

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

Анисимова Марина Анатольевна

**Детоксицирующая способность почв и выделенных из них
гуминовых кислот по отношению к гербицидам**

03.00.27-почвоведение

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

МОСКВА 1997

Актуальность темы. Применение средств химической защиты растений, ставшее неотъемлемым элементом практики современного земледелия, привело к возникновению проблемы загрязнения почвенного покрова остаточными количествами гербицидов и их метаболитов. В связи с этим в последние годы ведутся интенсивные изыскания по поиску детоксицирующих агентов, внесение которых в почву способствовало бы связыванию и инактивации гербицидов. Однако до сих пор весьма ограничен круг исследований по выявлению факторов, определяющих устойчивость почв по отношению к гербицидам. Так, несмотря на многочисленные указания в литературе на важную роль органического вещества почв и, в частности, гуминовых кислот (ГК) в процессах детоксикации гербицидов различных классов (Hayes, 1970; Самгин, 1975; Maqueda et al., 1990; Liu et al., 1996), практически отсутствуют комплексные исследования, направленные на изучение и сопоставление детоксицирующих свойств различных почв и формирующихся в них ГК. Кроме того, подходы к количественной оценке детоксицирующей способности как почв, так и ГК в отношении различных классов гербицидов разработаны недостаточно.

В связи с изложенным, систематическое исследование детоксицирующих свойств почв и выделенных из них ГК при смене типовой принадлежности почв в соответствии с законом широтной зональности и при различном виде их хозяйственного использования является важной и актуальной задачей, решение которой позволит найти новые подходы к регулированию токсичности гербицидов в условиях почвенной среды, а также использовать гуминовые препараты в качестве детоксикантов.

Цель работы. Целью настоящей работы было изучение детоксицирующей способности почв различной типовой принадлежности и вида хозяйственного использования и выделенных из них гуминовых кислот по отношению к гербицидам различных классов, а также установление роли ГК в детоксикации этих гербицидов в почвенной среде.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- изучить детоксицирующую способность почв в зависимости от типовой принадлежности и вида хозяйственного использования по отношению к гербицидам- представителям двух классов (сим-триазинов и динитроанилинов);
- выявить свойства почв, определяющие их детоксицирующую способность;
- изучить детоксицирующую способность препаратов ГК, выделенных из исследуемых почв, по отношению к тем же гербицидам;
- выявить свойства ГК, определяющие их детоксицирующую способность;
- на основании сопоставления детоксицирующей способности почв и выделенных из них ГК оценить роль ГК в формировании детоксицирующего потенциала почв по отношению к различным гербицидам.

Научная новизна. Впервые осуществлено систематическое исследование детоксицирующей способности почв и выделенных из них препаратов ГК по отношению к трифлуралину и атразину в непрерывном зональном ряду “дерново-подзолистые - серые лесные - черноземы” для окультуренных и целинных вариантов почв. Впервые произведено сопоставление детоксицирующей способности почв и выделенных из них препаратов ГК, которое позволило оценить роль ГК в формировании детоксицирующего потенциала почв по отношению к гербицидам различной химической природы. На основании корреляционного анализа данных по структуре и детоксицирующей способности ГК впервые установлено, что относительный вклад ароматических фрагментов (по сравнению с алифатическими) в структуру ГК является параметром, определяющим детоксицирующую способность гуминовых кислот по отношению к рассматриваемым гербицидам: увеличение содержания ароматических фрагментов способствует повышению детоксицирующего потенциала ГК.

Практическая значимость. Полученные результаты могут быть использованы при разработке рекомендаций по оптимизации применения гербицидов, относящихся к производным сим-триазинов и динитроанилинов, на почвах различных типов в зависимости от содержания и качественного состава органического вещества. Обнаруженная тесная взаимосвязь между детоксицирующей способностью ГК и относительным вкладом ароматических фрагментов в структуру ГК по сравнению с алифатическими позволяет сделать вывод о целесообразности применения в качестве детоксикантов гербицидов гуминовых препаратов с высоким содержанием ароматических структур (на основе углей).

Материалы диссертации используются при чтении спецкурсов на кафедре общего земледелия факультета почвоведения и на кафедре органической химии химического факультета МГУ.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на 9-ом Международном Коллоквиуме по оптимизации питания растений (Прага, 1996); на Международной научной конференции молодых ученых “Ломоносов-97” (Москва, 1997); на Международном Симпозиуме, посвященном роли гумусовых веществ в процессах переноса органических загрязнителей и металлов в почвенных и водных экосистемах (Анахейм, США, 1997).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, заключения, списка литературы и приложения. Материалы диссертации содержат 130 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 4 таблицами, 14 рисунками. Список литературы включает 165 источников, из которых 100 иностранных.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Дан анализ отечественных и зарубежных публикаций по теме исследования. Изложен материал по влиянию типовой принадлежности и вида использования почв на их способность инактивировать гербициды различных химических классов. Рассмотрена зависимость структуры и свойств гуминовых кислот от типа и вида использования почв. Отмечена роль гуминовых кислот в процессах “связывания” гербицидов, описаны механизмы взаимодействия “ГК - гербицид”. Рассмотрено влияние ГК на токсичность гербицидов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Отбор образцов почв и выделение препаратов ГК.

Для проведения исследований было отобрано 9 образцов трех типов почв (дерново-подзолистые, серые лесные, черноземы) из гумусового горизонта А с глубины 3-20 см. В Московской области - дерново-подзолистая почва в смешанном лесу с преобладанием ели ($P_{лес}^d$), пахотная после возделывания ржи ($P_{пах}^d$) и огородная на приусадебном участке ($P_{ог}^d$); в Тульской области - серая лесная в смешанно-широколиственном лесу ($СЛ_{лес}$), пахотная под кормовыми травами ($СЛ_{пах}$) и темно-серая лесная почва в широколиственном лесу ($ТС_{лес}$); в Воронежской области - чернозем типичный на злаковоразнотравном лугу ($Ч_{тип}$), чернозем обыкновенный распаханый ($Ч_{об}$) и черноземно-луговая почва на участке, используемом под сенокос ($Ч_{луг}$).

Препараты гуминовых кислот были выделены из семи почв по методике Орлова и Гришиной (1981), которая включает в себя следующие стадии: декальцирование $0.1M H_2SO_4$, экстрагирование ГК $0.1 M NaOH$ в соотношении почва:раствор 1:6, подкисление полученного щелочного экстракта серной кислотой до pH 2 для осаждения ГК, их последующее центрифугирование для отделения от примесей фульвокислот и очистка от легкорастворимых солей при помощи диализа. Полученный осадок ГК высушивали при $60^{\circ}C$.

Характеристика почв и препаратов ГК.

Для всех почвенных образцов были определены $pH_{водн}$, $pH_{сол}$, гидролитическая кислотность по Каппену, сумма обменных оснований и степень насыщенности почв основаниями по Каппену-Гильковицу, содержание подвижного алюминия по Соколову, содержание свободного кальция методом пламенной фотометрии (Аринушкина, 1970). Общее содержание органического углерода было определено по методу Тюрина, а состав гумуса - с применением пирофосфатной вытяжки по Кононовой и Бельчиковой (Орлов, Гришина, 1981).

Выделенные препараты ГК были охарактеризованы следующими методами:

Элементный анализ. Содержание С, Н, N в препаратах ГК определяли с помощью элементного анализатора “Carlo Erba Strumentazione”. Для пересчета полученных результатов на безводное беззольное вещество для каждого препарата проводили отдельные определения зольности и влажности. Содержание кислорода рассчитывали по разности.

^{13}C -ЯМР-спектроскопия. Строение углеродного скелета молекул ГК изучали методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии с использованием ЯМР-спектрометра VXR-400 (Varian). Содержание различных типов углеродных атомов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей: 0-50 м.д. (углерод алкильных групп, C_{Alk}), 50-108 м.д. (углерод карбогидратных структур, спиртов, ацеталей, $\text{C}_{\text{Alk-O}}$), 108-165 м.д. (углерод ароматических структур, C_{Ar}), 165-185 м.д. (углерод карбоксильных групп, C_{COOH}). Суммированием C_{Alk} и $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ определяли вклад алифатического углерода (C_{Al}) в скелет ГК. Рассчитывая отношение $\text{C}_{\text{Ar}}/(\text{C}_{\text{Alk}}+\text{C}_{\text{Alk-O}})$, определяли относительный вклад ароматических фрагментов по сравнению с алифатическими в структуру исследуемых ГК.

