных групп ($\text{C}_{\text{COO-H,R}}$); 165-145 - O-замещенных ароматических фрагментов ($\text{C}_{\text{Ar-O}}$), 145-108 - незамещенных и C-замещенных ароматических фрагментов ($\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$); 108-90 - ацетальных фрагментов ($\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$); 90-48 - O-замещенных алифатических фрагментов ($\text{C}_{\text{Alk-O}}$); 48-5 - алифатических фрагментов, не связанных с гетероатомами (C_{Alk}).

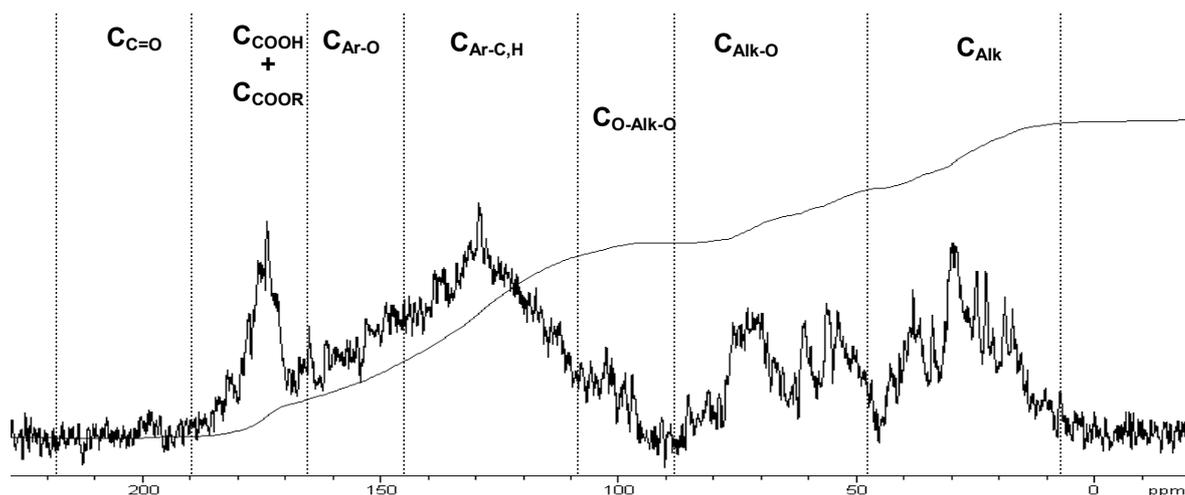


Рис. 2.1. Типичный ^{13}C ЯМР спектр ГК почв с указанием использованных в работе диапазонов спектральных областей соответствующих различным типам атомов углерода.

На основании полученных данных рассчитывали общее содержание алифатических ($\Sigma\text{C}_{\text{Alk}} = \text{C}_{\text{O-Alk-O}} + \text{C}_{\text{Alk-O}} + \text{C}_{\text{Alk-H,R}}$) и ароматических

($\Sigma C_{Ar} = C_{Ar-O} + C_{Ar-H,R}$) фрагментов. Кроме этого, было вычислено также отношение $\Sigma C_{Ar} / \Sigma C_{Alk}$, характеризующее степень ароматичности гумусовых кислот. Типичный ^{13}C ЯМР спектр гумусовых кислот с указанием спектральных областей, относящихся к углероду различных типов, приведен на рис 2.1.

2.3.3. Методика гель-хроматографического определения молекулярных масс

Анализы по определению молекулярных масс гумусовых кислот методом гель-хроматографии выполнялись на кафедре водной химии Университета Карлсруэ (ФРГ) согласно (Perminova et al., 1998). Экспериментальные условия определения: фракционирующий гель - *TOYOPEARL-50HW(S)* (Япония), размеры колонки: диаметр - 20 мм, высота - 25 см. Пробу гумусовых кислот растворяли в 0,028 М фосфатном буфере (pH 6,8), который использовали в качестве подвижной фазы при проведении фракционирования. Концентрация гумусовых кислот во фракционируемых пробах не превышала 2 мг органического углерода (OC)/л. Объем инжестируемой пробы - 2 мл. Скорость элюирования - 1 мл/мин. Регистрацию гумусовых кислот на выходе из колонки проводили с использованием двух последовательно соединенных детекторов: УФ и проточного DOC-детектора (Graentzel, Германия).

Типичная гель-хроматограмма препарата гумусовых кислот приведена на рис. 2.2. На хроматограмме указаны основные параметры используемой хроматографической системы - V_0 (свободный, или мертвый объем колонки) и V_t (общий объем колонки), которые составляли 26,0 и 66,8 мл, соответственно. Определение молекулярных масс проводили по калибровочному графику. В качестве калибровочных веществ использовали полидекстраны (молекулярная масса, Да: 830, 4400, 9900, 21400, 43500, 200000), олигосахариды (342, 504), глюкозу (180), глицерин (92) и метанол (37). Калибровочный график приведен на рис. 2.3.

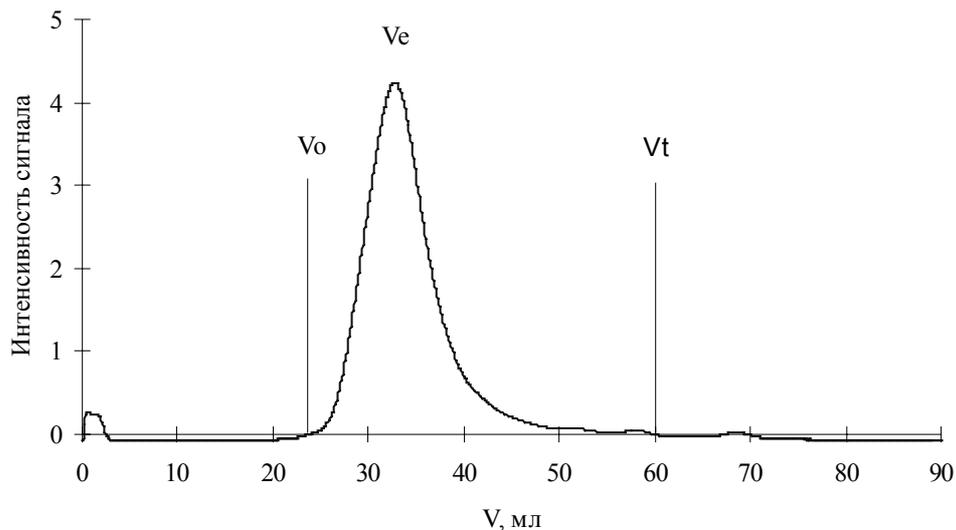


Рис. 2.2. Типичная гель-хроматограмма препарата гумусовых кислот. $V_0 = 26,0$ мл (свободный объем колонки), $V_t = 66,8$ мл (общий объем), V_e - объем элюирования фракционируемой пробы.

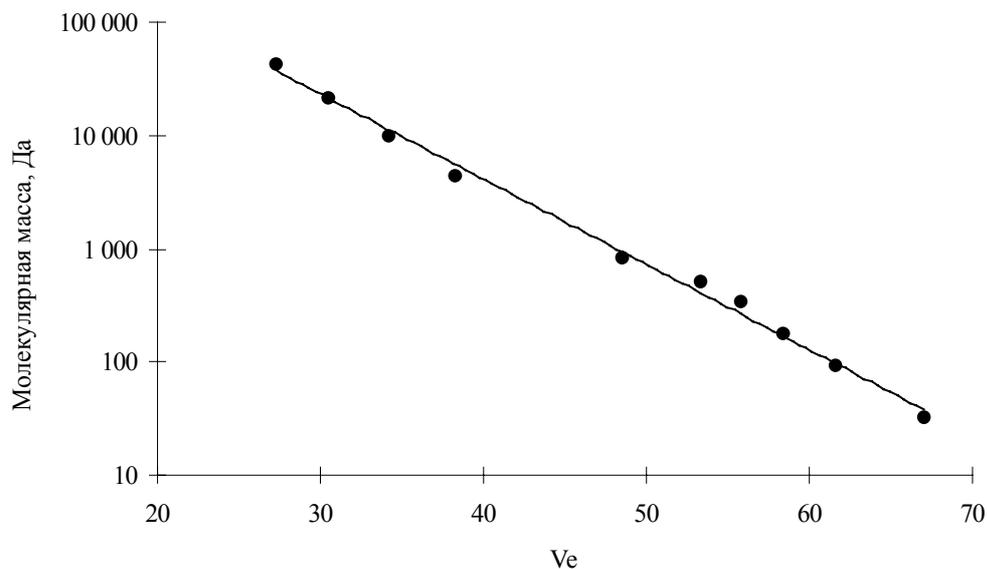


Рис. 2.3. Калибровочный график гель-хроматографической колонки *TOYOPEARL HW-50S*.

Обработка полученных гель-хроматографических данных проводилась автором самостоятельно с использованием оригинальной компьютерной программы GelTreat (автор - Кудрявцев А.В., Химфак МГУ). Данная программа позволяет проводить предварительную обработку получаемых гель-хроматограмм (коррекцию базовой линии, сглаживание) и рассчитывать на их основе важнейшие характеристики ММР: M_n , M_w , M_z , M_w/M_z и др.

2.3.4. Методика потенциометрического определения кислотных групп

Определение кислотных групп в выделенных препаратах гумусовых кислот проводили методом потенциометрического титрования в соответствии с (Georgi, 1998). Навеску препарата массой 5 мг растворяли в 4 мл 0,1 М NaOH и добавляли 2 мл дистиллированной воды. После полного растворения пробы к раствору приливали 5 мл 0,1 М HCl. Полученный раствор гумусовых кислот (pH≈2,6) титровали на автотитраторе TitroLine Alpha (Schott, Германия) раствором 0,1 М NaOH до pH 11, раствор щелочи прибавляли порциями по 0,006 мл. Параллельно проводили титрование смеси 4 мл 0,1 М NaOH + 2 мл дистиллированной воды + 5 мл 0,1 М HCl. По разнице кривых титрования гумусовых кислот в смеси соляной кислоты и гидроксида натрия и кривой титрования смеси соляной кислоты и гидроксида натрия определяли кривую титрования собственно гумусовых кислот. При расчете предполагали, что карбоксильные группы титруются в диапазоне pH от 3 до 7,5, а фенольные гидроксилы - от 7,5 до 10,3. Типичная кривая титрования приведена на рис. 2.4.

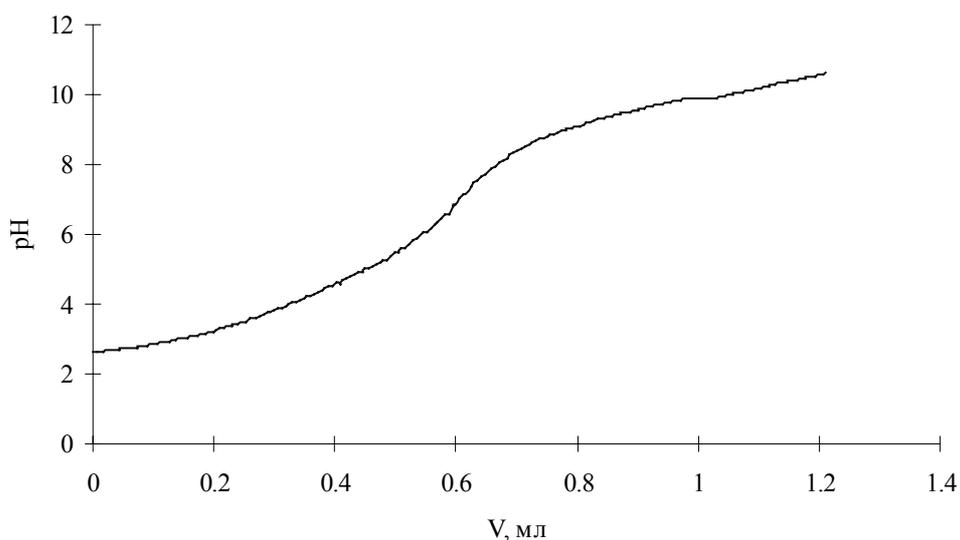


Рис. 2.4. Типичная кривая титрования гумусовых кислот.

2.4. МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ АДСОРБЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ КАОЛИНИТ-ГУМУСОВЫЕ КИСЛОТЫ

Подготовка каолинита. Для получения адсорбционных комплексов использовали каолинит Kaolin CF 70 ($d < 2$ мкм) (Caminauer Kaolinwerk GmbH, ФРГ), предварительно насыщенный натрием. Для насыщения каолинита натрием к навеске минерала массой 1 г прибавляли 20 мл 0,1 М раствора хлорида натрия с рН 5,6. Требуемое значение рН устанавливали с помощью стандартных растворов соляной кислоты или гидроксида натрия. Полученную суспензию встряхивали в течение 12 часов, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин и производили смену раствора на свежий. Процедуру повторяли трижды.

Проведение сорбции гумусовых кислот на каолините. К полученному как описано выше насыщенному натрием каолиниту (Na-каолинит) прибавляли 20 мл раствора гумусовых кислот в 0,1 М NaCl с концентрациями от 5, 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мг/л (рН 5,6) и встряхивали 12 часов. Затем суспензию центрифугировали и измеряли оптическую плотность супернатанта при 240 нм. Полученные значения использовали для определения концентрации гумусовых кислот по предварительно построенным для каждого препарата калибровочным кривым. По разнице концентрации гумусовых кислот в растворе до и после встряхивания с каолинитом рассчитывали количество адсорбированного на каолините углерода. Повторность трехкратная.

Проведение десорбции слабосвязанных гумусовых кислот. Для удаления слабосвязанных гумусовых кислот из состава полученных адсорбционных комплексов навеску комплекса 1 г, приготовленного в условиях 1 г каолинита + 20 мл раствора гумусовых кислот в концентрации 200 мг/л, многократно обрабатывали 20 мл 0,1 М раствора NaCl (рН 5,6), встряхивая каждый раз суспензию в течение 12 часов. После каждой обработки измеряли оптическую плотность супернатанта при 240 нм и определяли содержание гумусовых кислот. Процедуру повторяли до установления постоянной концентрации гумусовых кислот в супернатанте. Для этого, как правило, требовалось не менее восьми обработок. Эксперимент проводили в 3-кратной повторности.

Полученные комплексы каолинита с прочносвязанными гумусовыми кислотами лиофильно высушивали, отбирали навеску для анализа на содержание органического углерода и использовали для проведения экспериментов по взаимодействию атразина с адсорбированными гумусовыми кислотами. Анализ на содержание органического углерода проводили методом отжига в токе кислорода на приборе C-mat 5500 (Ströhlein Instruments, ГДР). Условия отжига: $t=900^{\circ}\text{C}$, время сжигания 5 мин, навеска 20 - 40 мг. Повторность трехкратная.

Данные, полученные при проведении сорбционных и десорбционных экспериментов, использовали для построения соответствующих изотерм адсорбции и десорбции гумусовых кислот на каолините.

2.5. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ АТРАЗИНА ГУМУСОВЫМИ КИСЛОТАМИ

2.5.1. Методика определения связывающей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием ультрафильтрации

В работе использовали атразин квалификации "осч" (99,97%) (Dr. Ehrendorf Ltd, США). Рабочий раствор атразина с концентрацией 10 мг/л готовили в дистиллированной воде. Полученный раствор хранили в темноте при 4°C .

Техника проведения экспериментов по взаимодействию атразина с растворенными гумусовыми кислотами была следующей. К свежеприготовленному раствору гумусовых кислот приливали раствор атразина. Концентрация атразина составляла 2 мг/л; концентрации гумусовых кислот 0,5; 0,8; 1,0; 1,3 и 1,5 г/л. рН растворов 5,5. Полученный раствор оставляли на 24 часа при постоянном перемешивании магнитной мешалкой, после чего подвергали его ультрафильтрации. В ультрафильтрате определяли содержание атразина методом ВЭЖХ. По разнице в концентрации начального раствора и обнаруженной в фильтрате рассчитывали количество связанного атразина.

Для проведения ультрафильтрации были использованы мембранные фильтры УМ-1 фирмы Amicon (США) с пределом проницаемости < 1000 Да.

Перед использованием фильтры замачивали в дистиллированной воде не менее, чем на 3 часа. В ячейку для ультрафильтрации переносили приблизительно 10 мл раствора атразина с гумусовыми кислотами. Первые 5 мл фильтрата отбрасывали, а последующие 2 мл собирали для анализа на содержание атразина методом ВЭЖХ. Ультрафильтрацию проводили при давлении 4,6 атм.

Методика ВЭЖХ-определения атразина. Определение атразина осуществляли методом ВЭЖХ с использованием хроматографа System Gold™ Model 126 (Beckman, США), снабженного ультрафиолетовым детектором на основе диодной матрицы. Хроматографическая колонка Ultrasphere ODS (Beckman, США) имела размеры 4,6 мм×15 см. В качестве элюента использовали смесь вода:ацетонитрил 50:50 (по объему), содержащую $3,18 \times 10^{-3}$ М HCl (pH 2,50); скорость элюирования - 1 мл/мин, режим элюирования - изократический. Регистрацию оптической плотности на выходе из колонки проводили при 220 нм.

2.5.2. Техника экспериментов по определению связывающей способности адсорбционных комплексов гумусовых кислот по отношению к атразину

К навеске минералорганического комплекса (500 мг) прибавляли 10 мл раствора атразина в 0,1 М NaCl с концентрациями 0,5; 1,0; 3,0 и 5,0 мг/л. Полученную суспензию встряхивали в течение 24 часов и затем центрифугировали в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. Концентрацию атразина в супернатанте определяли методом ВЭЖХ по описанной выше методике. Количество адсорбированного атразина рассчитывали по разнице начальной и конечной концентраций атразина в растворе. Повторность трехкратная. По полученным данным были построены изотермы адсорбции атразина на минералорганическом комплексе каолинит-гумусовые кислоты.

Для построения изотерм десорбции атразина к полученному комплексу атразин-гумусовые кислоты-каолинит (использовали вариант с максимальной начальной концентрацией атразина 5,0 мг/л) приливали 10 мл 0,1 М раствора NaCl. Затем суспензию встряхивали и центрифугировали как уже было описано ранее. В супернатанте определяли содержание атразина. Процедуру повторяли трижды. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

2.6. ПОСТАНОВКА ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

2.6.1. Постановка лабораторно-вегетационных экспериментов

Для исследования детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину в почвенных условиях проводили серию вегетационных экспериментов на трех дерново-подзолистых почвах различного сельскохозяйственного использования.

Установление диапазонов токсичности атразина на дерново-подзолистых почвах. Опыт проводили в вегетационных сосудах. В сосуд помещали 150 г почвы, в которую при тщательном перемешивании вносили водный раствор гербицида для создания в почве концентраций 0,25; 0,50; 1,00 и 2,00 мг/кг. В сосуды помещали пророщенные семена мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт “Московская-35”) в количестве 10 семян на сосуд. Продолжительность выращивания растений составляла 30 дней, освещение - дневное. В качестве тест-отклика использовали среднюю надземную сырую биомассу 1 растения. Схема опыта была следующая:

Вариант 1 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ контроль (без гербицида)

Вариант 2 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин (0,25 мг/кг)

Вариант 3 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин (0,50 мг/кг)

Вариант 4 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин (1,00 мг/кг)

Вариант 5 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин (2,00 мг/кг)

Вариант 6 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ контроль (без гербицида)

Вариант 7 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин (0,25 мг/кг)

Вариант 8 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин (0,50 мг/кг)

Вариант 9 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин (1,00 мг/кг)

Вариант 10 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин (2,00 мг/кг)

Вариант 11 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ контроль (без гербицида)

Вариант 12 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин (0,25 мг/кг)

Вариант 13 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин (0,50 мг/кг)

Вариант 14 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин (1,00 мг/кг)

Вариант 15 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин (2,00 мг/кг)

Повторность опыта трехкратная.

По результатам опыта была выбрана рабочая концентрация атразина, которая составила 1 мг/кг почвы.

Исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот в почвенной среде. Для исследования детоксицирующей способности гумусовых кислот в почвенной среде был выбран коммерческий препарат активированной гуминовой кислоты (АГК) АО"Спецбиотех" (Москва), полученной из бурого угля. Характеристики препарата АГК приведены в табл. 3.2

Опыты проводили в вегетационных сосудах, в которые помещали по 150 г почвы, куда при тщательном перемешивании последовательно вносили водный раствор гербицида и препарата АГК. Концентрация атразина составила 1 мг/кг, препарата АГК 35, 70 и 105 мг/кг почвы. Дальнейшая техника проведения эксперимента была аналогична опытам по установлению диапазонов токсичности атразина. Схема опыта была следующей:

Вариант 1 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ контроль (без гербицида и АГК)

Вариант 2 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин

Вариант 3 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + АГК (35 мг/кг)

Вариант 4 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (35 мг/кг)

Вариант 5 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + АГК (70 мг/кг)

Вариант 6 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (70 мг/кг)

Вариант 7 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + АГК (105 мг/кг)

Вариант 8 $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (105 мг/кг)

Вариант 9 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ контроль (без гербицида и АГК)

Вариант 10 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин

Вариант 11 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + АГК (35 мг/кг)

Вариант 12 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (35 мг/кг)

Вариант 13 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + АГК (70 мг/кг)

Вариант 14 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (70 мг/кг)

Вариант 15 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + АГК (105 мг/кг)

Вариант 16 $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (105 мг/кг)

Вариант 17 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ контроль (без гербицида и АГК)

Вариант 18 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин

Вариант 19 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + АГК (35 мг/кг)

Вариант 20 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (35 мг/кг)

Вариант 21 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + АГК (70 мг/кг)

Вариант 22 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (70 мг/кг)

Вариант 23 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + АГК (105 мг/кг)

Вариант 24 $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ + атразин + АГК (105 мг/кг)

Повторность опыта трехкратная.

2.6.2. Проведение токсикологических экспериментов в водных средах

В связи с тем, что атразин является специфическим ингибитором фотосинтеза, в ряде экспериментов регистрацию его токсичности проводили с использованием биофизических методов, основанных на измерении флуоресценции хлорофилла. Так как флуоресценция хлорофилла характеризует эффективность протекания фотосинтеза в растительных организмах, а именно процессы переноса электрона в электронтранспортной цепи фотосинтеза, то прежде всего необходимо остановиться их описании.

Процессы переноса электронов в первичных реакциях фотосинтеза.

Фотосинтез - образование зелеными растениями органических веществ с использованием солнечного света - происходит при участии хлорофиллов. В основе фотосинтеза лежит окислительно-восстановительные реакции, в которых электроны переносятся от донора (H_2O) к акцептору (CO_2) с образованием восстановленных соединений (углеводов) и кислорода (Гольдфельд, 1998). Процесс фотосинтеза пространственно и во времени разделяется на две обособленные стадии: световую стадию окисления воды и темновую стадию восстановления CO_2 . Обе эти стадии осуществляются в специализированных органеллах клетки - хлоропластах. Хлоропласт представляет собой замкнутую структуру, отделенную от остальной части клетки оболочкой. Световая стадия реализуется в мембранных структурах хлоропластов - тилакоидах, тогда как темновая стадия происходит в жидком содержимом хлоропластов (строме).

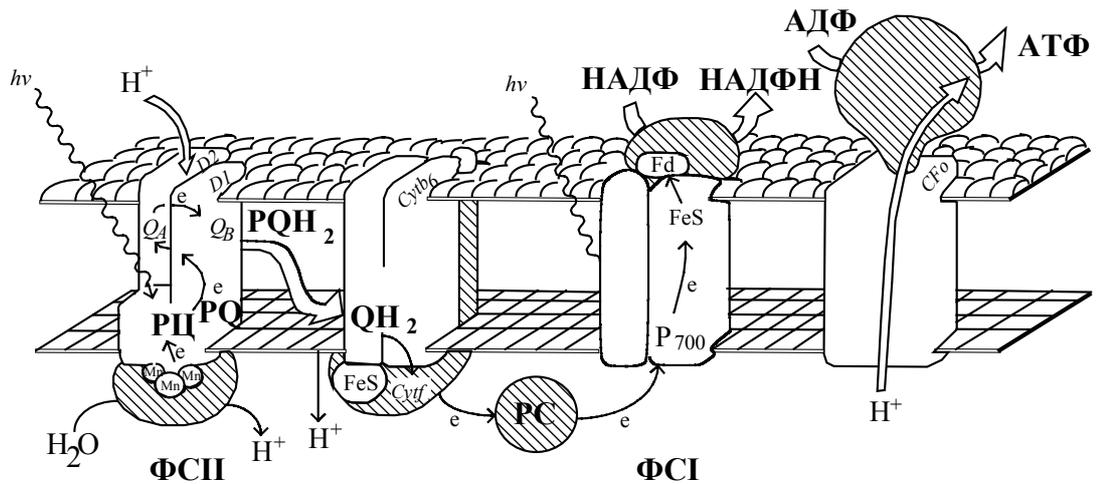
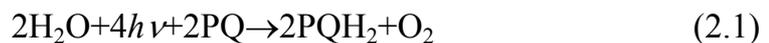


Рис. 2.5. Схема электронтранспортной цепи фотосинтеза (по Draber et al., 1991).

Тилакоид представляет собой микроскопический плоский диск, образованный мембраной, содержащей пигменты. В эти мембраны встроены все компоненты, необходимые для окисления воды, восстановления НАДФ до НАДФН и синтеза АТФ из АДФ. Световая стадия инициируется поглощением кванта света пигментами, организованными в специальные светособирающие комплексы. Среди пигментов преобладает хлорофилл *a*. К вспомогательным пигментам относятся хлорофилл *b*, каротиноиды и др. От светособирающего комплекса возбуждение от молекулы, поглотившей квант, переносится на фотохимически активный центр (реакционный центр, РЦ). В РЦ происходит первичная реакция между фотохимически активной молекулой хлорофилла *a* (первичный донор) и первичным акцептором электрона. Дальнейшие реакции в тилакоидных мембранах происходят между молекулами в их основных состояниях и не требуют возбуждения светом. Эти реакции организованы в электронтранспортную цепь (ЭТЦ) - последовательность фиксированных в мембране переносчиков электрона (рис. 2.5). В ЭТЦ содержится два фотохимических центра (фотосистемы, ФС), действующих последовательно.

В фотосистеме II (ФСII) при возбуждении РЦ происходит разделение зарядов и электрон переходит от хлорофилл *a* в центре Р680 (число 680 обозначает, что максимум спектральных изменений системы при возбуждении светом находится вблизи 680 нм) через промежуточный акцептор к феофитину. Далее феофитин восстанавливает первый пластохинон в ЭТЦ Q_A до семихинона. Семихинон (радикал $Q_A^{\bullet-}$) восстанавливает второй пластохинон Q_B также до семихинона.

После разделения зарядов окисленный Р680 восстанавливается до начального состояния, принимая электрон от Mn-содержащего комплекса, на котором происходит реакция фотолиза воды. Затем происходит следующий цикл возбуждения РЦ, в результате которого Q_B принимает второй электрон и восстанавливается до пластогидрохинона. Далее пластогидрохинон отсоединяется от белка D1 и переходит в пластохиноновый-гидрохиноновый пул, а его место занимает невосстановленный пластохинон Q_B . После следующих двух циклов возбуждения Р680 происходит полное окисление Mn-содержащего комплекса (комплекс включает в себя четыре атома Mn) и разложение двух молекул воды с образованием одной молекулы кислорода. Таким образом, в результате первичной реакции в ФСII происходит образование двух стабильных продуктов - пластогидрохинона и кислорода:



Как видно из рис. 2.5, протоны, образующиеся при разложении воды, поступают во внутреннее пространство тилакоида, в то время как протоны, необходимые для образования гидрохинона поступают из стромы. Вследствие этого на мембране возникает градиент протонов (во внутреннем пространстве тилакоида концентрация протонов увеличивается, в строме - уменьшается).

Пластохинон, образующийся в ходе реакций в ФСII, окисляется комплексом цитохромов *b₆/f*, который является переносчиком электрона через пластоцианин к фотосистеме I (ФСI). При этом протоны, высвобождающиеся при окислении PQH_2 , также поступают во внутреннее пространство тилакоида, увеличивая протонный градиент. Обратный транспорт протонов из тилакоидов в строму сопровождается синтезом АТФ. При освещении ФСI происходит окисление пластоцианина и восстановление НАДФ.

Вследствие избытка энергии возбужденное состояние молекулы хлорофилла *a* оказывается неустойчивым. Энергия кванта быстро растрачивается по нескольким параллельным путям в результате одновременно протекающих и конкурирующих процессов. К ним относятся: флуоресценция, растраты в тепло, тушение энергии при соударении с другими молекулами, переход в триплетное состояние, передача энергии возбуждения (миграция) и фотохимическая реакция (Биофизика фотосинтеза, 1975). С точки зрения механизма фотосинтеза существенны только два последних процесса, которые приводят к запасанию поглощенной энергии. Однако исследование конкурирующих “непроизводительных” путей оказывается чрезвычайно важным источником информации о процессе фотосинтеза. Предполагая, что растраты в тепло, межмолекулярные взаимодействия и фотохимические реакции незначительны, считают, что растрачивание энергии идет тремя путями: флуоресценция, переход в триплетное состояние и миграция. Вероятность потери энергии возбуждения в результате флуоресценции зависит от функциональной активности фотосинтетической мембраны и от активности процессов биосинтеза, использующих продукты световой стадии. Поэтому на основании данных о флуоресценции хлорофилла *a* можно судить о структурно-функциональном состоянии фотосинтетического аппарата клетки и, косвенным образом, о физиологическом состоянии самой клетки.

Потеря энергии возбуждения происходит главным образом в результате излучения квантов света с энергией, соответствующей переходу хлорофилла *a* из первого синглетного состояния в основное. Если такое излучение происходит до того, как возбуждение вызовет разделение зарядов в РЦ, его называют **флуоресценцией**. Если же возбужденное состояние возникает вторично, в результате обращения первичных фотохимических реакций, то говорят о рекомбинационной, или **замедленной флуоресценции** хлорофилла (ЗФ) (Рубин и др., 1987). Сходство спектров возбуждения флуоресценции и ЗФ свидетельствует о том, что в обоих случаях флуоресценция испускается молекулами хлорофилла *a* при переходе из их первого синглетного состояния в основное. Однако необходимо подчеркнуть, что флуоресценция испускается молекулами хлорофилла, возбуждение которых обусловлено энергией света, тогда как ЗФ обусловлена испусканием флуоресценции теми молекулами хлорофилла *a*,

возбуждение которых произошло в результате возвращения молекул на синглетный уровень с триплетного (по существующим данным от 1/4 до 1/2 синглетно-возбужденных молекул могут переходить в триплетное состояние) (Биофизика фотосинтеза, 1975). Поэтому время жизни флуоресценции зависит от времени жизни синглетных молекул и не превышает 10^{-8} секунды. Время жизни триплетно-возбужденных молекул значительно превышает таковое для синглетно-возбужденных, а время жизни ЗФ составляет до десятков секунд. При этом интенсивность ЗФ на 3-4 порядка ниже интенсивности флуоресценции (интенсивность ЗФ составляет около 1% от интенсивности флуоресценции), что позволяет пренебрегать интенсивностью ЗФ при регистрации флуоресценции.

Флуоресценция и ее использование для диагностики состояния тест-объектов при биотестировании. В настоящее время опубликован ряд работ, использующих явление индукции флуоресценции (эффект Каутского) для диагностики изменения состояния фотосинтезирующих организмов под действием сим-триазинов и других токсикантов, ингибирующих процесс фотосинтеза, а также для биотестирования (Brack and Frank, 1998; Salvetat et al., 1998; Trappmann et al., 1998). Индукция флуоресценции возникает при сильном освещении фотосинтезирующего объекта после его предварительного пребывания в темноте или на слабом свете. Общий вид индукционной кривой приведен на рис. 2.6.

Параметр F_0 (минимальная флуоресценция) соответствует флуоресценции, когда все акцепторы (переносчики) электронов в ЭТЦ находятся в окисленном состоянии. В условиях насыщающего освещения флуоресценция 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 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 количество таких центров от общего в долях единицы и варьирует 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 F_v/F_m , где $F_v = F_m - F_0$. У

лабораторной культуры хлореллы в оптимальных условиях F_v/F_m обычно составляет 0,75-0,78. Мертвые клетки характеризуются отношением F_v/F_m , равным нулю.

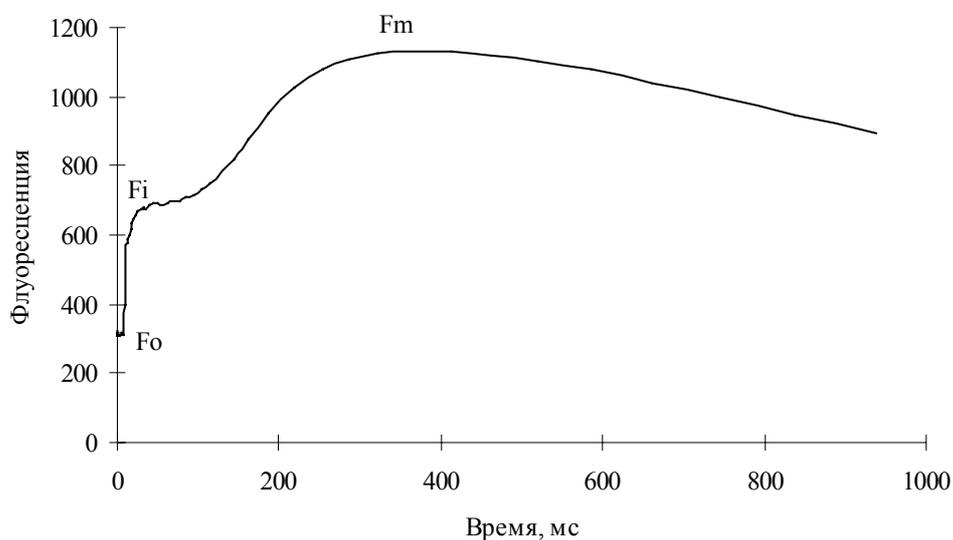


Рис. 2.6. Кривая индукции флуоресценции (эффект Каутского).

F_0 - минимальная флуоресценция, F_i - флуоресценция перегиба, F_m - пиковая флуоресценция.

