



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. Ломоносова

---

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

*НА ПРАВАХ РУКОПИСИ*

**Куликова Наталья Александровна**

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

03.00.27 – ПОЧВОВЕДЕНИЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-1999

Работа выполнена на кафедре общего земледелия факультета почвоведения Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова.

Научные руководители: кандидат биологических наук, доцент  
Г.Ф. Лебедева  
кандидат химических наук  
И. В. Перминова

Официальные оппоненты: доктор сельскохозяйственных наук  
Б.М. Когут  
доктор биологических наук,  
профессор Ю.Я. Спиридонов

Ведущая организация: ВИУА (Всероссийский институт  
удобрений и агропочвоведения)

Защита состоится “ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 1999 года в 15 час. 30 мин. в аудитории М-2 факультета почвоведения МГУ на заседании Диссертационного Совета К.053.05.16  
Адрес: 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, факультет почвоведения

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке факультета почвоведения МГУ.

Автореферат разослан “ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 1999 года.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Диссертационного Совета по почвоведению в МГУ, а отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, просим направлять по адресу: 119899, ГСП-3, Москва, Воробьевы горы, МГУ, факультет почвоведения, Ученый совет.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета,  
доктор биологических наук, профессор

Г.В. Мотузова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** 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. 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. 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. 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.

**Научная новизна.** Осуществлено определение констант связывания атразина с препаратами гумусовых кислот в растворенном и адсорбированном (на каолините) состоянии, что позволило установить существенное превосходство связывающей способности адсорбционных комплексов гумусовых кислот.

Установлено наличие корреляционной зависимости между связывающей способностью растворенных гумусовых кислот к атразину и содержанием в них ароматического углерода, в то время как для адсорбированных на каолините гумусовых кислот эта взаимосвязь отсутствует. Это позволило предположить различный механизм связывания атразина растворенными и адсорбированными гумусовыми кислотами

На основании оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину с помощью эффективной константы связывания показано несоответствие данных химических и токсикологических экспериментов и сделан вывод о том, что образование нетоксичных комплексов не может служить единственным механизмом детоксикации атразина растворенными гумусовыми кислотами. В качестве важной составляющей процесса детоксикации предложено учитывать стимулирующее воздействие гумусовых кислот на световую фазу фотосинтеза тест-организмов в условиях химического стресса.

Показано, что, в отличие от водных сред, детоксикация атразина в почве обуславливается образованием нетоксичных комплексов в результате связывания адсорбированными гумусовыми кислотами.

**Практическая значимость работы.** Предложен способ обработки данных альгологического тестирования водных сред, позволяющий учитывать мешающее влияние гумусовых кислот.

Полученные значения констант связывания атразина гумусовыми кислотами могут быть использованы для расчета форм существования атразина при построении моделей биогеохимического цикла и оценки токсичности почв, загрязненных атразином.

Установленные зависимости “структура - детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к атразину” могут быть использованы при выборе гуминовых препаратов, оптимальных для детоксикации загрязненных атразином почв.

**Апробация работы.** Отдельные части работы были представлены на Международных конференциях студентов и аспирантов “Ломоносов-96” и “Ломоносов -98” (Москва, 1996, 1998); на Международном симпозиуме IHSS “Humic Substances in Transport Processes” (Анахейм, 1997); на 16-ом Всемирном конгрессе по почвоведению (Монпелье, 1998), на 9-ой ежегодной конференции SETAC-Europe (Лейпциг, 1999).

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 6 статей и 7 тезисов докладов.

**Структура диссертационной работы.** Диссертационная работа состоит из обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Выделение и характеристика препаратов гумусовых кислот

Препараты гуминовых и фульвокислот (ГК и ФК) были выделены из трех дерново-подзолистых почв, расположенных на участках под лесом ( $P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$ ), пахотном ( $P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$ ) и огородном ( $P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$ ) (табл. 1). ГК выделяли по стандартной методике. Для выделения ФК использовали сорбцию на смоле XAD-2. Кроме того, были выделены водорастворимые гумусовые кислоты (нефракционированная сумма ГК и ФК) почвенного раствора. Данная фракция гумусовых кислот наименее изучена как с точки зрения химических свойств, так и воздействия на биоту. Предполагалось, что ввиду более низких значений молекулярных масс по сравнению с ГК и ФК щелочного экстракта, водорастворимые гумусовые кислоты могут лучше поглощаться микроорганизмами и растениями и в большей степени воздействовать на физиологическое состояние организмов. Для выделения указанной фракции водную вытяжку почвы (1:2) фильтровали, подкисляли до pH 2 и выделяли гумусовые кислоты с помощью сорбции на смоле XAD-2. Обозначения всех выделенных препаратов приведены в табл. 1.