Гель-хроматография. Молекулярные массы ГК определяли с помощью гель-хроматографии. Фракционирование проводили на колонке Toyopearl HW-50S. В качестве калибровочных веществ использовали полидекстраны. В качестве элюента применяли 0.028 М фосфатный буфер, концентрация ГК во фракционируемых пробах не превышала 5 мг/л

Обратное титрование. Общую кислотность ГК характеризовали баритовым методом. Для определений использовали соотношения реагент:субстрат не ниже 30 ммоль $\text{Ba}(\text{OH})_2$ на 1г ГК.

Гербициды. Исследования проводили с использованием гербицидов трифлуралина и атразина.

Трифлуралин (2,6 - динитро - N,N - дипропил - 4 - трифторметил - анилин) относится к классу замещенных 2,6 - динитроанилинов. Токсическое действие этого гербицида заключается в ингибировании роста корней, а именно, в нарушении процессов деления клеток. Норма расхода в полевых условиях 0.5-2 кг/га по действующему веществу.

Атразин (2 - хлор - 4 - этиламино - 6 - изопропиламино - 1,3,5 - триазин), представитель класса сим-триазинов, является ингибитором процессов фотосинтеза. Норма расхода 1-4 кг/га по действующему веществу (“Список ...”, 1994).

Определение в почвах остаточных количеств атразина и его метаболитов.

Извлечение остаточных количеств атразина производилось согласно (“Методические указания...”, 1983) путем экстракции предварительно увлажненной пробы почвы смесью этилацетата и гексана (1:1). Определение атразина в экстракте осуществляли методом ВЭЖХ с использованием хроматографа HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, Германия), снабженного ультрафиолетовым детектором на основе диодной матрицы. Разделение

атразина и его метаболитов проводили на колонке Lichrocarb в режиме градиентного элюирования водой и ацетонитрилом. Регистрацию оптической плотности проводили при 220 и 254 нм.

Токсикологический эксперимент на почвах с трифлуралином.

Тест-объектом служили растения пшеницы *Triticum aestivum* (сорт “Московская-35”). В качестве тест-отклика использовали длину корней проростков (“Методические указания...”, 1988). Гербицид вносили в дозах 1, 2, 4, 8, 12 мг/кг почвы. Почву инкубировали в термостате в течение 48 часов при температуре 25⁰С. Коэффициент вариации составил в среднем 4.6%.

Лабораторно-вегетационный опыт на почвах с атразином.

Тест-объектом служили растения пшеницы *Triticum aestivum* (сорт “Московская-35”). В качестве тест-отклика использовали наземную воздушно-сухую биомассу. Гербицид вносили в дозах из расчета 1, 2 и 4 кг/га. Продолжительность выращивания растений составляла 30 дней. Коэффициент вариации составил в среднем 5.2%.

Токсикологический эксперимент на препаратах ГК с трифлуралином.

Биотестирование проводили на проростках пшеницы. В качестве нейтрального субстрата использовали перлит, в который вносили нейтрализованные растворы гуминовых кислот в дозах 10, 25, 50, 100, 200 мг/кг субстрата. Доза трифлуралина составляла 0.5 мг/кг субстрата (при этой дозе наблюдалось 50%-ное снижение отклика биотеста). Коэффициент вариации составил в среднем 6.4%.

Токсикологический эксперимент на препаратах ГК с атразином.

Биотестирование проводили с использованием в качестве тест-объекта культуры зеленой одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* (Полынов, 1992). Тест-функцией служила фотосинтетическая активность водоросли (F_v/F_m). Рабочая концентрация гербицида составляла $2.2 \cdot 10^{-7}$ М (данная концентрация вызывала 50% снижение отклика биотеста по сравнению с контрольным опытом), концентрации ГК - от 1 до 10 мг/л. Коэффициент вариации составил в среднем 1.3%.

Повторность во всех проведенных экспериментах - трех-четырекратная.

Количественная оценка детоксицирующей способности почв и препаратов ГК.

Детоксицирующую способность (D) почв по отношению к используемым гербицидам рассчитывали по формуле:

$$D = \frac{R_t}{R_o} * 100\%,$$

где R_t - тест-отклик в присутствии гербицида, R_o - тест-отклик в контроле.

В качестве тест-отклика использовали воздушно-сухую наземную биомассу или длину корней проростков (для соответствующих экспериментов).

Детоксицирующую способность (D) препаратов ГК по отношению к гербицидам рассчитывали по следующей формуле (Perminova et al., 1996):

$$D = \left(1 - \frac{R_d - R_{d+t}}{R_d} \right) / \left(\frac{R_o - R_t}{R_o} \right) \times 100\%,$$

где R_o - тест-отклик в контроле; R_t - тест-отклик в присутствии гербицида; R_d - тест-отклик в присутствии ГК; R_{d+t} - тест-отклик в присутствии ГК и гербицида.

В качестве тест-отклика использовали длину корней проростков или фотосинтетическую активность (для соответствующих экспериментов).

Для характеристики детоксицирующей способности почв при всех дозах внесения гербицида или детоксицирующей способности ГК при всех дозах внесения ГК использовали показатель “суммарная детоксицирующая способность” (S_D). S_D рассчитывали как площадь под кривой зависимости D от дозы внесения гербицида (для почв) или дозы внесения ГК при постоянстве концентрации гербицида (для препаратов), отнесенную к площади, соответствующей стопроцентному детоксицирующему эффекту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика исследуемых почв и выделенных из них препаратов ГК.

Выбор объектов исследования, т. е. почвенных образцов, производился с учетом влияния двух основополагающих факторов на свойства почв и формирующихся в них ГК: это смена типовой принадлежности почв в соответствии с законом широтной зональности и различный вид их хозяйственного использования. В этом случае представлялось возможным выделить как общие для всего ряда почв и препаратов ГК, так и свойственные каждому конкретному типу почв факторы детоксикации используемых гербицидов.

1.1. Свойства почв

В соответствии с поставленными в настоящей работе целями в исследуемых почвах были определены те показатели химического состояния, от которых в наибольшей степени зависит поведение гербицидов в почве. Такими показателями являются кислотность почвы и насыщенность катионами, содержание органического вещества и его групповой состав. Как видно из табл.1, значения $pH_{\text{водн}}$ исследованных почв находились в диапазоне от 4.9 ($П_{\text{лес}}^I$) до 7.6 ($Ч_{\text{тип}}$), величина гидролитической кислотности составляла 9.9 мг-экв/100г почвы в $П_{\text{лес}}^I$ и 0.8 - в $Ч_{\text{тип}}$ и $Ч_{\text{об}}$. Максимальное содержание обменных оснований наблюдалось в черноземе обыкновенном - 64.6 мг-экв/100г почвы. Содержание кальция составляло 0.1 мг-экв/100г почвы в $П_{\text{лес}}^I$ и 30.2 - в $Ч_{\text{тип}}$. Наибольшая степень насыщенности почв основаниями - до 99% - была зафиксирована в черноземных почвах. В дерново-подзолистой почве под

лесом наблюдалось высокое содержание подвижного алюминия: ~ 0.4 мг/100г почвы; тогда как в черноземах его обнаружено не было.

Содержание органического углерода (табл.2) в гумусовом горизонте дерново-подзолистой почвы под лесом составило 2.1%, серой лесной под лесом - 2.8%, черноземно-луговой - 6.4%; при этом наблюдалось увеличение доли гуминовых кислот в составе гумуса: 33, 52 и 79% для тех же почв, соответственно. Гуматно-фульватный тип гумуса в дерново-подзолистых почвах сменился на гуматный в черноземах.

Сопоставление свойств почв различного использования позволило отметить следующие тенденции. Так, окультуривание кислых дерново-подзолистых почв способствовало увеличению содержания в них обменных оснований, в том числе, кальция (табл.1); наблюдалось снижение величины гидролитической кислотности и повышение pH. Вышеперечисленные изменения химических свойств в дерново-подзолистых почвах явились следствием внесения органических удобрений и извести, что не могло не сказаться на содержании и качественном составе органического вещества (табл. 2). Содержание органического углерода в окультуренном варианте дерново-подзолистой почвы ($P_{\text{пах}}^{\text{д}}$) оказалось ниже, чем в целинном, но при этом в нем наблюдалась более высокая доля гуминовых кислот. Содержание $C_{\text{орг}}$ в дерново-подзолистой огородной почве оказалось на уровне черноземов (4.8%). Однако органическому веществу данной почвы была присуща наименьшая среди всех исследованных почв степень гумификации - содержание ГК составило 24%.

