

## Глава 11. Количественное определение гуминовых веществ

### 11.1. Гумус в почвах

#### 11.1.1. Определения

Гумус играет фундаментальную роль в экологических процессах как источник углерода для атмосферы, потребитель углерода из биосферы, потребитель и источник удобрений для растений и фактор, влияющий на свойства почвы; ему посвящаются регулярные обзоры (Kononova, 1966; Flaig и др., 1975; Schnitzer, 1978; Stevenson, 1982, 1994; Aiken и др., 1985; Tate, 1992; Carter и Stewart, 1995; Piccolo, 1996; Magdoff и др., 1996; Hessen и Tranvik, 1998).

Стивенсон (Stevenson, 1982) определил термин «гумус» (или гумифицированное вещество) как сумму органических соединений в почве, за исключением живых организмов в биомассе и неразложившихся или частично разложившихся органических остатков растительного или животного происхождения (см. гл. 9). Использование термина «органическое вещество почвы» менее определено: иногда его используют в том же значении, что термин «гумус», но в действительности он должен относиться к сумме органических материалов почвы.

Гумифицированное вещество представляет более половины общего органического углерода почвы и может быть подразделено на две группы: гуминовые и негуминовые вещества (Schnitzer, 1978). Физические и химические характеристики негуминовых веществ, например, углеводов, белков, пептидов, аминокислот, липидов, восков и органических кислот низкого молекулярного веса, легко определяемы.

С другой стороны, гуминовые вещества не обладают такими заметными физико-химическими характеристиками. Они имеют более или менее темный цвет, их молекулярная масса изменяется от нескольких сотен до нескольких сотен тысяч дальтон, и они имеют сложную химическую структуру, гидрофильный характер и кислые свойства.

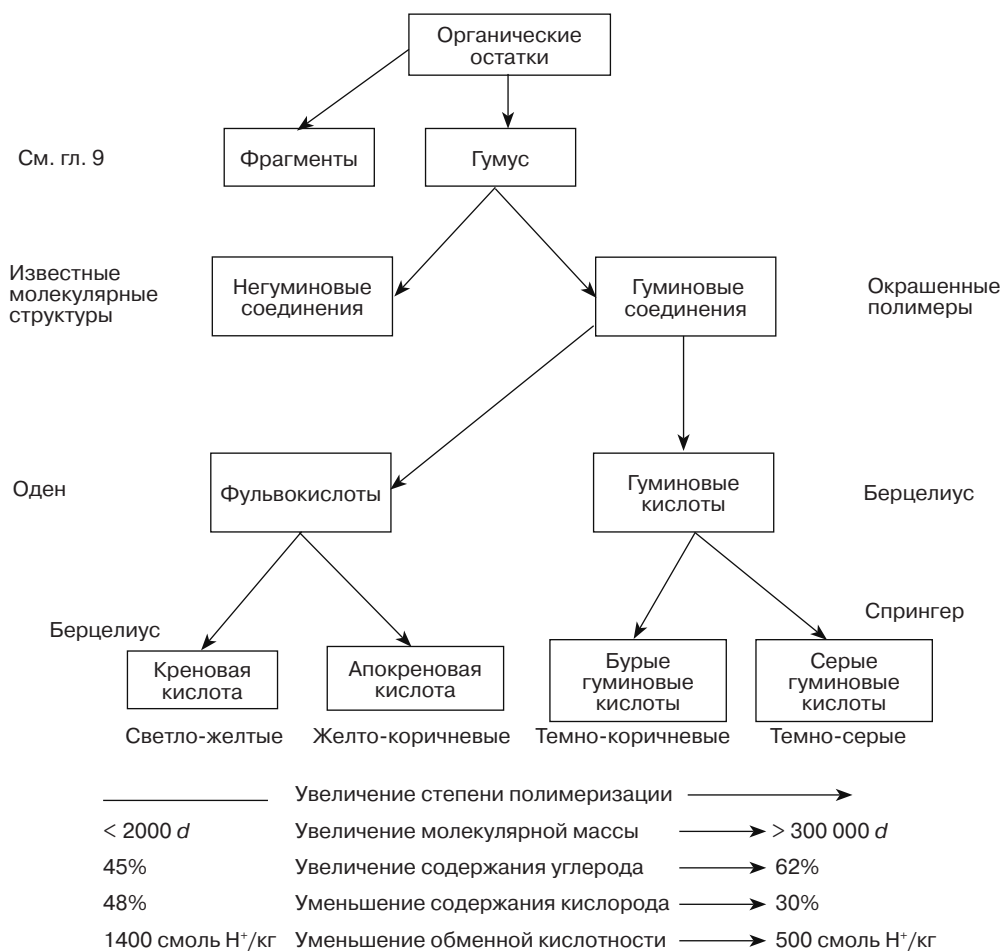
Однако различие между двумя типами веществ не полностью понятно, потому что гуминовые вещества всегда содержат негуминовые вещества, которые могут быть выделены такими химическими методами, как кислотный гидролиз.

Гуминовые вещества обычно разделяют на три основные группы в соответствии с их растворимостью:

- Гуминовые кислоты, растворимые в разбавленных щелочных растворах и нерастворимые в кислотах; они осаждаются при подкислении щелочных экстрактов из почвы.
- Фульвокислоты, растворимые в кислых и щелочных средах; эти соединения остаются в растворе после осаждения гуминовых кислот при подкислении щелочных экстрактов из почвы.
- Гумин — фракция гумуса, которая не экстрагируется кислотами или разбавленными основаниями.

Некоторые гуминовые вещества получили отдельные названия, связанные с их растворимостью в различных растворителях. Наиболее известны свойства гиматомелановых кислот как растворимой в этаноле фракции гуминовых кислот. Для фульвокислот

иногда используют устаревшее разделение на креновые и апокреновые кислоты. Некоторые авторы (например, *Chamayou* и *Legros*, 1989) не рекомендуют использовать эти термины. Можно различать бурые и серые гуминовые кислоты. Эти две группы были впервые выделены Спрингером (*Springer*, 1938) на основании их способности к флокуляции или растворению в различных растворителях, включая различные концентрации солей. На рис. 11.1 показаны некоторые свойства этих соединений.



**Рис. 11.1.** Классификация и химические свойства групп гуминовых веществ (согласно *Stevenson* и *Elliott*, 1989)

### 11.1.2. Роль гуминовых веществ в почвах и в окружающей среде

Гуминовые вещества содержат 60–70% углерода почвы, который представляет собой самый большой запас органического углерода на поверхности Земли. Гуминовые вещества играют значительную роль как источник углерода для атмосферного CO<sub>2</sub> и как резерв углерода, который может изменяться под воздействием различных внешних факторов (*Schnitzer*, 1978).