При внесении в среду ингибиторов фотосинтеза, обладающих специфическим сайтом (для атразина специфическим сайтом является Q_B), происходит блокирование определенных переносчиков электронов в ЭТЦ, что приводит к мгновенному увеличению отношения F_i/F_m , т.е. возрастанию количества акцепторов, которые способны принимать электрон, но не способны его передавать по цепи. Таким образом, увеличение отношения F_i/F_m по сравнению с контролем отражает концентрацию свободного токсиканта в среде. Поэтому данный показатель использовали при проведении токсикологических экспериментов с нулевым временем экспозиции. В отличие от F_i/F_m , снижение показателя F_v/F_m может происходить вследствие присутствия в среде как специфических ингибиторов фотосинтеза, так и токсикантов с другим механизмом действия. Уменьшение F_v/F_m характеризуется определенной временной задержкой и может быть обусловлено не только изменением состояния ЭТЦ (как в случае с F_i/F_m), но и нарушением других важнейших процессов жизнедеятельности, например, синтеза белка. В связи с этим данный

показатель использовали при проведении токсикологических экспериментов с ненулевым временем экспозиции.

Регистрацию кривой индукции флуоресценции проводили при помощи 2-х лучевого импульсного флуориметра, соединенного с персональным компьютером. Возбуждение свечения осуществляли сфокусированным интенсивным светом 50 Вт/см^2 от иодно-кварцевой лампы (КГМ 24-150). Темновая пауза составляла 30 с.

Замедленная флуоресценция и ее использование для диагностики состояния тест-объектов при биотестировании. Индукционные кривые ЗФ получают, как и в случае флуоресценции, при облучении светом растений, находившихся в темноте. Для отдельной регистрации флуоресценции и ЗФ спектры последних снимают через определенный интервал времени, превышающий время жизни флуоресценции. Общий вид индукционной кривой ЗФ представлен на рис. 2.7.

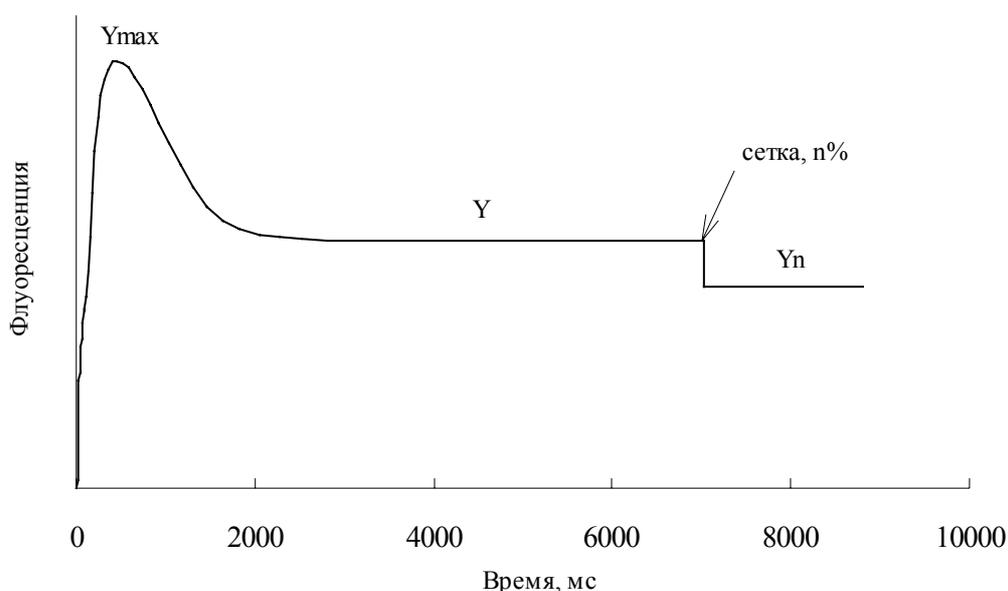


Рис. 2.7. Индукционная кривая флуоресценции

Как видно из рис. 2.7, сначала происходит резкое возрастание ЗФ до начального пика интенсивности (Y_{\max}), а затем она снижается до постоянной величины (Y_{100}). Начальный подъем интенсивности ЗФ обусловлен нарушением электронного транспорта вследствие временной блокировки оттока электронов от ФСII. В дальнейшем происходит активация акцепторной части ФСI и ферментов углеродного цикла фотосинтеза и интенсивность ЗФ снижается.

При установке сетки (рис. 2.7), ослабляющей интенсивность возбуждающего света, снижение интенсивности ЗФ происходит из-за уменьшения количества возбуждаемых светом электронов. Если фотосистема поражена и определенное количество переносчиков электронов заблокировано, то снижение, вызываемое установкой сетки, будет незначительным, т.к. в данном случае полное восстановление пула акцепторов электронов произойдет быстрее, а разница, возникающая при изменении интенсивности света уменьшится. Поэтому форма световой зависимости (т.е. зависимость интенсивности ЗФ от интенсивности света) может служить характеристикой транспорта электронов в ЭТЦ до и после ФСII (Васильев и др., 1988).

Для диагностики изменения состояния растений под действием симтриазинов (Кафаров и др., 1985; Маторин и др., 1975; Гольдфельд и Карапетян, 1989) и биотестирования (Асланиди и др., 1988) в настоящее время используют как индукционные кривые ЗФ, так и световую зависимость ЗФ. Основными параметрами, используемыми для оценки состояния объектов являются: Y_{\max} - интенсивность максимальной флуоресценции; Y_{\max}/Y_{100} - отношение интенсивности максимальной флуоресценции к величине стационарной флуоресценции; $\tau_{1/2}$ - длительность индукционного спада и отношение Y_{100}/Y_n , где Y_{100} - интенсивность ЗФ при интенсивности возбуждающего света 100%, Y_n - интенсивность ЗФ при интенсивности возбуждающего света n% (Андреев и др., 1985). Нами был использован показатель Y_{100}/Y_n , являющийся характеристикой транспорта электронов (Андреев и др., 1985; Тарусов и Веселовский, 1978).

Регистрацию спектров ЗФ проводили на установке, собранной на базе фосфороскопа, представляющего собой систему из трех коаксиальных цилиндров с зазором 0,5 мм между ними. В качестве детектора излучения использовали фотоумножитель ФЭУ-79, чувствительный в красной области спектра. Источником питания фотоумножителя служил высоковольтный стабилизированный выпрямитель ВС-23. Сигнал с фотоумножителя через усилитель постоянного тока (рН-метр 340) поступал на вход самопишущего потенциометра ЭПП-09. Возбуждение свечения осуществляли сфокусированным интенсивным светом от иодно-кварцевой лампы (КГМ 24-150) в сочетании со стеклянным светофильтром КС-14.

Использованные тест-объекты. Токсикологические эксперименты в водных средах проводили с использованием трех тест-объектов, представляющих различные уровни организации биоты - организменный, клеточные и органельный. Тест-объекты и соответствующие им тест-отклики приведены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Тест-объекты и соответствующие им тест-отклики, использованные при проведении токсикологических экспериментов

Тест-объект	Тест-отклик	Регистрация
Растения мягкой пшеницы <i>Triticum aestivum L.</i>	Y_{100}/Y_{34}	Фосфороскоп для регистрации ЗФ
Одноклеточная водоросль <i>Chlorella vulgaris</i>	F_i/F_m и F_v/F_m	Индуктор-флуориметр
Хлоропласты ячменя <i>Hordeum sativum L.</i>	Y_{100}/Y_{34} ; F_v/F_m	Фосфороскоп для регистрации ЗФ; Индуктор-флуориметр

Методика постановки токсикологических экспериментов с растениями пшеницы

В качестве тест-культуры использовали растения яровой мягкой пшеницы сорта Краснозерная, выращенные на питательной среде Прянишникова (Прянишников, 1940) в вегетационной камере (22⁰С, фотопериод 14 часов, нормальная влажность). В возрасте 9-15 дней, когда фотосинтетический аппарат был полностью сформирован, растения помещали на двое суток в пробирки с растворами, содержащими разные концентрации гумусовых кислот и атразина. Затем регистрировали спектр ЗФ (измерения проводили на кончиках 1-го и 2-го листьев растений) и рассчитывали показатель Y_{100}/Y_{34} , отражающий интенсивность фотосинтетического транспорта электронов.

Для приготовления исследуемых растворов смешивали растворы атразина ($0,9 \times 10^{-4}$ М) и гумусовых кислот в нужной концентрации и оставляли при комнатной температуре на 48 часов. Схема эксперимента была следующей:

- Вариант 1 Контроль (дистиллированная вода)
- Вариант 2 атразин ($0,9 \times 10^{-4}$ М)
- Вариант 3 гумусовые кислоты (30 мг ОС/л)
- Вариант 4 атразин + гумусовые кислоты (30 мг ОС/л)
- Вариант 5 гумусовые кислоты (50 мг ОС/л)

- Вариант 6 атразин + гумусовые кислоты (50 мг ОС/л)
Вариант 7 гумусовые кислоты (100 мг ОС/л)
Вариант 8 атразин + гумусовые кислоты (100 мг ОС/л)
Вариант 9 гумусовые кислоты (150 мг ОС/л)
Вариант 10 атразин + гумусовые кислоты (150 мг ОС/л)
Вариант 11 гумусовые кислоты (200 мг ОС/л)
Вариант 12 атразин + гумусовые кислоты (200 мг ОС/л)
Вариант 13 гумусовые кислоты (300 мг ОС/л)
Вариант 14 атразин + гумусовые кислоты (300 мг ОС/л)
Вариант 15 гумусовые кислоты (400 мг ОС/л)
Вариант 16 атразин + гумусовые кислоты (400 мг ОС/л)
Вариант 17 гумусовые кислоты (600 мг ОС/л)
Вариант 18 атразин + гумусовые кислоты (600 мг ОС/л)
Повторность пятикратная.

Методика постановки токсикологических экспериментов с одноклеточной водорослью *Chlorella vulgaris*

Культивирование интенсивной культуры *Chlorella vulgaris* (термофильный штамм) осуществляли в 20%-ной среде Тамия (Tamiya et al., 1961) при pH 6,6-6,8 в термостатируемых культиваторах емкостью 100 мл, при температуре 35°C, с продувкой увлажненным воздухом, при освещенности 30 Вт/м² (люминесцентные лампы типа ЛДЦ-40). Перед тестированием водоросль разращивали в течение суток. После разращивания интенсивную культуру хлореллы освобождали от культуральной среды центрифугированием в течение 3-х минут при скорости 5000 об./мин. Осажденную водоросль суспендировали в 20%-ной среде Тамия без фосфатов и ЭДТА. Полученную суспензию водоросли вносили в культиваторы с тестируемыми растворами гумусовых кислот и атразина, приготовленными на основе 20%-ной среды Тамия без фосфатов и ЭДТА. Регистрацию кривых индукции флуоресценции хлорофилла проводили сразу после добавления культуры хлореллы к тестируемым растворам (эксперименты с нулевой экспозицией) и через три часа (эксперименты с 3-часовой экспозицией). При проведении экспериментов с нулевой экспозицией в

качестве тест-отклика использовали показатель F_i/F_m . Схема экспериментов была следующей:

- Вариант 1 Контроль (20% среда Тамия без фосфатов и ЭДТА)
- Вариант 2 атразин ($1,1 \times 10^{-6}$ М)
- Вариант 3 гумусовые кислоты (1 мг ОС/л)
- Вариант 4 атразин + гумусовые кислоты (1 мг ОС/л)
- Вариант 5 гумусовые кислоты (5 мг ОС/л)
- Вариант 6 атразин + гумусовые кислоты (5 мг ОС/л)
- Вариант 7 гумусовые кислоты (10 мг ОС/л)
- Вариант 8 атразин + гумусовые кислоты (10 мг ОС/л)
- Вариант 9 гумусовые кислоты (20 мг ОС/л)
- Вариант 10 атразин + гумусовые кислоты (20 мг ОС/л)
- Вариант 11 гумусовые кислоты (30 мг ОС/л)
- Вариант 12 атразин + гумусовые кислоты (30 мг ОС/л)
- Вариант 13 гумусовые кислоты (40 мг ОС/л)
- Вариант 14 атразин + гумусовые кислоты (40 мг ОС/л)
- Вариант 15 гумусовые кислоты (50 мг ОС/л)
- Вариант 16 атразин + гумусовые кислоты (50 мг ОС/л)

Повторность восьмикратная.

При проведении экспериментов с 3-часовой экспозицией культуру водоросли после добавления к ней тестируемых растворов культивировали в течение 3 часов в условиях, аналогичных условиям разрачивания, а затем регистрировали кривые индукции флуоресценции хлорофилла хлореллы. Тест-откликом служил показатель F_v/F_m . Схема экспериментов была следующей:

- Вариант 1 Контроль (20% среда Тамия без фосфатов и ЭДТА)
- Вариант 2 атразин ($6,7 \times 10^{-7}$ М)
- Вариант 3 гумусовые кислоты (0,6 мг ОС/л)
- Вариант 4 атразин + гумусовые кислоты (0,6 мг ОС/л)
- Вариант 5 гумусовые кислоты (1 мг ОС/л)
- Вариант 6 атразин + гумусовые кислоты (1 мг ОС/л)
- Вариант 7 гумусовые кислоты (2 мг ОС/л)
- Вариант 8 атразин + гумусовые кислоты (2 мг ОС/л)
- Вариант 9 гумусовые кислоты (3 мг ОС/л)

Вариант 10 атразин + гумусовые кислоты (3 мг ОС/л)

Вариант 11 гумусовые кислоты (5 мг ОС/л)

Вариант 12 атразин + гумусовые кислоты (5 мг ОС/л)

Повторность восьмикратная.

Методика постановки токсикологических экспериментов на хлоропластах ячменя *Hordeum sativum L.*

При проведении токсикологических экспериментов использовали хлоропласты ячменя, выделенные по методу Арнона (помощь в этой работе была оказана аспирантами кафедры биофизики биологического факультета МГУ Макаровой В.В. и Волгиным С.А., за что я им искренне благодарна). Измерения флуоресценции на ранее описанных установках проводили в 4×10^{-2} М трис-НСI буфере (рН 7,8). В качестве тест-откликов использовали показатели Y_{100}/Y_{34} и F_v/F_m . Для проведения измерений в стеклянную кювету к 0,5 мл трис-НСI буфера приливали 0,5 мл исследуемого раствора и 30 мкл раствора хлоропластов и встряхивали. Затем кювету помещали в камеру для измерения, оставляли в темноте на 1 минуту, после чего включали лампу с возбуждающим свечением и проводили измерение флуоресценции. В экспериментах с использованием в качестве тест-отклика показателя F_v/F_m исследовали растворы атразина ($1,8 \times 10^{-6}$ М), гумусовых кислот (10 мг ОС/л) и смеси атразина и гумусовых кислот в этих же концентрациях, приготовленные в трис-буфере. Контролем служил 4×10^{-2} М трис-НСI буфер.

В экспериментах с использованием в качестве тест-отклика показателя Y_{100}/Y_{34} исследовали только собственное действие гумусовых кислот. Поэтому схема была следующей:

Вариант 1 Контроль (4×10^{-2} М трис-НСI буфер)

Вариант 2 гумусовые кислоты (3 мг ОС/л)

Вариант 3 гумусовые кислоты (5 мг ОС/л)

Вариант 4 гумусовые кислоты (6 мг ОС/л)

Вариант 5 гумусовые кислоты (10 мг ОС/л)

Вариант 6 гумусовые кислоты (15 мг ОС/л)

Вариант 7 гумусовые кислоты (20 мг ОС/л)

Вариант 8 гумусовые кислоты (30 мг ОС/л)

Вариант 9 гумусовые кислоты (40 мг ОС/л)

Вариант 10 гумусовые кислоты (60 мг ОС/л)

Повторность трехкратная.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАННЫХ ПОЧВ

Для выделения препаратов гумусовых кислот и проведения токсикологических экспериментов были использованы три дерново-подзолистые почвы различной степени окультуренности. Пробоотбор проводили на участках под лесом ($П_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$), пахотном ($П_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$) и огородном ($П_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$) на территории УОПЭЦ "Чашниково". В соответствии с поставленными целями, особое внимание было уделено получению характеристик гумусового состояния и кислотности почвенного раствора, в наибольшей степени определяющих поведение атразина в почве (Raman et al., 1988; Лунев, 1992; Barriuso and Calvet, 1992). Полученные характеристики приведены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Химические характеристики исследуемых дерново-подзолистых почв

Химические характеристики	$П_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$	$П_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$	$П_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$
$pH_{\text{ВОДН}}$	5,0	7,8	7,3
$pH_{\text{СОЛ}}$	4,5	-	-
$C_{\text{ОРГ}}$, % (по Тюрину)	4,3	1,5	3,8
$C_{\text{ОРГ}}$, % (анализатор углерода)	4,7	1,5	3,9
$C_{\text{ГК}}/C_{\text{ФК}}$	0,2	0,7	0,3
Сумма обменных оснований, мг-экв/100г	7,2	17,1	37,1
Подвижный алюминий, мг-экв/100г	4,4	нет	нет
Гидролитическая кислотность, мг-экв/100г	5,5	2,0	1,3
Свободный Са, мг-экв/100г	нет	7,7	0,5

Как видно из таблицы, наибольший уровень кислотности почвенного раствора был зафиксирован в $П_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$, наименьший - в $П_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ почве. При этом кислотность почвенного раствора $П_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ почвы в значительной мере обусловлена подвижным алюминием, содержание которого составляет 4,4 мг-экв/100 г почвы. Крайне высокий показатель $pH_{\text{ВОДН}}$ $П_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ почвы свидетельствует об интенсивном известковании, что подтверждается большим содержанием в ней свободного кальция. Относительно высокое содержание $C_{\text{ОРГ}}$ в $П_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ почве может быть следствием неполноты удаления подстилки при пробоотборе, это предположение хорошо соотносится с невысоким показателем в почве $C_{\text{ГК}}:C_{\text{ФК}}$.

Минимальное содержание $C_{\text{ОРГ}}$ наблюдали в $\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ПАХ}}$ почве, при этом для почвы было характерен самый высокий показатель $C_{\text{ГК}}:C_{\text{ФК}}$.

3.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Для проведения исследований был использован 31 препарат гумусовых кислот, выделенных по стандартным методикам из различных источников: природных вод, почв, торфов и бурых углей. Шифры использованных препаратов гумусовых кислот и источники происхождения приведены в табл. 3.2. Препараты, выделенные жирным шрифтом, были получены в рамках данной работы.

3.2.1. Элементный состав

Данные по элементному составу исследованных препаратов, скорректированные на зольность, приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2

Шифры, источники происхождения и элементный состав использованных препаратов.

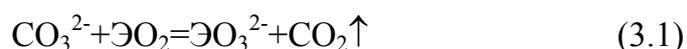
Препарат	Источник	Элементный состав (% масс.)				Атомные отношения			Зольность, %
		C	H	N	O	H/C	O/C	N/C	
<i>Гумусовые кислоты почвенных растворов, природных вод и водорастворимое ОВ торфов</i>									
WBW1	водная вытяжка $\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ЛЕС}}$	41,3	5,1	0	53,7	1,17	1,39	0	60,4
WBP1	водная вытяжка $\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ПАХ}}$	34,2	3,3	0	62,5	1,45	0,98	0	46,7
WBG1	водная вытяжка $\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ОГ}}$	44,2	6,4	0,3	49,2	1,73	0,83	0,01	30,8
FMX2	р. Москва	51,2	4,9	1,6	42,3	1,15	0,62	0,04	11,0
HO13H	ГК болотных вод	52,5	3,5	1,2	36,4	0,80	0,52	0,02	5,7
A									
HTW	ОВ водного экстракта верхового торфа	50,6	6,3	1,7	41,4	1,49	0,61	0,02	1,1
TTW	ОВ водного экстракта низинного торфа	42,2	5,3	1,0	50,2	1,50	0,82	0,09	3,3
<i>ФК почв</i>									
FBG	$\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ОГ}}$	41,4	4,2	2,8	31,2	1,02	0,56	0,06	20,4
FGW	$\text{Л}_{\text{ЛЕС}}$	43,9	4,7	3,4	31,2	1,28	0,53	0,07	16,9
FBW1	$\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ЛЕС}}$	51,9	4,3	2,0	41,8	0,99	0,60	0,04	8,4
FBP1	$\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ПАХ}}$	46,2	4,5	2,9	46,4	1,15	0,75	0,06	2,4
FBG1	$\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ОГ}}$	50,7	4,4	2,6	42,3	1,04	0,63	0,05	6,9
<i>ГК почв</i>									
<i>ГК дерново-подзолистых почв</i>									
HBW	$\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ЛЕС}}$	51,1	4,2	5,2	39,4	0,99	0,58	0,08	11,7

Препарат	Источник	Элементный состав (% масс.)				Атомные отношения			Зольность, %
		С	Н	N	О	H/C	O/C	N/C	
НВР	П ^Д _{ПАХ}	52,0	4,6	5,2	38,2	1,06	0,55	0,07	0,7
НВG	П ^Д _{ОГ}	55,1	5,1	4,7	35,0	1,11	0,48	0,07	22,2
НВW1	П ^Д _{ЛЕС}	54,3	4,6	4,0	37,1	1,02	0,51	0,07	9,4
НВР1	П ^Д _{ПАХ}	47,8	5,4	4,9	41,9	1,36	0,66	0,09	21,2
НВG1	П ^Д _{ОГ}	50,2	5,1	3,0	41,7	1,21	0,62	0,05	11,2
ГК серых лесных почв									
НGW	Л _{ЛЕС}	49,2	4,3	5,0	41,5	1,04	0,63	0,08	0,9
НGP	Л _{ПАХ}	48,3	4,2	4,8	42,7	1,05	0,66	0,08	6,8
ГК черноземов									
НС	Ч ^{ЛУГ}	54,3	3,9	4,6	37,2	0,86	0,51	0,07	4,5
НST	Ч ^Г	54,8	3,5	4,0	37,8	0,77	0,52	0,06	7,4
SEL	Ч ^Г	51,4	4,4	4,1	40,0	1,03	0,58	0,07	16,0
Гумусовые кислоты торфов									
Гумусовые кислоты торфов									
НTL	сумма ГК и ФК верхового сосново- пушицевого торфа	52,2	4,3	1,7	41,8	0,99	0,60	0,04	1,4
TTL	сумма ГК и ФК низинного древесного торфа	51,1	4,1	2,5	42,3	0,96	0,62	0,04	2,1
ГК торфов									
T4	сумма ГК и ФК верхового сфагнового торфа	54,0	4,8	2,3	38,9	1,07	0,54	0,04	1,5
Н8	ГК торфа	52,4	5,2	1,7	50,2	1,19	0,72	0,03	4,8
НТО	Коммерческие ГК НПО Биолар	52,7	4,6	2,8	39,9	1,05	0,57	0,04	12,3
ГК бурых углей									
AGK	Коммерческие ГК АО Спецбиотех	57,5	4,6	0,5	36,0	0,94	0,46	0,01	14,6
RHA	ГК бурого угля	49,3	4,0	1,1	50,2	0,97	0,76	0,02	9,5

Как видно из табл. 3.2, исследованные препараты значительно различались по элементному составу. Наибольшее содержание углерода и наименьшее - кислорода было отмечено для ГК углей, торфов и черноземов. В ряду почвенных препаратов самое высокое отношение O/C было характерно для ГК и ФК выделенных из П^Д_{ПАХ} почвы, что свидетельствует о значительном вкладе периферической части в их структуру. Наибольшее содержание кислорода было отмечено для препаратов гумусовых кислот природных вод и водных вытяжек почв, самое низкое - для гумусовых кислот торфов.

Некоторые из выделенных препаратов, особенно из почв, имели высокую зольность (табл. 3.2). Экстремально высокое содержание золы (до 60 %) было

зафиксировано в препаратах, представляющих собой сумму ГК и ФК почвенных растворов. Известно, что содержание и состав золы оказывают значительное влияние на результаты элементного анализа препаратов гумусовых кислот и на их свойства (Huffman and Stuber, 1985; Орлов, 1990). Поэтому все препараты гумусовых кислот были проанализированы на содержание минеральных элементов методом АЭС ИСП. Из полученных данных о содержании элемента в мг/л (Приложение 1), зная концентрацию гумусовых кислот, рассчитывали молярное содержание элемента в препарате. Далее, на основании химических свойств данного элемента и условий определения зольности - прокалывание препарата в токе кислорода при 750°C - делали предположение о форме, в которой он присутствует в золе (Жилин, 1998). Так, ввиду термостойкости карбонатов щелочных и щелочноземельных металлов, полагали что эти металлы в условиях определения образуют карбонаты, а остальные металлы - оксиды. При этом следовало учесть, что присутствующие в золе кислотные оксиды (SiO_2 , TiO_2 , V_2O_5 , Al_2O_3) могут реагировать с карбонатами с выделением углекислого газа:



где Э - минеральный элемент.

Поэтому содержание золы в гумусовых кислотах из данных АЭС ИСП рассчитывали для двух крайних случаев: реакция кислотных оксидов с карбонатами отсутствует ($A_{\text{МАКС}}$) и кислотные оксиды реагируют с карбонатами в соотношении 1:1 ($A_{\text{МИН}}$).

На основании полученных значений для каждого элемента рассчитывали массу зольной формы, приходящейся на единицу ОС гумусовых кислот. Также рассчитывали суммарную массу золы по данным АЭС-ИСП и соотносили ее с результатами прямого определения зольности (A). Результаты приведены в табл. 3.3.

Проведенные на основании полученных данных расчеты значений зольности, обусловленной присутствием Na (в форме Na_2CO_3), составляют 0,6-8,4 % и свидетельствуют, что обессоливание препаратов прошло достаточно качественно, т. е. высокая зольность препаратов гумусовых кислот обусловлена элементами, прочно связанными с гумусовыми кислотами, комплексы которых

не разрушаются в ходе использованных процедур выделения. При этом для большинства препаратов даже минимальная зольность, рассчитанная из данных ИСП, значительно превышает величину, определяемую методом ручного сжигания. Наиболее ярким примером являются препараты WBW1, WBP1, WBG1 и FBP1, рассчитанная зольность которых превышала 100 %. Это говорит о том, что данные ИСП о содержании элементов заметно завышены, что обусловлено, по-видимому, влиянием органической матрицы. Тем не менее, полученные данные весьма полезны для анализа качественного состава зольных компонентов препаратов гумусовых кислот.

Таблица 3.3

Состав золы в препаратах гумусовых кислот,
рассчитанный из данных АЭС ИСП

	Содержание зольной формы минерального элемента, мг/г ОВ												Зольность, %		
	Na	K	Ca	Mg	Al	Fe	Si	Ti	Mn	Zn	B	Cu	A _{МИН}	A _{МАКС}	A
	Na ₂ CO ₃	K ₂ CO ₃	CaCO ₃	MgCO ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	TiO ₂	MnO ₂	ZnO	B ₂ O ₃	CuO			
Сумма ГК и ФК водных экстрактов почв и торфов															
WBW1	72,3	1,8	8,6	1,2	3,5	1,9	2328	0,4	1,37	0,39	2,7	0,13	233	255	60,4
WBP1	29,2	1,9	4,8	1,5	1,6	0,7	618	0,2	0,95	0,15	1,6	0,14	62	66	46,7
WBG1	30,4	1,6	7,1	1,0	3,9	1,6	921	0,3	2,12	0,28	3,2	0,22	92	97	30,8
TTW	6,1	20,2	2,6	0,4	0,3	0,1	5		0,11	0,05	0,8	0,01	1,5	3,5	3,3
ФК почв															
FBW1	6,2	170,0	1,3	0,2	0,8	0,4	14	0,1	0,17	0,07	1,2	0,02	1,4	19	8,4
FBP1	18,6	963,1	13,9	0,4	1,7	0,6	47	0,1	0,52	0,10	3,3	0,16	4,9	10,5	2,4
FBG1	25,5	21,5	9,4	0,5	2,9	1,9	100	0,2	0,56	0,29	9,6	0,09	10	17	6,9
FGW	9,5	330,5	10,5	2,0	2,2	1,8	9	0,1	0,36	0,46	6,3	0,10	1,1	37	16,9
ГК почв															
ГК дерново-подзолистых почв															
HBW1	39,0		0,8	0,3	2,9	3,1	5	0,4	0,24	0,03	0,2	0,03	5,2	7,9	9,4
HBP1	58,8		1,6	1,4	6,8	2,5	16	0,3	0,30	0,15	0,3	0,05	8,8	22	21,2
HBG1	49,8		0,9	0,7	4,4	1,5	11	0,1	0,28	0,06	0,3	0,05	6,9	15	11,2
HBW	14,9		0,3	0,1	1,4	2,2	1	0,2	0,05	0,01	0,0	0,02	2,0	22	11,7
HBG	14,1		0,5	1,0	5,9	3,0	11	0,2	0,06	0,02	0,1	0,03	3,3	3,6	22,2
ГК серой лесной почвы и черноземов															
HGW	45,2		1,2	0,3	2,0	0,9	4	0,1	0,21	0,04	0,2	0,04	5,4	5,5	0,9
HST	48,4		0,9	0,2	0,7	0,2	5		0,23	0,03	0,4	0,04	5,5	5,6	7,4
HS	83,6		1,7	0,4	1,8	0,6	8	0,1	0,46	0,05	0,6	0,10	9,7	9,8	4,5
Гумусовые кислоты торфов															
HTO	71,4		0,9	0,2	1,0	0,3	6	0,1	0,36	0,03	0,5	0,02	8,1	8,9	12,3
H8	30,2		0,6	0,1	1,0	0,2	3		0,14	0,01	0,2	0,01	3,4	3,5	4,8
T4	4,4	22,0	34,0	6,4	5,9	3,3	24		0,23	2,00	0,9	0,31	8,6	10,3	1,5
HTL	2,9	5,0	32,0	2,8	2,2	0,8	18		0,26	0,40		0,10	5,2	6,4	1,4
TTL	5,2	10,0	15,0	2,9	2,5	3,6	12		0,27	0,50		0,17	4,4	5,2	2,1
ГК бурых углей															
RHA	46,9		1,7	0,3	1,4	1,8	5	0,1	0,27	0,02	0,3	0,02	5,7	5,8	9,5
AGK	18,5	16,0	18,0	0,8	16,6	33,4	27	2,4	0,38	0,40		0,19	10,9	13,4	14,6

Как следует из табл. 3.3, основными зольными компонентами являются K, Ca, Si. При этом Ca преобладает в составе ряда препаратов торфяных гумусовых

кислот, ФК лугово-черноземной и $\text{Pd}^{\text{ПАХ}}$ почв, тогда как Si - в препаратах гумусовых кислот водных вытяжек из почв. Принимая во внимание, что процедура выделения препаратов гумусовых кислот водных вытяжек почв включала в себя фильтрование через 0,45 мкм мембранный фильтр, можно сделать вывод, что кремнекислотные фрагменты прочно связаны с гумусовыми кислотами, а не являются механическими примесями. По всей видимости, это свидетельствует о том, что при экстракции выделяемые препараты гумусовых кислот в значительной степени представлены органоминеральными соединениями.

3.2.2. Молекулярно-массовые характеристики исследованных препаратов гумусовых кислот

Гель-хроматографический анализ препаратов гумусовых кислот проводили на колонке *TOYOPEARL-50HW(S)* при элюировании 0,028 М фосфатным буфером (рН 6,8). Пробы для анализа готовили, растворяя навеску препарата в фосфатном буфере той же концентрации. Типичные кривые элюирования гумусовых кислот, регистрируемые с помощью последовательно соединенных детекторов УФ-поглощения и органического углерода, приведены на рис. 3.1. Как видно из рис. 3.1, в указанных условиях определения гель-хроматограммы гумусовых кислот характеризовались мономодальным распределением. Это позволяет сделать вывод о том, что использование в качестве элюента 0,028 М фосфатного буфера позволяет устранить кулоновские взаимодействия гумусовых кислот с гелем, которое часто приводит к появлению артефактных пиков на гель-хроматограммах гумусовых кислот (Perminova et al., 1998). Влияние неэкслюзионных эффектов на результаты гель-хроматографического анализа гумусовых кислот подробно обсуждалось в соответствующей части обзора литературы.

Из полученных кривых элюирования и калибровочной кривой (рис. 2.3), построенной по полидекстранам, для каждого препарата рассчитывали молекулярно-массовое распределение и средние молекулярные массы. Для этой цели использовали программу GelTreat (Kudryavtsev et al., 1999). Типичное ММР приведено на рис. 3.1.

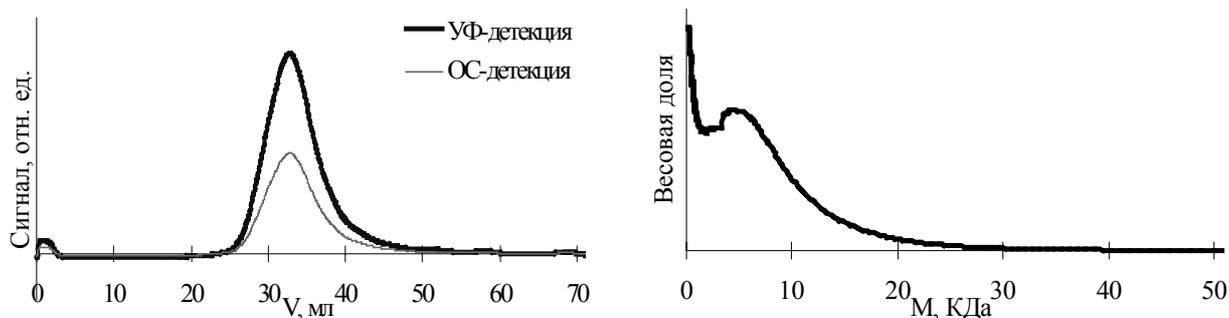


Рис. 3.1. Типичная гель-хроматограмма и кривая молекулярно-массового распределения препарата гумусовых кислот (на примере препарата FBW1)

Как видно из рисунка, гель-хроматограммы гумусовых кислот характеризовались наличием одного пика, что согласуется с результатами ряда исследователей (De Haan et al., 1987; Chin et al., 1994; Perminova et al., 1998) и свидетельствует о корректном подборе условий проведения гель-хроматографического анализа. Средневесовые молекулярные массы исследованных препаратов гумусовых кислот приведены в табл. 3.4.