1.2. Свойства препаратов ГК

Выделенные препараты ГК были охарактеризованы методами элементного анализа, титриметрии и ЯМР-спектроскопии. Как видно из данных по элементному составу (табл. 3),

Таблица 1. Показатели химического состояния исследуемых почв.

Почвы	$pH_{\text{водн}}$	$pH_{\text{сол}}$	мг-экв/100 г почвы			Степень насыщенности основаниями, %	Подвижный алюминий, мг/100 г почвы
			Ca^{2+}	Гидролитическая кислотность	Сумма обменных оснований		
$P_{\text{лес}}^{\text{д}}$	4.9	4.2	0.1	9.9	3.1	23	0.388
$P_{\text{пах}}^{\text{д}}$	7.0	6.8	2.8	1.1	17.4	94	0.002
$P_{\text{ог}}^{\text{д}}$	7.2	6.9	15.9	1.5	34.6	96	0.007
$СЛ_{\text{лес}}$	5.8	5.4	3.1	4.4	12.7	74	0.004
$СЛ_{\text{пах}}$	5.8	5.0	1.9	3.9	9.3	70	0.005

ТС _{лес}	5.7	5.2	3.3	4.8	13.9	74	0.013
Ч _{тип}	7.6	7.2	30.2	0.8	56.7	98	не обн.
Ч _{об}	7.5	7.2	22.2	0.8	64.6	99	не обн.
Ч _{луг}	6.2	5.5	15.6	10.8	36.6	77	не обн.

Таблица 2. Показатели гумусного состояния исследуемых почв.

Почвы	С _{орг} , %	С _{ГК} /С _{общ} , %	С _{ГК} /С _{фк}
П ^д _{лес}	2.1	33	0.5
П ^д _{пах}	1.5	39	0.6
П ^д _{ог}	4.8	24	0.3
СЛ _{лес}	2.8	52	1.1
СЛ _{пах}	1.3	54	1.2
ТС _{лес}	2.7	58	1.4
Ч _{тип}	4.0	68	2.1
Ч _{об}	5.0	63	1.7
Ч _{луг}	6.4	79	3.7

все исследуемые препараты ГК можно подразделить на две группы. В первую из них входят весьма близкие между собой пять препаратов, выделенных из дерново-подзолистых и серых лесных почв, для которых характерны соотношения О/С порядка 0.55-0.61 и Н/С -- 1.0-1.1. Вторая группа образуется двумя препаратами ГК, выделенными из черноземов, которые принципиально отличаются от препаратов первой группы гораздо более низкими соотношениями О/С (0.4) и Н/С (0.6-0.7). Уменьшение величин О/С и Н/С в ГК из черноземов свидетельствует о большем вкладе ароматических фрагментов в структуру данных соединений при одновременном снижении доли углеводной периферии.

Исследование препаратов методом ¹³С-ЯМР-спектроскопии подтвердило указанные тенденции. Так, согласно табл. 4, в ГК черноземов наблюдалось максимальное содержание ароматического углерода (54-55%) по сравнению с ГК дерново-подзолистых и серых лесных (45-47%) почв и минимальное - углерода карбогидратных структур (11%). При этом существенных различий по вкладу ароматических фрагментов в структуру ГК дерново-

подзолистых и серых лесных почв обнаружено не было. Определение общей кислотности не выявило существенных различий между препаратами ГК, выделенных из почв различных типов (7.1 - 8.1 мэкв/г).

Исследование молекулярно-массового состава показало (табл. 4), что самые низкие значения молекулярных масс - 15000 г/моль- наблюдались для ГК черноземов, тогда как для ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв они достигали 18000 и 24000 г/моль, соответственно. Это позволило предположить, что макромолекулы ГК серых лесных и дерново-подзолистых почв имеют в своем составе менее трансформированные полисахаридные цепочки, тогда как в черноземных ГК, вследствие высокой микробиологической активности среды их формирования, достигается самая высокая степень деградации углеводного комплекса.

2. Детоксицирующая способность почв и выделенных из них препаратов ГК по отношению к гербицидам

Под используемым в настоящей работе термином “детоксицирующая способность” в отношении почв понималась их способность снижать токсичность гербицида при действии всех почвенных факторов, препятствуя таким образом угнетению тест-растения. Данный термин можно до некоторой степени считать эквивалентным выражению “устойчивость” почв по отношению к гербицидному загрязнению. В отношении препаратов ГК понималась их способность инактивировать гербицид путем его “связывания” и перевода в нетоксичную форму.

Таблица 3. Элементный состав гуминовых кислот (в пересчете на абсолютно сухое беззольное вещество).

ГК	Содержание, ат.%				Атомные отношения		
	С	Н	N	О	O/C	H/C	C/N
П ^д _{лес}	38.2	37.6	3.3	20.8	0.55	0.99	11.48
П ^д _{пах}	36.9	38.9	3.1	21.0	0.57	1.05	11.73
П ^д _{ог}	36.3	39.9	2.6	21.1	0.58	1.10	13.54
СЛ _{лес}	36.7	38.3	3.2	21.8	0.59	1.04	11.45
СЛ _{пах}	37.2	37.0	3.1	22.6	0.61	1.00	11.79
Ч _{тип}	48.7	28.5	3.1	19.6	0.40	0.59	11.82
Ч _{луг}	45.9	33.8	3.4	16.8	0.37	0.74	13.52

Примечание. Зольность выделенных препаратов ГК составляла 6 - 13%, содержание гигроскопической влаги - 9 - 11%.

Таблица 4. Распределение углерода (С) в молекулах ГК (по данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии), общая кислотность и молекулярные массы (ММ) ГК.

ГК	Доля С в составе фрагментов, %				C_{Ar}	Общая кислотность, мЭКВ/г ГК	ММ, г/моль
	C_{COOH}	C_{Ar}	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	C_{Alk}	$\text{C}_{\text{Alk}} + \text{C}_{\text{Alk-O}}$		
$\text{П}_{\text{лес}}^{\text{д}}$	12	46	16	22	1.24	7.5	17900
$\text{П}_{\text{пах}}^{\text{д}}$	15	45	18	17	1.28	6.9	25900
$\text{П}_{\text{ог}}^{\text{д}}$	14	46	15	18	1.38	5.9	24800
$\text{СЛ}_{\text{лес}}$	12	46	19	18	1.23	8.2	24300
$\text{СЛ}_{\text{пах}}$	14	47	15	19	1.36	6.3	23700
$\text{Ч}_{\text{тип}}$	15	54	11	14	2.13	8.5	14900
$\text{Ч}_{\text{луг}}$	14	55	11	15	2.12	7.1	15500

Для постановки токсикологических экспериментов с применением трифлуралина и атразина были использованы различные тест-объекты, принимая во внимание специфику токсического действия гербицидов. Для регистрации гербицидной активности трифлуралина, ингибирующего рост корней растений, использовали экспресс-тест на проростках пшеницы. Для регистрации гербицидной активности атразина, ингибирующего процессы фотосинтеза, использовали вегетационный опыт (для тестирования почв) и альгологическое биотестирование (для оценки детоксицирующей способности выделенных препаратов ГК).