Стивенсон (*Stevenson*, 1982) привел девять свойств гумуса, оказывающих влияние на почву:

- темный цвет, который облегчает поглощение солнечного излучения и, следовательно, нагревает почву;
- водоудерживающая способность: органическое вещество может содержать количество воды, превышающее его собственную массу в 20 раз, и поэтому значительно улучшает водные свойства некоторых (особенно песчаных) почв;
- способность соединяться с глинистыми минералами, склеивая частицы почвы в структурные единицы, называемые агрегатами, что облегчает газовый обмен и увеличивает проницаемость;
- хелатообразование с образованием стабильных комплексов со многими поливалентными катионами — влияет на доступность питательных веществ растениям;
- очень малая растворимость в воде и способность образования связей с глинами и некоторыми поливалентными катионами, что уменьшает потери органического вещества из-за выщелачивания;
- буферные свойства, которые проявляются в слабокислой, нейтральной и щелочной среде;
- емкость катионного обмена: 20–70% от ЕКО многих почв обусловлено наличием органического вещества;
- минерализация, приводящая к выделению  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  и представляющая значительный источник питательных веществ для растений;
- сочетание с другими органическими молекулами, которое влияет на биологическую активность, стабильность и биоразлагаемость пестицидов.

В данной главе приводится описание основных методик для выделения и количественного определения гуминовых веществ почвы. Справочный раздел, приведенный в конце главы, содержит обширный список методов, используемых для этих целей.

Методы выделения описаны для образцов цельных почв, подготовленных стандартными методами. Однако часто предпочтительнее применять эти методы для выделенных фракций после физического разделения органического вещества (см. гл. 9), в частности для самых мелких фракций.

### 11.1.3. Методы экстракции

Органические вещества связаны с поливалентными катионами, гидроксидами и глинистыми минералами с образованием органоминеральных комплексов. Стабильность этих комплексов значительно меняется в зависимости от типа связей.

Органические вещества могут быть выделены методами экстракции, которые разрывают (по крайней мере, некоторые) органо-минеральные связи. Брукерт (*Bruckert*, 1979) различал три типа экстрагирующих растворов:

- Растворы солей, которые могут разрывать электростатические связи через простой обмен ионов и способствуют растворению органических молекул, ионизируя кислотные и фенольные функциональные группы; Брукерт предложил использовать раствор тетрабората натрия с рН 9,7; экстрагированные органоминеральные вещества относительно малой молекулярной массы были описаны как подвижные или легкодоступные новообразованные комплексы (*Duchaufour*, 1977); они характеризуются относительно малым содержанием металлов; тетраборат не затрагивает комплексы кальция.
- Комплексообразующие растворы, способные разрывать координационные связи: самым известным является раствор пирофосфата натрия, обычно используемый

при рН 9,8, он разрывает связи комплексов с металлическими центрами на глинистых минералах; он может солиubilизировать комплексы с высоким содержанием металлов (аморфные гидроксиды) и растворять гуматы кальция, образуя комплексы с кальцием, но, как и тетраборат, неэффективен в отношении аллофановых комплексов; все известные экстрагированные комплексы устойчивы.

- Раствор гидроксида натрия с рН 12 является самым эффективным экстрагентом, поскольку он способен разорвать большинство органо-минеральных связей и особенно связи комплексов гуминовых кислот с аллофаном в андосолях.

Стандартные методы, представленные в разделе 11.2.1, описывают:

- простую экстракцию щелочным раствором после обработки кислотой или без нее;
- двойную экстракцию последовательно растворами пирофосфата и гидроксида натрия (этот метод используется в лабораториях Исследовательского института *IRD*, Франция).

В разделе 11.2 сравниваются эффективность и точность этих методов и описываются основные методы очистки экстрагированных органических веществ.

Некоторые альтернативы этим методам экстракции, включая метод отделения гумина центрифугированием в гранулу, представлены в разделе 11.3. Методы фракционирования и характеристики гуминовых веществ описаны в гл. 12.

## 11.2. Основные методы анализа

### 11.2.1. Экстракция

#### Основные положения

Как указано в разделе 11.1.3, разбавленные растворы гидроксида натрия являются самыми эффективными экстрагентами для гумифицированного вещества. Однако использование этих экстрагирующих растворов было подвергнуто критике по трем основным причинам (*Bruckert*, 1979):

- новообразование растворимых веществ из негумифицированного растительного материала;
- разрушение гуминовых веществ при гидролизе, окислении или искусственной полимеризации;
- *лизис микробных организмов*; гидроксид натрия может разрушать бактерии и освобождать содержимое цитоплазмы, а стенки клеток затем образуют неэкстрагируемый остаток.

Однако Шнитцер (*Schnitzer*, 1982) не считал, что экстракция разбавленными щелочами в атмосфере азота и при комнатной температуре существенно изменяет структуру и характеристики экстрагированного органического вещества. Левеск и Шнитцер (*Lévesque* и *Schnitzer*, 1966) показали, что 0,1 М раствор гидроксида натрия экстрагирует больше органического вещества, чем концентрированные растворы. Они также показали, что 0,5 М раствор гидроксида натрия экстрагирует органическое вещество с меньшим содержанием золы.

Для максимизации экстракции гуминовых веществ и минимизации их разрушения были выбраны «метод Шнитцера» (*Schnitzer*, 1982) и «метод МГО» (Международного гуминового общества)<sup>1</sup>. Одноступенчатая экстракция выполняется: (1) в атмосфере

<sup>1</sup> *IHSS* – *International Humic Substances Society*, Univ. of California, Los Angeles, CA 90024; Federal Center, mall stop 407, Box 25046, Denver, CO 80225.

азота 0,1 М раствором гидроксида натрия, как описано в «методе МГО», или (2) тем же реагентом или 0,5 М раствором гидроксида натрия или пиродифосфата, как описано в «методе Шнитцера» (Schnitzer, 1982). «Метод Дабена» (Dabin, 1976) разделяет два типа экстрагированных соединений: органические вещества, экстрагируемые раствором пиродифосфата при рН 9,8, и органические вещества, экстрагируемые затем 0,1 М раствором гидроксида натрия. Негр с сотр. (Nègre и др., 1976) наблюдали качественные различия между двумя экстрактами в частности, в содержании аминокислот; Томанн (Thomann, 1963) обнаружил, что пиродифосфат растворяет гуматы кальция за счет образования комплексов с катионами металла; увеличение рН влияет в основном на диспергирование агрегатов, а рН 9,8 соответствует стабильной фазе на кривой экстракции гумуса в зависимости от рН.