Таблица 3.4

Средневесовые молекулярные массы (M_w) исследованных препаратов гумусовых кислот

Препарат	M_w , КДа	Препарат	M_w , КДа
Сумма ГК и ФК природных вод		ГК почв	
FMX2	6,4	ГК дерново-подзолистых почв	
HTW	6,7	HBW	15,9
TTW	5,3	HBP	17,1
WBW1	6,3	HBG	18,3
WBP1	7,2	HBW1	14,5
WBG1	7,9	HBP1	16,6
HO13HA	12,8	HBG1	14,2
ФК почв		ГК серых лесных почв	
FBG	11,3	HGW	17,4
FGW	11,7	HGP	15,4
FBW1	10,2	ГК черноземов	
FBP1	8,8	HS	13,0
FBG1	11,7	HST	12,7
Сумма ГК и ФК торфяков		SEL	14,4
HTL	18,3	ГК бурых углей	
TTL	21,0	RHA	16,4
H8	11,7	AGK	15,6
HТО	20,0		
T4	19,6		

Доверительный интервал ($P=95\%$) для M_w составил $\pm 3\%$

Как видно из табл. 3.4, в ряду исследованных препаратов наименьшими средневесовыми молекулярными массами (M_w) характеризовались гумусовые

кислоты природных вод и водных экстрактов почв; максимальными - торфов. В ряду почвенных препаратов было установлено увеличение M_w при переходе от ФК к ГК, выделенных из одной почвы. Следует отметить также возрастание M_w ГК в зональном ряду почв: черноземы < серые лесные почвы < дерново-подзолистые почвы. По-видимому, это является следствием того, что макромолекулы ГК серых лесных и дерново-подзолистых почв имеют в своем составе менее трансформированные полисахаридные цепочки, тогда как в черноземных ГК, в результате высокой микробиологической активности среды их формирования, достигается самая высокая степень деградации углеводного комплекса. Полученная структурная информация хорошо согласуется с известным положением о том, что черноземные ГК представляют собой продукт более глубокой гумификации, которому присуща меньшая химическая гетерогенность (Орлов, 1992). Обращает на себя внимание близость значений M_w гумусовых кислот природных вод (FMX2) и водных экстрактов почв (WBW1, WBP1 и WBG1).

В настоящее время гумусовые кислоты почвенного раствора являются наименее изученными среди почвенных гумусовых кислот. Однако именно они представляют собой наиболее подвижную часть почвенного гумуса, что обуславливает их наибольшую активность в отношении биоты. Кроме того, мягкая процедура экстракции из почвы (по сравнению с щелочной) позволяет рассматривать водорастворимые гумусовые кислоты как реально существующие в почвенном профиле.

Трудоемкая процедура извлечения гумусовых кислот почвенного раствора из почвы является, по-видимому, основной причиной небольшого количества данных об их содержании и форме нахождения в почвенном растворе. Поэтому при выделении препаратов суммы ГК и ФК почвенного раствора было проведено специальное исследование, посвященное этому вопросу.

Извлечение водорастворимых органических веществ из почвы проводили, получая водную вытяжку при соотношении почва:вода 1:2. Тем самым достигались условия, близкие к почвенному раствору (Когут, 1996). Почвенные коллоиды отделяли, пропуская полученную вытяжку через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Abbt-Braun et al., 1992). Далее выделение гумусовых кислот проводили по схеме, аналогичной выделению гумусовых кислот из

водных сред (там же). Полная схема выделения водорастворимых гумусовых кислот с указанием всех этапов приведена на рис. 3.2.

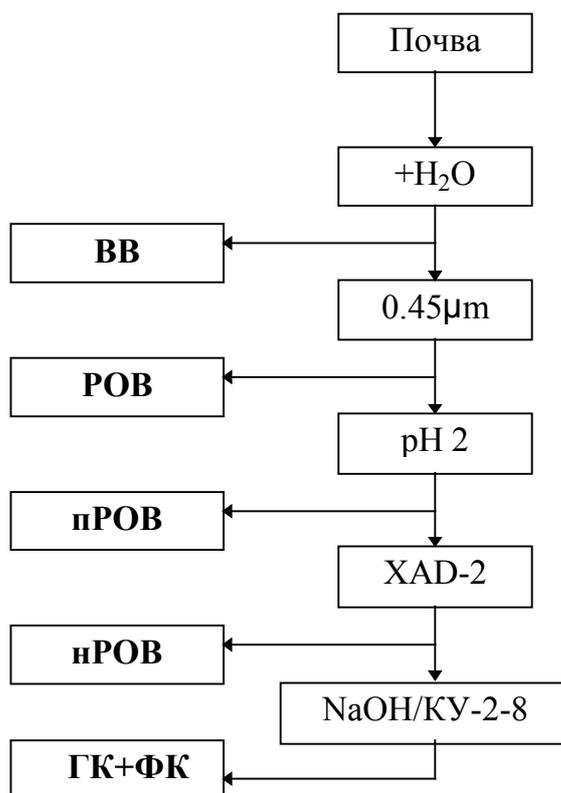


Рис. 3.2. Схема выделения препарата суммы ГК и ФК водного экстракта почв. ВВ - водная вытяжка; РОВ - растворенное органическое вещество; пРОВ - подкисленное до pH 2 РОВ; нРОВ - РОВ, не сорбировавшееся на XAD-2; ГК+ФК - сумма ГК и ФК почвенного раствора.

Для контроля изменений, происходящих с растворенным органическим веществом на различных стадиях выделения водорастворимых гумусовых кислот, на каждом этапе отбирали пробы соответствующих растворов и анализировали методом гель-хроматографии в описанном выше варианте. При этом комбинированное использование детектора органического углерода и УФ-поглощения позволяло следить как за изменениями в суммарном пуле водорастворимого органического вещества, так и в его гумусовой компоненте. Соответствующие гель-хроматограммы для препарата $\text{П}^{\text{Д}}_{\text{ОГ}}$ почвы приведены на рис. 3.3. Гель-хроматограммы для двух других дерново-подзолистых почв приведены в Приложении 2. Полученные гель-хроматограммы в дальнейшем использовали для расчета M_r и M_w органического вещества почвенного раствора (ОВ), которые обобщены в таблице 3.6.

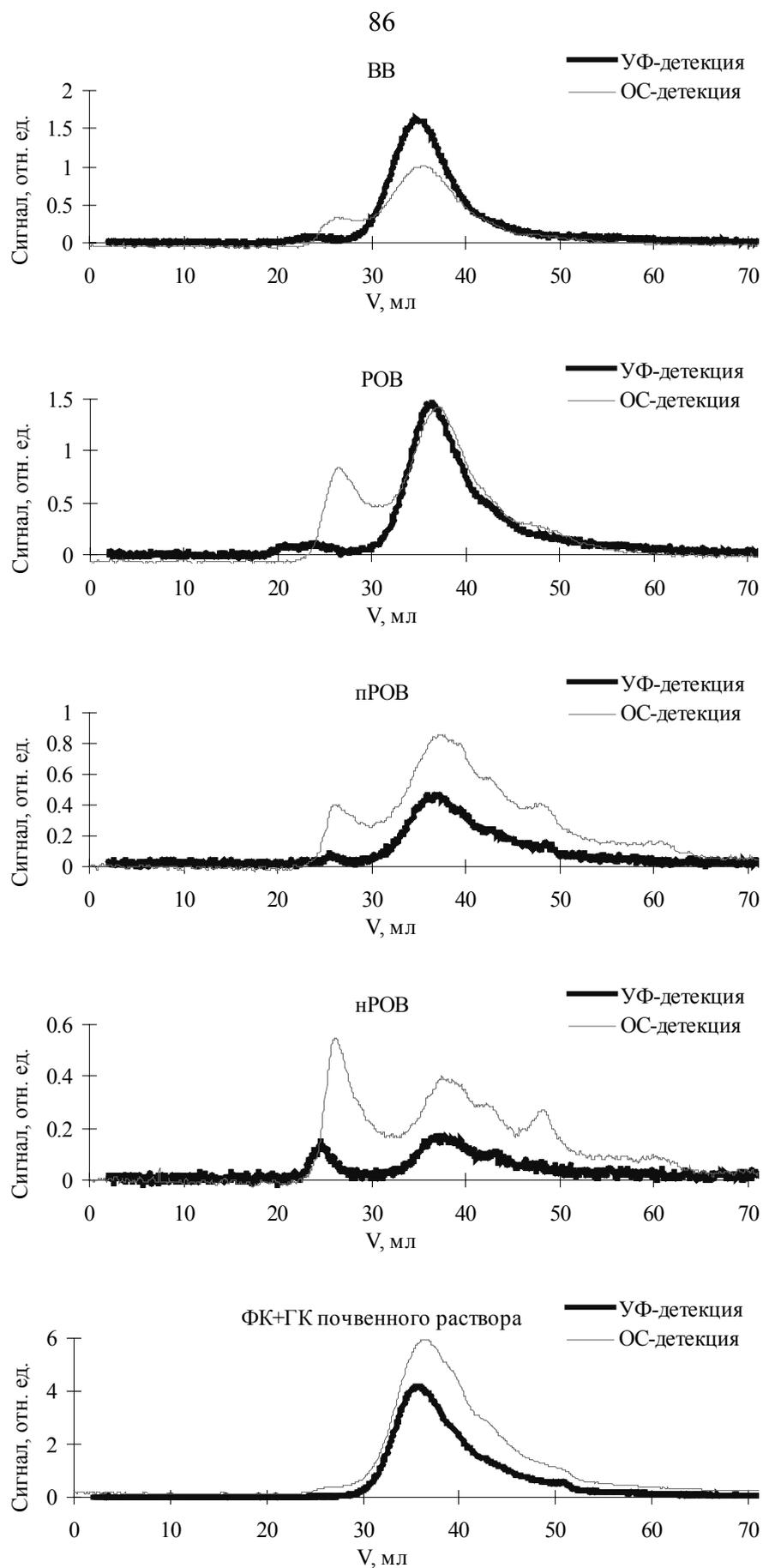
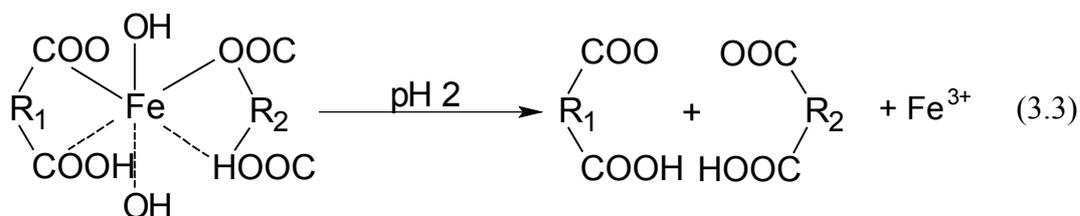


Рис. 3.3. Гель-хроматограммы ОВ водной вытяжки П^Д_{ЛЕС} почвы на различных этапах выделения препаратов водорастворимых гумусовых кислот

На гель-хроматограмме водной вытяжки почвы (ВВ) с детекцией по ОС было зарегистрировано два не полностью разрешенных пика на объемах эксклюзии $V_e=28$ и $V_e=35$ мл. При этом пик, относящийся к фракции ОВ с большей ММ характеризовался практически полным отсутствием поглощения при 254 нм. Это свидетельствует о том, что вещества с данным объемом выхода не относятся к гумусовым кислотам и представлены, по-видимому, полисахаридами. Наличие пика на гель-хроматограмме с УФ-детекцией при $V_e=35$ мл позволяет трактовать второй пик как гумусовые кислоты.

Фильтрация исходной водной вытяжки через мембранный фильтр 0,45 мкм, используемое обычно для отделения коллоидного ОВ от истинно растворенного, привело к уменьшению относительной площади “полисахаридного” пика (рис. 3.3, гель-хроматограмма РОВ). При подкислении РОВ до pH 2 (рис. 3.3, гель-хроматограмма пРОВ) объем элюирования пика “гумусовых кислот” увеличивается с 35 до 40 мл, при этом он распадается на два, причем пик с наибольшим объемом эксклюзии ($V_e=48$ мл) характеризовался отсутствием поглощения при 254 нм. В качестве объяснения наблюдаемого эффекта можно предложить две гипотезы. Первая заключается в том, что в исходном РОВ присутствовали соединения железа и алюминия с гумусовыми кислотами (главным образом ФК). Карпухиным (1977) была подробно изучена природа водорастворимых соединений железа и алюминия с гумусовыми кислотами дерново-подзолистых почв. Было установлено, что их константа устойчивости имеет минимум при pH 1,85-2,95 и 1,50-1,95 для железа и алюминия, соответственно. Следовательно, можно предполагать, что при снижении pH РОВ до 1-2 происходит разрушение соединений гумусовых кислот с металлами по следующему механизму:



Второе возможное объяснение - значительное изменение pH раствора при подкислении РОВ, что неизбежно сказывается на результатах гель-хроматографического анализа. Так, при увеличении концентрации протонов могут происходить следующие процессы:

- уменьшение заряда гумусовых кислот вследствие протонирования;
- увеличение сорбции гумусовых кислот на геле вследствие снижения их заряда;
- уменьшение размера молекул гумусовых кислот.

Все указанные процессы приводят к смещению пика на гель-хроматограмме в сторону больших объемов эксклюзии, что мы и наблюдали.

Появление дополнительного пика ($V_e=48$ мл) может быть объяснено так называемым солевым пиком, время выхода которого совпадает с выходом фосфатного буфера из колонки, который может быть представлен низкомолекулярными кислотами (De Nobili et al., 1989). Действительно, при введении пробы в соляной кислоте ($pH=2$) и элюировании фосфатным буфером ($pH=6,8$) можно предположить следующий механизм передвижения низкомолекулярных гумусовых кислот по колонке. Первоначально, пока они находятся в HCl, скорость их передвижения по колонке относительно низкая, т.к. отрицательный заряд молекул полностью скомпенсирован и отталкивания от частиц геля не происходит. При этом отрицательно заряженные хлорид-ионы передвигаются по колонке, несущей частичный отрицательный заряд, более быстро. Поэтому через определенное время низкомолекулярные гумусовые кислоты начинают отставать от соляной кислоты и попадают в буфер, где становятся отрицательно заряженными, т.е. скорость их движения возрастает вследствие электростатического отталкивания от частиц геля. В результате низкомолекулярные гумусовые кислоты снова оказываются в соляной кислоте. Таким образом, низкомолекулярные гумусовые кислоты в условиях, когда растворитель и элюент имеют разный состав, выходят из колонки на границе выхода растворителя.

Из гель-хроматограммы РОВ, не сорбирующегося на смоле Amberlite XAD-2 (рис. 3.3, гель-хроматограмма нРОВ), видно, что наибольшей степенью сорбции характеризовалось РОВ, относящееся к среднему (гумусовому) пику. Относительная площадь первого и последнего пика значительно увеличилась, тогда как среднего - уменьшилась. Массовые доли фракций с различными ММ для приведенных гель-хроматограмм даны в табл. 3.5.

Содержание фракций с различными ММ в растворах ОВ $\Pi_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ почвы на различных этапах выделения суммы ГК и ФК почвенного раствора

Препарат	Содержание фракций с различными ММ, %		
	16,5-42,0 КДа	1,7-16,5 КДа	0,1-1,7 КДа
ВВ	17	78	5
РОВ	19	77	4
пРОВ	19	65	16
нРОВ	34	38	28
ГК+ФК почвенного р-ра	5	83	12

На основании представленных гель-хроматограмм можно говорить о том, что только средний пик на гель-хроматограмме пРОВ (1,7-16,5 КДа) (рис. 3.3) отвечает гумусовым кислотам, так как он характеризуется поглощением при 254 нм и сорбцией на XAD-2. Так как площадь этого пика составляет приблизительно 65% от общего содержания ОС (табл. 3.5), то можно предполагать, что собственно гумусовые кислоты в исследованной нами почве составляли приблизительно 65 % от общего содержания РОВ. Эффективность амберлита XAD-2 для извлечения водорастворимых гумусовых кислот, рассчитанная как доля сорбировавшегося на нем пРОВ по известным концентрациям пРОВ и нРОВ, не превышала 40 %.

Таблица 3.6

Среднепиковые (M_p) и средневесовые (M_w) массы препаратов почвенного водорастворимого ОВ

Препарат	M_p , КДа			M_w , КДа		
	$\Pi_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$	$\Pi_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$	$\Pi_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$	$\Pi_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$	$\Pi_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$	$\Pi_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$
ВВ	7,6	7,1	9,6	18,5	16,1	15,7
РОВ	7,4	7,1	9,5	15,7	15,9	15,4
пРОВ	6,0	6,0	6,6	12,8	12,8	11,0
нРОВ	-	6,2	6,4	-	10,2	17,7
ГК+ФК почвенного р-ра	6,2	7,2	8,0	6,3	7,2	7,9
ФК	9,8	8,0	11,2	10,2	8,8	11,7
ГК	16,0	17,0	18,3	14,5	16,6	14,2

Доверительный интервал M_p и M_w составил ± 3 %.

Среднепиковые и средневесовые ММ водорастворимого ОВ на различных этапах выделения суммы ГК и ФК из почвенного раствора исследованных $\Pi^{\text{Д}}$ почв приведены в табл. 3.6. Для сравнения там же указаны характеристики ГК и

ФК, выделенных из этих почв стандартным способом с использованием щелочной экстракции.

Данные, приведенные в табл. 3.6, показывают, что при переходе от раствора ВВ к РОВ происходит небольшое уменьшение M_w за счет отделения коллоидного ОВ. При этом положение пика незначительно смещается в сторону меньших ММ. При подкислении РОВ до рН 2 M_w ОВ снижается на 3-4 КДа.

На основании близости значений M_p выделенных препаратов гумусовых кислот водной вытяжки и низкомолекулярного (гумусового) пика исходной водной вытяжки можно сделать вывод о том, что использованный в работе метод выделения позволяет получать препараты гумусовых кислот близких к реально существующим в почвенном растворе.

3.2.3. Распределение углерода в исследованных препаратах гумусовых кислот по данным ^{13}C ЯМР спектроскопии

Распределение углерода по основным структурным фрагментам исследовали методом количественной ^{13}C ЯМР спектроскопии. Условия регистрации спектров и диапазоны отнесений, использованные при интегрировании спектров, приведены в экспериментальной части. На основании полученных данных рассчитывали общее содержание алифатических ($\Sigma C_{\text{Alk}} = C_{\text{Alk-O}} + C_{\text{Alk-H,R}}$) и ароматических ($\Sigma C_{\text{Ar}} = C_{\text{Ar-O}} + C_{\text{Ar-H,R}}$) фрагментов. Кроме этого, было вычислено также отношение $\Sigma C_{\text{Ar}} / \Sigma C_{\text{Alk}}$, характеризующее степень ароматичности гумусовых кислот. Результаты приведены в табл. 3.7.

Как видно из табл. 3.7, максимальное содержание ароматических фрагментов было обнаружено в препаратах ГК углей, минимальное - в гумусовых кислотах природных вод и ОВ водного экстракта торфа. В ряду почвенных препаратов наибольшим содержанием ароматических фрагментов характеризовались препараты ГК черноземов, наименьшим - ФК П^Д почв. Наименьшее содержание карбоксильных групп и их производных наблюдали в препаратах гумусовых кислот торфов, наибольшее - в ФК почв. В ряду почвенных препаратов наибольшее содержание карбоксильных групп и алифатического углерода было характерно для ГК и ФК выделенных из П^Д_{ПАХ} почвы, что свидетельствует о значительном вкладе периферической части в их

структуру. По содержанию карбонильных фрагментов исследованные препараты не различались. Следует также отметить установленное значительное сходство распределения углерода в препаратах ФК и ГК, выделенных из одной и той же дерново-подзолистой почвы.

Таблица 3.7

Распределение углерода в структуре исследованных препаратов
гумусовых кислот

Препарат	Содержание углерода, % от общего С						Комбинированные ¹³ С ЯМР дескрипторы		
	C _{C=O}	C _{COO- H,R}	C _{Ar-O}	C _{Ar-H,R}	C _{Alk-O}	C _{Alk-H,R}	ΣC _{Ar}	ΣC _{Alk}	ΣC _{Ar} /ΣC _{Alk}
Гумусовые кислоты природных вод и водного экстракта торфа									
FMX2	2	19	11	25	19	24	36	43	0,84
HTW	0	11	3	13	58	15	39	46	0,85
ФК почв									
FBW1	4	20	12	22	18	25	34	43	0,79
FBP1	2	25	7	19	25	22	26	47	0,55
FBG1	3	18	13	28	19	18	41	37	1,11
ГК почв									
ГК дерново-подзолистых почв									
HBW	1	17	13	32	20	18	45	38	1,18
HBP	2	16	12	32	21	17	44	38	1,16
HVG	1	15	13	33	21	17	46	38	1,21
HBW1	4	20	9	24	14	26	33	40	0,83
HBP1	3	21	7	19	25	25	26	50	0,52
HVG1	2	19	11	31	14	23	42	37	1,14
ГК серых лесных почв									
HGW	1	19	13	34	16	17	47	33	1,42
HGP	3	14	12	34	18	19	46	37	1,24
ГК черноземов									
HS	2	14	9	48	14	14	57	28	2,04
HST	3	15	11	43	15	13	54	28	1,93
SEL	1	18	13	32	22	14	45	36	1,25
Гумусовые кислоты торфов									
HTL	2	15	14	31	20	17	45	17	2,65
TTL	3	15	13	32	20	17	45	17	2,65
T4	1	16	12	31	24	16	43	16	2,69
H8	2	16	18	37	13	13	55	13	4,23
HTO	3	13	13	31	24	16	44	40	1,10
ГК бурых углей									
AGK	1	17	10	48	4	21	58	21	2,76
RHA	3	18	18	48	3	11	66	14	4,71

3.2.4. Содержание кислотных групп в препаратах гумусовых кислот

Содержание кислотных групп является важной характеристикой гумусовых кислот. Кислотные свойства гумусовых кислот имеют особое значение для их адсорбции на минералах (Greenland, 1971; Inoue and Wada, 1971; Kaiser and Zech, 1997). Поэтому во всех препаратах гумусовых кислот, использованных для получения адсорбционных комплексов с каолинитом, было определено содержание кислотных групп методом потенциометрического титрования (Georgi, 1998; Masine et al., 1998). Результаты приведены в табл. 3.8.

Таблица 3.8

Содержание кислотных групп в исследованных препаратах гумусовых кислот

Препарат	COOH	ArOH мг-экв/г	Общая кислотность
ГК болотных вод			
HO13HA	3,05	2,22	5,27
ФК почв			
FBW1	3,4	1,2	4,6
FBG1	3,3	1,1	4,3
ГК почв			
HBW	3,4	0,2	3,6
HBW1	2,9	0,3	3,1
HS	3,3	0,2	3,6
HST	3,8	0,4	4,2
ГК торфов			
НТО	1,6	1,0	2,5
Н8	2,5	0,6	3,1
ГК бурых углей			
RHA	3,4	2,0	5,4
AGK	3,4	0,2	3,6

Как видно из табл. 3.8, минимальное содержание карбоксильных групп (1,6 и 2,5 мг-экв/г) было обнаружено в препаратах ГК торфов, остальные препараты характеризовались сходным содержанием COOH-групп (2,9-3,8 мг-экв/г). Максимальное содержание фенольных групп было зафиксировано в ФК, минимальное - в ГК почв. Наибольшая общая кислотность была характерна для препарата ГК бурого угля RHA, наименьшая - для препарата ГК торфа НТО. Как следует из представленных данных, отчетливой взаимосвязи между общей кислотностью препаратов и источником их происхождения не наблюдалось. По-видимому, причиной этого является недоопределение фенольных гидроксидов

вследствие использования прямого потенциометрического титрования в водной среде (Piccolo and Camaci, 1990).

3.2.5. Классификация исследованных препаратов гумусовых кислот с помощью кластерного анализа

Как видно из табл. 3.2, 3.4 и 3.7, исследованные препараты гумусовых кислот различного происхождения значительно различались по элементному составу, молекулярным массам и структурным характеристикам. Для выявления групп препаратов, обладающих набором сходных признаков, использовали кластерный анализ, который применяли к блоку данных по элементному составу и средневесовым молекулярным массам. Выбор этих структурных параметров был обусловлен тем, что соответствующие данные были получены для всех исследованных препаратов. Кластерный анализ позволил выделить 4 класса препаратов со сходными свойствами (рис. 3.4).

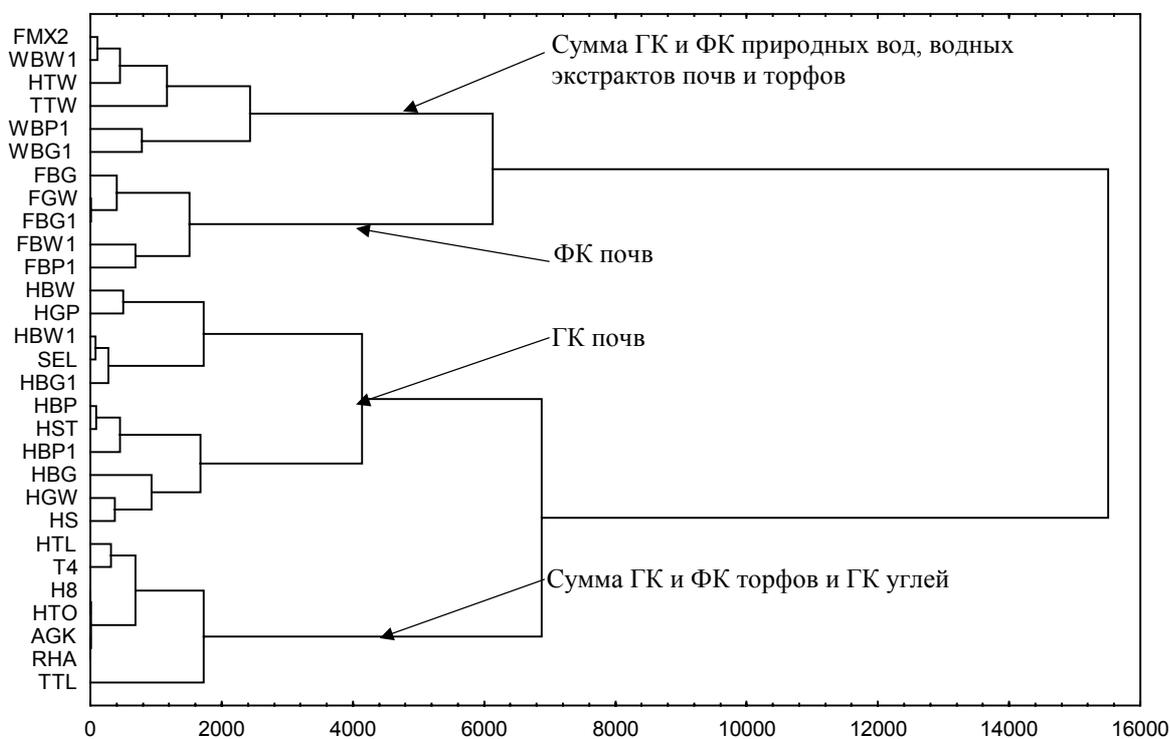


Рис. 3.4. Распределение препаратов гумусовых кислот по классам на основе кластерного анализа.

Как видно из рис. 3.4, распределение по классам в основном отражает различия входящих в них препаратов гумусовых кислот по источнику

происхождения и соотношению ГК:ФК. В связи с этим в дальнейшей работе было уделено внимание специфике связывания и детоксикации атразина гумусовыми кислотами, присущей не только индивидуальным препаратам гумусовых кислот, но и их классам, приведенным на рис. 3.4.

3.3. ПОЛУЧЕНИЕ АДСОРБЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ С КАОЛИНИТОМ

В почвенном профиле подавляющая часть гумусовых кислот находится не в растворенном, а в адсорбированном на минералах состоянии (Орлов, 1993). Поэтому для исследования роли гумусовых кислот в связывании атразина почвой необходимо было провести соответствующие модельные эксперименты по связыванию атразина на адсорбционных комплексах гумусовых кислот с глинистыми минералами. Получению таких комплексов предшествовало всестороннее исследование адсорбционного поведения выделенных препаратов гумусовых кислот по отношению к каолиниту. Выбор данного минерала был обусловлен тем, что он является представителем группы глинистых алюмосиликатов, составляющих значительную часть илистых и коллоидных фракций почв (Орлов, 1992).

Изотермы адсорбции на каолините были получены для 11 препаратов гумусовых кислот. Для этого раствор гумусовых кислот в 0,1 М NaCl приливали к навеске каолинита, предварительно насыщенного натрием. Полученную суспензию встряхивали в течение 12 часов, центрифугировали и измеряли оптическую плотность супернатанта при 240 нм для спектрофотометрического определения равновесной концентрации гумусовых кислот в растворе. Количество гумусовых кислот, адсорбированных на каолините, определяли по разности общей и равновесной концентраций. Полученные данные использовали для построения изотермы адсорбции гумусовых кислот (рис. 3.5). Изотермы сорбции препаратов, не приведенных на рисунке, даны в Приложении 3.

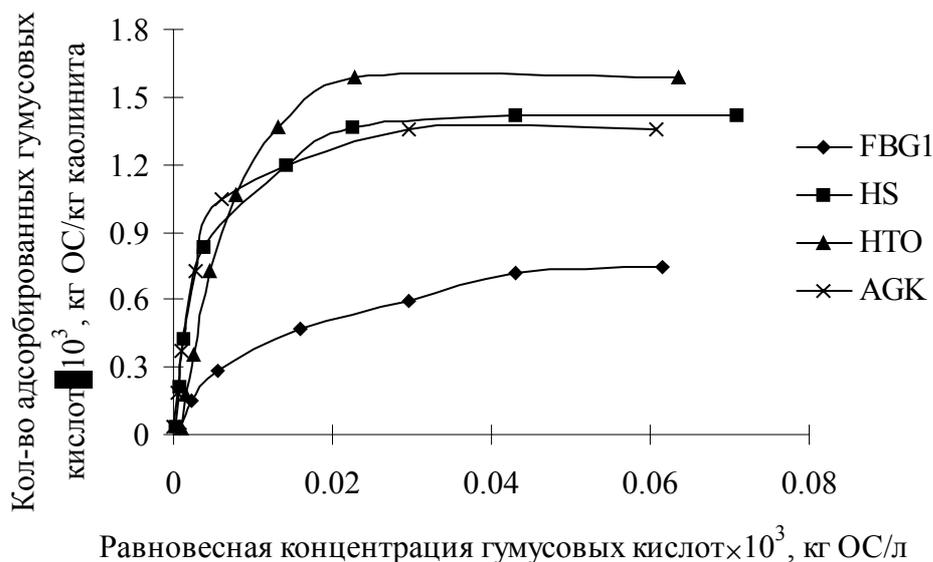


Рис. 3.5. Типичные изотермы адсорбции гумусовых кислот различного происхождения на каолините.

Как видно из рисунка, наименьшей адсорбционной емкостью по отношению к каолиниту характеризовались ФК, а наибольшей - ГК торфа. ГК бурого угля и почв занимали промежуточное положение. Для количественной оценки адсорбции гумусовых кислот на каолините изотермы аппроксимировали уравнением Ленгмюра, позволяющего рассчитать константу адсорбции (K) и максимальную адсорбцию гумусовых кислот на каолините (b):

$$\text{[Blank Box]} \quad (3.4)$$

где HS_{ads} и $[HS]$ - количество адсорбированных гумусовых кислот (кг ОС/кг каолинита) и их равновесная концентрация (кг ОС/л), соответственно. Вычисленные значения параметров адсорбции приведены в табл. 3.9.

В связи с тем, что для проведения экспериментов по взаимодействию атразина с адсорбционными комплексами гумусовых кислот необходимо было получить комплексы с прочно связанными гумусовыми кислотами, т. е. недесорбирующимися в условиях эксперимента, то для всех препаратов были получены соответствующие изотермы десорбции (рис. 3.6). Десорбцию проводили, приливая к навеске адсорбционного комплекса аликвотную часть раствора 0,1 М NaCl. Содержание десорбированных гумусовых кислот определяли через 12 часов спектрофотометрически. Процедуру повторяли 8-кратно, до достижения постоянной оптической плотности раствора.

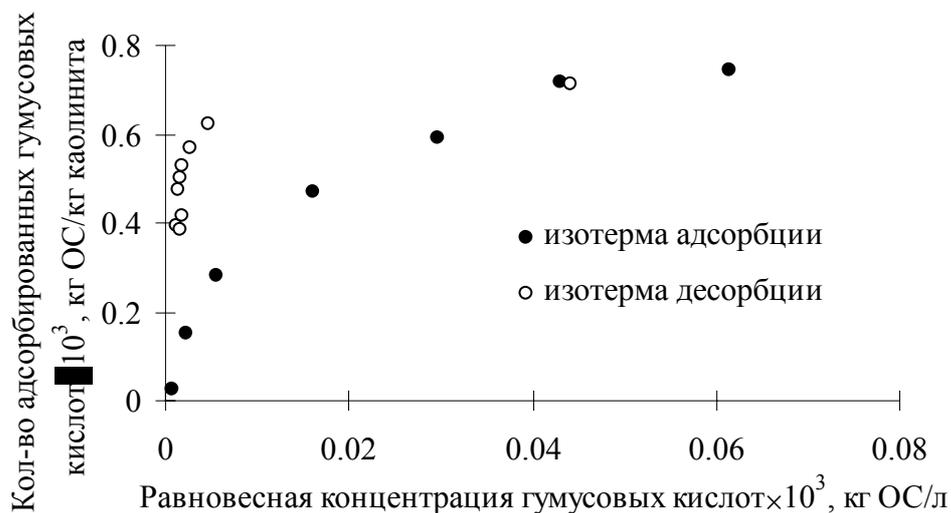


Рис. 3.6. Типичные изотермы адсорбции-десорбции гумусовых кислот на каолините

Как видно из рис. 3.6, адсорбция гумусовых кислот на каолините является лишь частично обратимой. Для расчета основной количественной характеристики обратимости адсорбции - коэффициента гистерезиса N , соответствующие изотермы адсорбции и десорбции гумусовых кислот на каолините аппроксимировали уравнением Фрейндлиха:

$$HS_{ads} = k \times [HS]^n \quad (3.5)$$

где k и n - константы. Коэффициент гистерезиса N (Jamet, 1993) рассчитывали как отношение степенных показателей уравнений изотерм Фрейндлиха:

$$N = \frac{n_f}{n_{fd}} \quad (3.6)$$

где n_f и n_{fd} коэффициенты уравнения Фрейндлиха для изотерм адсорбции и десорбции, соответственно. Полученные значения N приведены в табл. 3.9.

Результирующим показателем различного адсорбционно-десорбционного поведения гумусовых кислот является содержание органического углерода (ОС) в адсорбционном комплексе с каолинитом после проведения десорбции. Его измеряли путем отжига лиофильно высушенных комплексов в воздушно-сухом состоянии (после экспериментов по десорбции) в кварцевой трубке при $t = 900^\circ\text{C}$. Результаты приведены в табл. 3.9.