2.1. Детоксицирующая способность почв и препаратов ГК по отношению к трифлуралину

2.1.1. Почвы

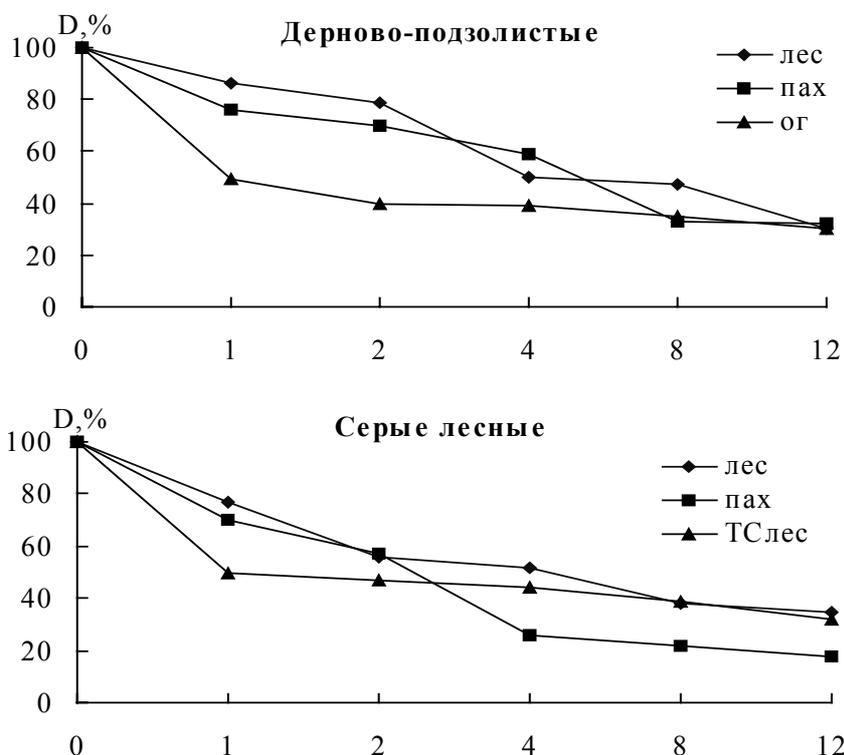
Применение экспресс-теста на проростках пшеницы показало (рис. 1), что для всех типов почв токсичность гербицида была выше на окультуренных вариантах - длина корней составила в среднем 45% от контроля, чем на целинных - 53% от контроля (при коэффициенте вариации 4.6%). Наибольшая токсичность трифлуралина (длина корней проростков составила 38% от контроля) наблюдалась для дерново-подзолистой огородной

($P_{ог}^A$) и серой лесной пахотной ($СЛ_{пах}$) почвах. При этом в $P_{ог}^A$ уже после внесения наименьшей дозы гербицида длина корней резко уменьшалась и с увеличением дозы трифлуралина практически не менялась. Аналогичная зависимость наблюдалась и для темно-серой лесной почвы. Для почв черноземного ряда с увеличением дозы гербицида было отмечено более равномерное снижение величины тест-отклика по сравнению с другими почвами.

Сравнение величины суммарной детоксицирующей способности (S_D) исследованных почв (рис.2) не выявило существенной роли типовой принадлежности почв в формировании их детоксицирующего потенциала по отношению к трифлуралину.

Корреляционный анализ блоков данных по детоксицирующей способности почв и их химическим характеристикам (табл.1 и 2) также не показал наличия значимых взаимосвязей.

Таким образом, полученные результаты не позволили получить однозначный вывод о влиянии типа почвы и содержания и состава органического вещества на способность почв детоксицировать трифлуралин. В то же время было отмечено влияние вида использования почв на их детоксицирующую способность по отношению к трифлуралину.



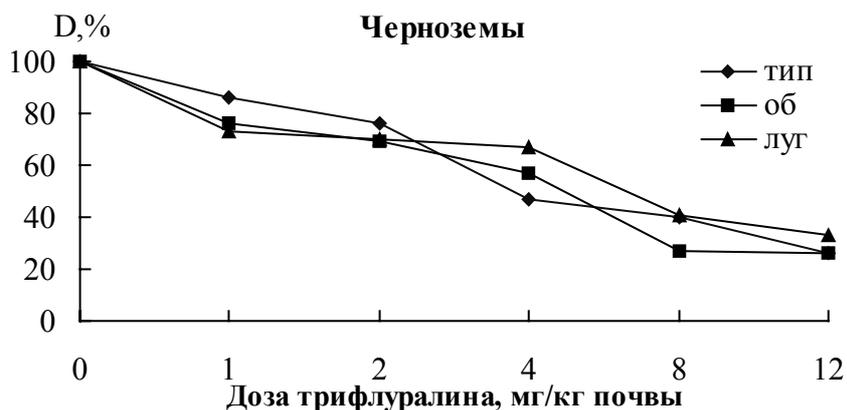


Рис.1. Зависимость тест-отклика от дозы внесения трифлуралина на исследуемых почвах, где D,% - длина корней проростков пшеницы при различных дозах внесения гербицида.

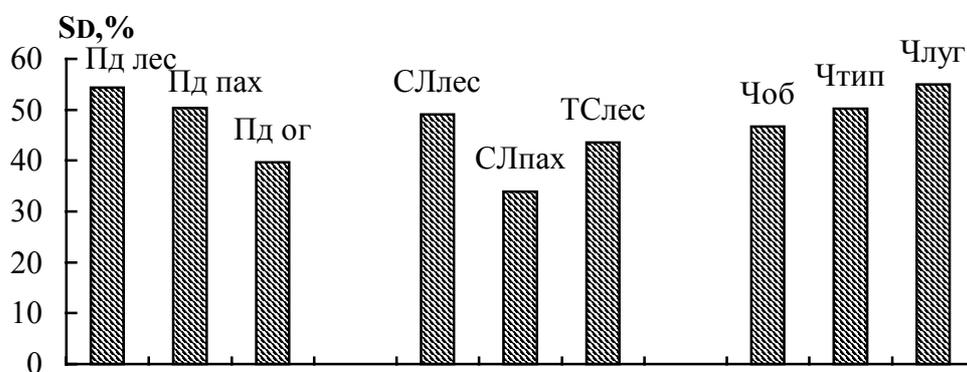


Рис. 2. Суммарная детоксицирующая способность (S_D) исследуемых почв по отношению к трифлуралину.

2.1.2. Препараты ГК

Токсикологический эксперимент с использованием выделенных препаратов ГК показал (рис. 3), что детоксицирующие свойства большинства ГК (за исключением П^д_{лес} и СЛ_{лес}) проявлялись при их внесении от 10 до 50 мг/кг субстрата. В то же время ГК целинных дерново-подзолистых и серых лесных почв практически не обладали детоксицирующим действием по отношению к трифлуралину во всех исследованных дозах. ГК окультуренных вариантов снижали токсический эффект на 10-15%, тогда как ГК почв черноземного ряда характеризовались наиболее высоким значением D и в дозах 100-200 мг/кг субстрата снижали токсичность гербицида в среднем на 50%.

Сравнение суммарной детоксицирующей способности (S_D) препаратов ГК по отношению к трифлуралину (рис. 4) показало улучшение детоксицирующих свойств ГК при переходе от целинного варианта почвы к окультуренному и от типа дерново-подзолистых почв к черноземам.

Для выявления взаимосвязей между детоксицирующей способностью ГК и их структурными параметрами был проведен корреляционный анализ между блоком

структурных данных, приведенных в табл. 3 и 4, и величиной S_D . Полученные результаты позволили установить наличие тесной корреляции ($r=0.95$, $P=95\%$) между S_D и обогаченностью молекулы ГК ароматическими фрагментами (зависимость S_D от C_{Ar}/C_{Al} приведена на рис. 13). Кроме того, наблюдалась значительная отрицательная корреляция ($r=-0.85$, $P=95\%$) между S_D и отношением H/C , что является дополнительным подтверждением важной роли ароматических фрагментов для осуществления химического связывания между молекулой ГК и трифлуралином.

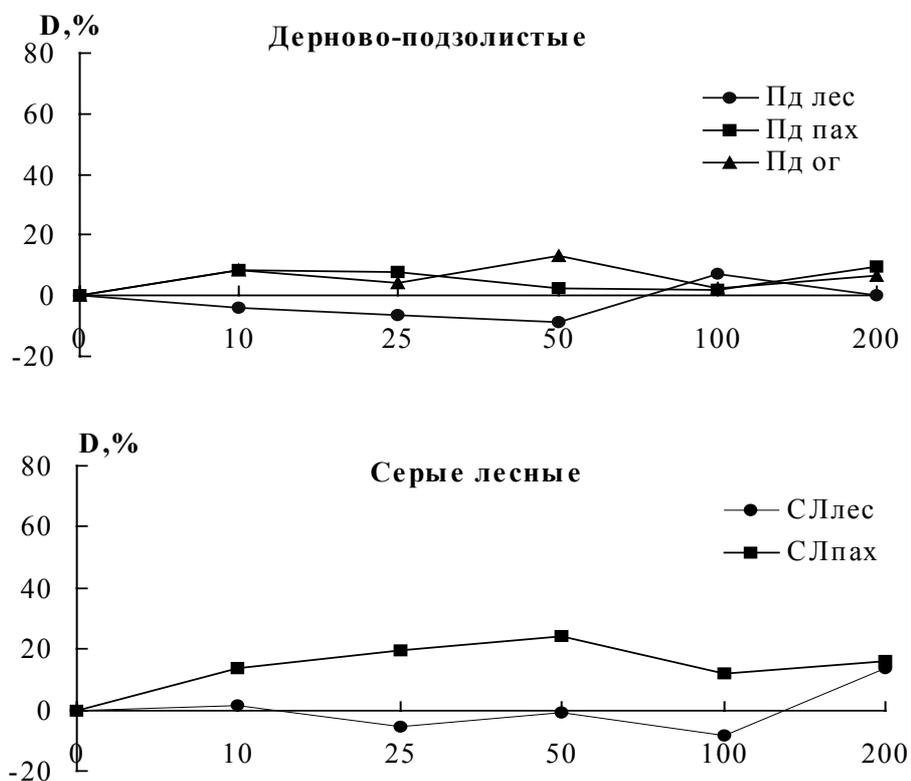
Таким образом, детоксицирующая способность выделенных ГК по отношению к трифлуралину зависела от степени их ароматичности и увеличивалась с ростом этого показателя при переходе от дерново-подзолистых почв к черноземам и от целинного варианта почвы к окультуренному.