Другой подход включает предварительную обработку почвы кислотой; такая обработка облегчает последующую экстракцию гумифицированного вещества, разрушая карбонаты и растворяя гидроксиды железа и алюминия; однако количественный эффект обработки очевиден только для карбонатных почв. «Метод МГО» рекомендует обязательную предварительную обработку 1 М раствором хлористоводородной кислоты. В «методе Шнитцера» рекомендуется предварительная обработка 0,05 М раствором хлористоводородной или серной кислоты только в случае карбонатных почв. «Метод Дабена» рекомендует обязательную предварительную обработку 2 М фосфорной кислотой. Эта кислота имеет два преимущества: (1) ее более высокая плотность (примерно 1,2) более благоприятна для отделения легких органических фрагментов (см. гл. 9), и (2) она не мешает определению углерода (мокрым озолением) и таким образом позволяет определять количество органического вещества, экстрагированного кислотой (несвязанная фульвокислота).

### Оборудование

- Колбы для экстракции и центрифугирования из стекла, полипропилена или поливинила (объем 200 мл и 300–500 мл) с навинчивающимися крышками для использования в качестве центрифужных пробирок, выдерживающие 10 000 g.
- Центрифуга (10 000 g), оборудованная ротором для центрифужных колб.

### Реагенты

- *Дегазированная вода без органических веществ.* Пригодны большинство коммерческих марок воды. Сначала ее нужно проверить на отсутствие органического вещества (холостой опыт в условиях последующих испытаний). Для удаления органического вещества из воды либо (1) кипятят воду в присутствии 1%  $\text{KMnO}_4$  и  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в течение 2 ч и затем перегоняют, либо (2) используют деионизированную воду, очищенную активированным углем (например, фильтром Миллипор), затем дегазируют воду для удаления растворенного кислорода, чтобы исключить окисление органического вещества во время экстракции (для этого воду кипятят или барботируют азотом в течение 10 мин).
- *0,1 М раствор NaOH:* растворяют 8 г гранулированного гидроксида натрия в двухлитровой мерной колбе в дегазированной воде без органики, доливают до 2 л, перемешивают и хранят в тщательно закрытой бутылке.
- *0,5 М раствор NaOH:* растворяют 40 г гидроксида натрия в 2 л воды, как описано выше.
- *10 М раствор NaOH:* растворяют 400 г гидроксида натрия в 1 л воды, как описано выше.

- *0,1 М раствор  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$* : растворяют 89,2 г  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  в дегазированной воде без органики, доливают до 2 л и хранят в тщательно закрытой бутылки.
- *0,1 М раствор  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7/\text{NaOH}$* : растворяют 89,2 г  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  и 8 г гранулированного гидроксида натрия в дегазированной воде без органики, доливают до 2 л и хранят в тщательно закрытой бутылки.
- *2 М раствор  $\text{HCl}$* : растворяют 166,7 мл концентрированной  $\text{HCl}$  ( $d = 1,19$ ) в дегазированной воде без органики, доливают до 1 л.
- *6 М раствор  $\text{HCl}$* : растворяют 500 мл концентрированной хлористоводородной кислоты в 1 л дегазированной воды без органики.
- *1 М раствор  $\text{HCl}$* : растворяют 166,7 мл  $\text{HCl}$  в 2 л дегазированной воды без органики.
- *0,5 М раствор  $\text{HCl}$* : растворяют 83,3 мл  $\text{HCl}$  в 2 л дегазированной воды без органики.
- *0,05 н. раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$* : растворяют 27,8 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $d = 1,81$ ) в дегазированной воде без органики, охлаждают и доливают до 2 л.
- *2 М раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$* : растворяют 136 мл концентрированной фосфорной кислоты ( $d = 1,71$ ) в дегазированной воде без органики, и доливают до 1 л.

## Методики

### Метод Шнитцера (1982)

Если почва содержит карбонаты (реакция с разбавленной хлористоводородной кислотой), ее оставляют в контакте с 0,05 н. раствором хлористоводородной или серной кислоты при комнатной температуре до окончания выделения газа. Смывают избыток кислоты водой без органики и сушат почву на пластине при комнатной температуре.

Отвешивают 10 г воздушно-сухой почвы в полипропиленовой колбе на 200 мл. Добавляют 100 мл выбранного экстрагирующего раствора (0,1 или 0,5 М  $\text{NaOH}$ , 0,1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  или смесь 0,1 М  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7/\text{NaOH}$ ). Вытесняют воздух из колбы потоком азота. Тщательно закрывают и перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч. Отделяют темную надосадочную жидкость от твердой фазы центрифугированием (предпочтительно в течение 10 мин при 10 000 g), суспендируют остаток в 50 мл дегазированной воды без органики, снова центрифугируют и добавляют промывную воду к предыдущему раствору.

Подкисляют щелочной экстракт до pH 2, добавляя 2 М раствор  $\text{HCl}$ . Оставляют на 24 ч при комнатной температуре, затем отделяют водорастворимое вещество (фульвокислоты) от коагулировавшего вещества (гуминовые кислоты) центрифугированием. Обе фракции можно высушить лиофилизацией или упариванием на роторном испарителе при 40 °C.

### Метод МГО

Смешивают 20 г воздушно-сухой почвы с 1 М раствором хлористоводородной кислоты. Доводят pH раствора до 1–2 (добавлением 15–20 мл 10 М раствора гидроксида натрия) так, чтобы конечный объем раствора был равен 200 мл (отношение жидкость : почва = 10 мл : 1 г). Перемешивают в течение 1 ч и отделяют надосадочную жидкость центрифугированием.

Нейтрализуют отцентрифугированную гранулу до pH 7 добавлением 1 М раствора гидроксида натрия и добавляют 0,1 М раствор  $\text{NaOH}$  в атмосфере азота до достижения отношения раствор : почва = 10 : 1.

Перемешивают смесь не менее 4 ч в атмосфере азота. Оставляют на ночь и центрифугируют.

Подкисляют отцентрифугированную жидкость до pH 1 добавлением 6 М раствора хлористоводородной кислоты при перемешивании. Оставляют стоять на 12–16 ч и центрифугируют для отделения фульвокислот в растворе от коагулированных гуминовых кислот.