Основные характеристики адсорбционно-десорбционного поведения гумусовых кислот на каолините

Препарат	$K \times 10^{-3}$, л/кг ОС	b, г ОС/кг каолинита	H	кол-во прочно связанных гумусовых кислот, г ОС/кг каолинита
ГК болотных вод				
HO13HA	0,29	1,12	4,9	1,20
ФК почв				
FBW1	0,07	0,92	2,3	0,56
FBG1	0,09	0,89	2,1	0,57
ГК почв				
ГК дерново-подзолистых почв				
HBW	0,11	2,16	11,1	1,40
HBW1	0,18	2,40	12,7	1,51
ГК черноземов				
HS	0,26	1,55	5,2	1,36
HST	0,31	1,49	3,9	1,39
ГК торфов и бурых углей				
ГК торфов				
HTO	0,11	2,21	12,4	1,65
H8	0,19	1,80	9,0	1,77
ГК бурых углей				
AGK	0,36	1,49	1,2	1,31
RHA	0,15	1,80	2,2	1,28

Доверительный интервал ($P=95\%$) для K и b составил $\pm 5\%$, для ОС $\pm 3\%$.

Как видно из табл. 3.9, по величине максимальной адсорбции b на каолините исследованные препараты гумусовых кислот образуют следующий ряд: ФК почв < ГК черноземов < ГК торфов и углей < ГК П^Д почв. По значениям K препараты располагаются в несколько иной последовательности: ФК почв < ГК торфов < ГК П^Д почв и углей < ГК черноземов, т.е. увеличение константы адсорбции не всегда сопровождается возрастанием b .

По величине гистерезиса изученные препараты можно расположить в следующий ряд: ФК почв \approx ГК бурых углей < ГК черноземов < ГК торфов \approx ГК П^Д почв.

Количество прочно связанных гумусовых кислот возрастало в следующем ряду: ФК почв < ГК бурых углей < ГК черноземов < ГК П^Д почв < ГК торфов.

Как видно из табл. 3.9, препараты гумусовых кислот разных классов обладали различными особенностями адсорбционно-десорбционного поведения. Так, ГК бурых углей, несмотря на значительную адсорбцию на каолините, относительно легко десорбировались с минерала. ГК П^Д почв характеризовались высокими значениями как максимальной адсорбции b , так и коэффициента гистерезиса H . Таким образом, на основании использованных параметров

адсорбции трудно дать однозначную оценку средства классов гумусовых кислот к каолиниту. В целом можно говорить, что средство гумусовых кислот к каолиниту количественно характеризуется тремя показателями: константой адсорбции K , величиной максимальной сорбции b и коэффициентом гистерезиса H . Чем выше значения этих показателей, тем большим средством к каолиниту обладают те или иные гумусовые кислоты. 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 (Дэвис, 1990). Максимальным значениям K , b и H были присвоены новые значения, равные единице, а минимальным - ноль. Далее для каждого препарата гумусовых кислот были рассчитаны новые безразмерные параметры K_i , b_i и H_i , укладывающиеся в диапазон от 0 до 1. Суммарный индекс, отражающий средство гумусовых кислот к каолиниту, вычисляли на основании следующего уравнения:

$$I = \sqrt{K_i^2 + b_i^2 + H_i^2} \quad (3.7)$$

Результаты представлены в табл. 3.10.

Таблица 3.10

Средство гумусовых кислот к каолиниту

Препарат	K_i	b_i	H_i	I	среднее I
<i>ГК болотных вод</i>					
HOI3HA	0,07	0,93	0,25	0,96	-
<i>ФК почв</i>					
FBW1	0,06	0,00	0,08	0,10	0,10
FBG1	0,00	0,07	0,07	0,09	
<i>ГК почв</i>					
<i>ГК дерново-подзолистых почв</i>					
HBW	1,00	0,15	0,80	1,29	1,30
HBW1	0,97	0,48	0,73	1,30	
<i>ГК черноземов</i>					
HS	0,35	0,78	0,62	1,06	1,08
HST	0,32	0,98	0,41	1,11	
<i>ГК торфов и бурых углей</i>					
<i>ГК торфов</i>					
HTO	0,97	0,17	1,00	1,40	1,23
H8	0,76	0,41	0,59	1,05	
<i>ГК бурых углей</i>					
AGK	0,48	1,00	0,00	1,11	0,89
RHA	0,57	0,34	0,07	0,66	

Как видно из табл. 3.10, по сродству к каолиниту изученные препараты гумусовых кислот можно расположить в следующий ряд: ФК П^Д почв < ГК бурых углей < ГК черноземов < ГК П^Д почв.

О наличии взаимосвязи между свойствами гумусовых кислот (табл. 3.2, 3.4, и 3.7) и параметрами их адсорбции (табл. 3.9) судили на основании корреляционного анализа. Результаты приведены в табл. 3.11. Жирным шрифтом отмечены значения коэффициентов корреляции, превышающие табличные ($P=95\%$, $n = 11$).

Таблица 3.11

Корреляционная взаимосвязь между свойствами препаратов гумусовых кислот и параметрами их адсорбции на каолините

	b	K	H	Кол-во прочно связанных гумусовых кислот	I
b	1,00	-0,18	0,76	0,79	0,76
K	-0,18	1,00	-0,15	0,33	0,44
H	0,76	-0,15	1,00	0,69	
Кол-во прочно связанных гумусовых кислот	0,79	0,33	0,69	1,00	0,90
I					1,00
H/C	0,35	-0,62	0,15	0,00	-0,12
O/C	0,00	-0,66	-0,18	-0,03	-0,39
N/C	0,20	-0,11	0,56	0,06	0,23
Зольность	0,39	0,02	-0,01	0,08	0,31
M _w	0,72	0,21	0,77	0,81	0,89
C _{C=O}	-0,28	-0,30	-0,09	-0,31	-0,39
C _{COOH}	-0,03	-0,40	-0,35	-0,43	-0,47
C _{Ar-O}	0,04	-0,10	-0,19	0,22	-0,14
C _{Ar-H,R}	0,10	0,45	-0,12	0,39	0,25
C _{Alk-O}	0,04	0,06	0,49	0,16	0,34
C _{Alk-H,R}	0,00	-0,21	-0,07	-0,37	-0,14
ΣC _{Ar}	0,09	0,34	-0,15	0,38	0,17
ΣC _{Alk}	0,03	-0,07	0,36	-0,08	0,19
ΣC _{Ar} /ΣC _{Alk}	0,04	0,09	-0,32	0,17	-0,09
COOH	-0,57	0,36	-0,53	-0,51	-0,33
ArOH	-0,41	-0,66	-0,38	-0,58	-0,70
Общая кислотность	-0,81	-0,05	-0,75	-0,83	-0,75

Как видно из табл. 3.11, нами была установлена взаимосвязь между парами переменных " $\Sigma C_{Ag} - K$ " ($r = 0,66$) и " $M_w - b$ " ($r = 0,72$), что согласуется с результатами предыдущих исследователей (Murphy et al., 1992). Полученные результаты указывают на то, что по мере возрастания содержания ароматических фрагментов и молекулярной массы гумусовых кислот становится более энергетически выгодным их переход из растворенного в адсорбированное состояние. Следовательно, можно ожидать, что адсорбция высокомолекулярных фракций гумусовых кислот будет предпочтительной. Для проверки этого предположения были измерены M_w четырех препаратов гумусовых кислот до их адсорбции на каолините (т.е. в растворе гумусовых кислот перед добавлением к каолиниту) и после (т.е. в супернатанте спустя 12 часов после начала эксперимента). Результаты приведены в табл. 3.12.

Таблица 3.12

M_w препаратов гумусовых кислот до и после адсорбции на каолините				
Препарат	M_w до адсорбции, КДа	M_w после адсорбции,		
		КДа	% от начальной	
FBW1	9,1	8,5	93	
HST	12,7	11,2	88	
RHA	16,4	14,5	88	
AGK	13,6	13,2	97	

Доверительный интервал ($P=95\%$) для M_w составил $\pm 3\%$.

Данные, приведенные в таблице, подтверждают высказанное предположение. Во всех случаях после адсорбции средневесовая молекулярная масса уменьшилась на 3-12 %.

Кроме молекулярной массы, при адсорбции гумусовых кислот на каолините значительную роль играет также содержание в них кислорода и кислотных групп. Установленная отрицательная корреляция для пар переменных "O/C - K" ($r = -0,66$) и "общая кислотность - b" ($r = -0,81$) согласуется с существующими данными (Murphy et al., 1992) и свидетельствует о том, что в выбранных нами условиях адсорбция гумусовых кислот на каолините в значительной мере определялась гидрофильно-гидрофобным балансом гумусовых кислот, в то время как связывание по механизму образования металлических или водных мостиков отсутствовало. При этом можно ожидать, что увеличение

гидрофильности гумусовых кислот происходит вследствие возрастания содержания кислотных групп, т.е. чем больше общая кислотность гумусовых кислот, тем меньше их адсорбция на каолините. Использование в качестве насыщающего катиона одновалентного Na^+ определило невозможность адсорбции гумусовых кислот по механизму образования металлических мостиков.

На основании корреляционного анализа нами было также установлено, что с ростом M_w необратимость адсорбции гумусовых кислот на каолините (коэффициент H) возрастает ($r=0,77$). При этом содержание прочно связанных гумусовых кислот коррелировало с M_w гумусовых кислот ($r=0,81$), коэффициентом гистерезиса H ($r=0,69$) и максимальной адсорбцией b ($r=0,79$). Средство гумусовых кислот к каолиниту (показатель I) также увеличивается с ростом M_w гумусовых кислот ($r=0,89$). На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что молекулярная масса гумусовых кислот в значительной мере определяет их адсорбционное поведение по отношению к каолиниту.

Полученные адсорбционные комплексы каолинита с прочно связанными гумусовыми кислотами в дальнейшем были использованы для проведения экспериментов по связыванию атразина.

Таким образом, проведенные исследования адсорбции гумусовых кислот на каолините показали следующее:

- адсорбция гумусовых кислот на каолините возрастает с увеличением M_w гумусовых кислот и убывает с увеличением содержания кислородсодержащих функциональных групп;
- адсорбция гумусовых кислот на каолините обратима; коэффициент гистерезиса возрастает с увеличением M_w гумусовых кислот;
- адсорбция гумусовых кислот на каолините избирательная, при этом происходит поглощение более высокомолекулярных фракций гумусовых кислот;
- количество прочно связанных на каолините гумусовых кислот возрастает с увеличением M_w и уменьшением общей кислотности гумусовых кислот.

3.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АТРАЗИНА С ГУМУСОВЫМИ КИСЛОТАМИ

3.4.1. Взаимодействие атразина с растворенными гумусовыми кислотами

Проведение экспериментов по связыванию атразина гумусовыми кислотами проводили при следующих условиях: $C_A = 1 \times 10^{-5}$ М; $C_{HS} = (1,5 - 6,5) \times 10^{-4}$ кг ОС/л; рН 5,5; время взаимодействия - 24 часа. Определение несвязанного атразина, прошедшего через мембранный фильтр, осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием УФ-детекции при 220 нм.

Константу связывания атразина гумусовыми кислотами рассчитывали как тангенс угла наклона зависимости ($C_A/[A]$) от концентрации гумусовых кислот (Глава 1.2.2). Типичные графики указанной зависимости для исследованных препаратов гумусовых кислот приведены на рис. 3.7.

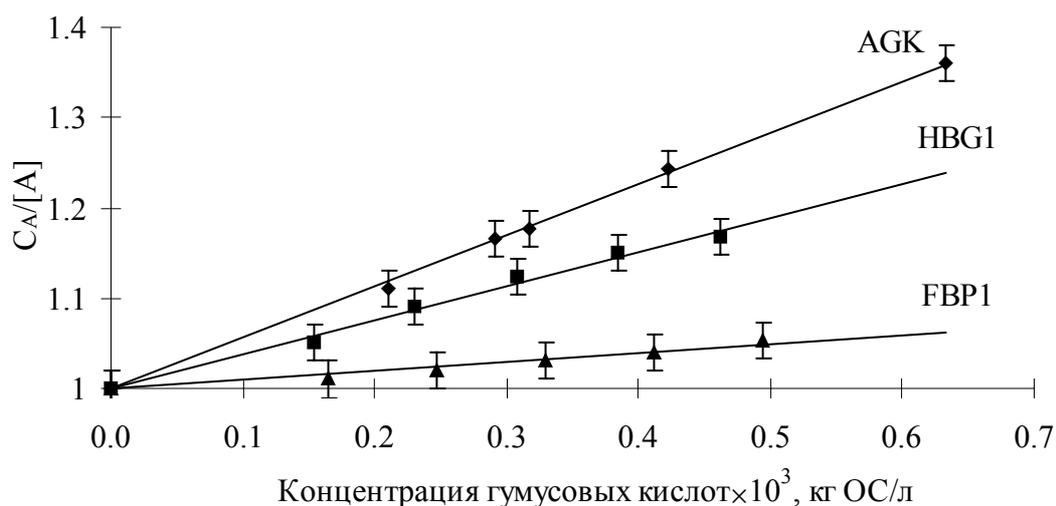


Рис. 3.7. Типичные графики зависимости $C_A/[A]$ от концентрации гумусовых кислот

Как видно из рис. 3.7, исследованные препараты гумусовых кислот обладали различной связывающей способностью по отношению к атразину. Об этом же свидетельствуют полученные значения K_{OC} (табл. 3.13). Для большей наглядности полученных результатов на основании известных K_{OC} рассчитывали количество атразина, связанного с гумусовыми кислотами (в расчете на кг ОС). Количество связанного атразина (S) при максимальных использованных концентрациях гумусовых кислот ($(3 - 7) \times 10^{-4}$ кг ОС/л) приведено в табл. 3.13.

Рассчитанные константы взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами находятся в пределах 87-575 л/кг ОС, что хорошо согласуется с

существующими литературными данными и свидетельствует о незначительном взаимодействии атразина с гумусовыми кислотами в выбранных условиях. Максимальное количество связанного атразина составило 0,90 мг/кг ОС, что также соответствует существующим литературным данным (Глава 1.2.2).

Таблица 3.13

Константы связывания (K_{OC}) и количество связанного атразина (S) при максимальных использованных концентрациях гумусовых кислот $(3-7) \times 10^{-4}$ кг ОС/л

Препарат	K_{OC} , л/кг ОС	S , г/кг ОС	Препарат	K_{OC} , л/кг ОС	S , г/кг ОС
ОВ водного экстракта торфа			ГК почв		
НТW	87	0,17	ГК дерново-подзолистых почв		
ФК почв			НВW	380	0,63
FBW1	192	0,49	НВG	400	0,68
FBP1	110	0,21	НВW1	281	0,50
FBG1	275	0,49	НВP1	181	0,34
Сумма ГК и ФК торфов			НВG1	380	0,65
НТО	300	0,51	ГК серых лесных почв и черноземов		
T4	377	0,62	НГW	575	0,90
ГК бурого угля			НСТ	404	0,63
АGК	575	0,75	НС	501	0,75
			SEL	444	0,72

Доверительный интервал ($P=95\%$) для величин K_{OC} и S составил $\pm 6\%$.

Как видно из табл. 3.13, наибольшей связывающей способностью по отношению к атразину обладал препарат ГК угля, а наименьшей - ОВ водного экстракта торфа. Среди ряда почвенных препаратов наименьшие значения K_{OC} были получены для ФК, наибольшие - для ГК черноземов и промежуточные - для ГК П^Д почв. Полученные значения K_{OC} для трех пар ГК и ФК, выделенных из одной почвы, показывают, что ГК в целом обладают большим сродством к атразину, чем ФК. В тоже время большее сходство в связывающей способности наблюдали для ГК и ФК из одной почвы, чем для ГК или ФК из разных почв. Так ГК и ФК из огородной дерново-подзолистой почвы (НВG1 и FBG1) показали более высокую связывающую способность по сравнению с ГК и ФК, выделенными из дерново-подзолистой почвы под лесом (НВW1 и FBW1). ГК и ФК дерново-подзолистой полевой почвы (НВP1 и FBP1) обладали наименьшим сродством к атразину в ряду изученных дерново-подзолистых почв.

Полученные значения K_{OC} использовали для выявления взаимосвязи между связывающей способностью и структурой гумусовых кислот (табл. 3.7). Корреляционный анализ показал наличие связи между K_{OC} и двумя

взаимозависимыми параметрами, характеризующими степень ароматичности гумусовых кислот. Коэффициенты корреляции для пар переменных " $\Sigma C_{Ar} - K_{OC}$ " и " $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk} - K_{OC}$ " составили 0,91 и 0,87, соответственно. Точечная диаграмма, соответствующая полученному коэффициенту корреляции для пары переменных " $\Sigma C_{Ar} - K_{OC}$ ", представлена на рис. 3.8. Наличие данной взаимосвязи подтверждает важную роль ароматических фрагментов гумусовых кислот в процессе связывания атразина. Коэффициент корреляции между M_w препаратов гумусовых кислот и K_{OC} составил 0,73 (рис. 3.9). Это может свидетельствовать о преимущественном связывании атразина с более высокомолекулярными фракциями гумусовых кислот, что отмечалось ранее другими исследователями (Wang et al., 1990).

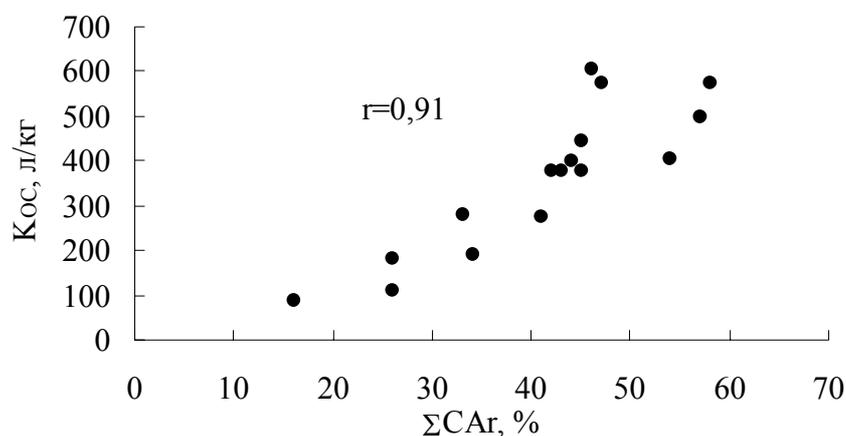


Рис. 3.8. Корреляционное поле для пары переменных " $\Sigma C_{Ar} - K_{OC}$ ".

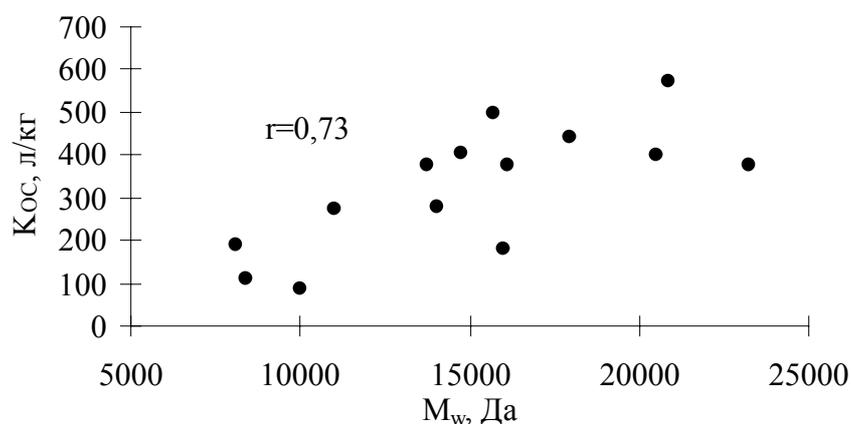


Рис. 3.9. Корреляционное поле для пары переменных " $M_w - K_{OC}$ ".

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что степень ароматичности и молекулярная масса гумусовых кислот определяют их

реакционную способность по отношению к атразину. Их совместное влияние показано на рис. 3.10.

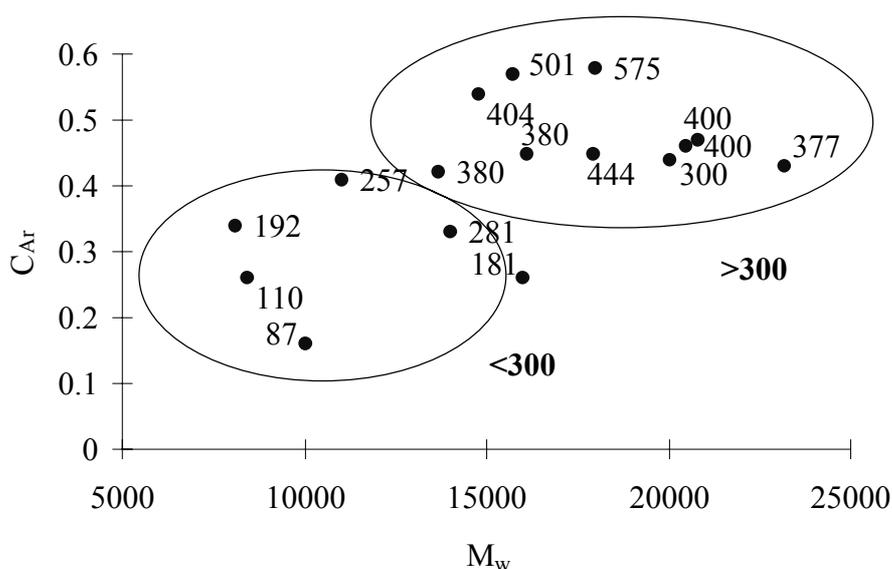


Рис. 3.10. Взаимосвязь между K_{OC} атразина гумусовыми кислотами, содержанием ароматических фрагментов и M_w .

Как видно из рис. 3.10, при увеличении M_w и содержания C_{Ar} в препаратах гумусовых кислот их связывающая способность по отношению к атразину также возрастает.

Зависимость константы связывания атразина гумусовыми кислотами от степени их ароматичности подтверждает предположения о важной роли донорно-акцепторного механизма и, в частности, π - π взаимодействия (т.е. непосредственное перекрывание орбиталей ароматических колец гумусовых кислот и двойных связей триазинового кольца атразина) в процессе связывания атразина гумусовыми кислотами (Müller-Wegener, 1977; Müller-Wegener and Ziechmann, 1980). Электрон-ненасыщенные хиноноподобные фрагменты в молекулах гумусовых кислот могут принимать электрон от обогащенных электронами фрагментов в молекуле атразина (атомы азота в амино группы и/или гетероцикле) (Senesi, 1992).

Однако установленная нами зависимость реакционной способности гумусовых кислот по отношению к атразину от их обогащенности ароматическими фрагментами противоречит данным некоторых исследователей, полагающих маловероятным взаимодействие гумусовых кислот с атразином по донорно-акцепторному механизму. Так, Уанг и др. (Wang et al., 1992) предположили в качестве механизма взаимодействия гумусовых кислот с

атразином водородное и гидрофобное связывание. По мнению Салливана и Фелбека (Sullivan and Felbeck, 1968), наиболее вероятными механизмами взаимодействия являются образование водородных связей или же протонный перенос между атразином и карбоксильными и фенольными группами гумусовых кислот. Вебер и др. (Weber et al., 1969), основываясь на данных, что максимальная адсорбция атразина гумусовыми кислотами наблюдается при значениях pH, близких к pK_a атразина, высказали гипотезу, что атразин протонируется при низких значениях pH и в последствие может участвовать в реакциях ионного обмена с протонами фенольных и гидроксильных групп гумусовых кислот. Эта гипотеза подтверждается данными Сенези и Тестини (Senesi and Testini, 1982), которые методом ИК-спектроскопии показали образование связи между атразином и гумусовыми кислотами по ионно-обменному механизму. При этом сначала в молекуле атразина протонируются вторичные аминогруппы, а затем атразин в виде катиона может вступать в реакции обмена с протонами карбоксильных и фенольных групп гумусовых кислот.

На основании предложенных механизмов взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами логично было бы предположить наличие зависимости K_{OC} от общей кислотности молекулах гумусовых кислот. Однако проведенный нами корреляционный анализ не выявил такой связи ($r = -0,25$). Возможное объяснение наблюдаемого разногласия заключается в поведении атразина в выбранных нами условиях проведения экспериментов. Протонирование атразина при значениях pH, превышающих значение pK_a атразина (приблизительно 1,7) на 2 и более единицы, крайне незначительно (Devitt and Weisner, 1998). Таким образом, взаимодействие атразина по ионообменному механизму возможно лишь при значениях pH раствора, меньших 3,7, в то время как pH в наших экспериментах был равен 5,5. Это делает взаимодействие по механизму ионного обмена весьма маловероятным в выбранных нами условиях.

Таким образом, проведенные нами эксперименты показали:

- связывание атразина растворенными гумусовыми кислотами весьма слабое: значения K_{OC} не превышают 585 л/кг ОС;
- установленная корреляционная взаимосвязь между содержанием ароматических фрагментов в гумусовых кислотах и их связывающей

способностью по отношению к атразину свидетельствует, что возможным механизмом взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами является донорно-акцепторный, в частности, π - π взаимодействие.

3.4.2. Связывание атразина адсорбционными комплексами гумусовых кислот с каолинитом

Оценку связывающей способности полученных адсорбционных комплексов гумусовых кислот по отношению к атразину проводили по методу адсорбционных изотерм. Для этого к навеске адсорбционного комплекса приливали раствор атразина с концентрациями $(2 - 20) \times 10^{-6}$ М, полученную суспензию встряхивали в течение 12 часов и центрифугировали. В супернатанте методом обращенно-фазовой ВЭЖХ определяли равновесную концентрацию атразина. Количество адсорбированного атразина рассчитывали по разнице общей и равновесной концентраций. Типичные изотермы адсорбции атразина на каолините и адсорбционном комплексе каолинит-гумусовые кислоты приведены на рис. 3.11.

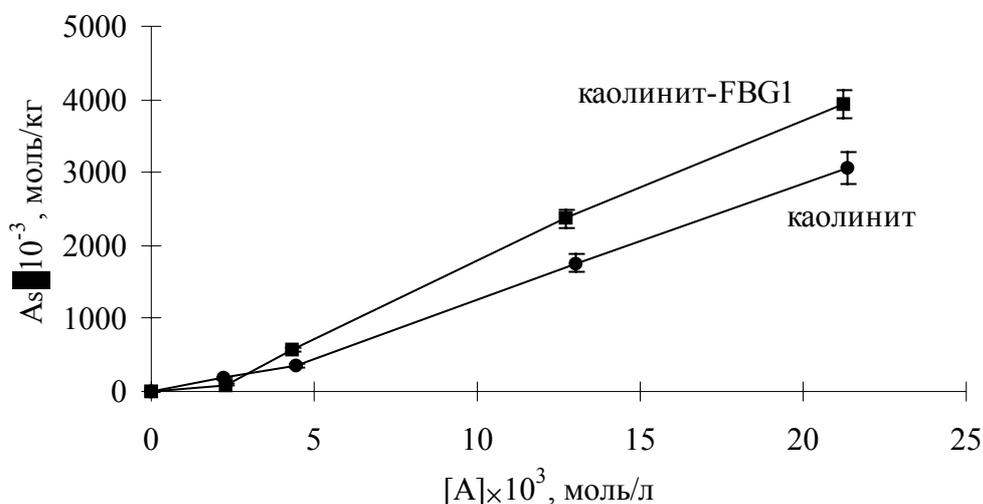


Рис. 3.11. Типичные изотермы адсорбции атразина на каолините и адсорбционном комплексе каолинит-гумусовые кислоты.

Линейность полученных изотерм во всем диапазоне использованных концентраций атразина свидетельствует, что полученные зависимости принадлежат к начальному участку изотермы, где она может быть описана уравнением (1.19). Поэтому K_d рассчитывали как тангенс угла наклона изотермы адсорбции атразина (Глава 1.2.2). При расчете константы связывания атразина с

адсорбированными гумусовыми кислотами проводили нормирование K_d на содержание ОС в адсорбционном комплексе:

$$K_{OC}^* = \frac{K_d}{OC, \%} \times 100, \quad (1.20)$$

где K_{OC}^* - константа связывания атразина с адсорбированными гумусовыми кислотами, а $OC, \%$ - содержание органического углерода в адсорбционном комплексе. Полученные значения K_{OC}^* приведены в табл. 3.14.

Для оценки обратимости адсорбции были получены изотермы десорбции атразина с адсорбционных комплексов гумусовых кислот с каолинитом, на основании которых рассчитывали коэффициент гистерезиса Н и количество прочно связанного атразина (Глава 1.2.2). Результаты приведены в табл. 3.14.

Таблица 3.14

Параметры адсорбции и десорбции атразина на каолините и адсорбционных комплексах каолинит-гумусовые кислоты

Препарат	Адсорбция		Н	Кол-во прочно связанного атразина, г/кг ОС
	K_d , л/кг	$K_{OC}^* \times 10^4$, л/кг ОС		
Каолинит				
	172	-	1,21	0
Адсорбционные комплексы каолинита с гумусовыми кислотами				
ГК болотных вод				
HO13HA	207	9,06	9,24	2,33
ФК почв				
FBW1	193	11,7	8,30	4,79
FBG1	194	11,7	5,90	4,49
ГК почв				
ГК дерново-подзолистых почв				
HBW	222	8,84	7,17	5,65
HBW1	209	7,93	5,73	1,64
ГК черноземов				
HS	216	8,84	5,93	2,03
HST	217	8,86	7,76	2,68
ГК торфов и бурых углей				
ГК торфов				
НТО	220	8,04	2,31	1,21
Н8	206	7,21	3,19	1,04
ГК бурых углей				
AGK	228	9,62	7,18	3,54
RHA	248	10,3	5,40	1,80

Доверительный интервал ($P=95\%$) для K_d , K_{OC}^* составил $\pm 5\%$.

Как видно из таблицы, величины K_d адсорбционных комплексов гумусовых кислот с каолинитом во всех случаях превышали таковую для чистого минерала. Подобный эффект был отмечен предыдущими исследователями по отношению как к атразину (Celis et al., 1998), так и к другим органическим пестицидам (Murphy et al., 1990; Murphy et al., 1992). При этом увеличение связывающей способности адсорбционных комплексов объясняют гидрофобизацией поверхности минералов при адсорбции на них гумусовых кислот. Кроме того, адсорбированные гумусовые кислоты являются дополнительным источником H^+ для протонирования атразина, что может приводить к возрастанию адсорбции атразина по механизму ионного обмена.

Комплексы с адсорбированными ФК почв обладали минимальными значениями K_d , а с ГК бурого угля - максимальными. Адсорбционные комплексы с ГК почв и торфов занимали промежуточное положение. Наличие тесной корреляции между K_d и показателями степени ароматичности гумусовых кислот ΣC_{Ar} и $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ ($r = 0,76$ и $0,74$, соответственно) свидетельствует об участии ароматических фрагментов гумусовых кислот во взаимодействии атразина с адсорбционными комплексами гумусовых кислот с каолинитом. В качестве возможного механизма связывания можно предполагать гидрофобное взаимодействие (Laird, 1996; Celis et al., 1997).

По значениям K_{OC}^* исследованные препараты гумусовых кислот в адсорбированном на каолините состоянии образуют следующий ряд: ГК торфов < ГК почв \approx ФК почв < ГК бурых углей. При этом данная последовательность отличается от таковой для тех же препаратов гумусовых кислот в растворенном состоянии, составленной по значениям K_{OC} , что свидетельствует о различных механизмах взаимодействия атразина с гумусовыми кислотами в растворенном и адсорбированном состоянии. Дополнительным подтверждением этого является отсутствие взаимосвязи между K_{OC}^* и ΣC_{Ar} отмеченное ранее для K_{OC} , при наличии тесной корреляции с общей кислотностью гумусовых кислот ($r = 0,85$), не обнаруженной для растворенных гумусовых кислот. На основании полученных данных можно высказать предположение, что связывание атразина адсорбированными гумусовыми кислотами даже в нейтральных условиях раствора ($pH=5,5$) протекает по механизму ионного обмена, что согласуется с представлениями предыдущих исследователей (Celis et al., 1997). Причиной

этого является повышенный уровень кислотности раствора вблизи поверхности минерала: разница в значениях рН может достигать 2 единиц и более (Орлов, 1992).

Сравнение полученных значений K_{OC}^* и K_{OC} (табл. 3.14) позволяет сделать вывод, что связывающая способность адсорбированных на каолините гумусовых кислот по отношению к атразину на два порядка превышает таковую для растворенных. Подобный эффект отмечали ранее предыдущие исследователи (Celis et al., 1998).

Гистерезис адсорбции-десорбции атразина варьировал в зависимости от свойств адсорбированного препарата гумусовых кислот (табл. 3.14). Для чистого каолинита был получен наименьший коэффициент гистерезиса, близкий к единице ($N = 1,21$), что означает возможность практически полной десорбции с него атразина. В то же время связывание атразина с адсорбционными комплексами было лишь частично обратимым: коэффициент гистерезиса значительно превышал единицу и варьировал от 2,31 до 9,24. При этом минимальные значения N были характерны для адсорбционных комплексов каолинита с ГК торфов. Наличие положительной корреляции между содержанием кислорода в препаратах гумусовых кислот (О/С) и коэффициентом гистерезиса ($r = 0,75$) может свидетельствовать об участии кислородсодержащих групп гумусовых кислот в связывании атразина. При этом ведущая роль принадлежит, по-видимому, карбоксильным группам: коэффициент корреляции между их содержанием в гумусовых кислотах и коэффициентом гистерезиса N составил 0,93 (рис. 3.12).

Увеличение содержания прочно связанного атразина (табл. 3.14) наблюдали в следующем ряду иммобилизованных гумусовых кислот: ГК торфов < ГК черноземов \approx ГК бурых углей \approx ГК П^Д почв < ФК почв.