Исследуемые почвы и препараты ГК образовали следующие ряды по возрастанию суммарной детоксицирующей способности (S_D) по отношению к трифлуралину:

$$\text{ПОЧВЫ:} \quad СЛ_{\text{пах}} \leq ПД_{\text{ог}} < СЛ_{\text{лес}} \leq Ч_{\text{тип}} \leq ПД_{\text{пах}} \leq ПД_{\text{лес}} \leq Ч_{\text{луг}}$$

$$\text{ГК:} \quad ПД_{\text{лес}} \leq СЛ_{\text{лес}} \leq ПД_{\text{пах}} \leq ПД_{\text{ог}} < СЛ_{\text{пах}} \ll Ч_{\text{тип}} < Ч_{\text{луг}}$$

Несовпадение приведенных последовательностей явилось подтверждением вывода о том, что в условиях почвенной среды содержание органического вещества и его качественный состав не являются определяющими факторами в процессах детоксикации трифлуралина.



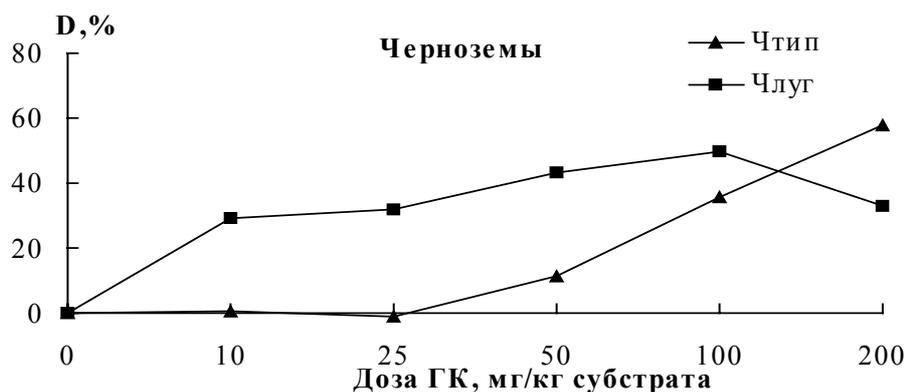


Рис. 3. Детоксицирующая способность ГК, выделенных из исследуемых почв, по отношению к трифлуралину в зависимости от дозы внесения ГК (доза трифлуралина -- 0.5 мг/кг субстрата).

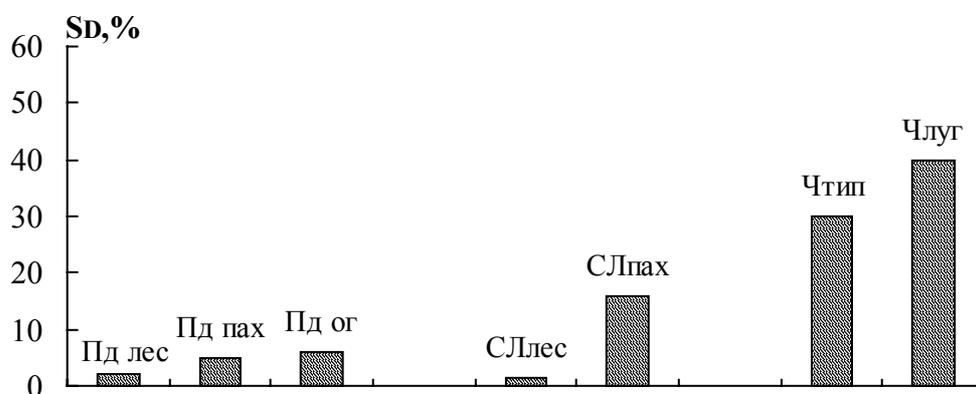


Рис. 4. Суммарная детоксицирующая способность (S_D) препаратов ГК по отношению к трифлуралину.

2.2. Детоксицирующая способность почв и препаратов ГК по отношению к атразину

2.2.1. Почвы

Результаты лабораторно-вегетационного опыта показали, что для серых лесных почв (за исключением темно-серой лесной) и окультуренных вариантов дерново-подзолистой (рис. 5) биомасса растений снижалась в среднем на 75% уже после внесения наименьшей дозы гербицида. При этом дальнейшее увеличение дозы атразина не приводило к изменению этого показателя. На дерново-подзолистой почве под лесом наблюдался более плавный ход указанной зависимости. Наибольшая устойчивость к токсическому действию атразина наблюдалась на черноземах, а также на темно-серой лесной почве. Внесение 1 кг/га атразина вызывало снижение биомассы на этих почвах в среднем на 30%. При этом по мере дальнейшего увеличения дозы атразина наблюдалось постепенное снижение тест-отклика до уровня 30% от контроля.

Как видно из ряда почв, представленного на рис. 6, самой высокой детоксицирующей способностью характеризовались черноземные почвы. Существенное влияние вида использования наблюдалось в случае дерново-подзолистой огородной почвы, для которой

было отмечено значительное снижение детоксицирующей способности по сравнению с целинным вариантом.

Для установления взаимосвязей между способностью почвы снижать токсичность атразина и ее химическими свойствами был проведен корреляционный анализ между приведенными выше результатами лабораторно-вегетационного опыта и характеристиками почв, обобщенными в табл. 1 и 2. В результате удалось установить значимую корреляцию между величиной S_D и следующими показателями: содержанием в почве $C_{орг}$ ($r=0,67$, $P=95\%$); $C_{гк}/C_{общ}$ ($r=0,71$, $P=95\%$); $C_{гк}/C_{фк}$ ($r=0,80$, $P=95\%$).

Таким образом, в отличие от трифлуралина, детоксицирующая способность исследуемых почв по отношению к атразину определялась прежде всего их типовой принадлежностью и возрастала с ростом содержания в почве органического вещества и гуминовых кислот в его составе.

После завершения лабораторно-вегетационного эксперимента был проведен анализ всех исследованных почв на содержание остаточных количеств атразина и его метаболитов.

На рис. 7 приведена хроматограмма модельной смеси атразина и его основных метаболитов.