Метод Дабена (1976)

Помещают 40 г воздушно-сухой почвы, измельченной и просеянной сквозь сито 0,5 мм, в центрифужную пробирку на 300–500 мл. Добавляют 200 мл 2 М раствора  $H_3PO_4$ , перемешивают в течение 30 мин на возвратно-поступательном шейкере и центрифугируют при 1500 g в течение 5 мин. Отфильтровывают надосадочную жидкость через плоский фильтр в стеклянную колбу на 1 л. Повторяют экстракцию дважды или трижды в той же центрифужной пробирке, отфильтровывая через тот же фильтр и собирая кислые экстракты в ту же колбу. Фильтр содержит легкое органическое вещество (ЛОМ) из негумифицированных растительных и животных остатков (см. гл. 9); кислотный раствор содержит небольшую фракцию органического вещества, названную Дабеном (*Dabin*, 1976) свободными фульвокислотами (СФК). Промывают отцентрифугированный осадок дважды или трижды 200 мл воды без органики в той же пробирке, перемешивая в течение 15 мин; центрифугируют и фильтруют промывную воду на использованном фильтре для сбора легкого вещества, оставшегося в промывной воде, а фильтрат отбрасывают.

Добавляют 200 мл 0,1 М раствора  $Na_4P_2O_7$  с pH 9,8. Перемешивают в течение 4 ч на возвратно-поступательном шейкере или оставляют на ночь при периодическом перемешивании. Отделяют надосадочную жидкость центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин и переносят ее после фильтрования в мерную колбу на 1 л. Проводят вторую экстракцию в тех же условиях и объединяют экстракты. Если второй экстракт темного цвета, выполняют третью экстракцию.

Повторяют аналогичную серию экстракций с отцентрифугированным осадком, используя 0,1 М раствор NaOH вместо раствора пиррофосфата с pH 9,8.

Гуминовые кислоты из пиррофосфатных и щелочных экстрактов отделяют от фульвокислот подкислением до pH 1, добавляя 2 М раствор HCl, как описано в параграфе «Метод Шнитцера (1982)». В конечном счете, получают следующие фракции: ЛОВ, СФК, пиррофосфатные фульвокислоты (ПФК), пиррофосфатные гуминовые кислоты (ПГК), щелочные фульвокислоты (ЩФК), щелочные гуминовые кислоты (ЩГК) и остаток после экстракции, или гумин.

Примечание

В некоторых почвах пиррофосфатные или щелочные экстракты могут содержать большие количества мелких частиц глинистых минералов (менее 0,2 мкм). Эти частицы можно отделить флокуляцией при добавлении небольшого количества сульфата калия, однако существует риск одновременной флокуляции некоторых серых гуминовых кислот (см. раздел 11.2.4 и гл. 12). После центрифугирования флокулированный осадок анализируют на содержание углерода индивидуально или после объединения с предыдущим гуминовым осадком.

## 11.2.2. Количественный анализ экстрактов

### Основные положения

Количественное определение углерода проводят, измеряя его содержание в каждом экстракте (см. раздел 11.2.1). Методы определения содержания углерода в цельной почве



могут применяться и для гуминового осадка (см. гл. 10). Для ЛОВ предпочтителен метод озоления. Экстракты можно также анализировать озолением остатка после выпаривания аликвоты досуха. Азот можно определять одновременно с углеродом, водородом и, возможно, серой и кислородом на CHN-анализаторе. Однако мокрые методы, такие как окисление бихроматом (см. ниже), часто предпочтительнее для анализа экстрактов. Существует также метод с использованием прибора для определения растворенного углерода. Многие из таких приборов основаны на определении диоксида углерода (обычно по поглощению в инфракрасной области), полученного при окислении раствора мощным окислителем. Приборы для определения растворенного углерода довольно дорогие и используются для точных исследований объектов окружающей среды; они требуют точного выполнения инструкции производителя.

В кислой среде бихромат окисляет углерод органического вещества до  $\text{CO}_2$  в соответствии с реакцией окисления – восстановления:



В отсутствие автоматизированного оборудования количество выделенного  $\text{CO}_2$  можно измерить непосредственно. В традиционном окислительно-восстановительном методе используют избыток бихромата, который затем определяют обратным титрованием раствором двухвалентного железа:



Один моль двухвалентного железа соответствует 1/6 моля  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , т. е. 1/4 атома С или 3 г углерода.

### Оборудование

- Лабораторные стаканы из пирекса на 50 и 100 мл.
- Прецизионная бюретка (на 25 или 50 мл).
- Если необходимо, прибор для определения углерода методом сухого озоления, хотя методы мокрого анализа предпочтительнее.

### Реагенты

- 0,1 М раствор  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  и 0,1 М раствор  $\text{NaOH}$  (см. параграф «Реагенты» раздела 11.2.1).
- Концентрированная серная кислота ( $d=1,81$ ).
- 2 н. раствор серной кислоты: растворяют 56 мл концентрированной серной кислоты ( $d=1,81$ ) в 1 л воды без органических веществ.
- 0,1 н. раствор серной кислоты: растворяют 2,8 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $d=1,81$ ) в 1 л воды без органических веществ.
- 2%-ный раствор бихромата калия: растворяют 20 г  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в примерно 400 мл воды без органических веществ, медленно добавляют 500 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают, охлаждают и доводят объем до 1 л добавлением воды без органических веществ.
- 0,5 н. раствор  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ : постепенно растворяют 24,52 г бихромата калия в воде без органических веществ, и доводят объем до 1 л (раствор для титрования соли Мора).



- *0,2 М раствор соли Мора*: растворяют 78,4 г соли Мора ( $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) в 500 мл воды, добавляют 20 мл концентрированной серной кислоты, доливают до 1 л.
- *Фторид натрия* в форме порошка.
- *Раствор сульфата дифениламина*: растворяют 0,5 г порошка дифениламина в 100 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , наливают в 20 мл воды, перемешивают и хранят в темном флаконе.

## Методика

Анализируемые пробы

*Общее органическое вещество щелочных и пирофосфатных экстрактов*. В низкий стакан на 100–200 мл помещают точно измеренный объем экстракта, соответствующий 5–8 мг С. Объем аликвоты рассчитывают, исходя из анализа общего С в пробе (см. гл. 10). Содержание углерода в щелочном экстракте составляет около 40% от общего С, в пирофосфатном экстракте — около 25%, в щелочном экстракте после экстракции пирофосфатом — около 15% от общего С. Перед определением пробу высушивают в сушильном шкафу при 70 °С.

*Гуминовые кислоты*. Берут более 50% экстракта пробы для определения общего органического вещества. Осаждают гуминовые кислоты при  $\text{pH} \sim 1$  добавлением 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (примерно 4–5 мл кислоты на 10 мл общего экстракта, 3 мл на 10 мл пирофосфатного экстракта, 1,5 мл на 10 мл щелочного экстракта); оставляют для флокуляции не менее чем на 4 ч, и центрифугируют при 3500 г не менее 5 мин; отделяют надосадочную жидкость (фульвокислоты) и промывают 0,1 н. раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Растворяют отцентрифугированный осадок в 0,1 М растворе NaOH, переносят в стакан и высушивают при 70 °С перед анализом.