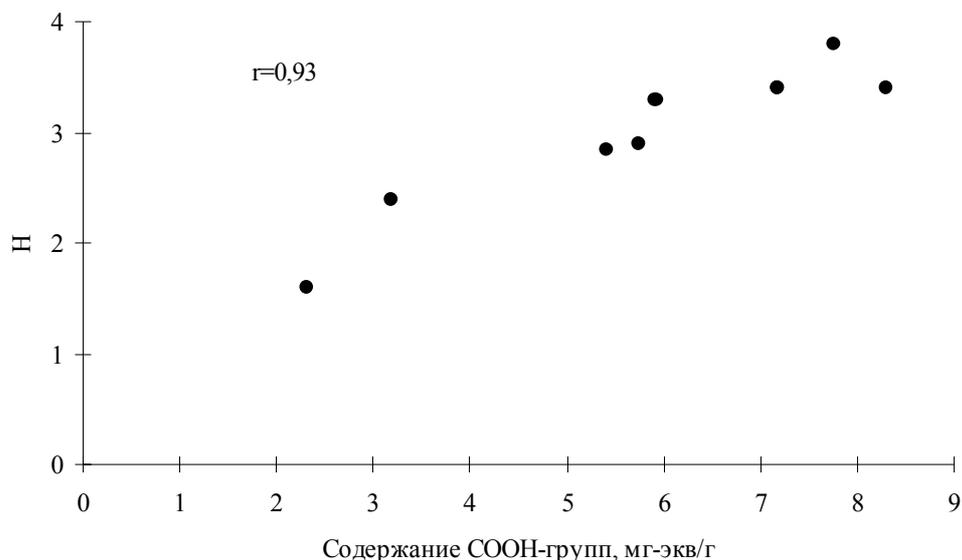


Рис. 3.12. Корреляционное поле для пары переменных "содержание COOH-групп в молекулах гумусовых кислот - коэффициент гистерезиса H".

Таким образом, проведенные эксперименты показали следующее:

- адсорбционные комплексы каолинита с гумусовыми кислотами обладают высокой связывающей способностью по отношению к атразину; коэффициент распределения K_d для атразина составляет 193 - 248, а K_{OC} - $7,93 \times 10^4$ - $1,17 \times 10^5$ л/кг;
- связывание атразина адсорбционными комплексами гумусовых кислот с каолинитом возрастает с увеличением содержания ароматических фрагментов в гумусовых кислотах;
- адсорбция атразина на адсорбционных комплексах гумусовых кислот является частично обратимой; коэффициент гистерезиса H возрастает при увеличении содержания COOH групп в молекулах гумусовых кислот и варьирует от 2,31 до 9,24;
- связывание атразина гумусовыми кислотами, адсорбированными на каолините, протекает при участии ароматических фрагментов и карбоксильных групп гумусовых кислот.

3.5. ДЕТОКСИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРЕННЫХ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПО ОТНОШЕНИЮ К АТРАЗИНУ

Детоксикация атразина в присутствии растворов гумусовых кислот ранее отмечалась многочисленными исследователями (Кулик и Горювая, 1980; Приходько и др., 1980; Булгакова и Приходько, 1983; Genevini et al., 1994). Тем не менее, большинство работ посвящено исключительно констатации наблюдаемого явления, в то время как исследование его взаимосвязи со структурными параметрами гумусовых кислот, их собственным действием на тест-организмы и связующей способностью по отношению к атразину практически не проводились. Кроме того, использование в качестве количественной оценки детоксикации только относительного изменения тест-отклика по сравнению с контролем в значительной мере затрудняет интерпретацию полученных результатов, так как в этом случае невозможно учесть собственное действие гумусовых кислот. Поэтому в данной работе было проведено комплексное исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину, включающее в себя следующие этапы:

- изучение и количественную оценку связывающей способности гумусовых кислот по отношению к атразину (Глава 3.3)
- изучение и количественную оценку собственного действия гумусовых кислот на тест-организмы
- изучение и количественную оценку детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину
- сопоставление полученных результатов, позволяющее высказать предположение о механизме детоксикации атразина гумусовыми кислотами.

Для более детального исследования детоксицирующих свойств растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину были использованы тест-объекты, представляющие собой разные уровни организации биоты:

- растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.*, (уровень организма);
- зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* (уровень клетки);
- хлоропласты ячменя *Hordeum sativum L.*(уровень органелл).

Для количественной оценки детоксицирующего действия гумусовых кислот был использован подход, являющийся оригинальной разработкой нашей

рабочей группы. Его рассмотрение заслуживает особого внимания, так как он во многом predetermined логику постановки соответствующих токсикологических экспериментов. Поэтому мы сочли необходимым начать изложение главы, посвященной изучению детоксицирующих свойств гумусовых кислот, с подробного рассмотрения введенных для этой цели количественных параметров - коэффициента детоксикации D , эффективной константы связывания атразина гумусовыми кислотами - K_{OC}^{tox} , определяемой из данных токсикологического эксперимента, и количество атразина S^{tox} , связанного гумусовыми кислотами при их максимальной концентрации.

3.5.1. Количественная оценка детоксицирующих свойств гумусовых кислот

Основной трудностью при оценке детоксицирующих свойств гумусовых кислот является то, что помимо химического взаимодействия с токсикантом, приводящего к уменьшению концентрации его свободной формы, гумусовые кислоты оказывают собственное воздействие на биологический объект, используемый в качестве тест-организма. Так, наблюдаемое снижение токсичности атразина в присутствии гумусовых кислот может быть обусловлено как связыванием атразина в нетоксичные комплексы, так и стимулирующим действием гумусовых кислот. Поэтому для расчета детоксицирующей способности препаратов гумусовых кислот был введен особый показатель - коэффициент детоксикации D . Достоинством данного показателя является то, что он отражает изменение уровня токсичности атразина в присутствии гумусовых кислот (T_{HS+A}) по сравнению с токсичностью атразина в их отсутствие (T_A) (Perminova et al., 1996), учитывая при этом возможное изменение тест-отклика под влиянием собственного воздействия гумусовых кислот:

$$D = \frac{T_A - T_{HS+A}}{T_A} = 1 - \frac{T_A}{T_{HS+A}} \quad (3.8)$$

при этом

$$T_A = \frac{R_0 - R_A}{R_0} \quad (3.9)$$

$$T_{HS+A} = \frac{R_{HS} - R_{HS+A}}{R_{HS}} \quad (3.10)$$

где R_0 - тест-отклик в контроле; R_A - тест-отклик в присутствии атразина; R_{HS} - тест-отклик в присутствии гумусовых кислот; R_{HS+A} - тест-отклик в присутствии гумусовых кислот и атразина. Подставлением в формулу (3.8) выражений (3.9) и (3.10) для коэффициента D можно получить следующую формулу:

$$D = \left(1 - \frac{R_A - R_{HS+A}}{R_{HS}} \bigg/ \frac{R_0 - R_A}{R_0} \right) \quad (3.11)$$

При условии, что чувствительность тест-организмов к собственному действию гумусовых кислот не изменяется в присутствии токсиканта, использование коэффициента D позволяет охарактеризовать чисто детоксицирующий эффект гумусовых кислот, обусловленный связыванием атразина в нетоксичные комплексы, на фоне их стимулирующего воздействия на тест-объект. Поэтому зная зависимость коэффициента D от концентрации гумусовых кислот (кривая детоксикации), можно рассчитать эффективную константу связывания атразина K_{OC}^{tox} (Perminova et al., 1999a). Преимущество данного параметра при оценке детоксикации по сравнению с коэффициентом D состоит в том, что если последний позволяет получить точечную оценку детоксикации, то K_{OC}^{tox} является характеристикой детоксицирующей способности гумусовых кислот во всем диапазоне концентраций. Кроме того, использование K_{OC}^{tox} позволяет проводить сравнение результатов токсикологических экспериментов с химическими.

Для вывода уравнения данной константы примем, что значение тест-отклика в присутствии атразина линейно убывает прямо пропорционально его концентрации:

$$R_A = R_0 - R_0 \times a \times C_A \quad (3.11)$$

где a - коэффициент пропорциональности, отражающий угол наклона зависимости R_A от C_A . Тогда токсичность в присутствии атразина запишется как:

$$T_A = \frac{R_0 - R_A}{R_0} = \frac{R_0 - R_0 + R_0 \times k \times C_A}{R_0} = k \times C_A \quad (3.12)$$

Так как при внесении гумусовых кислот часть атразина может быть связана в нетоксичные комплексы, то токсичность атразина в присутствии гумусовых кислот аналогично (3.12) можно записать как:

$$T_{HS+A} = k \times [A] \quad (3.13)$$

Подставляя (3.11) и (3.12) в уравнение (3.10), и выражая $C_A/[A]$ через K_{OC}^{tox} и C_{HS} аналогично (1.13), получаем:

$$D = \frac{K_{OC}^{tox} \times C_{HS}}{1 + K_{OC}^{tox} \times C_{HS}} \quad (3.14)$$

На практике K_{OC}^{tox} можно рассчитать путем аппроксимации экспериментальных зависимостей D от концентрации гумусовых кислот уравнением (3.14). На основании известной величины K_{OC}^{tox} , в свою очередь, можно рассчитать количество атразина S^{tox} , связанного гумусовыми кислотами при их максимальной концентрации:

$$S^{tox} = \frac{C_A - [A]}{C_{HS}} \quad (3.15)$$

где

$$[A] = \frac{C_A}{K_{OC}^{tox} \times C_{HS} + 1} \quad (3.16)$$

3.5.2. Исследование детоксицирующих свойств растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием растений мягкой пшеницы *Triticum aestivum*

Для исследования детоксицирующей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием растений пшеницы *Triticum aestivum* сорта "Московская-35" были выбраны препараты гумусовых кислот торфов (ТТЛ, НТЛ) и ОВ водных экстрактов этих же торфов (ТТВ, НТВ). Выбор был обусловлен тем, что данные препараты характеризовались максимальными различиями в свойствах (табл. 3.2; 3.4; 3.7). В качестве тест-функции использовали интенсивность фотосинтеза растений пшеницы. Характеристикой интенсивности фотосинтеза служил показатель Y_{100}/Y_{34} , характеризующий фотосинтетический транспорт электронов. Схема экспериментов включала в себя варианты с возрастающими концентрациями препаратов при постоянной концентрации атразина, которую выбирали на основании предварительно полученного диапазона токсичности атразина. Для изучения стимулирующего действия препаратов в схему опытов были включены варианты с такими же концентрациями препаратов, но без внесения атразина.

Контрольным вариантом служил вариант без внесения препаратов гумусовых кислот и атразина.

Собственное действие гумусовых кислот. Проведенные эксперименты показали, что внесение гумусовых кислот вызывало снижение фотосинтетической активности растений пшеницы во всем исследованном диапазоне концентраций (рис. 3.13).

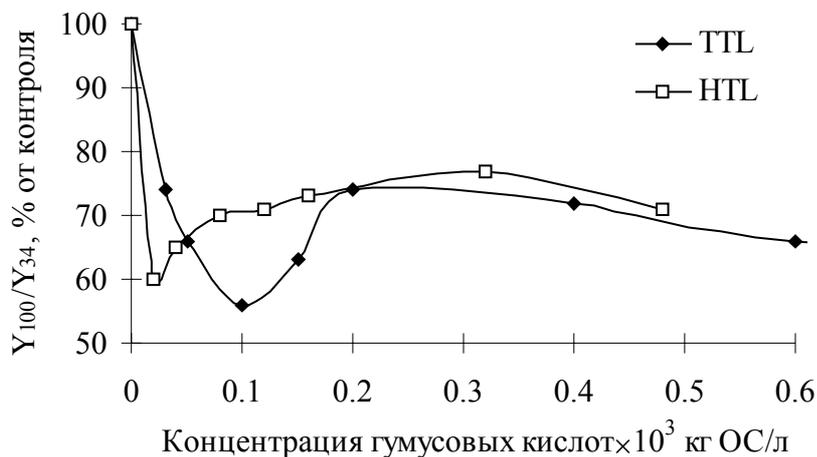


Рис. 3.13. Влияние гумусовых кислот торфов на фотосинтетическую активность растений пшеницы.

Как видно из рис. 3.13, максимальное угнетение растений отмечали при возрастании концентрации гумусовых кислот до 100 мг ОС/л, дальнейшее увеличение их концентрации сопровождалось увеличением фотосинтетической активности растений и при концентрации 200 мг ОС/л кривая зависимости показателя Y_{100}/Y_{34} выходила на стационарный уровень, соответствующий приблизительно 70% от контроля. Возможное объяснение наблюдаемому эффекту заключается в образовании недоступных для растений комплексов гумусовых кислот с минеральными элементами питательной среды, главным образом, металлами. Используя константу взаимодействия гумусовых кислот с Fe^{3+} , равную $1,41 \times 10^7$ л/кг ОС (Линник и Набиванец, 1986), можно рассчитать, что при минимальной исследованной концентрации гумусовых кислот (30 мг ОС/л) они могут полностью связать ионы железа в концентрации 87,7 мг/л, в то время как концентрация Fe^{3+} в питательной среде Прянишникова составляет всего 5,2 мг/л (Прянишников, 1940).

Общий вид концентрационной зависимости действия ОБ водных экстрактов торфов на фотосинтетическую активность растений пшеницы представлен на рис. 3.14.

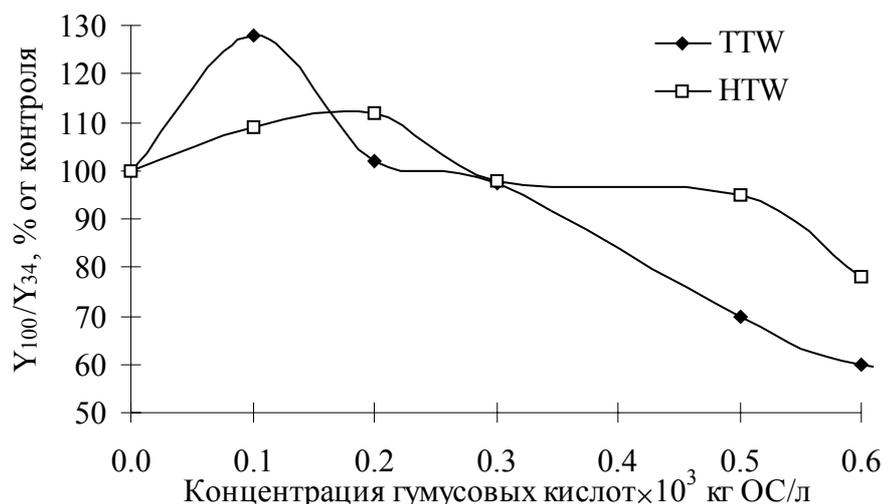


Рис. 3.14. Влияние ОБ водных экстрактов торфов на фотосинтетическую активность растений пшеницы

Как видно из рис. 3.14, при концентрациях меньше 100 мг ОС/л внесение препаратов HTW и TTW стимулировало фотосинтез растений, более высокие концентрации ингибировали фотосинтез. При этом ингибирующее действие препаратов ОБ было сильнее выражено для ОБ водного экстракта низинного торфа, обладающего более низкой ММ. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами предыдущих исследователей (Христева, 1951), отмечавших положительное влияние гумусовых кислот на растения при небольших (менее 100 мг/л) концентрациях и отрицательное - при высоких (более 100 мг/л).

Отсутствие стимулирующего действия исследованных препаратов гумусовых кислот торфов на растения можно объяснить тем, что в выбранном нами диапазоне даже минимальная концентрация превышала пороговую, после которой внесение гумусовых кислот приводит к угнетению растений.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили установить, что препараты гумусовых кислот и ОБ водных экстрактов торфов могут оказывать как стимулирующее (в низких концентрациях), так и угнетающее (в высоких концентрациях) действие на фотосинтез растений

Изучение детоксицирующих свойств гумусовых кислот. Для оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот в тест-систему, содержащую постоянную концентрацию токсиканта, вносили возрастающие концентрации гумусовых кислот и проводили биотестирование. В качестве рабочей использовали концентрацию атразина, вызывающую 50% снижение показателя

Y_{100}/Y_{34} . Данная концентрация была выбрана по результатам опыта по установлению диапазона токсичности атразина и составила $8,75 \times 10^{-5}$ М (рис. 3.15). Концентрации гумусовых кислот в различных опытах составляли $0,03 \div 1,28 \times 10^{-3}$ кг ОС/л.

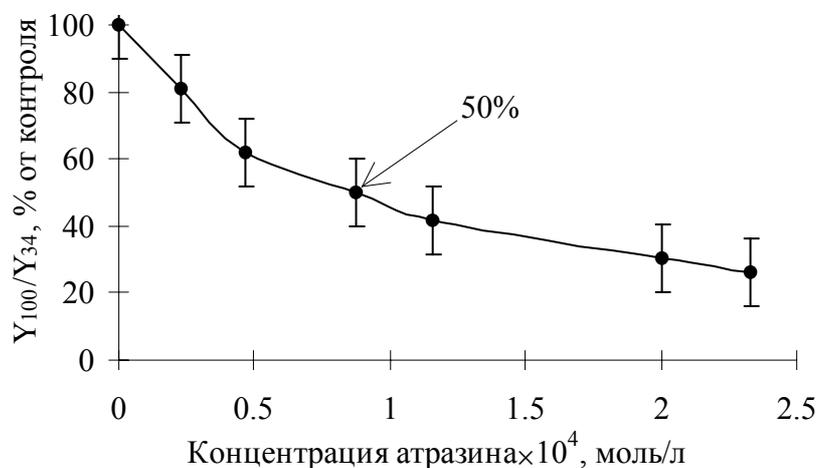


Рис. 3.15. Диапазон токсичности атразина. Тест-культура - *Triticum aestivum*.

Проведенные эксперименты показали, что внесение препаратов гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов торфов способствовало снижению токсичности атразина во всех исследованных концентрациях. Кривые детоксикации атразина препаратами гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов торфов (зависимости коэффициента D от концентрации ОВ) приведены на рис. 3.16.

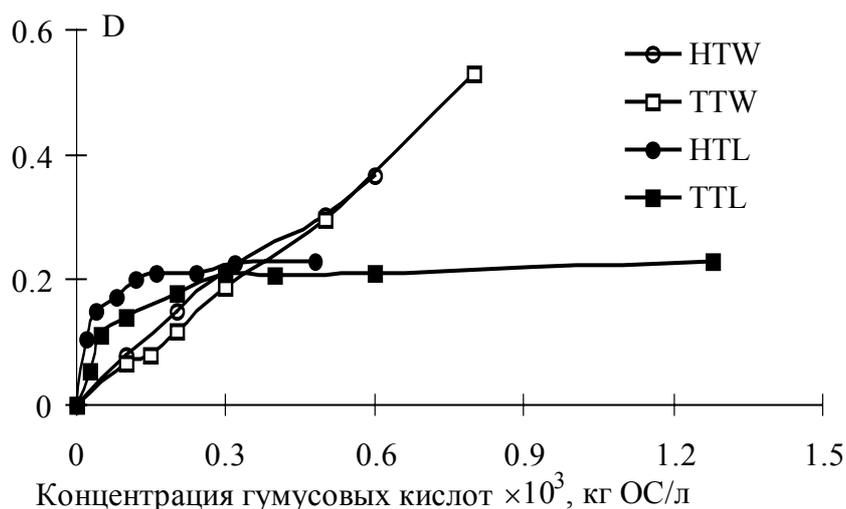


Рис. 3.16. Кривые детоксикации атразина препаратами гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов торфов. Тест-культура - *Triticum aestivum*.

Как видно из рис. 3.16, кривые детоксикации атразина гумусовыми кислотами и ОВ водных экстрактов торфов имеют принципиально различную форму. Так, кривые детоксикации препаратами HTL и TTL выходят на плато при

концентрации приблизительно $0,3 \times 10^{-3}$ кг ОС/л, в то время как зависимость D от концентрации препаратов НТW и ТТW имеет линейный характер. Следует отметить, что все исследованные препараты незначительно снижали уровень токсичности атразина: значение коэффициента D не превышало 0,2 или 0,6 для гумусовых кислот или ОВ водных экстрактов торфов, соответственно. Принимая во внимание, что концентрация гумусовых кислот в препаратах ОВ водных экстрактов была меньше, чем в препаратах гумусовых кислот, можно высказать предположение, что выход кривых детоксикации атразина препаратами НТW и ТТW наступит при больших концентрациях. С другой стороны, полученные результаты могут также свидетельствовать о гораздо более высокой детоксицирующей способности препаратов НТW и ТТW.

Значения K_{OC}^{tox} , рассчитанные на основании полученных кривых детоксикации согласно уравнению (3.14), приведены в табл. 3.15. На основании K_{OC}^{tox} для большей наглядности также было рассчитано количество атразина S^{tox} , связанного гумусовыми кислотами при их концентрации 5×10^{-3} кг ОС/л (табл. 3.15). Там же для сравнения приведены значения K_{OC} и S, полученные при проведении химических экспериментов.

Таблица 3.15

Константы связывания и максимальное количество связанного атразина, рассчитанные по данным токсикологических и химических экспериментов для исследуемых препаратов гумусовых кислот

Препарат	Константы связывания		Кол-во связанного атразина	
	K_{OC}^{tox} , л/кг	K_{OC} , л/кг	S^{tox} , г/кг ОС	S, г/кг ОС
НТW	918	87	0,46	0,17
ТТW	957	-	0,47	-
НТL	632	377*	0,31	0,62*
ТТL	440	-	0,22	-

* - приведено значение для аналогичного препарата гумусовых кислот торфа (Т4)

Как видно из табл. 3.15, значения K_{OC}^{tox} в 2-10 раз превышали значения K_{OC} , причем для препарата ОВ водного экстракта торфа НТW это различие было более выражено, чем для препарата гумусовых кислот НТL. Кроме того, необходимо отметить, что значения K_{OC}^{tox} возрастали при уменьшении M_w препаратов гумусовых кислот (рис. 3.17), в то время как для значений K_{OC} была отмечена обратная тенденция.

Таким образом, несмотря на близкие значения, константы взаимодействия K_{OC} и K_{OC}^{tox} по-разному зависят от свойств гумусовых кислот, т. е. определяются различными процессами. Подтверждением этому является также установленная взаимосвязь для пар переменных "О/С - K_{OC}^{tox} " и "Н/С - K_{OC}^{tox} ", коэффициент корреляции для которых составил 0,94 и 0,96, соответственно, в то время как для K_{OC} подобной взаимосвязи отмечено не было.

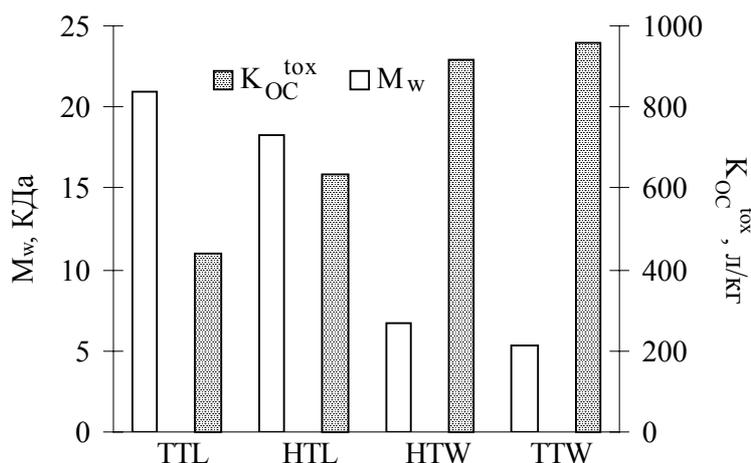


Рис. 3.17. K_{OC}^{tox} (тест-культура - *Triticum aestivum*) и M_w препаратов водных экстрактов торфов и гумусовых кислот торфов

На основании полученных данных можно высказать предположение, что связывание атразина гумусовыми кислотами не является основным фактором, определяющим величину коэффициента D . Для установления причины детоксикации атразина гумусовыми кислотами необходимо было провести дополнительные эксперименты, при этом в качестве тест-объектов следовало выбрать более простую, чем целый организм, систему. Поэтому нами была проведена серия экспериментов с использованием в качестве тест-объекта одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*.

3.5.3. Исследование детоксицирующих свойств растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*

Детоксицирующие свойства гумусовых кислот оценивали на основании изменения интенсивности фотосинтеза хлорофилла в культуре водоросли в присутствии постоянной концентрации атразина и переменной - гумусовых кислот. Тест-откликами служили два параметра кривой индукции флуоресценции: F_i/F_m и F_v/F_m . Показатель F_i/F_m характеризует содержание переносчиков электронов (в долях единицы), не способных принимать электрон вследствие каких-либо нарушений. Значение показателя F_v/F_m характеризует общее количество акцепторов электронов в ЭТЦ (в долях единицы), которые могут принимать электрон, и является характеристикой эффективности реакции фотосинтеза (Krause and Weis, 1991). При внесении атразина - специфического ингибитора фотосинтеза величина F_i/F_m сразу возрастает, так как происходит блокирование определенной части переносчиков электрона. Изменение показателя F_v/F_m , которое может наблюдаться и вследствие присутствия в среде токсиканта общего действия, наступает через определенный интервал времени.

Схема экспериментов была аналогична таковой в экспериментах с использованием растений пшеницы, т.е. при постоянной концентрации атразина вносили возрастающие дозы гумусовых кислот. О собственном действии гумусовых кислот судили на основании экспериментов с такими же концентрациями гумусовых кислот, но без внесения атразина. Контрольным служил вариант без внесения атразина и гумусовых кислот.

Так как детоксикация атразина гумусовыми кислотами может происходить как вследствие связывания гербицида в нетоксичные комплексы, так и вследствие стимулирующего действия гумусовых кислот, нами были проведены две серии экспериментов, различающиеся временем экспозиции культуры водоросли. В первой серии применяли нулевую экспозицию хлореллы, т.е. регистрацию токсичности проводили непосредственно после внесения смеси атразина и гумусовых кислот в культуру водоросли. В качестве тест-отклика использовали показатель F_i/F_m . Согласно нашим предположениям детоксикация атразина в данном случае должна быть обусловлена главным образом его связыванием гумусовыми кислотами, так как используемый показатель напрямую зависит от концентрации свободного атразина. В второй серии

использовали 3-часовую экспозицию (выбор времени экспозиции см. ниже). Это позволило нам регистрировать "суммарную" детоксикацию, вызванную как связыванием атразина, так и стимулирующим действием гумусовых кислот, так как продолжительность проведения эксперимента достаточна для того, чтобы зафиксировать собственное действие гумусовых кислот на рост хлореллы. В качестве тест-отклика в данном случае использовали показатель F_v/F_m . На основании сравнения результатов указанных экспериментов представлялось возможным высказать предположение о ведущем механизме детоксикации атразина гумусовыми кислотами.

Учет мешающего влияния гумусовых кислот. Так как гумусовые кислоты обладают собственной флуоресценцией, то их присутствие в растворе может существенно сказываться на величинах получаемых показателей F_i/F_m и F_v/F_m . Поэтому нами была проведена серия экспериментов, в которых кривые индукции флуоресценции хлорофилла водоросли регистрировали непосредственно после добавления гумусовых кислот (нулевая экспозиция). При этом параллельно регистрировали также фоновую флуоресценцию гумусовых кислот. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что показатель F_v/F_m хлорофилла в клетках водоросли при внесении гумусовых кислот в концентрациях 1 - 50 мг ОС/л существенно снижается, если его расчет производить непосредственно из регистрируемых кривых индукции флуоресценции (рис. 3.18).

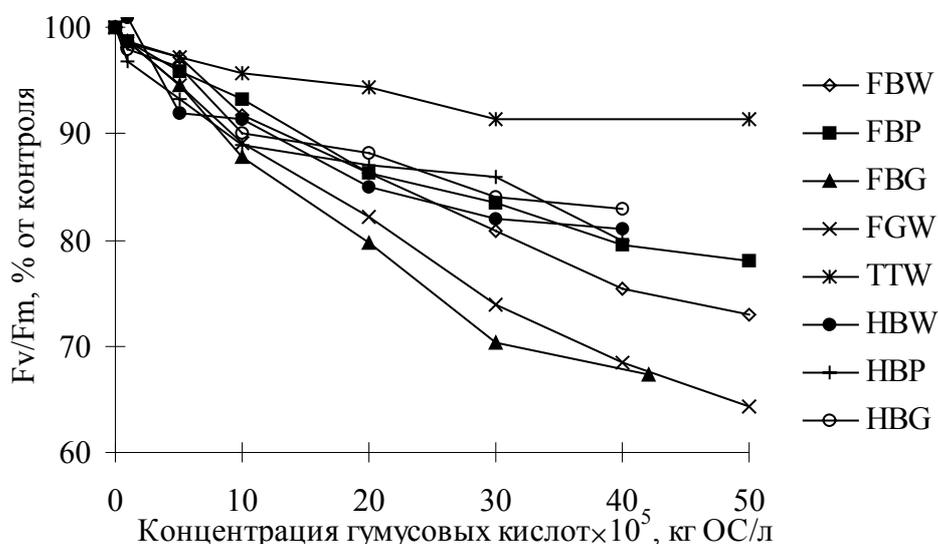


Рис. 3.18. Снижение показателя F_v/F_m индукции флуоресценции хлореллы в присутствии гумусовых кислот при его расчете без учета собственной флуоресценции гумусовых кислот.

Однако, как видно из рис. 3.19, причиной наблюдаемого эффекта "токсичности" гумусовых кислот является их собственная флуоресценция.

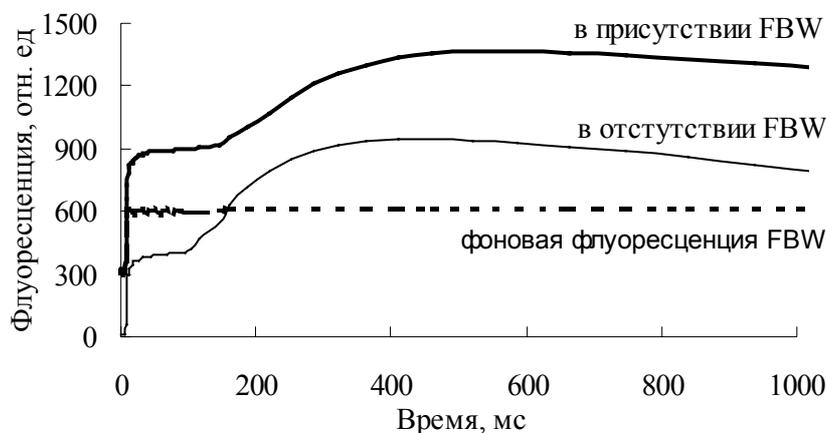


Рис. 3.19. Фоновая кривая флуоресценции гумусовых кислот (на примере препарата FBW) и кривые индукции флуоресценции хлорофилла хлореллы в отсутствие и в присутствии гумусовых кислот (FBW)

Действительно, если гумусовые кислоты обладают собственной флуоресценцией F , то отношение F_v/F_m будет рассчитываться как

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m + F - F_0 - F}{F_m + F} = \frac{F_m - F_0}{F_m + F} = \frac{F_v}{F_m + F} \quad (3.17)$$

Так как при наличии собственной флуоресценции гумусовых кислот (F_m+F) всегда больше F_m , то значения рассчитываемого таким способом показателя F_v/F_m получаются заниженными. Поэтому для корректного расчета F_v/F_m было предложено из кривой индукции флуоресценции хлорофилла предварительно вычитать кривую фоновой флуоресценции гумусовых кислот. Для этого было создано оригинальное программное обеспечение (автор - Ковалевский Д.В., химический факультет МГУ), позволяющее:

- считывать получаемые с прибора файлы с регистрируемыми кривыми индукции флуоресценции хлорофилла и фоновыми кривыми флуоресценции тестируемых растворов (контрольного, гумусовых кислот и атразина);

- по разнице исходных кривых индукции флуоресценции хлорофилла и фоновых кривых флуоресценции рассчитывать исправленные кривые индукции флуоресценции хлорофилла;

- на основании исправленных кривых индукции флуоресценции хлорофилла рассчитывать показатели F_0 , F_i , F_m , F_i/F_m , F_v/F_m .

Сравнение F_v/F_m , рассчитанных с учетом собственной флуоресценции гумусовых кислот (F_v/F_m) и без (F_v/F_m^*) приведено в табл. 3.16.

Таблица 3.16

Влияние собственной флуоресценции гумусовых кислот (на примере препарата FGW) на показатель F_v/F_m индукции флуоресценции хлорофилла в клетках водоросли *Chlorella vulgaris*.

Концентрация FGW, мг ОС/л	F_v/F_m^*	F_v/F_m
0	0,75	0,75
1	0,72	0,75
5	0,69	0,74
10	0,65	0,75
20	0,60	0,75
30	0,54	0,75
40	0,50	0,74
50	0,47	0,74

Доверительный интервал (P=95%) для показателя F_v/F_m составил $\pm 3\%$.

Как видно из табл. 3.16, предлагаемый метод расчета позволяет устранить мешающее влияние гумусовых кислот. Поэтому при всех дальнейших расчетах из кривой индукции флуоресценции хлорофилла, регистрируемой в присутствии гумусовых кислот, предварительно вычитали фоновую кривую флуоресценции гумусовых кислот.

Однако рассчитываемые показатели интенсивности фотосинтеза могут искажаться не только из-за собственной флуоресценции гумусовых кислот, но также и вследствие способности последних поглощать определенные длины волн света, а именно, эффекта внутреннего фильтра, появляющегося при высоких концентрациях гумусовых кислот (Паркер, 1972). При проведении экспериментов с использованием ненулевой экспозиции водоросли в присутствии гумусовых кислот, интенсивное поглощение концентрированных растворов гумусовых кислот может приводить к искажению получаемых показателей F_v/F_m также вследствие неодинаковой освещенности водоросли в вариантах с внесением гумусовых кислот и без. Поэтому выбранные рабочие концентрации гумусовых кислот не превышали 50,0 и 5,0 мг ОС/л для экспериментов с нулевой и 3-часовой экспозицией, соответственно.

Собственное действие гумусовых кислот. Как показали проведенные эксперименты, в выбранных нами условиях (см. далее) гумусовые кислоты в

целом не обладали стимулирующим действием по отношению к культуре водоросли. Результаты для серии экспериментов с 3-часовой экспозицией приведены на рис. 3.20. Для экспериментов с нулевой экспозицией были получены аналогичные данные.