Время удерживания (t_R) в выбранных экспериментальных условиях составило 26.311, 23.990,

16.382 и 12.674 минут для атразина, гидрокси-атразина, дезэтил-атразина и дезизопропил-атразина, соответственно. На рис. 8 приведена типичная хроматограмма экстрактов из почв,

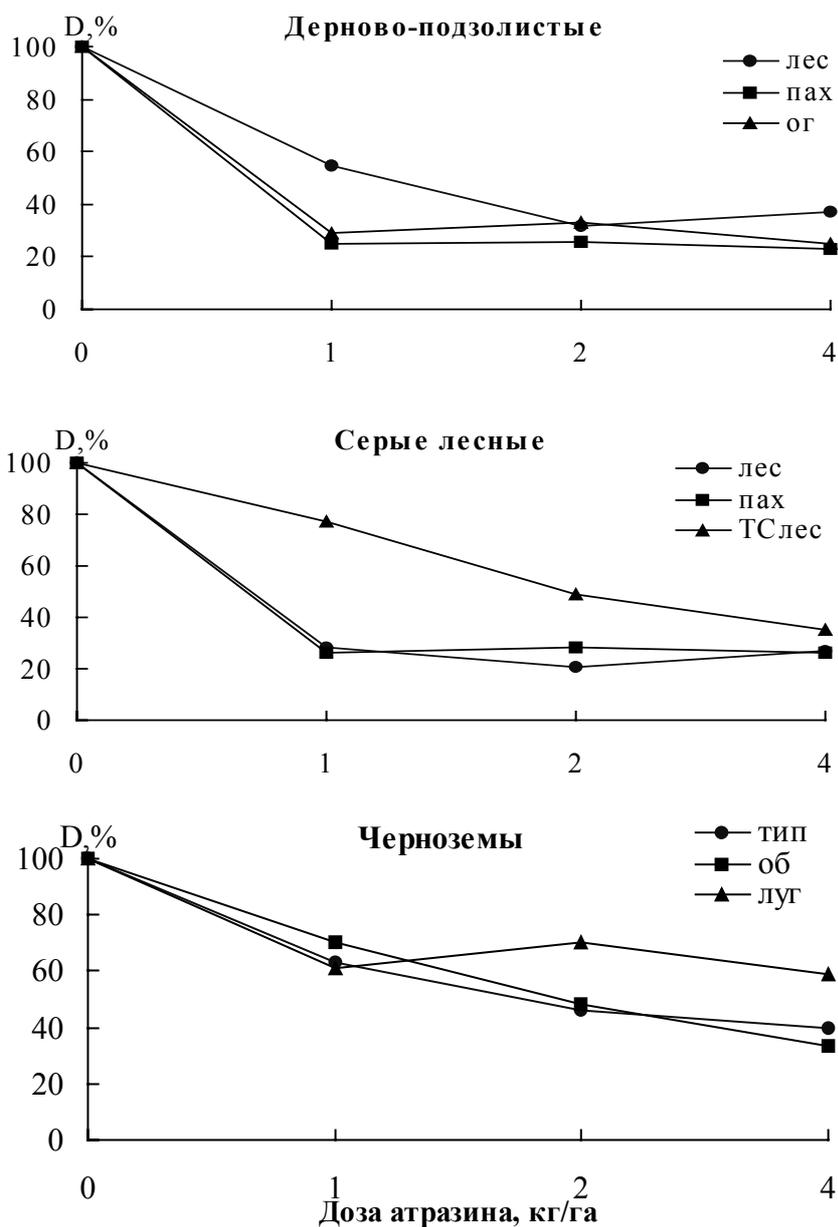


Рис. 5. Зависимость тест-отклика от дозы внесения атразина на исследуемых почвах, где $D, \%$ - наземная воздушно-сухая биомасса пшеницы при различных дозах внесения гербицида.

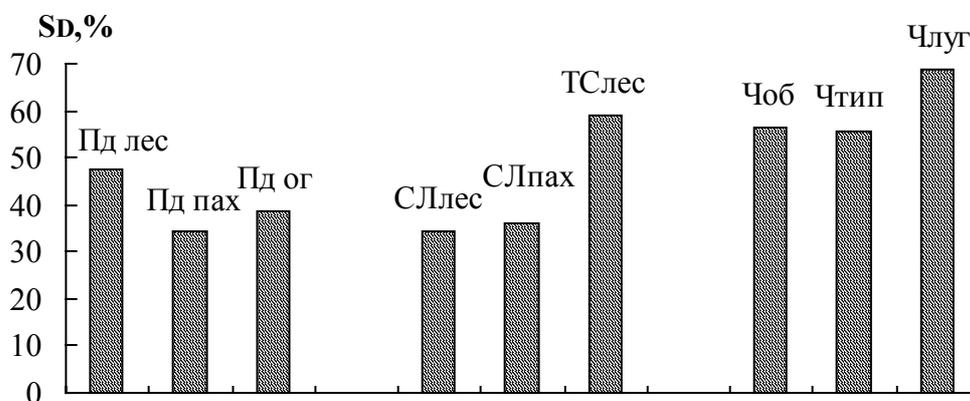


Рис. 6. Суммарная детоксицирующая способность (S_D) исследуемых почв по отношению к атразину.

Рис. 7. ВЭЖХ-хроматограмма калибровочной смеси атразина и его основных метаболитов.
1 – дезизопропил-атразин ($t_R = 12.674$), 2 – дезэтилатразин ($t_R = 16.382$), 3 – атразин ($t_R = 26.311$).

Рис. 8. Типичная хроматограмма почвенного экстракта ($t_R = 26.326$ – атразин).

на которых проводилось биотестирование. Как видно из данной хроматограммы, в почве после проведения биотестирования обнаруживались только остаточные количества атразина, а его метаболиты практически полностью отсутствовали. Два метаболита - дезизопропил-атразин и дезэтил-атразин - были обнаружены только в одном случае - в пахотном варианте дерново-подзолистой почвы.

Наибольшее количество атразина (21-35% от внесенного) извлекалось из черноземных почв (рис. 9), наименьшее -- из дерново-подзолистой почвы под лесом (12% от внесенного). Из подвергавшихся известкованию окультуренных вариантов дерново-

подзолистой почвы со степенью насыщенности основаниями 95% извлекалось атразина на 7-8% больше, чем из почвы под лесом (степень насыщенности основаниями 23%). Интересно отметить, что степень извлечения остаточных количеств атразина из всех исследованных почв оставалась постоянной вне зависимости от дозы внесения гербицида. Данный факт продемонстрирован рисунком 10, где приведены степени извлечения атразина из трех типов пахотных почв при дозах гербицида 1, 2 и 4 кг/га.

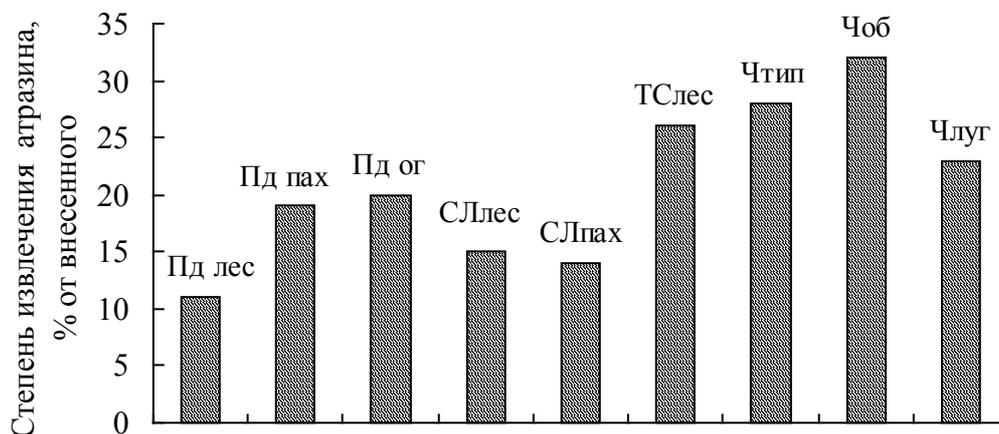


Рис. 9. Степень извлечения остаточных количеств атразина из различных почв при дозе внесения 1 кг/га.

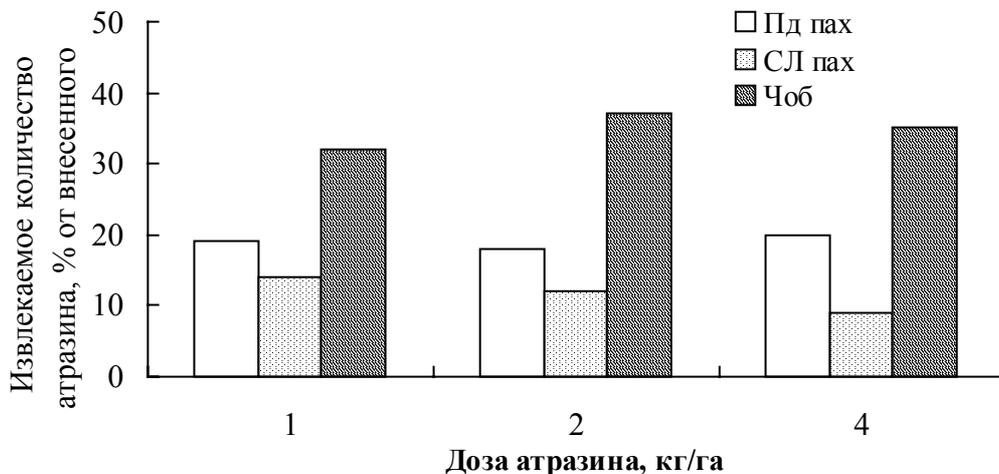


Рис. 10. Степень извлечения остаточных количеств атразина из пахотных вариантов различных почв в зависимости от дозы внесения гербицида.