*Фосфорнокислый экстракт*. Точно отбирают 100 мл аликвоту экстракта, концентрируют в сушильном шкафу до объема примерно 10 мл ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  не упаривается досуха) и титруют полученный концентрированный раствор.

*Фульвокислоты*. Фульвокислоты можно определять аналогично общему органическому веществу после удаления гуминовых кислот, но обычно их содержание рассчитывают по разнице между содержанием общего органического вещества и гуминовых кислот.

Окислительно-восстановительное титрование

После высушивания навесок в стаканах добавляют 10 мл 2%-ного раствора бихромата калия в серной кислоте. Одновременно выполняют холостой опыт с 10 мл того же раствора бихромата в стакане. Накрывают стакан крышкой и очень осторожно кипятят на плитке, отрегулированной на 215–220 °С; кипятят в течение 5 мин, избегая перегрева или слишком бурного выпаривания.

Охлаждают, споласкивают крышку стакана и добавляют в стакан 100 мл воды без органических веществ, 1,5 г NaF (или 2,5 мл  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) и три капли раствора дифениламина.

Титруют раствором соли Мора из бюретки до тех пор, пока фиолетовый цвет раствора не изменится на светло-зеленый.  $V$  и  $V'$  — объемы раствора двухвалентного железа, необходимые для титрования холостого раствора и анализируемой пробы, соответственно.

Если  $T$  — молярная концентрация раствора соли Мора; количество  $\text{Fe}^{2+}$ , эквивалентное количеству окислителя, использованному для титрования углерода пробы —  $T(V-V')$  ммоль  $\text{Fe}^{2+}$ , что, согласно уравнениям окисления — восстановления

(см. параграф «Основные положения» раздела 11.2.2), соответствует  $3T(V-V')$  мг углерода в стакане, то содержание углерода в образце почвы, выраженное в мг С/г почвы, составит

$$C = 3 T(V-V')V_f/(A m_p), \quad (11.1)$$

где  $V_f$  — общий объем экстракта гуминовых веществ, мл;  $A$  — аликвота гуминового экстракта, использованная для титрования, мл;  $m_p$  — масса пробы почвы, использованной для экстракции, г;  $T$  — величина, определяемая титрованием.

Титрование раствора соли Мора

Помещают в стакан на 250 мл точно 10 мл 0,5 н. раствора  $K_2Cr_2O_7$ , 100 мл воды без органических веществ и 15 мл концентрированной  $H_2SO_4$ .

Охлаждают и добавляют 3,75 г NaF и три капли индикатора дифениламина.

Титруют раствором соли Мора из бюретки. Если  $V_f$  — объем раствора соли Мора, мл, молярная концентрация  $T$  этого раствора будет равна  $T = 5/V_f$ . Тогда содержание углерода в уравнении (11.1) можно выразить в мг С/г почвы:

$$C = 15(V-V')V_f/(A m_p V_f). \quad (11.1')$$

Примечания

10 мл 2%-ного раствора бихромата соответствуют 20,4 мл 0,2 М раствора соли Мора. Объем раствора соли Мора, использованный для титрования пробы, должен быть от 7 до 15 мл; если он меньше, повторяют анализ с пробой большей массы, если больше — берут пробу меньшей массы.

Количество углерода в фосфорнокислом растворе обычно мало. В этом случае окисление проводят, используя только 5 мл 2%-ного раствора бихромата и добавив пять капель концентрированной  $H_2SO_4$  перед кипячением.

Пирексовые стаканы подвергаются воздействию щелочных растворов и NaF в кислой среде. Их надо споласкивать сразу после титрования и использовать только для этой цели.

### 11.2.3. Точность и сопоставимость методов экстракции

#### Межлабораторные испытания

Межлабораторные сравнительные испытания, проведенные *GEMOS*<sup>1</sup> (Группой по исследованию органического вещества почвы Французской ассоциации почвоведов), включали сравнение результатов определения количества органических веществ, экстрагированных из семи почв различных регионов Франции (*Dabin* и др., 1983):

1. Илистая почва с плит Буаньиля.
2. Перегнойно-карбонатная почва из Понтарлье.
3. Горизонт А1 подзола из леса Вилле-Котре.
4. Горизонт Вh того же подзола (п. 3).
5. Феррисиаллитная почва из окрестностей Монпелье.
6. Глеевая почва с гидромулевым гумусом из Бонво.
7. Рендзина на меловых отложениях из Шалона-на-Марне.

<sup>1</sup> *GEMOS* — *Groupe d'Etude des Matieres Organiques des Sols, sub-group of the Association Francaise d'Etude des Sols (AFES), INRA, 78850 Thiverval-Grignon, France.*

Каждая почва анализировалась в четырех французских лабораториях:

- лаборатория Центра международного сотрудничества и агрономических исследований в целях развития (*CIRAD*<sup>1</sup>), г. Монпелье;
- лаборатория почвоведения университета г. Пуатье;
- лаборатория института для целей развития (*IRD*<sup>2</sup>) г. Бонди;
- лаборатория почвоведения университета г. Безансон.

В качестве стандартного метода для сравнения результатов был выбран метод, описанный в параграфе «Метод МГО». Кроме того, лаборатория в Бонди использовала «метод Дабена» на тех же пробах.

### Результаты экстракции методом МГО

Результаты межлабораторных испытаний приведены на рис. 11.2. Содержание углерода в г/100 г сухой почвы, полученное для суммы трех фракций (кислотный экстракт + щелочной экстракт + неэкстрагируемый остаток) по сравнению с содержанием общего углерода, полученного для цельной почвы, показано на рис. 11.2, *a*. Тот факт, что результаты расположены близко к прямой, проведенной из центра координат под углом 45°, указывает на отсутствие систематического сдвига между двумя методами.

На рис. 11.2, *b* показано количество углерода, экстрагированного раствором хлористоводородной кислоты, по сравнению с общим экстрагированным количеством. Оно оказалось низким, не более 5% общего углерода. Два исключения, для которых полученное значение равно 10%, вероятно объясняются присутствием фрагментов легкого негумифицированного органического вещества. Полученные величины отличались значительным разбросом и не коррелировали с содержанием общего углерода.