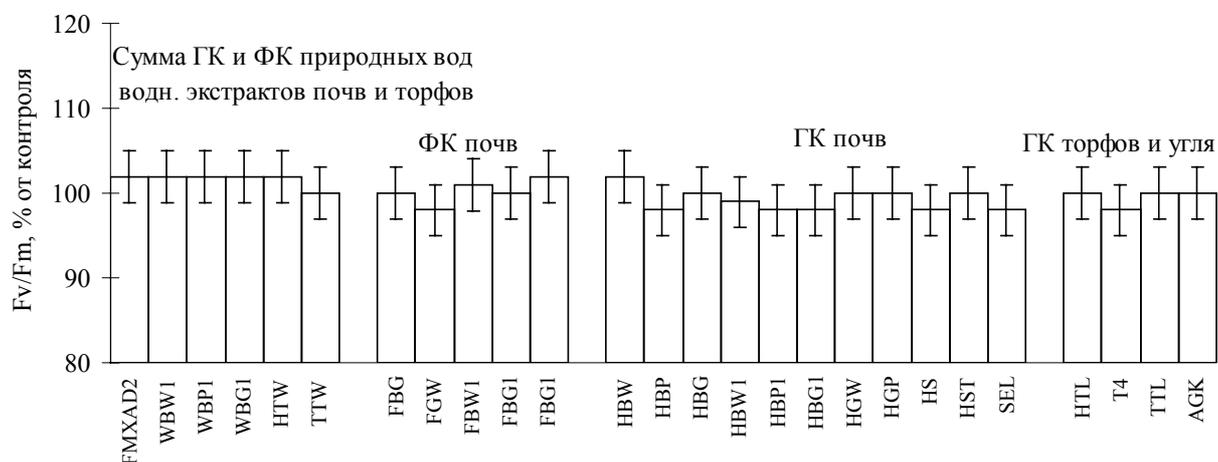


Рис. 3.20. Влияние гумусовых кислот на фотосинтетическую активность одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*. Концентрация гумусовых кислот - 5×10^{-5} кг ОС/л. Время экспозиции - 3 часа.

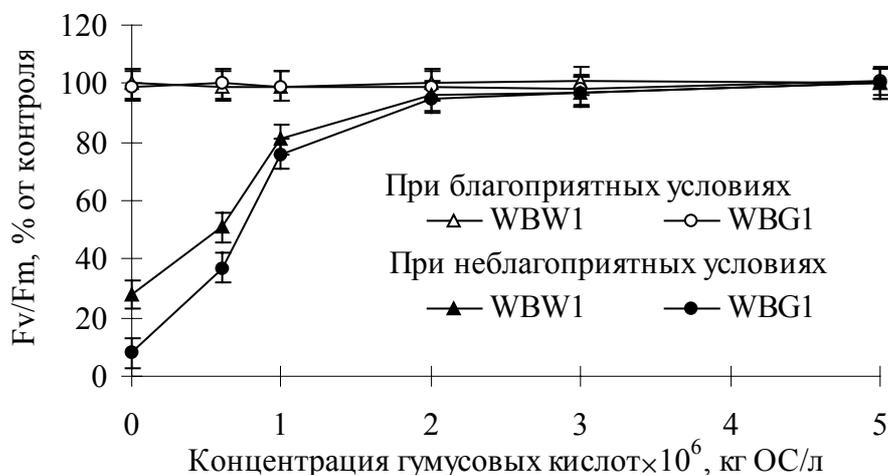


Рис. 3.21. Воздействие гумусовых кислот на фотосинтетическую активность *Chlorella vulgaris* при пониженной (25°C) и нормальной (35°C) температурах культивирования. Время экспозиции - 3 часа.

В то же время выраженное стимулирующее действие гумусовых кислот отмечалось при проведении экспериментов с 3-часовой экспозицией в неблагоприятных условиях культивирования хлореллы. Так, заметное увеличение показателя F_v/F_m наблюдалось при внесении гумусовых кислот у хлореллы, выращиваемой при пониженной температуре (25°C вместо 35°C).

Результаты для двух препаратов приведены на рис. 3.21. Аналогичные данные были получены и для ряда других исследованных препаратов (НВW1, НВР1, НВG1, НСТ, НGW).

Подобные эффекты могут служить подтверждением известного тезиса о способности гумусовых кислот повышать общую неспецифическую сопротивляемость организмов, сформулированного Христовой с сотрудниками на основе многочисленных опытов с растениями (Христева и др., 1968). Возможным механизмом, объясняющим стимулирующее воздействие гумусовых кислот при неблагоприятных условиях среды, является увеличение проницаемости клеточных мембран при изменении внешних условий, приводящее к усиленному поступлению гумусовых кислот в клетки водоросли. При этом восстановление фотосинтетической активности, по-видимому, происходит за счет “шунтирования” нарушенной ЭТЦ поступившими в клетку гумусовыми кислотами и их участием в процессе переноса электронов (Бобырь, 1980). В качестве возможных переносчиков электронов могут выступать хинонные фрагменты гумусовых кислот.

Таким образом, в выбранных нами условиях препараты гумусовых кислот не оказывали какого-либо действия на фотосинтез культуры водоросли. В то же время, гумусовые кислоты способствуют восстановлению фотосинтетической активности культуры водоросли при ее угнетении вследствие неспецифического отрицательного действия факторов среды (температура).

Детоксицирующие свойства растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину. Выбор рабочей концентрации атразина. В связи с тем, что исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину проводили с различным временем экспозиции водоросли, была изучена токсичность атразина при времени экспозиции 0 и 3 часа. В первом случае в качестве тест-функции использовали показатель F_i/F_m , а во втором - F_v/F_m . Как уже говорилось выше, значения показателя F_i/F_m увеличиваются при возрастании концентрации свободного атразина. Поэтому мы решили нецелесообразным приводить диапазон токсичности в координатах “концентрация атразина - F_i/F_m , проценты от контроля” и использовали абсолютные значения показателя F_i/F_m (рис. 3.22). Значение показателя F_i/F_m , соответствующее 50% угнетению рассчитывали как половину разности между

максимальным и минимальными значениями F_i/F_m . По результатам эксперимента была выбрана концентрация атразина, вызывающая 50% угнетение фотосинтеза водоросли. Она составила $1,1 \times 10^{-6}$ М, при этом при минимальной концентрации гумусовых кислот соотношение атразин : гумусовые кислоты (ОС) в расчете на массу составляло 1 : 4

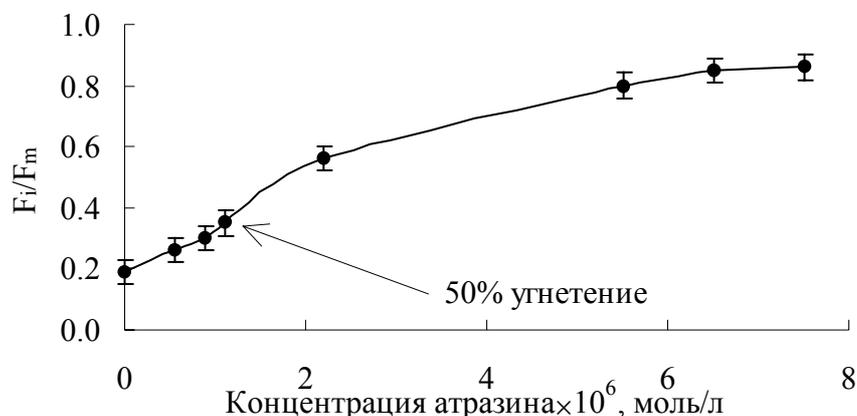


Рис. 3.22. Диапазон токсичности атразина для водоросли *Chlorella vulgaris*. Нулевая экспозиция.

В экспериментах с 3-часовой экспозицией в качестве тест-отклика использовали показатель F_v/F_m . Диапазон токсичности атразина при 3-часовой экспозиции водоросли приведен на рис. 3.23.

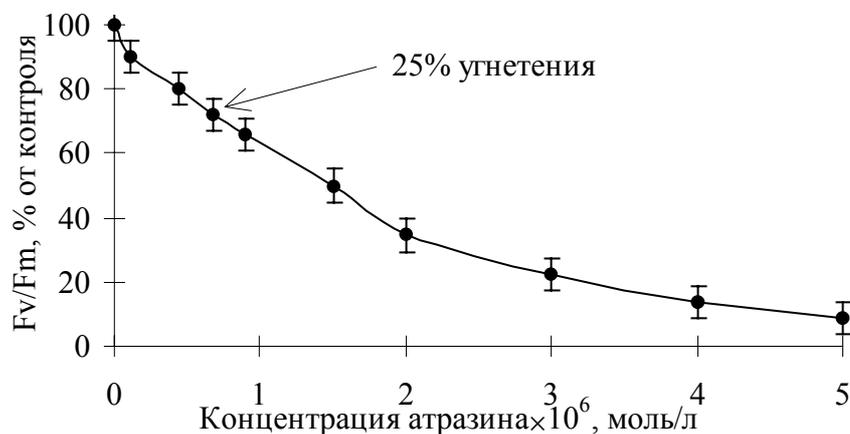


Рис. 3.23. Диапазон токсичности атразина для водоросли *Chlorella vulgaris*. Время экспозиции 3 часа.

Как показали проведенные эксперименты, при использовании концентрации атразина, вызывающей 50% снижение показателя F_v/F_m ($1,5 \times 10^{-6}$ М), внесение гумусовых кислот вплоть до концентрации 50 мг ОС/л детоксицирующего действия на атразин не оказывало. Однако достигаемое при этом максимальное соотношение (масс.) атразин : ОС составляло 1 : 1,8, т.е. превышало таковое для экспериментов с нулевым временем экспозиции. В связи

с тем, что увеличить концентрацию гумусовых кислот не представлялось возможным вследствие их мешающего влияния, для установления соотношения атразин : ОС, равного 1 : 4, уменьшили концентрацию атразина. Поэтому в качестве рабочей нами была выбрана концентрация атразина $6,7 \times 10^{-7}$ М, приводящая к 25 % угнетению фотосинтеза *Chlorella vulgaris*.

Выбор времени экспозиции водоросли. Согласно нашим первоначальным предположениям, связывание атразина гумусовыми кислотами должно было привести к снижению концентрации свободного гербицида и, как следствие, уменьшению наблюдаемой токсичности атразина. Поэтому при исследовании детоксицирующей способности гумусовых кислот в первых сериях экспериментов регистрацию токсичности атразина для культуры водоросли проводили сразу после внесения в нее предварительно приготовленной смеси атразина с гумусовыми кислотами. Время взаимодействия гумусовых кислот и атразина составляло от 1 часа до 7 суток, концентрация гумусовых кислот и атразина 1 - 50 мг ОС/л и $1,7 \times 10^{-6}$ М, соответственно. Результаты экспериментов на примере препарата НВW1 приведены в табл. 3.17. Аналогичные данные были получены и для ряда других препаратов (FBW, FBG, FBP, FGW, FBW1, FBG, НВW, НВP1, НВG1, НST, FMX2, НTL, НTW, ТTW).

Таблица 3.17

Влияние гумусовых кислот (на примере препарата НВW1, 50 мг ОС/л) на токсичность атразина в экспериментах с нулевой экспозицией хлореллы

Время взаимодействия гумусовых кислот с атразином	F_i/F_m
1 час	0,56
2 часа	0,56
4 часа	0,54
6 часов	0,57
1 сутки	0,54
3 суток	0,53
7 суток	0,53

Доверительный интервал (P=95%) для показателя F_i/F_m составил $\pm 7\%$

F_i/F_m в контрольном варианте 0,19; в варианте с внесением атразина 0,56

Как видно из табл. 3.17, присутствие гумусовых кислот не влияло на показатель F_i/F_m , характеризующий количество переносчиков электронов, не участвующих в процессах переноса электронов в ЭТЦ. Так как показатель F_i/F_m непосредственно зависит от концентрации атразина, установленные эффекты

свидетельствуют о том, что взаимодействие атразина с гумусовыми кислотами в условиях эксперимента крайне незначительно или отсутствует.

Однако в связи с тем, что детоксикация в присутствии гумусовых кислот может быть обусловлена не только связыванием токсиканта, но также их собственным действием на тест-организмы, то необходимо было провести серию экспериментов с ненулевой экспозицией хлореллы. Проведение таких экспериментов, как уже говорилось выше, позволило регистрировать "суммарную" детоксикацию атразина в присутствии гумусовых кислот, обусловленную вышеупомянутыми причинами. В качестве тест-функции использовали показатель F_v/F_m . Как уже говорилось выше, снижение показателя интенсивности флуоресценции F_v/F_m при внесении токсиканта происходит лишь через определенный период времени. Поэтому была исследована динамика его изменения в присутствии атразина. Результаты приведены на рис. 3.24.

Как видно из рис. 3.24, снижение показателя F_v/F_m наступало только через час после внесения атразина и было наиболее выражено через 3 часа и более. Поэтому в дальнейших экспериментах токсичность атразина регистрировали через 3 часа после добавления к культуре водоросли смеси атразина с гумусовыми кислотами, которую готовили непосредственно перед началом эксперимента.

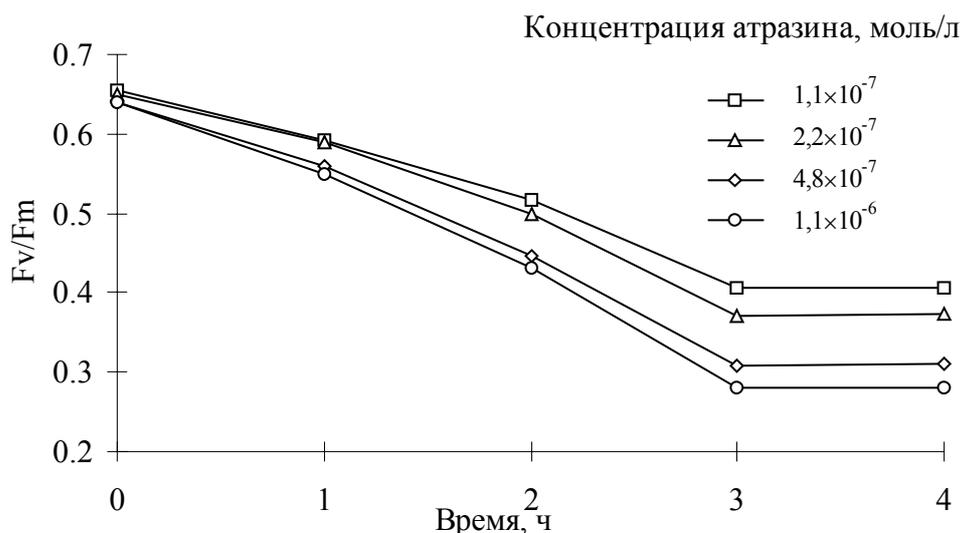


Рис. 3.24. Динамика показателя F_v/F_m кривой индукции флуоресценции хлорофилла в клетках хлореллы при внесении атразина

Оценка детоксицирующих свойств гумусовых кислот. Для исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к

атразину была проведена серия экспериментов с 3-х часовым временем экспозиции с внесением возрастающих количеств гумусовых кислот (0,6 - 5,0 мг ОС/л) при постоянной концентрации атразина ($1,5 \times 10^{-6}$ М), выбранной на основании установленного диапазона токсичности (см. выше). Как показали проведенные эксперименты, гумусовые кислоты снижали токсичность атразина во всем исследованном диапазоне концентраций. На основании полученных данных (зависимости показателя F_v/F_m от концентрации гумусовых кислот) согласно (3.10) для каждой использованной концентрации гумусовых кислот были рассчитаны значения коэффициента D. Типичные кривые детоксикации приведены на рис. 3.25.

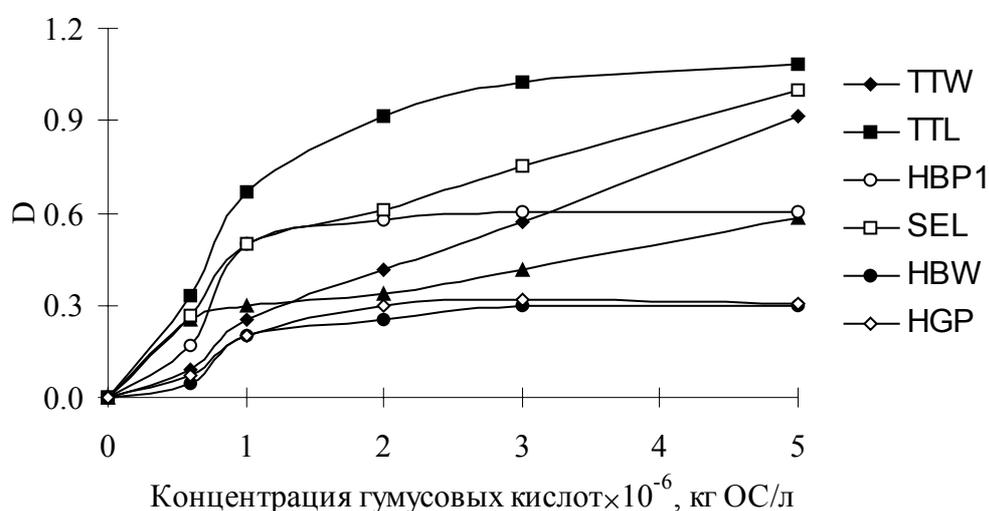


Рис. 3.25. Примеры кривых детоксикации атразина гумусовыми кислотами различного происхождения.

Как видно из рисунка, препараты, представляющие собой сумму ГК и ФК водных вытяжек почв, обладали наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину; ГК угля и чернозема характеризовались сходной высокой детоксицирующей способностью. Влияние ФК на проявляемую токсичность атразина было незначительным. Среднее значение коэффициента D для всех исследованных препаратов гумусовых кислот, рассчитанное из его значений при всех использованных концентрациях (рис. 3.25), приведено на рис. 3.26.

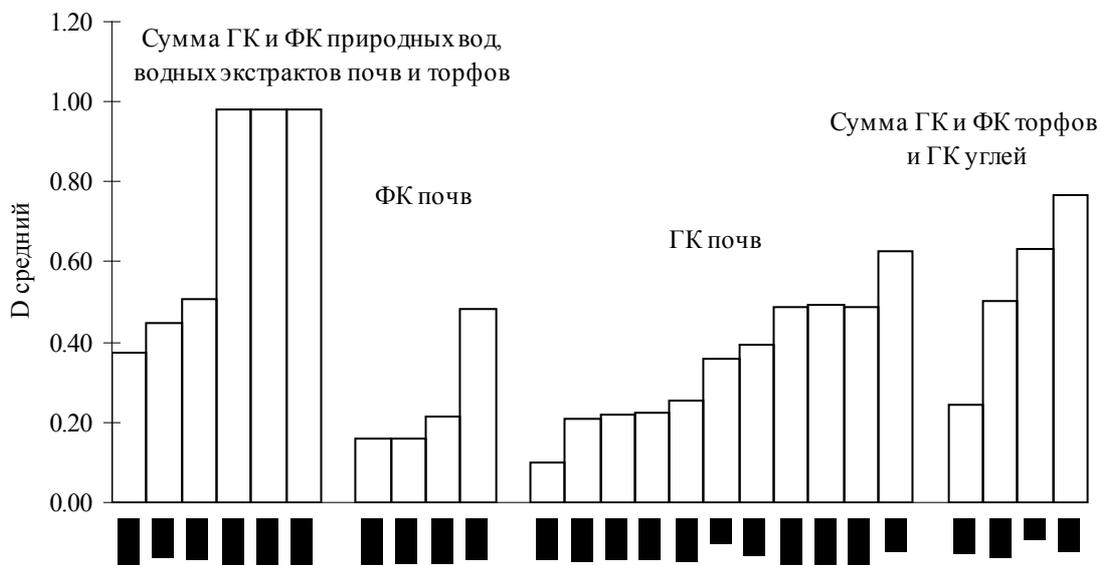


Рис. 3.26. Детоксицирующая способность препаратов гумусовых кислот.

Результаты, приведенные на рис. 3.26, хорошо согласуются с данными рис. 3.25: водорастворимые почвенные ФК характеризовались наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину; ГК угля и чернозема также обладали высокой детоксицирующей способностью. Влияние ФК на проявляемую токсичность атразина незначительно.

На основании полученных зависимостей коэффициента D от концентрации гумусовых кислот по формуле (3.14) были рассчитаны эффективные константы связывания атразина гумусовыми кислотами. Полученные значения K_{OC}^{tox} приведены в табл. 3.18. Там же для сравнения даны величины K_{OC} , рассчитанные по данным химических экспериментов.

Как видно из табл. 3.18, гумусовые кислоты водных вытяжек почв обладали наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину. Близкими к ним значениями K_{OC}^{tox} характеризовались ГК угля, чернозема и некоторых П^Д почв. ОВ водного экстракта торфов и препараты ФК почв практически не снижали токсичность атразина. Следует отметить, что оценка детоксицирующей способности с помощью среднего коэффициента D (рис. 3.26) и константы K_{OC}^{tox} (табл. 3.18) приводит к сходным выводам, коэффициент корреляции между этими показателями составляет 0,92, что свидетельствует о наличии между ними линейной связи. Таким образом, среднее значение коэффициента детоксикации D также можно использовать для оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот. Следует принимать во внимание однако, что в этом случае для корректного сравнения детоксицирующих свойств

различных гумусовых кислот необходимо проведение экспериментов по строго идентичной схеме, то есть исследуемые концентрации гумусовых кислот и атразина должны совпадать во всех сериях экспериментов.

Таблица 3.18
Константы связывания K_{OC}^{tox} и K_{OC} атразина гумусовыми кислотами

Препарат	K_{OC}^{tox} , л/кг ОС	K_{OC} , л/кг ОС	Препарат	K_{OC}^{tox} , л/кг ОС	K_{OC} , л/кг ОС
Сумма ГК и ФК природных вод			ГК почв		
FMX2	$2,9 \times 10^5$		ГК дерново-подзолистых почв		
HTW	$5,8 \times 10^5$	87	HBW	$1,2 \times 10^5$	380
TTW	$4,5 \times 10^5$		HBP	$1,4 \times 10^5$	
WBW1	$2,1 \times 10^6$		HBG	$1,0 \times 10^4$	400
WBP1	$1,8 \times 10^6$		HBW1	$5,6 \times 10^5$	281
WBG1	$1,9 \times 10^6$		HBP1	$5,5 \times 10^5$	181
ФК почв			HBG1	$5,6 \times 10^5$	380
FBG	$1,4 \times 10^5$		ГК серых лесных почв		
FGW	$5,3 \times 10^5$		HGW	$2,0 \times 10^5$	575
FBW1	$5,0 \times 10^4$	192	HGP	$1,4 \times 10^5$	
FBP1	$5,0 \times 10^4$	110	ГК черноземов		
FBG1	$6,0 \times 10^4$	275	HS	$2,9 \times 10^5$	501
Сумма ГК и ФК торфов			HST	$3,7 \times 10^5$	404
HTL	$5,7 \times 10^5$		SEL	$7,1 \times 10^5$	444
TTL	$1,3 \times 10^6$		ГК бурого угля		
T4	$8,9 \times 10^5$	300	AGK	$7,4 \times 10^5$	575

Доверительный интервал (P=95%) для K_{OC}^{tox} составил $\pm 15\%$, $K_{OC} \pm 6\%$

Сравнение K_{OC} и K_{OC}^{tox} (табл. 3.18) показало, что K_{OC}^{tox} в среднем на два-три порядка превышали K_{OC} , при этом коэффициент корреляции между ними составлял 0,12. Кроме того, для K_{OC}^{tox} было установлено наличие значимой взаимосвязи только с содержанием низкомолекулярной фракции <5 КДа - предела проницаемости клеточных мембран (Del Agnola et al., 1986) ($r = 0,93$) (рис. 3.27), в то время как для K_{OC} наиболее тесная корреляция наблюдалась с содержанием C_{Ag} в гумусовых кислотах. Следовательно, в данном случае связывание атразина гумусовыми кислотами не является основным фактором, определяющим величину коэффициента D.

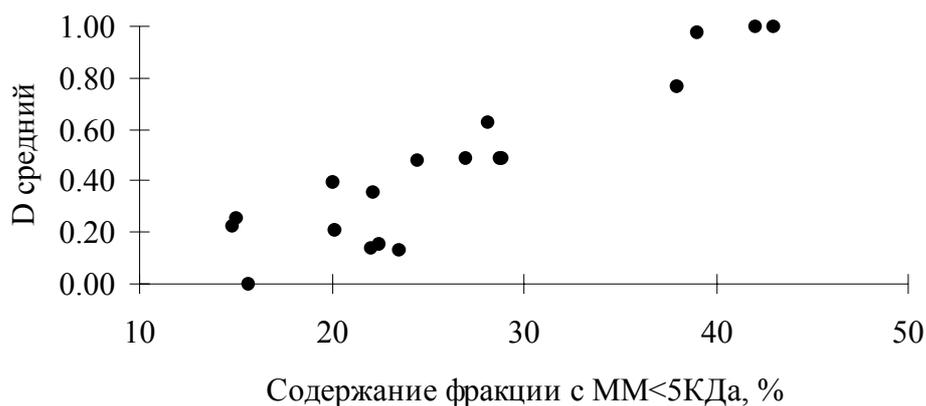


Рис. 3.27. Корреляционное поле для пары переменных "содержание фракции с ММ < 5КДа - K_{OC}^{tox} ".

По-видимому, в условиях внесения атразина преобладающим фактором является стимулирующее действие гумусовых кислот, проявляющееся только при неблагоприятных условиях среды, отмеченное нами ранее (рис. 3.21). Возможным механизмом, объясняющим стимулирующее воздействие гумусовых кислот при неблагоприятных условиях среды, является увеличение проницаемости клеточных мембран при изменении внешних условий, в наших экспериментах - при внесении атразина. Наличие тесной корреляции между K_{OC}^{tox} и содержанием в гумусовых кислотах низкомолекулярной фракции (<5 КДа) свидетельствует в пользу данного предположения. При этом восстановление фотосинтетической активности, по-видимому, происходит по "шунтирующему типу" (Бобырь, 1980), т. е. за счет участия поступивших в клетку гумусовых кислот в процессах переноса электронов в ЭТЦ, нарушенной атразином. В качестве возможных переносчиков электронов могут выступать хинонные фрагменты гумусовых кислот. Для проверки этой гипотезы необходимо было провести дополнительные эксперименты в условиях, исключающих взаимодействие атразина с гумусовыми кислотами. При этом в качестве тест-объекта следовало выбрать хлоропласты, представляющие собой органеллы, не отделенные плазмалеммой от тестируемого раствора. В этом случае регистрирование детоксикации атразина в присутствии гумусовых кислот служило бы доказательством высказанной гипотезы о действии гумусовых кислот непосредственно на процессы переноса электронов в ЭТЦ.

3.5.4. Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину с использованием хлоропластов

Эксперименты по исследованию влияния гумусовых кислот на токсичность атразина с использованием в качестве тест-объектов хлоропластов ячменя проводили при высоких значениях $\text{pH} = 8$ (Трис-буфер), исключающих образование комплексов атразина с гумусовыми кислотами (Wang et al., 1990, 1991). Так как в этом случае детоксицирующее действие гумусовых кислот не зависит от их связывающей способности по отношению к атразину, то в качестве единственного механизма детоксикации можно предполагать способность гумусовых кислот восстанавливать электронный транспорт. С другой стороны, в отличие от экспериментов с нулевой экспозицией хлореллы, в данном случае фотосинтетическая мембрана не отделена от тестируемого раствора плазмалеммой и клеточной стенкой, что позволило исследовать действие препаратов в целом, а не только их отдельных фракций, способных проникать через мембрану благодаря относительно небольшим размерам.

В связи с недостаточным количеством хлоропластов схема проведения экспериментов включала в себя варианты с внесением одной концентрации гумусовых кислот и атразина. Для изучения собственного действия гумусовых кислот в схему ввели варианты с внесением гумусовых кислот, но без внесения атразина. Контрольным служил вариант без внесения атразина и гумусовых кислот.

Собственное действие гумусовых кислот. Проведенные эксперименты показали, что в выбранных условиях гумусовые кислоты (10 мг ОС/л) в целом не оказывали влияния на фотосинтетическую активность хлоропластов (рис. 3.28). Так как отношение F_v/F_m зависит от целого набора факторов, а именно, разобщенности ФС II, ее гетерогенности, размера пластохинонового пула и скорости его окисления, скорости электронного транспорта к ФС I и др. (Krause and Weis, 1991), полученные результаты свидетельствуют лишь о том, что гумусовые кислоты не изменяют эффективность световой фазы фотосинтеза в целом. Однако данной информации недостаточно для того, чтобы судить о влиянии гумусовых кислот на конкретные стадии переноса электронов в ЭТЦ.

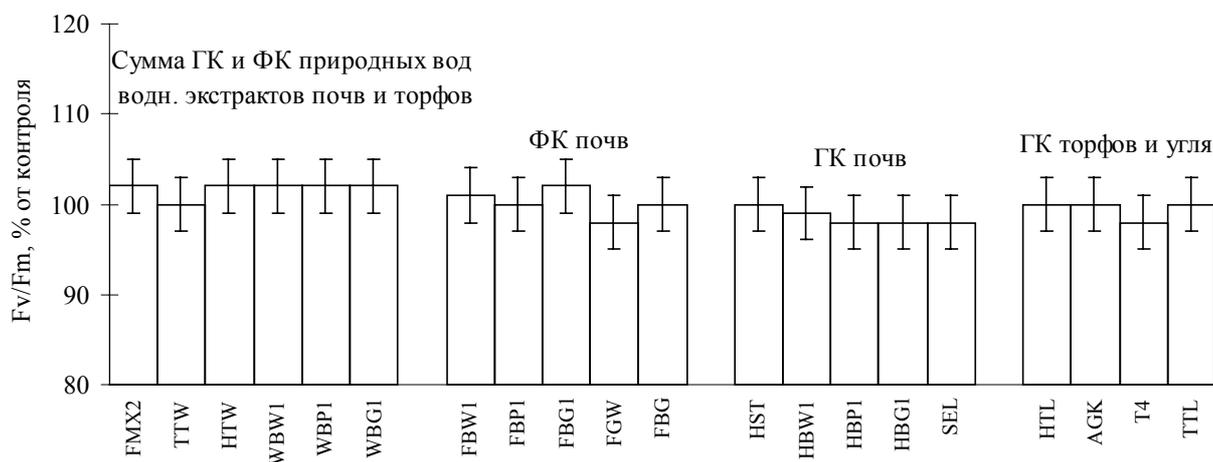


Рис. 3.28. Влияние гумусовых кислот на фотосинтетическую активность хлоропластов ячменя

Так как согласно нашим предположениям собственное действие гумусовых кислот на фотосинтез является главной причиной детоксикации атразина в случае использования в качестве тест-объекта хлоропластов, для четырех из двадцати использованных препаратов было проведено более детальное исследование их собственного действия, а именно, влияние на скорость фотосинтетического транспорта электронов с помощью регистрации спектров ЗФ. Тест-откликом в данном случае служил показатель Y_{100}/Y_{34} . Для исследования выбрали препараты гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов торфов, действие которых на растения пшеницы обсуждалось ранее. Результаты приведены на рис. 3.29.

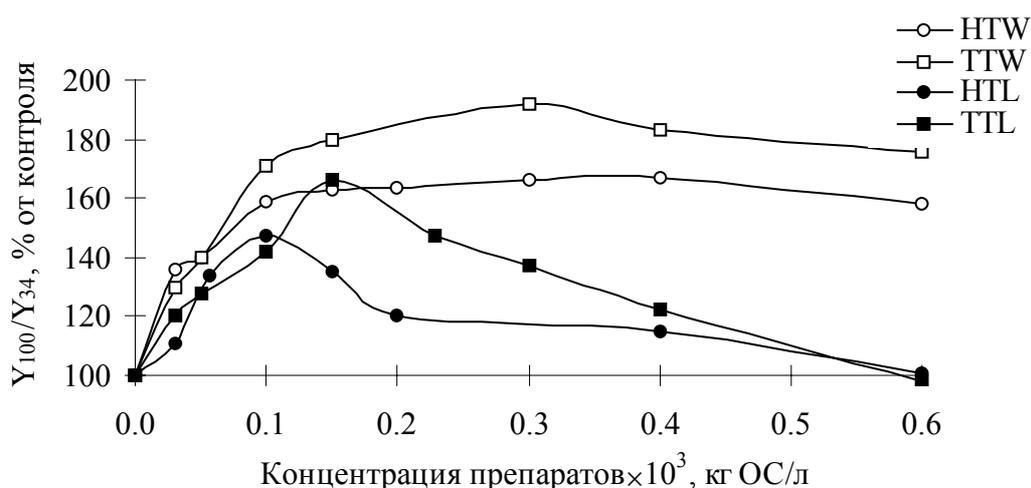


Рис. 3.29. Концентрационная зависимость действия гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов торфов на скорость фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах.

Как видно из рис. 3.29, во всех исследованных концентрациях препараты гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов торфов повышали скорость

фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах. Однако форма кривой концентрационной зависимости была различной для гумусовых кислот и ОВ водных экстрактов. Так, при внесении гумусовых кислот в концентрациях до 0,1 - 0,15 г ОС/л наблюдали значительное увеличение скорости транспорта электронов в хлоропластах, тогда как при дальнейшем повышении их концентрации отмечали снижение показателя Y_{100}/Y_{34} . На основе наблюдаемой тенденции можно высказать предположение, что при концентрации гумусовых кислот больше 0,6 г ОС/л они будут вызывать угнетение фотосинтеза хлоропластов. В то же время кривые зависимости Y_{100}/Y_{34} от концентрации ОВ водных экстрактов торфов имеют S-образную форму с выходом на плато при концентрации препаратов 0,15 г ОС/л.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что гумусовые кислоты и ОВ водных экстрактов торфов способны усиливать фотосинтетический транспорт электронов в хлоропластах. При этом внесение гумусовых кислот в концентрациях больше 0,6 г ОС/л может вызывать его снижение.

Детоксицирующее действие гумусовых кислот. Результаты эксперимента по установлению диапазона токсичности атразина для хлоропластов ячменя приведены на рис. 3.30.