Сопоставление высокой степени извлечения атразина из черноземов типичного и обыкновенного, а также из темно-серой лесной почвы с наблюдаемой в этих почвах максимальной детоксикацией гербицида может свидетельствовать о переходе атразина в нетоксичную форму в результате связывания с органическим веществом почв. По-видимому, образующиеся ассоциаты настолько прочны, что они не разрушаются при контакте с почвенным раствором, тем самым обуславливая снижение биоусвояемости атразина. Однако

при введении органического растворителя происходит разрушение ассоциатов и атразин извлекается в неизменном состоянии.

2.2.2. Детоксицирующая способность выделенных препаратов ГК по отношению к атразину

Изучение детоксицирующей способности выделенных препаратов ГК по отношению к атразину проводилось методом альгологического биотестирования. Как видно из рис. 11, максимальная детоксицирующая способность наблюдалась для ГК черноземов: при концентрациях ГК 2-3 мг/л токсичность атразина снижалась в среднем на 65-70%. Для ГК серых лесных почв показатель D был ниже и составил в среднем 50%. Самой низкой детоксицирующей способностью (8-15%) характеризовались ГК из дерново-подзолистых почв.

Сравнение суммарной детоксицирующей способности (S_D) препаратов ГК по отношению к атразину (рис. 12) показало улучшение детоксицирующих свойств ГК при переходе от дерново-подзолистых почв к черноземам. ГК из окультуренных вариантов характеризовались некоторым снижением S_D по сравнению с ГК целинных почв.

Корреляционный анализ данных по детоксицирующей способности ГК и блока их структурных параметров (табл. 3 и 4) показал, что для атразина, как и для трифлуралина, наиболее тесная зависимость наблюдалась между детоксицирующей способностью ГК и соотношением ароматических и алифатических фрагментов в молекуле ГК ($r=0.80$, $P=95\%$) (рис. 13).

Исследуемые почвы и препараты ГК образовали следующие ряды по возрастанию суммарной детоксицирующей способности (S_D) по отношению к атразину:

$$\underline{\text{почвы:}} \quad П_{\text{пах}}^D \cong П_{\text{ог}}^D \cong СЛ_{\text{пах}} \cong СЛ_{\text{лес}} < П_{\text{лес}}^D < Ч_{\text{тип}} < Ч_{\text{луг}}$$

$$\underline{\text{ГК:}} \quad П_{\text{ог}}^D < П_{\text{пах}}^D \sim П_{\text{лес}}^D < СЛ_{\text{пах}} < СЛ_{\text{лес}} < Ч_{\text{тип}} < Ч_{\text{луг}}$$

Сопоставление приведенных последовательностей показало их практически полную идентичность. Данный вывод свидетельствует о том, что гуминовые кислоты играют наиболее важную роль в процессах детоксикации атразина в почвенной среде.

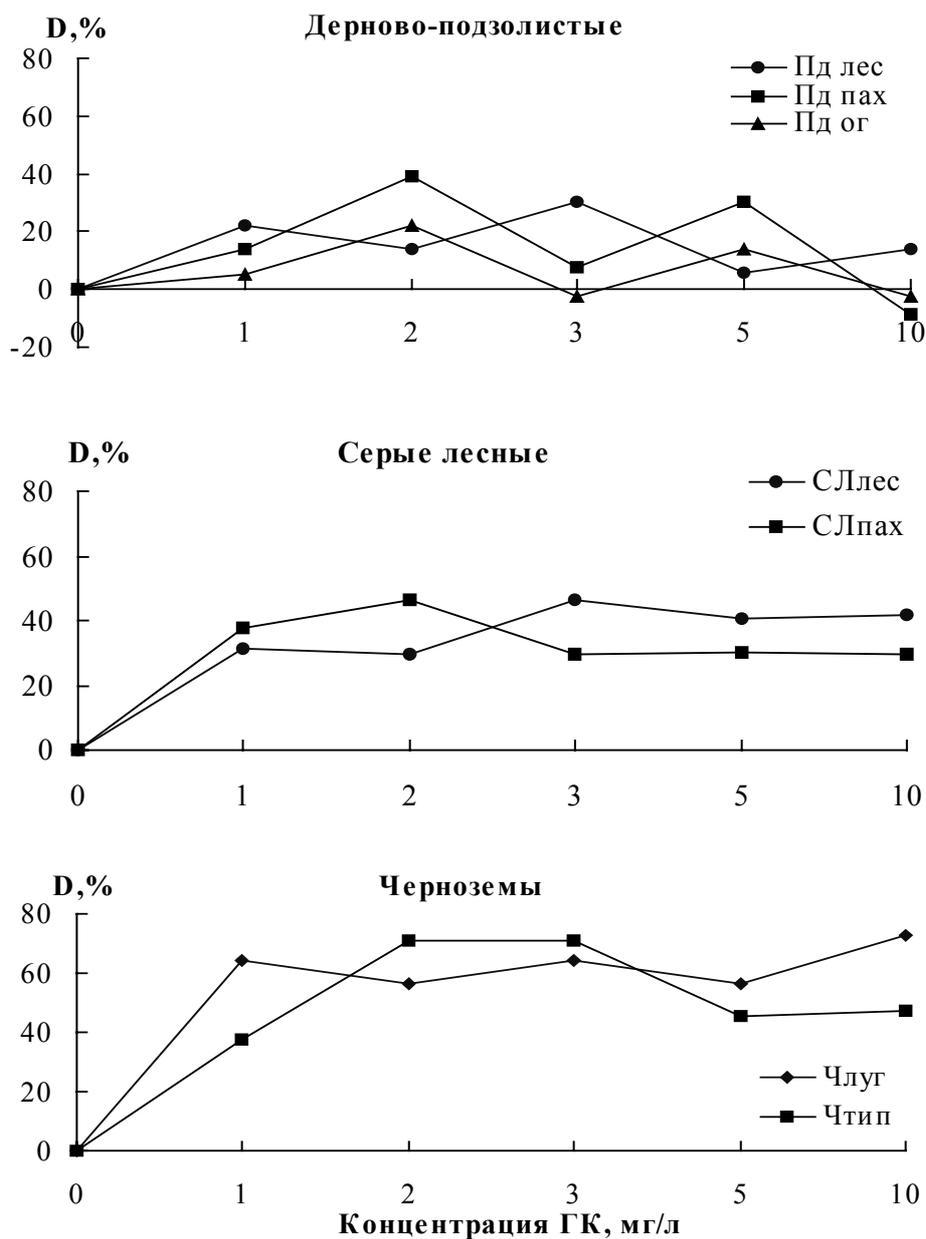


Рис. 11. Детоксицирующая способность ГК, выделенных из исследуемых почв, по отношению к атразину в зависимости от концентрации ГК в тестируемой среде (концентрация атразина -- $2.2 \cdot 10^{-7}$ М).