На рис. 11.2, *c* показано содержание углерода в щелочном экстракте по сравнению с содержанием общего углерода. Можно сделать два замечания:

1. В 6 из 7 случаев щелочной раствор экстрагировал 20–40% общего углерода. Результаты показывают меньший разброс, чем в случае кислотной экстракции. Распределение результатов указывает на существование предела экстракции, равного примерно 40% общего углерода, для шести почв (прямая). Значения, расположенные выше этого предела, вероятно, связаны с ошибками из-за недостаточной экстракции.
2. Получено аномально высокое значение для почвы 4. Это может быть связано с тем фактом, что проба почвы была отобрана из глубокого органогенного горизонта Vh подзола; органическое вещество, выщелоченное до этой глубины, было гораздо лучше растворимо в щелочном растворе, чем в других шести почвах, и в этом случае реагент экстрагировал более  $\frac{3}{4}$  углерода пробы.

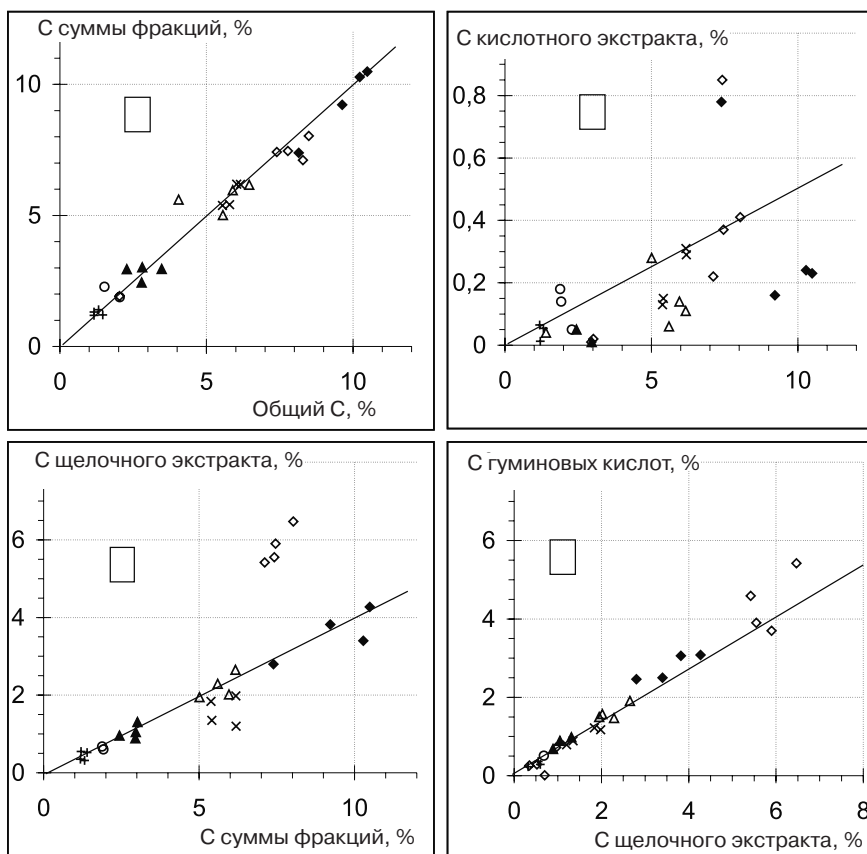
На рис. 11.2, *d* показано количество углерода в форме гуминовых кислот по сравнению с углеродом в общем щелочном экстракте. Независимо от типа почвы, углерод гуминовых кислот составлял примерно  $\frac{2}{3}$  углерода щелочных экстрактов, т. е. примерно 27% общего углерода. Разброс результатов относительно этого значения невелик.

### Точность метода МГО

В табл. 11.1 показаны результаты дисперсионного анализа данных, полученных методом МГО: оценена значимость различий между величинами, полученными для каждой почвы, по сравнению с экспериментальной погрешностью.

<sup>1</sup> *CIRAD* — *Centre International de Recherche Agronomique pour le Developpement*, Avenue d'Agropolis, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex, France.

<sup>2</sup> *IRD* — *Institute of Research for the Development (ex-Orstom)*, 32 Avenue Varagnat, 93143 Bondy, France.



**Рис. 11.2.** Результаты межлабораторного сравнения использованного метода экстракции, описанного в параграфе «Метод МГО» (неопубликованные данные). Результаты, полученные в 4 лабораториях для 7 почв, описанных в тексте: + — почва 1; Δ — почва 2, ▲ — почва 3, ◇ — почва 4, × — почва 5, ◆ — почва 6, ○ — почва 7

**Таблица 11.1.** Точность измерений в межлабораторных сравнительных испытаниях на 7 почвах с использованием метода МГО ( $F$ -тест — критерий значимости полученных величин относительно остаточной дисперсии  $s_r^2$  для 4 лабораторий)

Определяемый параметр	$F(6,21)$	$s_r^2$	$s$	ОСО, %
С кислотного экстракта	4,2 (—)	0,026	0,16	83
С щелочного экстракта	107***	0,141	0,38	17
С гуминового остатка	37***	0,317	0,56	22
С суммы фракций	83***	0,410	0,64	13
Общий С почвы	100***	0,403	0,63	13
С гуминовых кислот	67***	0,131	0,36	22
С фульвокислот	16***	0,036	0,19	35

\*\*\* — Существенная разница между данными лабораторий при уровне значимости  $< 1\%$ .

— — Разница незначительна.

$s$  и ОСО — ожидаемое абсолютное (г С/100 г сухой почвы) и относительное (%) стандартное отклонение среднего результата измерения в лаборатории.

F-тест — отношение дисперсии между почвами (7 почв, т. е. 6 степеней свободы) к внутрилабораторной дисперсии (27 измерений, т. е. 20 степеней свободы), представленной величиной  $s_r^2$ . Суммарная оценка стандартной погрешности, связанной с измерениями в данной лаборатории для неопределенной почвы, выражена в абсолютных значениях — обозначена как  $s$  (г С/100 г сухой почвы) и в относительных величинах — ОСО (относительное стандартное отклонение). Эти величины, представляющие межлабораторную воспроизводимость, являются верхними границами погрешности. Повторяемость внутри одной лаборатории с квалифицированным персоналом будет лучше.

Содержание углерода измерялось в хлористоводороднокислом экстракте, в щелочном экстракте, в гуминовом остатке, в сумме этих трех фракций, и наконец, в гуминовых кислотах и в фульвокислотах.