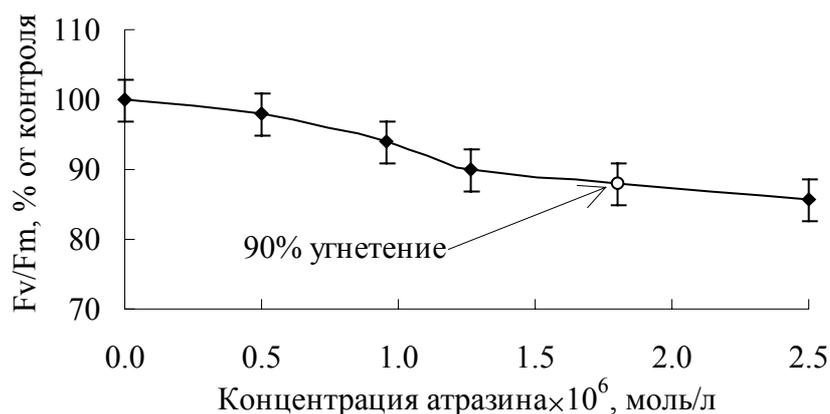


Рис. 3.30. Диапазон токсичности атразина для хлоропластов ячменя

Как видно из рис. 3.30, внесение атразина вызывало лишь незначительное снижение показателя F_v/F_m даже при больших концентрациях (рабочая концентрация атразина в экспериментах с хлореллой составила $6,7 \times 10^{-7}$ М, т.е. в 2,7 раза ниже). Это согласуется с существующими данными (Гольдфельд и Карапетян, 1989). Действительно, так как действие атразина сводится к

замещению Q_B , то ни значение F_o ни F_m не должны изменяться. Однако известно, что внесение атразина приводит к небольшому увеличению F_o , что приводит к снижению F_v/F_m . Данный эффект к настоящему времени еще не получил теоретического объяснения, тем не менее, возможность использования хлоропластов для определения гербицидов на основании анализа кривой индукции флуоресценции хлорофилла была показана предыдущими исследователями (Trappmann et al., 1998). В качестве рабочей была выбрана наименьшая концентрация атразина, вызывающая достоверное снижение тест-отклика (10%), которая составила $1,8 \times 10^{-6}$ М. Использование большей концентрации атразина с нашей точки зрения являлось нецелесообразным, так как в этом случае соотношение концентраций атразин : гумусовые кислоты намного превышало бы таковое, использованное нами в предыдущих экспериментах (см. п. 3.5.3), что затруднило бы интерпретацию полученных результатов.

В связи с тем, что детоксицирующая способность гумусовых кислот была исследована лишь при одной концентрации, для ее количественной оценки использовали только коэффициент D. Результаты экспериментов приведены на рис. 3.31.



Рис. 3.31. Детоксицирующее действие гумусовых кислот по отношению к атразину, тест-объект - хлоропласты ячменя.

Как видно из рисунка, внесение гумусовых кислот способствовало снижению уровня токсичности атразина. Это свидетельствует о том, что гумусовые кислоты способны восстанавливать фотосинтетический транспорт электронов в присутствии специфического ингибитора фотосинтеза. В качестве

переносчика электронов в данном случае могут выступать хинонные фрагменты гумусовых кислот. Установленная значимая корреляция для выборки почвенных гумусовых кислот между содержанием хинонных фрагментов в их молекулах и коэффициентом D ($r=0,64$) свидетельствует в пользу этого предположения. Тем не менее, никаких корреляционных взаимосвязей между коэффициентом D и свойствами гумусовых кислот в случае, когда анализировалась вся исследованная выборка гумусовых кислот, обнаружено не было. Поэтому на основании проведенных экспериментов можно сделать заключение только о том, что гумусовые кислот, по-видимому, могут принимать непосредственное участие в процессах переноса электронов в ЭТЦ. Тем не менее, для выявления конкретных фрагментов гумусовых кислот, которые могут выступать в качестве переносчика электронов, необходимо проведение дополнительных экспериментов.

3.5.5. Сравнение результатов токсикологических экспериментов с использованием различных тест-объектов

Проведенные эксперименты показали, что в зависимости от используемого тест-объекта рассчитываемые значения эффективных констант связывания для одних и тех же препаратов гумусовых кислот могут значительно различаться. В табл. 3.19 приведены значения K_{OC}^{tox} четырех препаратов, рассчитанные по данным экспериментов с растениями пшеницы и хлореллой.

Таблица 3.19

Значения K_{OC}^{tox} (л/кг ОС), рассчитанные по данным токсикологических экспериментов с использованием различных тест-объектов.

Препарат	Тест-объект	
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
HTW	918	$5,8 \times 10^5$
TTW	957	$4,5 \times 10^5$
HTL	632	$5,7 \times 10^5$
TTL	440	$1,3 \times 10^6$

Как видно из табл. 3.19, во всех четырех случаях значения K_{OC}^{tox} , рассчитанные по данным экспериментов с хлореллой, значительно превышали таковые для экспериментов с растениями пшеницы. Полученные результаты хорошо согласуются с высказанной нами гипотезой о непосредственном участии гумусовых кислот в процессах фотосинтетического переноса электронов по

“шунтирующему” механизму. Тем не менее, прямое доказательство высказанной гипотезы требует постановки дополнительных экспериментов, в частности, более детального исследования собственного действия гумусовых кислот на хлоропласты в присутствии и отсутствие атразина.

На основании проведенных экспериментов возможно предложить следующий механизм детоксикации атразина гумусовыми кислотами в водной среде. При создании стрессовых условий, в нашем случае - при внесении атразина, происходит усиление поглощения гумусовых кислот клетками и за счет этого возрастает стимулирующее действие гумусовых кислот. Поглощенные гумусовые кислоты могут восстанавливать нарушенный транспорт электронов в ЭТЦ по механизму “шунтирующего типа” (Бобырь, 1980). В качестве возможных переносчиков электронов могут выступать хинонные фрагменты гумусовых кислот.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод, что причиной наблюдаемого эффекта снижения токсичности атразина в водной среде в присутствии гумусовых кислот является повышение общей неспецифической сопротивляемости тест-организма; возможным механизмом является шунтирование различных участков ЭТЦ, приводящее к восстановлению нарушенного транспорта электронов.

3.6. ДЕТОКСИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПО ОТНОШЕНИЮ К АТРАЗИНУ НА ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВАХ

Исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину в условиях дерново-подзолистых почв проводили на примере коммерческого препарата АГК. Данный выбор был обусловлен, прежде всего, выявленной высокой как связывающей, так детоксицирующей способностью АГК по отношению к атразину (Главы 3.4 и 3.5). Другим определяющим фактором явилось то, что в нашем распоряжении находилось достаточное для проведения токсикологических экспериментов количество препарата, производимого в промышленном масштабе.

Исследование детоксицирующих свойств препарата АГК проводили с помощью лабораторно-вегетационных экспериментов. При проведении экспериментов в почву с предварительно внесенным в нее атразином вносили возрастающие дозы АГК. Рабочую концентрацию атразина определяли на основании экспериментов по установлению диапазонов токсичности гербицида (см. далее). Далее в сосуды с почвой помещали проращенные семена пшеницы и через 30 дней проводили учет сырой биомассы растений. Количественную оценку детоксицирующих свойств препарата АГК проводили с помощью описанных ранее коэффициента D (3.10) и эффективной константы связывания (3.14).

Диапазон токсичности атразина на дерново-подзолистых почвах. Как показали проведенные лабораторно-вегетационные эксперименты, атразин обладал различной гербицидной эффективностью на трех исследованных дерново-подзолистых почвах (рис. 3.32).

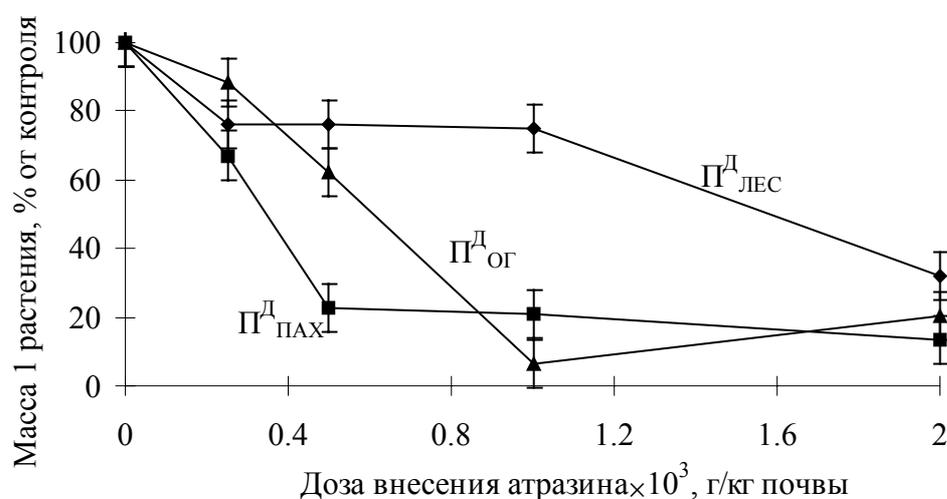


Рис. 3.32. Диапазоны токсичности атразина на трех дерново-подзолистых почвах различного типа сельскохозяйственного использования. Тест-культура *Triticum aestivum*. Тест-отклик - сырая надземная биомасса.

По-видимому, это объясняется различиями в свойствах почв (табл. 3.32). Так, минимальная токсичность атразина была зафиксирована на $P^D_{\text{ЛЕС}}$ почве, характеризующейся самым большим содержанием ОС (4,3%) и самым низким рН водной вытяжки (5,0). Максимальный уровень токсичности атразина был отмечен на $P^D_{\text{ПАХ}}$ почве, где было обнаружено минимальное содержание ОС (1,5%) и самый высокий рН (7,8). $P^D_{\text{ОГ}}$ почва занимала промежуточное положение как по уровню токсичности гербицида, так и по своим химическим

характеристикам. Полученные данные подтверждают, что уровень кислотности почвенного раствора и содержание органического вещества являются факторами, определяющими эффективность гербицидного действия атразина в почве (Bailey and White, 1964; Лебедева, 1990).

По результатам проведенных экспериментов была выбрана рабочая концентрация атразина, которая составила 10^{-6} кг/кг почвы (1 мг/кг).

Собственное действие препарата АГК. Исследование собственного действия препарата АГК также проводили с помощью лабораторно-вегетационных экспериментов с внесением в почву возрастающих доз АГК. Проведенные эксперименты показали, что внесение препарата практически не вызывало увеличение длины растений, но приводило к значительному увеличению надземной биомассы (табл. 3.20). Наибольшее увеличение биомассы растений пшеницы было зафиксировано на $\Pi_{\text{ог}}^{\text{д}}$ почве (138% от контрольного варианта). Полученные данные хорошо согласуются с результатами предыдущих исследователей (Христева и др., 1951) и свидетельствуют о стимулирующем действии гумусовых кислот на растения, что делает возможным их использование в качестве стимуляторов роста растений. Необходимо также отметить, что на двух почвах ($\Pi_{\text{лес}}^{\text{д}}$ и $\Pi_{\text{пах}}^{\text{д}}$) из трех максимальный эффект от внесения препарата АГК наблюдали при средней дозе внесения (70 мг/кг почвы), тогда как увеличение содержания АГК в почве (105 мг/кг почвы) вызывало снижение биомассы растений пшеницы. По-видимому, это свидетельствует о возможном угнетающем действии препарата АГК в высоких дозах.

Детоксицирующие свойства препарата АГК. Как уже говорилось выше, исследование детоксицирующих свойств препарата АГК проводили с помощью лабораторно-вегетационных экспериментов. При проведении экспериментов в почву с предварительно внесенным в нее атразином вносили возрастающие дозы АГК. Как показали проведенные эксперименты, внесение препарата АГК способствовало снижению токсичности атразина на всех трех исследованных дерново-подзолистых почвах (рис. 3.33).

Влияние препарата АГК на рост растений пшеницы в условиях вегетационного эксперимента на дерново-подзолистых почвах

Концентрация АГК, мг/кг почвы	Средняя длина растений		Средняя масса 1 растения	
	% от контроля			
<i>Дерново-подзолистая почва под лесом</i>				
35	108±9		108±10	
70	103±9		123±12	
105	112±10		115±11	
<i>Дерново-подзолистая почва пахотного участка</i>				
35	93±8		128±6	
70	103±9		132±8	
105	118±10		128±8	
<i>Дерново-подзолистая почва огородного участка</i>				
35	105±9		108±6	
70	107±9		133±8	
105	102±8		138±7	

Доверительный интервал рассчитан для P=0,95

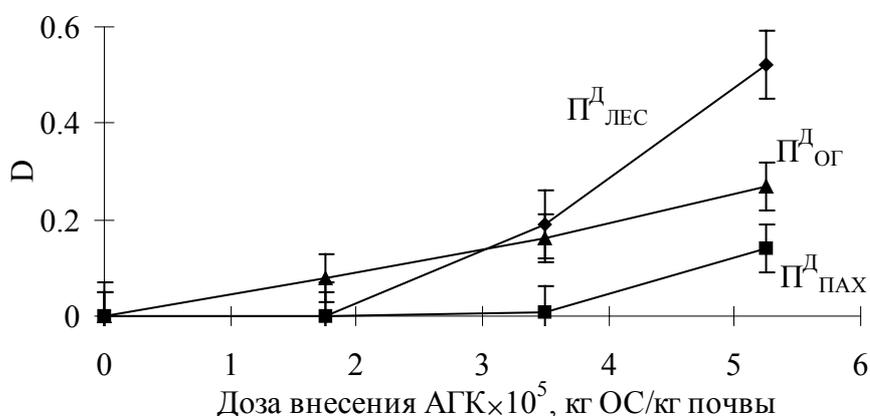


Рис. 3.33. Детоксицирующая способность препарата АГК по отношению к атразину в условиях вегетационного эксперимента на дерново-подзолистых почвах различного сельскохозяйственного использования. Тест-культура - *Triticum aestivum*. Тест-функция - сырая надземная биомасса.

Как видно из рис. 3.33, препарат АГК проявляет различную детоксицирующую способность по отношению к атразину на разных ПД почвах. Наибольшее значение коэффициента D было зафиксировано в условиях ПД_{ЛЕС} почвы (0,52), а наименьшее - на ПД_{ПАХ} почве (0,14). Вероятно, это связано с разной эффективностью действия гербицида на исследованных почвах (рис. 3.32). Так, внесение атразина в дозе 1 мг/кг почвы вызывало 25% снижение

сырой надземной биомассы в варианте $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ почвы, 93% - $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ и 80% - для $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ почвы. При этом на всех исследованных почвах сырая биомасса пшеницы в варианте с одновременным внесением атразина и АГК в максимальной исследованной дозе ($5,3 \times 10^{-6}$ кг ОС/кг почвы) составляла $150 \pm 6\%$ от варианта с внесением атразина.

Рассчитанные согласно (3.14) значения эффективных констант связывания атразина препаратом АГК составили $2,1 \times 10^4$; $0,3 \times 10^4$ и $0,7 \times 10^4$ л/кг ОС для $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$, $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ и $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$, соответственно. При этом установленное ранее значение константы связывания атразина адсорбированным на каолините препаратом АГК было близко вышеуказанным и составляло $9,6 \times 10^4$ л/кг ОС (табл. 3.14).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что основным фактором, определяющим детоксикацию атразина гумусовыми кислотами в почве, является связывание гербицида адсорбированными гумусовыми кислотами.

ВЫВОДЫ

1. Препараты ГК и ФК, выделенные из трех дерново-подзолистых почв различного сельскохозяйственного использования, характеризовались уменьшением вклада ароматических фрагментов в их структуру в ряду: $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}} > P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}} > P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$. Препараты гумусовых кислот водной вытяжки этих почв характеризовались более низкими молекулярными массами, повышенным содержанием кислорода и пониженным - азота по сравнению с препаратами ГК и ФК.
2. Константы связывания атразина с растворенными гумусовыми кислотами K_{OC} не превышают 585 л/кг ОС и возрастают в ряду: ФК почв < ГК почв < ГК торфов < ГК бурых углей. При этом величины констант связывания возрастают с увеличением содержания ароматических фрагментов в гумусовых кислотах.
3. Константы связывания атразина с адсорбированными на каолините гумусовыми кислотами K_{OC}^* на два порядка превосходят таковые для растворенных гумусовых кислот и возрастают в ряду: ГК торфов < ГК почв \approx ФК почв < ГК бурых углей. При этом величины констант связывания возрастают с увеличением содержания кислородсодержащих функциональных групп в гумусовых кислотах.
4. Впервые рассчитаны эффективные константы связывания $K_{\text{OC}}^{\text{tox}}$ для оценки детоксицирующей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину и установлено их возрастание в ряду: ФК почв < ГК почв < ГК торфов \approx ГК бурых углей < сумма ГК и ФК водных вытяжек почв. При этом величина $K_{\text{OC}}^{\text{tox}}$ не зависит от содержания ароматических фрагментов в гумусовых кислотах и возрастает по мере увеличения содержания низкомолекулярной фракции.
5. Эффективные константы связывания $K_{\text{OC}}^{\text{tox}}$ на два-три порядка превосходят K_{OC} и не коррелируют с ними, что позволило сделать вывод о вторичной роли связывания атразина в процессе его детоксикации растворенными гумусовыми кислотами. Экспериментально обосновано предположение, что основным механизмом детоксикации атразина растворенными гумусовыми кислотами является повышение неспецифической сопротивляемости организмов в их присутствии.
6. Эффективные константы связывания $K_{\text{OC}}^{*\text{tox}}$ атразина, рассчитанные из токсикологических экспериментов на почвах, близки к константам связывания атразина гумусовыми кислотами, адсорбированными на каолините. Сделан вывод, что основным механизмом детоксикации атразина в почве является его связывание адсорбированными гумусовыми кислотами.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Л.Н. Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. Л.: Наука, 1980
2. Алиев С.А. Парамагнетизм органического вещества почв. Новосибирск, 1987. 20 с.
3. Аммосова Я.М и Балаганская Е.Д. Свойства гуминовых кислот окультуренных подзолистых почв Мурманской области. Почвоведение, 7: 29-39, 1991.
4. Анисимова М.А. Детоксицирующая способность почв и выделенных из них гуминовых кислот по отношению к гербицидам. Дисс. на соиск. уч. степени к.б.н. М. 1997.
5. Анисимова М.А, Перминова И.В. и Лебедева Г.Ф. Детоксицирующая способность гуминовых кислот по отношению к гербициду трифлуралину. Почвоведение, 9: 1079-1084, 1998.
6. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1970, 488 с.
7. Аронов С.Г. Гуминовые кислоты. В.: Химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, т. 1, с. 618, 1988.
8. Баталкин Г.А., Кочанов М.М., Махно М.Ю. Проницаемость мембран для некоторых веществ гумусовой природы и их вклад в физиологическую активность препарата гуматов Na. Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 8, 117-121, 1983
9. Беленький Б.Г. и Виленчик Л.З. Хроматография полимеров. М., 1978.
10. Белькевич П.И., Чистова Л.Р. Торф и проблема защиты окружающей среды. Минск: "Наука и техника", 1979, 64 с.
11. Березовский М.Я., Немова Г.Н. Особенности применения гербицидов производных симм-триазина на торфяных почвах. Агрохимия. 12, 102-110, 1973.
12. Биофизика фотосинтеза. (под ред. А.Б. Рубина). М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1975, 224 с.
13. Бобырь Л.Ф. Интенсивность фотосинтеза, состояние электронтранспортной цепи и активность фосфорилирующей системы под воздействием гуминовых

- веществ. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 7, 54-63, 1980.
14. Бобырь Л.Ф., Епишина Л.А. О влиянии различных фракций гумусовых кислот на восстановление ферроцитохрома С. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 5, 1975.
 15. Булгакова М.П., Приходько Л.А. Снижение ингибирующего действия гербицидов на чувствительные к нему культуры физиологически активными веществами гумусовой природы и минеральными удобрениями. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 9, с. 15-18, 1983.
 16. Васильев И.Р., Маторин Д.Н. и Венедиктов П.С. Метод биотестирования природных вод по замедленной флуоресценции микроводорослей. Методы биотестирования вод, Черноголовка, ОИХФ АН СССР, с. 23-26, 1988.
 17. Вахмистров Д.Б., Зверкова О.А., Дебеец С.Ю., Мишустина Н.Е. Гуминовые кислоты: связь между поверхностной активностью и стимуляцией роста растений. Докл. АН СССР. т. 293, 5, 1277-1280, 1987.
 18. Вишнякова О.В., Егорова Р.А. и Чимитдоржиева Г.Д. Основные свойства гуминовых кислот холодных почв Забайкалья. Тез. докл. II съезда почвоведов. С-Петербург, книга 1, с. 150-151, 1996.
 19. Глебова Г.И. Гиматомелановые кислоты почв. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1985, 740 с.
 20. Гольдфельд М. Г. Фотосинтез. В: Химическая энциклопедия, т. 5, с. 175-179, 1998.
 21. Гольдфельд М.Г., Карапетян Н.В. Физико-химические основы действия гербицидов. Итоги науки и техники ВИНТИ. Биол. химия, т. 30, с. 1-144, 1989.
 22. Драгунов С.С. Методы исследования гумусовых веществ. Труды почв. инст. им. Докучаева. т. 38, с. 86-98, 1951.
 23. Дэвис Дж.С. Статистический анализ данных в геологии. М.: Недра, 1990. Кн.1, С. 319
 24. Епишина Л.А и Бобырь Л.Ф. Влияние физиологически активных гумусовых веществ на биоэнергетические процессы у растений. В: Доклады о гумусе, Брно, ЧССР, 1979.

25. Жилин Д.М. Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II). Диссертация на соиск. уч. степени к.х.н. М., 1998.
26. Захаренко В.А. Гербициды. М. 1990, 238 с.
27. Зинченко В.А. Природа действия гербицидов производных триазины на растения. М.: Мин-во с-х. ТСХА, 1971, 28с
28. Карпухин А.И и Фокин А.Д. Применение гелевой хроматографии для изучения фульвокислот и железофульватных соединений. В кн.: Особенности почвенных процессов дерново-подзолистых почв. М.: 1977, с. 102-114.
29. Кауричев И.С., Карпухин А.И., Степанова Л.П.. Изучение водорастворимых железоорганических соединений подзолистых и дерново-подзолистых почв. В кн.: Особенности почвенных процессов дерново-подзолистых почв. М.: 1977, с. 5-21.
30. Келдербенк А. Распространение и роль связанных почвой остатков пестицидов. В кн.: Проблемы загрязнения окружающей среды и токсикологии. М.: Мир, с. 84-117, 1986.
31. Ковалевский Д.В. Исследование структуры гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C . Дисс. на соиск. уч. ст. к.х.н. М.: МГУ, 1998
32. Когут Б.М. Трансформация гумусового состояния черноземов при их сельскохозяйственном использовании. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. доктора с-х наук. М.: 1996.
33. Кононова М. М. Органическое вещество почвы. М., Изд-во МГУ, 1963, 55 с.
34. Круглов В.П. Влияние торфяных физиологически активных веществ на интенсивность течения ростовых процессов. Докл. Всес. Акад. с-х наук им. В.И. Ленина, 4, 16-18, 1985
35. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. М.: Агропромиздат, 1991, 12 с.
36. Кузнецова И.А., Вожик Т.Л., Кончиц В.А. Трансформация гумат-симазинового комплекса в культуре почвенных актиномицетов. Бюллетень ВНИИ СХН, 16, 30-32, 1987.
37. Кулик А.Ф., Горовая А.И. Физиологически активные вещества как фактор нормализации состояния компонентов искусственных экосистем,

- нарушенного действием симм-триазинов. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 7, с. 151-158, 1980
38. Лебедева Г.Ф. и др. (Экологические аспекты применения гербицидов). М.: Изд-во МГУ, 1990, 208 с.
39. Лебедева Г.Ф. Шустрова З.А. Поведение триазинов в почве. В кн: Проблемы сельскохозяйственной науки в Московском Университете”, М.: МГУ. с. 292-295, 1975.
40. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Гидрометеиздат. Л., 1986, 268 с.
41. Логинов Л.Ф., Комиссаров И.Д. Влияние гуминовых препаратов на ростовые процессы растений. В кн.: Гуминовые препараты. Тюменский с-х ин-т. Научные труды. XIV, 1971, 266 с.
42. Лунев М.И. Пестициды и охрана фитоценозов. М.: Колос, с. 43-45, 1992.
43. Майер-Боден Г. Гербициды и их остатки. М.: Мир, 1972, 206 с.
44. Михайленко В.И., Михальчук В.В. Ж. Прикл. Спектр., 1987, т. 46, N. 4, с.535-543, 1987.
45. Назарова А.В. Взаимодействие гуминовых кислот различного происхождения с минералами. Науч. труды Ленингр. с-х ин-та, 354:35-42, 1978.
46. Овчинникова М.Ф. Химия гербицидов в почве. М.: Изд-во МГУ, 1987, 109 с.
47. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1990, 325 с.
48. Орлов Д.С. Химия почв. М., Изд-во МГУ, 1992, 259 с.
49. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ. В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М., Наука, 1993, с. 16-27.
50. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н. и Суханова Н.И. Органическое вещество почв Российской Федерации. М.: Наука, 1996. 256 с.
51. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: МГУ, с. 119-126, 1981.
52. Орлов Д.С., Лозановская И.Н., Попов П.Д. Органическое вещество почвы и органические удобрения. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1985, 97с
53. Паркер Ч. Фотолюминесценция растворов. М.:1972, 495 с.

54. Пивоваров Л.Р. О природе физиологической активности гуминовых кислот в связи с их строением. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 2, с. 101-121, 1962.
55. Польшов В.А. Разработка и применение флуоресцентных методов биотестирования токсичности природных и сточных вод. Дисс. на соиск. уч. степени к.б.н. М., 1992.
56. Приходько Л.А., Горювая А.И., Глоба М.П., Кулик А.Ф. Эффективность гуминовых и минеральных удобрений при выращивании сельскохозяйственных культур на фоне повышенных доз атразина. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 7, с. 243-253, 1980
57. Прянишников Д.Н. Агрoхимия. М.: Сельхозгиз, 1940, 644с
58. Раковский В.Е., Пигулевская Л.В. Химия и генезис торфа. М.: Недра, 1978, 231 с.
59. Рубин А.Б., Кононенко А.А., Пашенко В.З., Чаморовский С.К., Венедиктов П.С. Принципы регуляции и модельные системы первичных процессов фотосинтеза. Итоги науки и техники, сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, т. 22, 1987.
60. Рэуце, Кырстя. Борьба с загрязнением почвы. М. Агропромиздат, 1986, 221 с.
61. Самгин П.А. Инактивация и передвижение триазиновых гербицидов в почве. М. 1975.
62. Сизов А.П., Хомяков Д.М., Хомяков П.М. Проблемы борьбы с загрязнением почв и продукции растениеводства. М., 1990, 51 с.
63. Соколов М.С., Галиулин Р.В. Микробиологическое самоочищение почвы от пестицидов. М.: 1987
64. Сосновая О.Н., Приходько Л.А., Булгакова М.П. Формирование растениями систем детоксикации атразина в зависимости от условий питания в присутствии ФАВ гумусовой природы. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. т. 8, с. 44-47, 1983
65. Сюняев Х.Х. Радиоиндикаторное исследование трансформации и миграции симазина в почвах подзолистого и черноземного типов. Автореферат на соиск. уч. степени к.б.н. М. 1984. 15 с.

66. Сюняев Х.Х. Радиоиндикаторное исследование трансформации и миграции симазина в почвах подзолистого и черноземного типов. М., 1984, автореферат дисс. на звание КБН, 15 с.
67. Тинсли И. Поведение химических загрязнителей в окружающей среде. М.: Мир, 1982. 281 с.
68. Ткаченко Л.К., Филиппова Т.В., Горовая А.И., Давыдовский А.А., Сулиман Г.Ф. и Христева Л.А. Минеральные и гуминовые удобрения как фактор снятия ингибирующего действия гексахлорана у ячменя. В: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 6, 31-45, 1977.
69. Тюрин И.В. Органическое вещество почвы и его роль в плодородии. М.: Наука, 1965. 319 с.
70. Удовенко Г.В. Механизмы адаптации растений к стрессам. Физиология и биохимия культурных растений, 11 (2), 1979.
71. Фокин А.Д., Бобырь Л.Ф., Епишина Л.Е., Кравцова Л. и Христева Л.А. О проникновении гумусовых веществ в клетки растений. В: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. т.5, Днепропетровск, 1975.
72. Фокин А.Д. и Карпухин А.И. Исследование состава комплексных соединений фульвокислот с железом. Изв. ТСХА, вып. 1, №132, 1972.
73. Хлебникова М.В. Адсорбция 2-хлор-4-этиламина-6-изопропиламина-симметриазина (атразина) почвенными сорбентами. Автореферат на соиск. уч. степени к.х.н. М. 1975 16 с.
74. Христева Л.А. Роль гуминовой кислоты в питании растений и гуминовые удобрения. Труды почвенного ин-та им. В.В.Докучаева, Академия Наук СССР, 1951, т. 38, с. 108-184.
75. Христева Л.А. Физиологическая функция гуминовых кислот в процессах обмена веществ у высших растений. В: Гуминовые удобрения, теория и практика их применения. Изд-во ХГУ, 1957.
76. Христева Л.А. Еще о функции гуминовых кислот в обмене веществ у высших растений В: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 2, с. 123-129, 1962.
77. Христева Л.А. О природе действия физиологически активных форм гуминовых кислот и других стимуляторов роста растений. В: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 3, с. 13-27, 1968.

78. Христева Л.А., Старостин А.Н., Улитина В.П. Еще к природе физиологической активности гуминовых кислот. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 3, с. 136-142, 1968
79. Христева Л.А. Действие физиологически активных гуминовых кислот на растения при неблагоприятных внешних условиях. В: Гуминовые удобрения Теория и практика их применения, т. 4, с. 5-23, 1973.
80. Христева Л.А., Горовая А.И. др. Способ детоксикации ядохимикатов. Авторское свидетельство №460037, 1974.
81. Христева Л.А. К природе действия физиологически активных гумусовых веществ на растения в экстремальных условиях. В: Гуминовые удобрения Теория и практика их применения, т. 6, 1977.
82. Abbt-Braun G., Frimmel F.H., and Lipp P. Isolation of organic substances from aquatic and terrestrial systems - comparison of some methods. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, 24: 285-292, 1991.
83. Ahlrichs J.L. The soil environment. In: *Organic chemicals in the soil environment.* Goring C.A.I., Hamaker J.W. (Eds.). Markel Dekker, New York, vol. 1, 1972. pp. 3-46.
84. Aiken G.R. and Gillam A.H. Determination of molecular weights of humic substances by colligative property measurements. In: *Humic Substances II.* Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., and Swift R.S. (Eds.) John Wiley&Sons Ltd., pp. 516-543, 1989.
85. Bailey G.W., White J.L. Soil-Pesticide Relationships, Review of Adsorption and Desorption of Organic Pesticides by Soil Colloids, with Implication Concerning Pesticide Bioactivity. *J. Agric Food Chem*, 12(4): 324-332, 1964
86. Barriuso E. and Calvet R. Soil type and herbicides adsorption. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 46: 117-128, 1992.
87. Bender M.E., Matson W.R., Jordan S.A. *Environ. Sci. Technol.* 4(6): 520, 1970
88. Brack W. and Frank H. Chlorophyll *a* fluorescence: a tool for the investigation of toxic effect in the photosynthetic apparatus. *Exotoxicology and environ. safety.* 40: 34-41, 1998.
89. Brown D.C. and Flagg E.W. *J. Environ. Qual.* 10: 382-386, 1981.

90. Capriel P., Haisch A., Khan S. U. Distribution and nature of bound (nonextractable) residues of atrazine in a mineral soil nine years after herbicide application. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 567-569, 1985
91. Celis R., Cornejo J., Hermosin M.C., and Koskinen W.C. Sorption-desorption of atrazine and simazine by model soil colloidal components. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 61:436-443, 1997.
92. Celis R., Cornejo J., Hermosin M.C., and Koskinen W.C. Sorption of atrazine and simazine by model associations of soil colloids. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 62:165-171, 1998.
93. Chin Yu-P., Aiken G., and O'Loughlin E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1853-1858, 1994.
94. Choudhry, G.G. and Webster, G.R.B. Soil organic matter chemistry. Part 1. Characterization of several humic preparations by proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol.@Environ.Chem.* 23:227-242, 1989.
95. Clapp C.E., Hayes.B.H., and Mingelgrin U. Measurements of sorption-desorption and isotherm analysis. In: *Humic substances in transport processes*. Anaheim, California, USA, p. 13, 1997.
96. Conte, P., Piccolo, A., Van Lagen, B., Buurman, P. and De Jager, P.A. Quantitative differences in evaluating soil humic substances by liquid- and solid-state C(13) NMR spectroscopy. *Geoderma* 80:339-352, 1997.
97. Cook, R.L. and Langford, C.H. Structural characterization of a fulvic acid and a humic acid using solid-state ramp-CP-MAS C(13) NMR. *Environ.Sci.Technol.* 32:719-725, 1998.
98. Davis J.A. Adsorption of natural organic matter from fresh-water environments by aluminium oxide. In: *Contaminants and sediments*. Baker R.A. (Ed.). Vol. 2, Ann Harbor Science, Ann Arbor, MI, 1980.
99. Davis J.A. Adsorption of natural dissolved organic matter at the oxide/water interface. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 46: 2381-2393, 1982.
100. Davis J.A. and Glour R. Adsorption of dissolved organics in lake water by aluminium oxide: effect of molecular weight. *Environ. Sci. Technol.* 15: 1223-1229, 1981.

101. De Haan H., Jones R.I., and Salonen K. Does ionic strength affect the configuration of aquatic humic substances, as indicated by gel filtration. *Freshwater Biol.*, 17: 453-459, 1987.
102. Dell'Agnola G., Ferrari G., and Maggioni A. Gelfiltration of humus. 2. Fractionation of soil organic matter by filtration across gels of Sephadex type. *Ric. Sci.*, Part 2, B4:347-352, 1964.
103. Dell'Agnola G. and Nardi S. News about Biological Effect of Humic Substances. In: *Humic Substances Effect on Soil and Plant*. Italy, Reda, 78-88, 1986.
104. De Nobili M., Gjessing E., and Sequi P. Sizes and shapes of humic substances by gel chromatography. In: *Humic substances II*. Hayes M.B.H., MacCarthy P., Malcolm R.L., and Swift R.S. (Eds). John Wiley & Sons Ltd. 1989, pp. 562-591.
105. Devitt E.C. and Weisner M.R. Dialysis investigation of atrazine-organic matter interactions and the role of divalent metal. *Environ. Sci. Technol.* 32: 232-237, 1998.
106. Draber W., Tietjen K., Kluth J.F., and Trebst A. Herbicides in photosynthesis research. *Angew. Chem. Ed. Engl.*, 30: 1621-1633, 1991.
107. Easthouse K.B. et al. Dissolved Organic Carbon Fraction In Soil And Stream Water During Variable Hydrological Conditions at Birkenes, Southern Norway. *Water Resources Res.*, 28, 6, 1585-1596, 1992
108. Edwards C.A. and Bremner J.M. Microaggregates in soils. *J. Soil Sci.* 18: 64-73, 1967.
109. Evans L.T. and Russell E.W. The adsorption of humic and fulvic acids by clays. *J. Soil Sci.* 10(1): 119-132, 1959.
110. Fisher, N.S., and D. Frood. Heavy metals and marine diatoms: influence of dissolved organic compounds on toxicity and selection for metal tolerance among four species. *Mar. Biol.* 59, 85-93, 1980.
111. Gachrer R., Davis J.S., and Mares A. *Environ. Sci. Technol.*, 12(13): 1416, 1978.
112. Gamble D.S. and Khan S.U. Atrazine hydrolysis in aqueous suspensions of humic acids at 25.0°C. *Can. J. Chem.* 66: 2605-2617, 1988.
113. Ghassemi M. and Christman R.F. Properties of the yellow organic acids in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 13: 583-587, 1968.