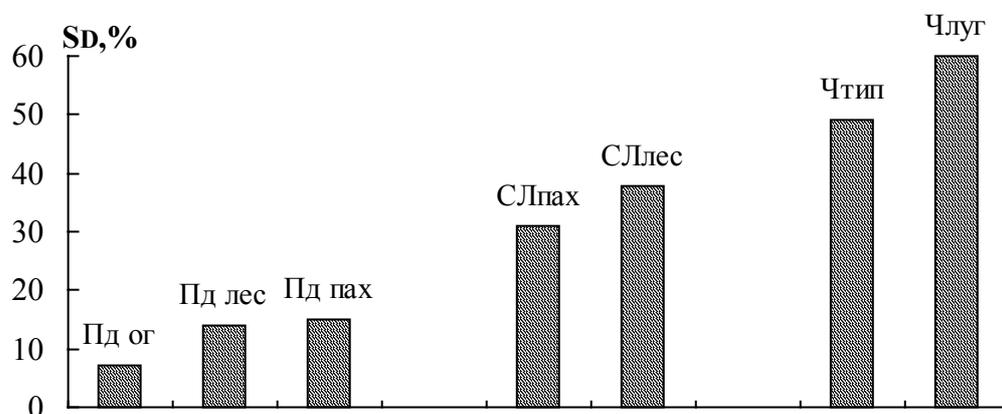


Рис. 12. Суммарная детоксицирующая способность (S_D) препаратов ГК по отношению к атразину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного в настоящей работе исследования детоксикации трифлуралина и атразина почвами разных зональных типов и видов хозяйственного использования и выделенными из них ГК выявили вклад свойств почв и ГК в формирование их детоксицирующей способности по отношению к гербицидам различных химических классов. Роль органического вещества в процессах инактивации трифлуралина и атразина была существенно различной. По-видимому, это связано с различным характером взаимодействия органического вещества в целом и, в частности, гуминовых кислот с рассматриваемыми гербицидами. Как видно из рис. 13, на котором представлена зависимость детоксицирующей способности ГК по отношению к обоим гербицидам от соотношения C_{Ar}/C_{Al} , увеличение содержания в молекуле ГК ароматических составляющих приводит к увеличению детоксицирующей способности ГК. При этом детоксицирующие свойства ГК по отношению к атразину более выражены (точки корреляционной зависимости лежат выше), чем к трифлуралину. Наличие такой зависимости может быть обусловлено важной ролью донорно-акцепторных взаимодействий между молекулами ГК и гербицида. Так, в зависимости от химической структуры гербицида, молекула гуминовой кислоты может проявлять как донорные (по отношению к трифлуралину - сильному акцептору), так и акцепторные (по отношению к электроно-донорному атразину) свойства. При этом взаимодействие ГК с атразином будет приводить к образованию более устойчивых комплексов с переносом заряда, поскольку акцепторные свойства ГК выражены сильнее,

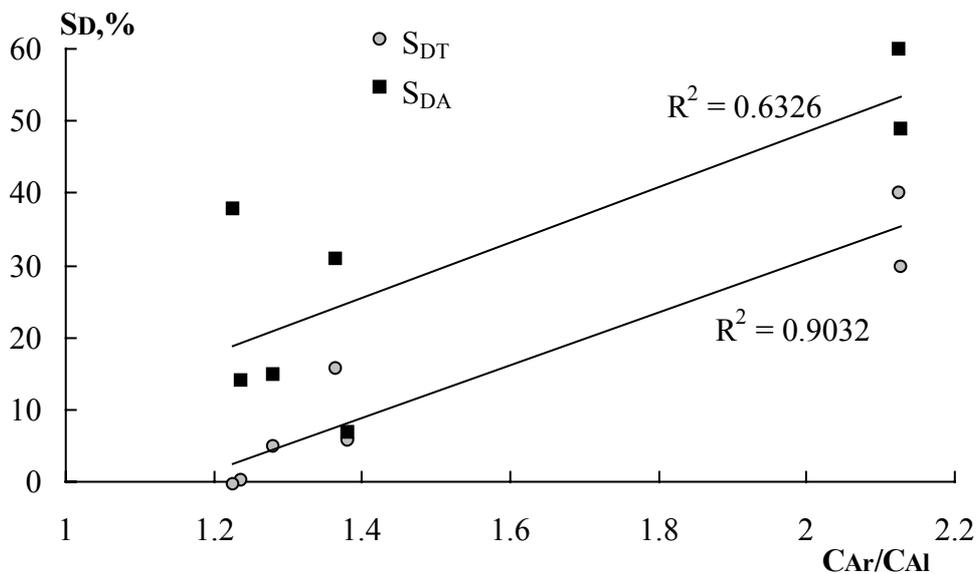


Рис. 13. Корреляционная зависимость между детоксицирующей способностью препаратов ГК по отношению к трифлуралину (S_{DT}) и атразину (S_{DA}) и структурным параметром C_{Ar}/C_{Al} .

чем донорные, за счет обогащенности их молекул хиноно-подобными структурами. Кроме того, существенный вклад во взаимодействие атразина с ГК вносит водородное связывание, что также способствует инактивации гербицида.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что детоксицирующая способность почв по отношению к гербицидам класса сим-триазинов (и близким к ним по свойствам гербицидам других классов) будет в основном определяться количественным и качественным составом органического вещества, тогда как роль органической компоненты в снижении токсического эффекта на почвах представителей динитроанилинов не будет столь значительной.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы девять образцов почв различного типа (дерново-подзолистые, серые лесные, черноземы) и вида хозяйственного использования (целина, пашня) и семь выделенных препаратов гуминовых кислот. Анализ структуры гуминовых кислот показал нарастание содержания ароматических фрагментов от дерново-подзолистых почв к черноземам и в окультуренных вариантах почв по сравнению с целинными.

2. Исследование детоксицирующей способности почв показало возрастание показателя D с увеличением содержания гуминовых кислот в составе органического вещества по отношению к атразину, тогда как для трифлуралина аналогичной зависимости не наблюдалось. По возрастанию показателя D почвы образовали следующие ряды:

трифлуралин: $СЛ_{пах} \leq П^D_{ог} < ТС_{лес} \leq Ч_{об} \leq СЛ_{лес} \leq Ч_{тип} \leq П^D_{пах} \leq П^D_{лес} \leq Ч_{луг}$;

атразин: $П^D_{пах} \cong П^D_{ог} \cong СЛ_{пах} \cong СЛ_{лес} < П^D_{лес} < Ч_{тип} < Ч_{об} < ТС_{лес} < Ч_{луг}$.

3. Корреляционный анализ данных по детоксицирующей способности почв и их свойствам показал отсутствие значимой зависимости показателя D от охарактеризованных почвенных параметров для трифлуралина и выявил важную роль ГК в детоксикации атразина (коэффициент корреляции между показателем детоксицирующей способности и $С_{ГК}/С_{ФК}$ составил 0,80 при $P=95\%$).

4. Исследование детоксицирующей способности препаратов ГК показало максимальную детоксицирующую способность ГК, выделенных из черноземных почв, по отношению к обоим гербицидам. По возрастанию показателя D препараты ГК образовали следующие ряды:

трифлуралин: $П^D_{лес} \leq СЛ_{лес} \leq П^D_{пах} \leq П^D_{ог} < СЛ_{пах} \ll Ч_{тип} < Ч_{луг}$;

атразин: $П^D_{ог} < П^D_{пах} \sim П^D_{лес} < СЛ_{пах} < СЛ_{лес} < Ч_{тип} < Ч_{луг}$.

5. Корреляционный анализ данных по детоксицирующей способности препаратов ГК и их структурным параметрам позволил выявить непосредственную зависимость показателя D препаратов ГК от относительного содержания в молекуле ГК ароматических фрагментов по сравнению с алифатическими (C_{Ar}/C_{Al}) ($r=0,95$ для трифлуралина и $r=0,80$ для атразина при $P=95\%$).
6. Сопоставление детоксицирующей способности почв и препаратов ГК выявило ведущую роль гуминовых кислот в детоксикации атразина в почве, тогда как в процессах детоксикации трифлуралина содержание органического вещества и его качественный состав не являлись определяющими факторами.

СПИСОК РАБОТ

1. Marina A. Anisimova, Galina F. Lebedeva & Irina V. Perminova. Influence of zonal factor and soil agricultural treatment on the properties of humic acids in relation to herbicides. // Abstract book of the 9-th International Colloquium for Optimization of Plant Nutrition, Czech Republic, Praha, September 8-16, 1996, p. 215.
2. М. А. Анисимова. Детоксицирующая способность почв различного генезиса и использования и выделенных из них гуминовых кислот по отношению к гербициду трифлуралину. // Материалы Международной научной конференции студентов и аспирантов “Ломоносов-97”, М., Изд-во МГУ, 1997, p.
3. М. А. Anisimova, I. V. Perminova, G. F. Lebedeva. Detoxifying ability of different soil humic acids in relation to herbicide trifluralin. // Abstract book of the 7-th Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam, The Netherlands, April 6-10, 1997, p. 288.
4. I. V. Perminova, N. Yu. Yaschenko, M. A. Anisimova, N. A. Kulikova. Impact of humic substances on the toxicity of xenobiotic organic compounds. // Abstract book of the 1997 ASA, CSSA, SSSA Annual Meeting, Oct. 26-31, 1997, Anaheim, California, p. 197.
5. Marina A. Anisimova, Galina F. Lebedeva & Irina V. Perminova. Influence of zonal factor and soil agricultural treatment on the properties of humic acids in relation to herbicides. // Proc. of the 9-th International Colloquium for Optimization of Plant Nutrition, Czech Republic, Praha, September 8-16, 1996, p. 418-422.