Данные табл. 11.1 показывают:

- Результаты экстракции хлористоводородной кислотой невозможно контролировать, погрешности определения превышают различия между почвами; это подтверждает распределение результатов, приведенное на рис. 11.2, *b*.
- Во всех других случаях различия между почвами были существенны по сравнению с остаточной ошибкой, представляющей межлабораторную вариабельность.
- В щелочных экстрактах точность измерений гуминовых кислот выше, чем фульвокислот, что может быть связано с большим содержанием гуминовых кислот.
- Точность измерения содержания общего углерода почвы, полученная для суммы первых трех фракций, имеет одинаковый порядок величины с точностью прямого определения содержания углерода в цельной почве; более того, полученная величина согласуется с правилом распространения ошибок (*Pansu* и др., 2001); действительно, для  $C_{\text{суммы}}$ , полученной как:

$$C_{\text{суммы}} = C_{\text{кислотного экстракта}} + C_{\text{щелочного экстракта}} + C_{\text{гумина}}.$$

В случае нормального распределения:

$$s_{C_{\text{суммы}}} = (s_{C_{\text{кислотного экстракта}}}^2 + s_{C_{\text{щелочного экстракта}}}^2 + s_{C_{\text{гумина}}}^2)^{1/2}.$$

Тогда

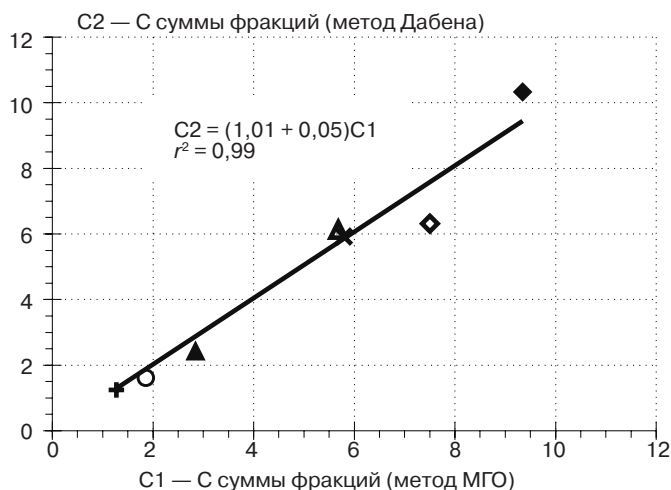
$$s_{C_{\text{суммы}}} = (0,026 + 0,141 + 0,317)^{1/2} = 0,69.$$

Эта величина близка значениям 0,64 и 0,63, полученным для углерода (суммы фракций и общего углерода, соответственно).

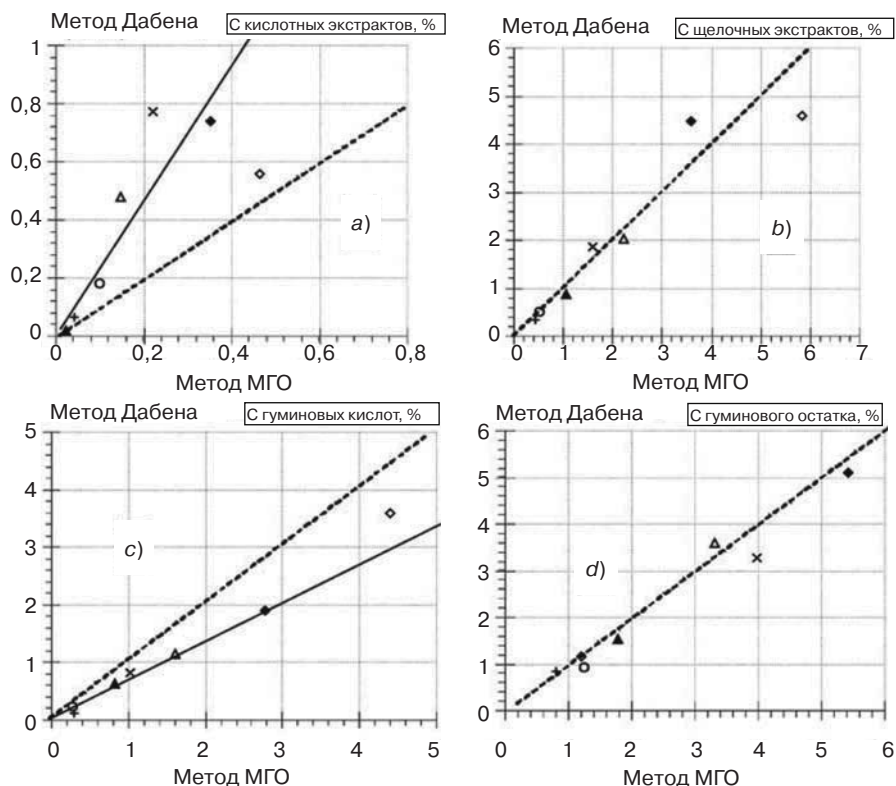
### Сравнение методов МГО и Дабена

Данные на рис. 11.3 показывают, что значения содержания общего углерода (кислотный экстракт + щелочной экстракт + гуминовый остаток), полученные двумя методами, очень близки. Однако более подробное сравнение данных, приведенных на рис. 11.4, выявляет сходства и различия между методами.

- Экстракция фосфорной кислотой, описанная в методе Дабена, солибилизирует от 1,2 до 4 раз больше (в среднем больше в 2 раза) органического вещества, чем экстракция хлористоводородной кислотой, описанная в методе МГО (рис. 11.4, *a*); самые близкие результаты получены двумя методами для глубокого горизонта Вh подзола.



**Рис. 11.3.** Сравнение содержания углерода, полученного двумя методами экстракции: средние значения результатов четырех лабораторий для семи типов почв, описанных в тексте: + – почва 1;  $\Delta$  – почва 2,  $\blacktriangle$  – почва 3,  $\diamond$  – почва 4,  $\times$  – почва 5,  $\blacklozenge$  – почва 6,  $\circ$  – почва 7



**Рис. 11.4.** Сравнение фракций, экстрагированных двумя методами: средние значения результатов четырех лабораторий для семи типов почв, описанных в тексте: + – почва 1;  $\Delta$  – почва 2,  $\blacktriangle$  – почва 3,  $\diamond$  – почва 4,  $\times$  – почва 5,  $\blacklozenge$  – почва 6,  $\circ$  – почва 7

- Щелочная экстракция дает сравнимые результаты для двух методов (рис. 11.4), если учитывать сумму пирофосфатного и щелочного экстрактов, описанных в методе Дабена; сравнимые результаты также получены для углерода гумина, хотя и слегка заниженные в методе Дабена (рис. 11.4, *d*).
- С другой стороны, отчетливая разница между двумя методами наблюдается для качества экстрагированного органического вещества, поскольку «метод Дабена» определяет значительно меньшее количество гуминовых кислот; на рис. 11.4, *c* соотношение между количествами С, определенного по методу Дабена, и С по методу МГО, составляет примерно 2:3, а поведение пробы 4 (из глубокого горизонта Вh подзола) несколько отличается; различие может быть связано с влиянием экстрагирующего раствора на экстрагируемые молекулы, т. е. полимеризацией в «методе МГО» и разрывом макромолекул в «методе Дабена» (см. примечание во введении к данной главе).