114. Gauthier T.D., Seitz W.R., and Grant C.L. Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene KOC values. *Environ. Sci. Technol.* 21(3): 243-248, 1987.
115. Genevini, P.L., Saxxhi, G.A. and Borio, D. Herbicide effect of atrazine, diuron, linuron and prometon after interaction with humic acids from coal. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*
116. Giesy, J.P., A. Newell, and G.J. Levesee. Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus Serrulatus* (Daphnidae). *Sci. Total. Environ.* 28, 23–36, 1983.
117. Gilmour J.T., Coleman N.T., S-Trizines Adsorbtion Studies: Ca-H-humic Acid. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 35(2), 256-259, 1971
118. Giessing E.T. Gel- and ultramembrane filtration of aquatic humus: comparison of two methods. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 35(2): 286-294, 1973.
119. Greenland D.J. Interactions between clays and organic compounds in soils. Part I and II. *Soil and Fert.* 28: 412-425; 521-523, 1965
120. Greenland D.J. Interactions between humic and fulvic acids and clays. *Soil Sci.* 111:34-41, 1971.
121. Grover R. and Hance R.J. *J. Soil Sci.* 109: 136-138, 1970.
122. Hance R.J. Influence of pH, exchangeable cation and the presence of organic matter on the adsorption of some herbicides by montmorillonite. *Can. J. Soil Sci.*, 49: 357-364, 1969.
123. Hatcher, P.G., Breger, I.A. and Mattingly, M.A. Structural characteristics of fulvic acids from Continental Shelf sediments. *Nature* 285:560-562, 1980.
124. Hatcher, P.G., Rowan, R. and Mattingly, M. H(1) and C(13)NMR of marine humic acids. *Org. Geochem.* 2:77-85, 1980.
125. Hayes, M.H.B. Adsorption of triazine herbicides on soil organic matter, including a short review on soil organic matter chemistry. *Residue Rev.* 32:131-174, 1970.
126. Hesketh N., Jones M.N., and Tipping E. The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances. *Anal. Chim. Acta.* 327(3): 191-201, 1996.
127. Huffman E.W.D. and Stuber H.A. Analytical methodology for elemental analysis of humic substances. In: *Humic substances in soils, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization.* Aiken G.R., MacKnight D.M.,

- Wershaw R.L., and MacCarthy (Eds.). John Wiley&Sons, N.Y., 1985, pp. 433-455.
128. Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures. Averett R.C., Leenheer J.A. McKnight D.M., and Thorn K.A. (Eds.) U.S. Geological survey water-supply paper 2373, 1994.
129. Inoue T. and Wada K. Adsorption of humified clover extracts by various clays. Trans. 9th int. Congr. Soil Sci., Adelaide. 3:289-298, 1968.
130. Inoue T. and Wada K. Reactions between humified clover extracts and imogolite as a model of humus clay interactions. Parts I and II. Clay Sci. 4:61-80, 1971.
131. Ishiwatari R., Hamana H., Machihara T. Isolation and characterization of polymeric organic materials in a polluted river water. Water Res., 14: 1257-1262, 1980.
132. Jamet P. Environmental fate of pesticides. Behavior of pesticides in soil. Int. J. Food, Pharmaceuticals, Cosmetics as Linked to Agriculture through Advanced Technology, May-June 19-21, 1993.
133. Kaiser K. and Zech W. Structure-dependent sorption of dissolved organic matter on soils and related minerals. In: The role of humic substances in the ecosystems and environmental protection. J. Drozd, S.S. Gonet, N. Senesi (Eds.) IHSS, 1997. pp. 385-390.
134. Kaufman D.D. and Kearny P.C. Degradation of herbicides. Marcel Dekker Inc., New York, 1969.
135. Khan S.U. Organic matter association with soluble salts in the water extract of a black solonetz soil. Soil Sci., 109(4): 227-228, 1970.
136. Khan, S.U. The interaction of organic matter with pesticides. Ch.4. In: Soil organic matter, edited by Schnitzen, M. and Khan, S.U. Amsterdam Oxford NJ: Elsev.Scienc.Pub.comp., 1978, p. 137-171.
137. Khan S.U. Kinetics of hydrolysis of atrazine in aqueous fulvic acid solution. Pest. Sci. 9: 38-43, 1978.
138. Khan S.U. Determining the role of humic substances in the fate of pesticides in the environment. J. Environ. Sci. Health. Sec. B. 15:1071-1020, 1980
139. Knulst, J.C., Boerschke, R.C. and Loemo, S. Differences in organic surface microlayers from an artificially acidified and control lake, elucidated by XAD-8/XAD-4 tandem separation and solid state C(13) NMR spectroscopy.

- Environ.Sci.Technol. 32(1):8-12, 19
Kodama and Schnitzer, 1974
- 140.Krause G.H. and Weis E. Chlophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Phisol. Plant Mol. Biol. 42:313-349, 1991.
- 141.Kretzschmar R., Hesterberg D., and Sticher H. Effects of adsorbed humic acid on surface charge and flocculation of kaolinite. Soil Sci. Soc. Am. J. 61: 101-108, 1997.
- 142.Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., and Petrosyan V.S. Size-Exclusion Chromatographic Descriptors of Humic Substances. Anal. Chem. Acta, 1999 (в печати)
- 143.Laird D.A., Yen P.Y., Koskinen W.C., Steinheimer T.R., and Dowdy R.H. Sorption of atrazine on soil clay components. Eviron Sci. Technol., 28:1054-1061, 1994.
- 144.Laird D.A. Interactions between atrazine and smectite surfaces. ACS Symp. Ser., 630:86-100, 1996
- 145.Landrum, P.F., M.D. Reinhold, S.R. Nihart, and B.J. Eadie. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia Hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. Environ. Toxicol. Chem. 4, 459–467, 1985
- 146.Li G.-C., Felbeck G.T. A Study Of the Mechanism Of Atrazine Adsorbtion By Humic Acid From Muck Soil. Soil Sci., 113(2), p. 572, 1967.
- 147.Liu R., Clapp C.E., Hayes M.B.H. Stability complexes formed by the herbicide napropamide and soluble humic acids. Proc. of the 7-th Int. Conf. IHSS. pp. 305-315, 1996.
- 148.Lowe L.E. Studies On the Nature Of Sulfur In Peat Humic Acids From Froser River Delta, British Columbia. Sci. Total Environ., 113: 133-145, 1992.
- 149.Luoma, S.N. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – A Review. Sci. Total Environ., 28, 1–22, 1983.
- 150.Malcolm, R.L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. Anal.Chim.Acta 232:19-30, 1990.
- 151.Masini J.C., Abate G., Lima E.C., Hahn L.C., Nakamura M.S., Lichtig J., Nagatomy H.R. Comparison of methodologies for deterrmination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. Anal. Chim. Acta, 364: 223-233, 1998.

152. Mantoura R.F.C and Riley J.R. The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds. *Anal. Chim. Acta*, 78: 193-200, 1975.
153. Maqueda C., Morillo E., Perez J.L., A. Justo. Adsorption of chlordimeform by humic substances from different soils. *Soil Sci.*, 150: 431, 1990.
154. McCarthy, J.F. and S.M. Bartell. How the trophic status of a community can alter the bioavailability and toxic effects of contaminants. Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals. ASTM STP 988, J. Cairns, Jr. and J.R. Pratt, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 3–16, 1988.
155. McCarthy, J.F., and B.D. Jimenez. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 511–521, 1985.
156. Müller-Wegener U. Über die Bindung von s-Triazinen am Huminsäuren. *Geoderma*, 19: 227-235, 1977.
157. Müller-Wegener U. Interaction of humic substances with biota. In: *Humic substances and their role in the environment*, edited by Frimmel, F.H. and Christman, R.F. John Wiley & Sons Limited, 1988, p. 179-192.
158. Müller-Wegener U. and Ziechmann W. Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexe zwischen aromatischen Stickstoffheterocyclen und Huminsäure. *Z. Pflanz. Bodenk.* 143: 247-249, 1980.
159. Murphy E. M. and Zachara J.M. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Geoderma*. 67: 103-124, 1995.
160. Murphy E.M., Zachara J.M., Smith S.C. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 24:1507-1516, 1990.
161. Murphy E.M., Zachara J.M., Smith S.C., and Phillips J.L. The sorption of humic acids to mineral surfaces and their role in contaminant binding. *Sci. Total Environ.*, 117/118:413-423, 1992.
162. Oris, J.T., A.T. Hall, and J.D. Tylka. Humic acids reduce the photo-induced toxicity of anthracene to fish and daphnia. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 575–583, 1990.

163. Papilloud S., Haerdi W., Chiron S., and Barceló D. Supercritical fluid extraction of atrazine and polar metabolites from sediments followed by confirmation with LC-MS. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1822-1826, 1996.
164. Parfitt R.L., Fraser A.R., and Farmer V.C. Adsorption on hydrous oxides. III. Fulvic acid and humic acid on goethite, gibbsite and imogolite. *J. Soil Sci.* 28: 289-296, 1977.
165. Payá-Pérez A.B., Cortés A., Sala M.N., and Larsen B. Organic matter fractions controlling the sorption of atrazine in sandy soils. *Chemosphere*, 25 (6): 887-898, 1992.
166. Perdue E.M. Analytical constraints on the structural features of humic substances. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48: 1435-1442, 1984.
167. Perdue, E.M. Acidic functional groups of humic substances. In: *Humic substances in soil, sediment and water*, NY: 1985, p. 493-526.
168. Perminova I.V., Lebedeva G.F., D.V. Kovalevsky D.V., Kulikova N.A., Philippova O.I., Danchenko N.N, and Lomonosov M.V. Humic substances as natural detoxicants. *Proceedings of the 7th Meeting of IHSS, teil 2, F7*, 1996.
169. Perminova I.V., Frimmel F.H., Kovalevskii D.V, Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., and Hesse S. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. *Wat. Res.*, 32: 872-881, 1998.
170. Perminova IV, Grechishcheva NY, Petrosyan VS. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors. *Environ. Sci. Technol.* 33, "in press". 1999.
171. Perminova I.V., Kudryavtsev A.v., Kulikova N.A., Yaschenko N.Yu., and Petrisyan V.S. Development of quantitative relationships between structure, reactivity and detoxifying ability of humic substances to organic xenobiotics. *Abstracts of 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, 25-29 May 1999a*. Leipzig, Germany, p. 111.
172. Petersen, R.C., Jr. The contradictory biological behavior of humic substances in the aquatic environment. In: *Humic substances in the aquatic and terrestrial environment*, Berlin Heidelberg: Springer-verlag, 1991, p. 369-389.
173. Phuong H.K. and Tichy V. Activity of Humus Acids from Peat as Studied by Means of Some Growth Regulator Bioassays. *Biologia Plantrum (Praha)*, 18(3): 195-199, 1976.

174. Piccolo A. and Camici L. A comparison of two methods for the determination of total acidity of humic substances. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 41: 65-69, 1990.
175. Piccolo, A., Celano, G. and De Simone, C. Interaction of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolysed products. *Sci. Total Environ.* 117/118:403-412, 1992.
176. Piccolo A. and Mirabella A. Molecular weight distribution of peat humic substances with different inorganic and organic solutions. *Sci. Total Environ.* 62: 39-46, 1987.
177. Pommery J., M. Imbenotte, and F. Erb. Relation entre toxicite et formes libres de quelques metaux traces. *Environ. Poll. (Ser. B.)* 9, 127-136, 1985
178. Posner A.M. Importance of electrolyte in the determination of molecular weights by Sephadex gel with special reference to humic acids. *Nature (London)*. 198: 1161-1163, 1963.
179. Prat S. Permeability of Plant Tissues to Humic Acids. *Biol. Plant. (Praha)*, 5(4): 279-283, 1963
180. Prat S., Pospisil F. Humic Acids with C¹⁴. *Biol. Plant. (Praha)*, 1(1): 71-80, 1959
181. Preston, C.M. and Blackwell, B.A. Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid: signal-to-noise optimization, quantitation, and spin-echo techniques. *Soil Sci.* 139(1):88-96, 1985.
182. Preston, C.M. and Schnitzer, M. C(13) NMR of humic substances: pH and solvent effects. *J. Soil Sci.* 38:667-678, 1987.
183. Raman S., Krishna M., and P.R. Rao. Adsorption-desorption of atrazine on four soils of hyderabad. *Water, Air, and Soil Pollution.* 40: 177-184, 1988.
184. Rashid M.A. *Geochemistry of marine humic compounds.* Springer-Verlag, Oxford, 1985, 243 p.
185. Ricca, G. and Severini, F. Structural investigations of humic substances by IR-FT, C(13)- NMR spectroscopy and comparison with a maleic oligomer of known structure. *Geoderma* 58:233-244, 1993.
186. Rice J.A. and MacCarthy P. Stastical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.* 17(5): 635-648, 1991.
187. Salvetat R., Juneau Ph., and Popovic R. Measurements of chlorophyll fluorescence by synchronous detection in integrating sphere: a modified analytical approach for

- the accurate determination of photosynthesis parameters for whole plants. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2640-2645, 1998.
188. Sapek A. Effect of pH value of sample solution on separation of humic substances by gel filtration. *Rocz. Glebozn.* 24: 519-527, 1973.
189. Schlautman M.A. and Morgan J.J. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.* 27:961-969, 1993
190. Schnitzer M., Khan S.U. *Humic substances in the environment*. N.Y., Marcel Decker, 1972, p. 12-17.
191. Schnitzer M. The synthesis, chemical structure, reactions and functions of humic substances. In: *Humic substances effect on soil and plants*, pp. 26-28, 1986.
192. Schnitzer, M. and Preston, C.M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Soil Sci.Soc.Amer.J.* 50:326-331, 1986.(Abstract)
193. Schwertmann U. Inhibitory effect of soil organic matter on the crystallization of amorphous ferric hydroxide. *Nature (London)*. 212: 645-646, 1966.
194. Senesi N. and Testini C. Theoretical aspects and experimental evidence of the capacity of humic substances to bind herbicides by charge-transfer mechanism. *Chemosphere*, v. 13, N. 13, pp. 461-468, 1982.
195. Senesi N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Tot. Environ.* 123/124: 63-76, 1992
196. Senesi N., Dorazio V.D., Miano T.M. Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*. 66: 273-283, 1995.
197. Servos, M.R., D.C.G. Muir, and G.R.B.e Webster. The effect of dissolved organic matter on the bioavailability of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Aquat. Toxicol.* 14, 169-184, 1989.
198. Seta A.K. and Karathanasis A.D. Atrazine adsorption by soil colloids and co-transport through subsurface environment. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61: 612-617, 1997.
199. Shin, H.S. and Moon, H. An "average" structure proposed for soil fulvic acid aided by DEPT/QUAT C(13)NMR pulse techniques. *Soil Sci.* 161(4):250-256, 1996.

200. Sibanda H.M. and Young S.D. Competitive adsorption of humic acids and phosphate on goethite, gibbsite, and two tropical soils. *J. Soil Sci.* 37: 197-204, 1986.
201. Söchtig H. Gel chromatography as a method for characterization of humic systems. In: *Humic substances. Their structure and function in biosphere.* Povoledo D., Golterman L. (Eds.) PUDOC, Wageningen, pp. 321-335, 1972.
202. Sposito G., Martinetto L., and Yang A. Atrazine complexation by soil humic acids. *J. Environ. Quality.* 25 (6): 1203-1209, 1996.
203. Stevenson, F.J. Ch.9. Reactive functional groups of humic substances. In: *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions,* New York: John Wiley & Sons, 1982, p. 221-243.
204. Stewart, A.J. Interactions between dissolved humic materials and organic toxicants. In: *Synthetic fossil fuel technologies,* edited by Cowser, K.E. Boston: Butterworth publ., 1984, p. 505-521.
205. Stuermer, D.H. and Payne, J.R. Investigation of seawater and terrestrial humic substances with carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40:1109-1114, 1976.
206. Sullivan J.D., Felbeck G.T., A Study Of the Interaction Of S-Triazine Herbicides With Humic Acids From Three Different Soils. *Soil Sci.*, 106(1), p. 42, 1968
207. Swift, R.S. Molecular weight, shape, and size of humic substances by ultracentrifugation. In: *Humic substances II.* Ed. by Hayes M.H.B., MacCarthy P., and Swift R.S. John Wiley & Sons Ltd., 1989. p. 468-495.
208. Swift R.S. Organic matter characterization. In: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical methods-SSSA.* pp. 1011-1069, 1996.
209. Swift R.S. and Posner A.M. Gel chromatography of humic acids. *J. Soil Sci.* 22:237-249, 1971.
210. Tamiya H., Morimura K., Yokota M., and Kunieda R. Mode of nuclear division in synchronous cultures of *Chlorella*: comparison of various methods of synchronization. *Plant Cell Physiol.* 2: 383-403, 1961.
211. Tipping E. The adsorption of aquatic humic substances by iron oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 45: 191-199, 1981.

212. Trapmann S., Etxebarria N., Schnabl H., and Grobeker K.H. Progress in herbicide determination with the thylakoid bioassay. *Environ. Sci.&Pollut. Res.* 5:1, 17-20, 1998.
213. Tulonen, T., Salonen, K. and Arvola, L. Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. *Hydrobiologia* 229:239-252, 1992.
214. Varney M., Mantoura R.F.C., Whitfield M., Turner D.R, and Riley J.P. Potentiometric and conformational; studies of the acid-base properties of fulvic acids from natural waters. In: Trace metals in sea water. Proceedings of the NATO conference, Sicily, p. 751-772, 1981.
215. Vermeer A.W.P and Koopal L.K. Adsorption of humic acids to mineral particles. 2. Polydispersity effects with polyelectrolyte adsorption. *Langmuir.* 14: 4210-4216, 1998.
216. Visser S.A. Effects Of Humic Substances On Plant Growth. In: Humic Substances Effect On Soil And Plants. Italy, Reda, 89-135, 1986.
217. Vymazal, J. Short-term uptake of heavy metals by periphyton algae. *Hydrobiologie.* 119, 171-179, 1984.
218. Wang, Z-D., Gamble, D.S. and Langford, C.H. Interaction of atrazine with Laurentian fulvic acid: binding and hydrolysis. *Anal.Chim.Acta* 232:181-188, 1990.
219. Wang Z., Gamble D.S., Landford C.H. Interaction of Atrazine with Laurentian Humic Acid. *Analitica Chimica Acta*, 244, 135-143, 1991
220. Weber J.B., Weed S.B., Ward T.M. Adsorption of s-triazines on soil organic matter. *Weed Sci.* 17: 417-421, 1969.
221. Welhouse G.J Bleam W.F. Atrazine hydrogen-bonding potentials. *Environ. Sci. Technol.*, 27:494-500, 1993.
222. Wershaw, R.L. and Pinckney, D.J. Chemical structure of humic acids-Part 2. The molecular aggregation of some humic acid fractions in N,N-dimethylformamide. *Jour.Research U.S.Geol.Survey* 5(5):571-577, 1977.
223. Wershaw, R.L., Pinckney, D.J. and Booker, S.E. Chemical structure of humic acids-Part 1. A generalized structural model. *Jour.Research U.S.Geol.Survey* 5(5):565-569, 1977.

224. Wilson, M.A. and Goh K.M., NMR spectroscopy of soils: structure of organic material in sodium deuterioxide extracts from Patua loam, New Zealand. *J. Soil Sci.* 34:305-313, 1983.
225. Wilson, M.A., Vassallo, A.M., Perdue, E.M. and Reuter, J.H. Compositional and solid-state nuclear magnetic resonance study of humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Anal. Chem.* 59:551-558, 1987.
226. Winner, R.W. Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Res.* 19, 449–455, 1985.
227. Ziechman W. Huminstoffen. Problemen, Methoden, Ergebniss. Weicheim: Chemie, 1980, 480 p.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность:

- Заведующему кафедрой водной химии Университета Карлсруэ, Германия, проф. F. Frimmel и его сотруднику S. Hesse за оказанную помощь при проведении гель-хроматографических анализов.
- Сотруднику центра по изучению окружающей среды, Лейпциг, Германия, G. Balcke за неоценимую помощь при проведении экспериментов по взаимодействию атразина с гумусовыми кислотами и приготовлению адсорбционных комплексов каолинит-гумусовые кислоты.
- Сотруднику Института Экологической Химии (IÖC), Мюнхен, Германия, Dr. N. Hertkorn за оказанную помощь в постановке ЯМР экспериментов и обсуждению полученных результатов.
- Сотрудникам лаборатории ФОХ Химического факультета МГУ за любезно предоставленные препараты гумусовых кислот почв и помощь при обработке и обсуждении результатов.

А также организациям, оказавшим финансовую поддержку при выполнении данной работы:

- Российскому фонду фундаментальных исследований (проекты №96-04-49838 и №98-03-33186),
- Фонду INTAS (грант INTAS-1997 №1129)
- Фонду Сороса (гранты NBN000 и NBN300)
- Фонду BMBF (грант RUS-143/97)
- Leonardo Büro Part Sachsen
- Robert Havemann Scholarship

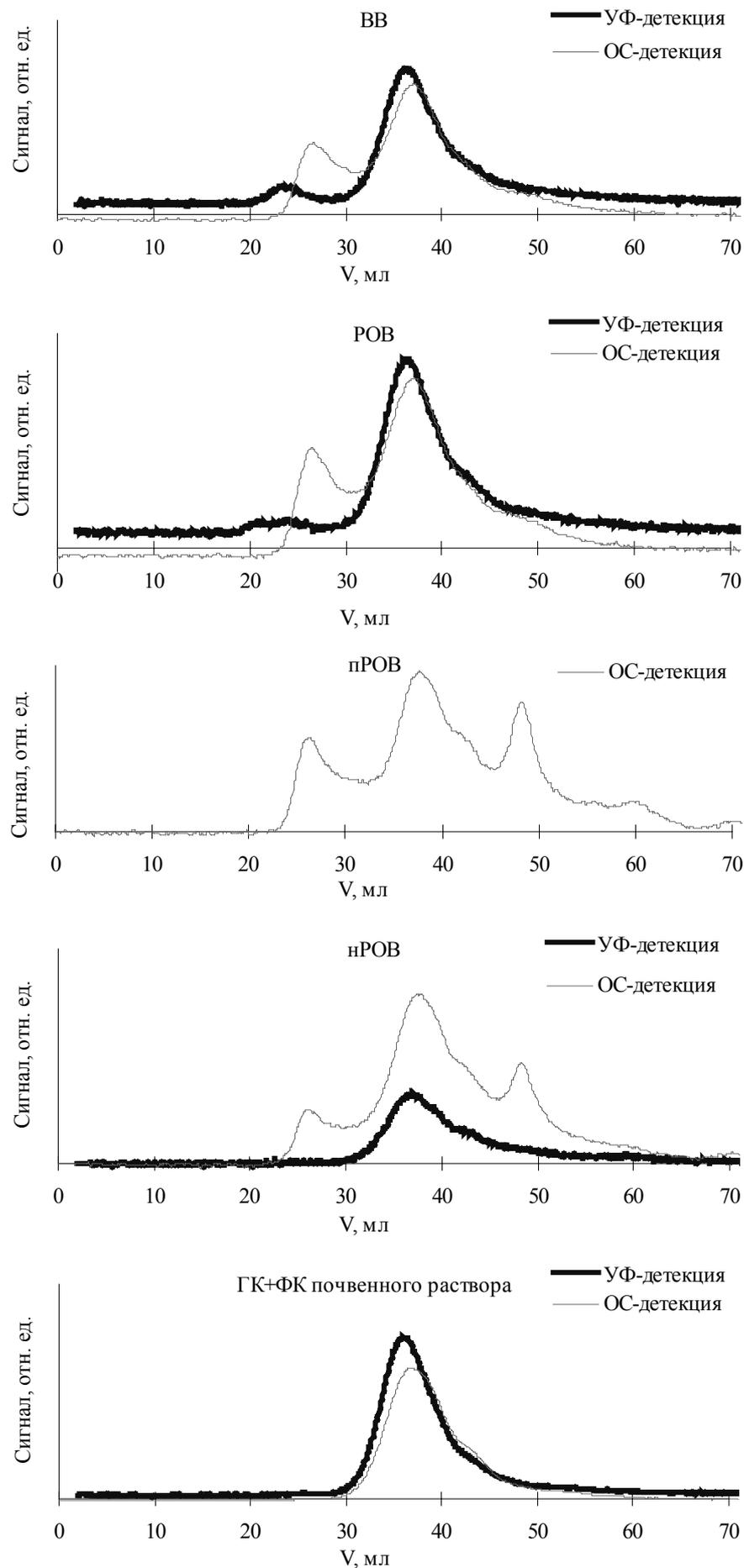
ПРИЛОЖЕНИЯ

Содержание элементов в препаратах гумусовых кислот по данным АЭС-ИСП анализа

Образец	Al	B	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Na	Si	Ti	Zn	K	Конц. ОБ
	мг/л												
WBW1	0,290±0,004	0,132±0,006	0,54±0,02	0,016±0,001	0,203±0,001	0,055±0,002	0,135±0,006	4,90±0,12	169,6±2,9	0,035±0,004	0,049±0,004	10,92±0,17	156
WBP1	0,219±0,019	0,127±0,003	0,49±0,02	0,028±0,010	0,132±0,007	0,107±0,002	0,154±0,002	0,154±0,002	74,23±0,39	0,028±0,004	0,030±0,007	0,282±0,001	257
WBG1	0,274±0,013	0,134±0,009	0,38±0,02	0,024±0,001	0,145±0,007	0,039±0,002	0,179±0,004	1,76±0,09	57,4±2,4	0,023±0,004	0,030±0,004	0,122±0,006	134
FBW1	0,474±0,037	0,43±0,18	0,59±0,01	0,016±0,001	0,294±0,014	0,067±0,004	0,120±0,004	2,99±0,18	6,97±0,16	0,045±0,009	0,059±0,004	106,2±3,5	1106
FBP1	0,355±0,022	0,401±0,012	2,16±0,03	0,050±0,001	0,153±0,001	0,040±0,002	0,127±0,002	3,15±0,14	8,61±0,30	0,020±0,004	0,030±0,007	212±11	389
FBG1	0,678±0,027	1,34±0,04	1,67±0,12	0,032±0,001	0,600±0,025	0,069±0,001	0,158±0,002	4,94±0,17	20,80±0,68	0,043±0,004	0,105±0,002	5,41±0,17	446
FGW	0,707±0,012	1,22±0,003	2,58±0,06	0,047±0,001	0,761±0,033	0,353±0,005	0,142±0,002	2,55±0,05	2,63±0,05	0,045±0,004	0,226±0,008	115±9	616
TTW	0,361±0,017	0,700±0,009	2,80±0,08	0,029±0,001	0,224±0,007	0,277±0,006	0,197±0,004	7,16±0,15	6,14±0,09	0,028±0,004	0,101±0,004	31,10±1,25	2722
H8*	2,61±0,07	0,321±0,007	1,25±0,07	0,037±0,001	0,641±0,019	0,163±0,002	0,456±0,016	65,6±4,7	6,30±0,15	0,088±0,004	0,048±0,002	2847±284	5000
RHA*	2,42±0,016	0,338±0,002	2,36±0,04	0,041±0,001	4,30±0,11	0,278±0,002	0,566±0,004	68,7±0,8	8,38±0,08	0,171±0,009	0,067±0,002	2815±44	3375
HST*	1,273±0,024	0,424±0,018	1,33±0,02	0,106±0,002	0,530±0,007	0,168±0,001	0,527±0,008	76,14±3,44	8,27±0,14	0,065±0,004	0,081±0,002	2988±147	3625
HS*	1,83±0,05	0,351±0,007	1,28±0,01	0,156±0,004	0,811±0,002	0,198±0,004	0,540±0,008	68,00±0,74	7,31±0,07	0,083±0,004	0,075±0,002	2931±25	1875
HTO*	1,307±0,047	0,380±0,011	0,925±0,007	0,035±0,001	0,600±0,001	0,161±0,002	0,562±0,016	77,5±2,8	7,56±0,17	0,171±0,004	0,056±0,006	2943±115	2500
HGW*	3,88±0,05	0,266±0,007	1,742±0,002	0,125±0,001	2,35±0,003	0,309±0,006	0,480±0,002	71,13±0,75	7,31±0,07	0,201±0,004	0,128±0,006	2752±33	3625
HBG1*	7,24±0,10	0,328±0,006	1,136±0,002	0,136±0,002	3,32±0,03	0,606±0,011	0,536±0,009	67,5±2,5	15,46±0,09	0,277±0,009	0,157±0,007	2983±105	3125
HBP1*	8,98±0,17	0,262±0,007	1,60±0,02	0,102±0,010	4,42±0,08	1,034±0,031	0,47±0,01	63,8±3,8	18,32±0,32	0,390±0,012	0,295±0,008	2790±212	2500
HBW1*	5,69±0,08	0,281±0,007	1,25±0,05	0,085±0,002	8,14±0,06	0,368±0,004	0,536±0,002	63,4±1,5	8,72±0,14	0,920±0,011	0,096±0,004	2775±90	3750
HBG*	39,04±0,28	0,240±0,005	2,73±0,02	0,325±0,003	26,43±0,55	3,64±0,07	0,499±0,006	76,5±2,1	64,96±0,44	1,19±0,02	0,180±0,004	2781±103	12500
HBW*	10,97±0,22	0,197±0,007	1,62±0,04	0,187±0,002	22,53±0,32	0,326±0,005	0,460±0,006	94,3±1,9	5,20±0,05	1,79±0,02	0,101±0,002	2741±67	14652

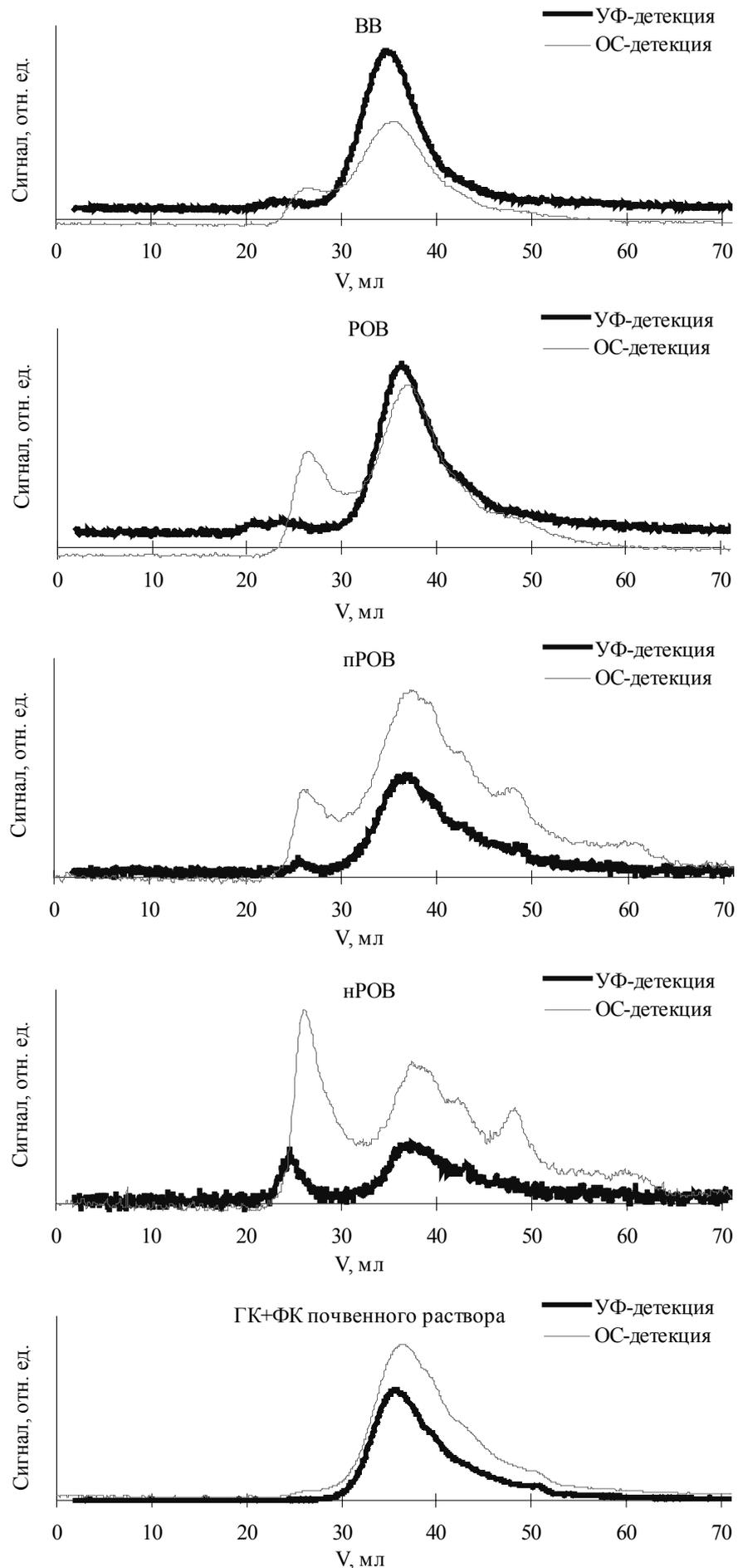
* - образцы готовили растворением в 0,1 М КОН.

Гель-хроматограммы ОВ водной вытяжки П^Д_{ПАХ} почвы на различных этапах выделения препаратов водорастворимых гумусовых кислот



ВВ - водная вытяжка; РОВ - растворенное органическое вещество; пРОВ - подкисленное до pH 2 РОВ; нРОВ - РОВ, не сорбировавшееся на XAD-2; ГК+ФК - сумма ГК и ФК почвенного раствора.

Гель-хроматограммы ОВ водной вытяжки П^Д_{ОГ} почвы на различных этапах выделения препаратов волонастворимых гумусовых кислот



ВВ - водная вытяжка; РОВ - растворенное органическое вещество; пРОВ - подкисленное до pH 2 РОВ; нРОВ - РОВ, не сорбировавшееся на XAD-2; ГК+ФК - сумма ГК и ФК почвенного раствора.

Изотермы адсорбции-десорбции гумусовых кислот на каолините