#### 11.2.4. Методы очистки гуминовых веществ

##### Введение

Существует много методов очистки гуминовых веществ, и трудно выбрать лучший метод. Согласно Шнитцеру (*Schnitzer*, 1982), главной целью очистки является минимизация количества золы, а вторая задача — отделить от гуминовых веществ органические молекулы меньшей молекулярной массы. Однако этого может оказаться недостаточно, потому что природа связей между гуминовыми, негуминовыми и неорганическими веществами в экстрактах очень сложна, и многие методы очистки влияют на структуру выделенных конечных соединений.

Негр с сотр. (*Nègre* и др., 1976) рекомендовали использовать диализ (диализные мешки Вискинса с размером пор 24 Å) для очистки гуминовых веществ, экстрагированных раствором пирофосфата. Эти авторы, как и другие, отметили превращение фульвокислот в гуминовые полимеры большей молекулярной массы. Похоже, что «во время диализа, который сопровождается последовательным возвращением реакции среды к нейтральным значениям, молекулы, которые были деполимеризованы в процессе щелочной экстракции, могут полимеризоваться вновь простым восстановлением связей CO–NH, аналогичным пептидным связям, ведущим к образованию нуклеиновых кислот» (*Nègre* и др., 1976).

Отдельные простые методы очистки позволяют удалять некоторые минералы из экстракта простой коагуляцией при добавлении небольшого количества сульфата натрия и центрифугировании (*Kumada* и др., 1967) или ультрацентрифугировании (*Jacquin* и др., 1970).

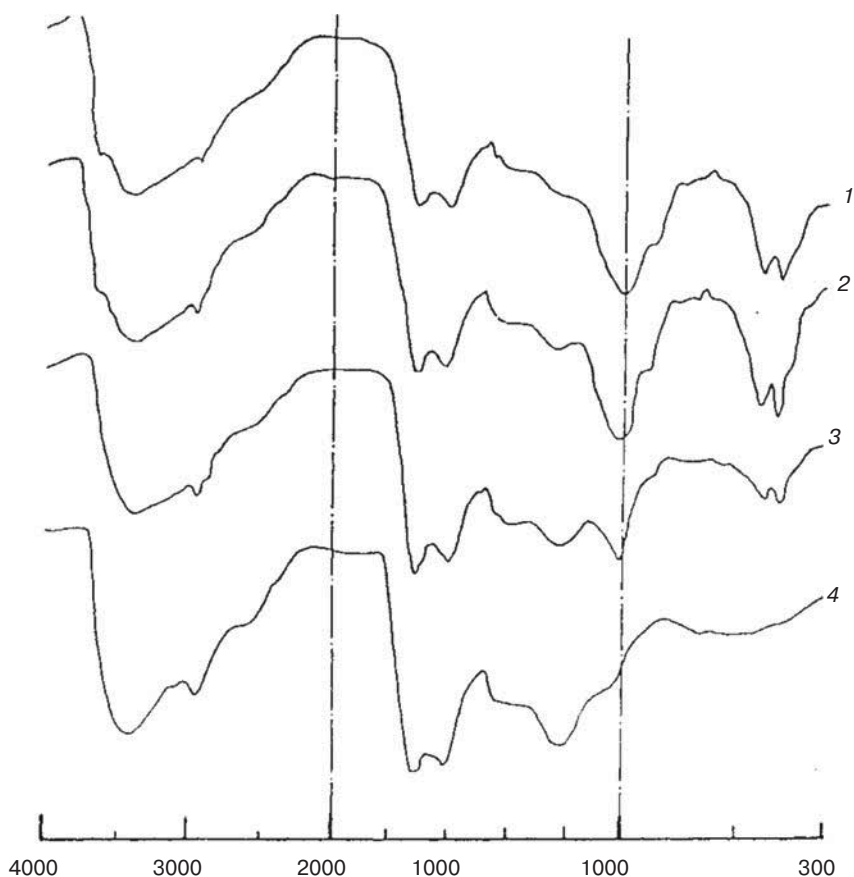
Гуминовые кислоты также могут быть очищены растворением в щелочной среде и последующим осаждением в кислой среде (*Lowe*, 1980), или повторным циклом экстракции — фракционирования экстрактов, предварительно подвергнутых сублимационной сушке (*Schnitzer*, 1982), или длительным замораживанием растворов гуминовых кислот, которое может разделить различные фазы (*Bachelier*, 1983).

Наиболее эффективным методом очистки, хотя пригодным только для гуминовых кислот, является химическая реакция минералов с разбавленным раствором смеси кислот HCl–HF для уменьшения количества золы. Шнитцер (*Schnitzer*, 1982) отмечал, что обработка смесью HCl–HF может снизить количество золы до менее 1%. Жакен с сотр. (*Jacquin* и др., 1970) получили менее 3% золы в трех экстрактах, очищенных смесью HCl–HF. Для четырех методов очистки, исследованных этими авторами, ИК-спектры



поглощения очищенных гуминовых веществ показали, что только обработка смесью  $\text{HCl-HF}$  почти полностью удаляет интенсивные полосы поглощения филлосиликатов при 470, 520 и 1030  $\text{cm}^{-1}$  (рис. 11.5). Однако, согласно данным этих авторов, обработка фтористоводородной кислотой приводит к изменению химической структуры молекул, в частности, к значительному снижению карбоксильной кислотности.

Фульвокислоты могут быть очищены в кислой среде адсорбцией на стандартных неионных полиакриловых смолах типа амберлита XAD-7 (Aiken и др., 1979). После промывания смолы слабокислым раствором для удаления неорганических солей, более 98% фульвокислот могут быть выделены элюированием при pH 6,5 (Gregor и Powell, 1986). Более простой метод включает удаление катионов металлов повторным обменом на катионообменной смоле в  $\text{H}^+$ -форме (Schnitzer, 1982).



**Рис. 11.5.** Исследование влияния трех методов очистки на гуминовые кислоты, экстрагированные из глубокого горизонта Vh подзола методом абсорбционной ИК-спектроскопии (Jacquin и др., 1970): 1 — неочищенные гуминовые кислоты; 2 — гуминовые кислоты, очищенные на  $\text{OH}^-$  и  $\text{H}^+$  смолах; 3 — гуминовые кислоты, очищенные ультрацентрифугированием; 4 — гуминовые кислоты, очищенные смесью  $\text{HCl-HF}$ .