Для получения ряда препаратов с более широким диапазоном химических свойств дополнительно было использовано 22 препарата гумусовых кислот, предоставленных лабораторией ФОХ Химфака МГУ и UFZ (Лейпциг, Германия), выделенных по стандартным методикам из различных источников.

Таблица 1

Химические характеристики использованных почв и принятые в работе обозначения выделенных из них препаратов гумусовых кислот

Химические характеристики	$P_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$	$P_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$	$P_{\text{ОГ}}^{\text{Д}}$
pH <sub>водн</sub>	5,0	7,8	7,3
pH <sub>сол</sub>	4,5	-	-
C <sub>орг</sub> , %	4,3	1,5	3,8
C <sub>гк</sub> /C <sub>фк</sub>	0,2	0,7	0,3
Сумма обменных оснований, мг-экв/100г	7,2	17,1	37,1
Подвижный Al, мг-экв/100г	4,4	нет	нет
Гидролитическая кислотность, мг-экв/100г	5,5	2,0	1,3
Ca водной вытяжки, мг-экв/100г	нет	7,7	0,5
Выделенные препараты гумусовых кислот			
Гуминовые кислоты (ГК)	НВW1	НВP1	НВG1
Фульвокислоты (ФК)	FBW1	FBP1	FBG1

Сумма ГК и ФК водной вытяжки	WBW1	WBP1	WBG1
------------------------------	------	------	------

Препараты гумусовых кислот были охарактеризованы методами элементного анализа,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии и гель-хроматографии (табл. 2). Содержание С, Н, N определяли на элементном анализаторе Carlo Erba Strumentazione-1106. Содержание О рассчитывали по разности. Элементный состав рассчитывали на беззольное органическое вещество. Количественные  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры регистрировали на спектрометре VXR-400 при времени задержки 4 с. Содержание углерода различных типов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м. д.): 220-187 - С кетонных и хинонных групп ( $\text{C}_{\text{C=O}}$ ); 187-165 - С карбоксильных и сложноэфирных групп ( $\text{C}_{\text{COO}}$ ); 165-108 - С ароматических фрагментов ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 108-5 - С алифатических фрагментов ( $\text{C}_{\text{Alk}}$ ). Гель-хроматографический анализ проводили на колонке, заполненной гелем *Toyopearl-50HW(S)*, при элюировании 0,028 М фосфатным буфером (рН 6,8) со скоростью 1 мл/мин. Регистрацию гумусовых кислот на выходе из колонки проводили с помощью проточных детекторов УФ-поглощения и органического углерода. Для расчета ММР проводили калибровку колонки по полидекстранам с известными молекулярными массами.

Как видно из табл. 2, исследованные препараты значительно различались по элементному составу и структурным характеристикам. Так, наибольшее содержание углерода и наименьшее - кислорода было отмечено для ГК углей, торфов и черноземов. Эти же препараты характеризовались наибольшим содержанием ароматических фрагментов. В ряду почвенных препаратов самое высокое отношение О/С, максимальное содержание карбоксильных групп и алифатического углерода было характерно для ГК и ФК выделенных из  $\text{П}_{\text{ПАХ}}^{\text{Д}}$  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. Средневесовые молекулярные массы ( $M_w$ ) всех препаратов приведены в табл. 2. Как видно, для ряда исследованных препаратов можно отметить, что наименьшими  $M_w$  характеризовались гумусовые кислоты природных вод и водных экстрактов почв; максимальными - торфов. В ряду почвенных препаратов было отмечено увеличение  $M_w$  при переходе от ФК к ГК, выделенных из одной почвы.

В связи с отсутствием стандартных методик выделения гумусовых кислот из водной вытяжки почв, было проведено исследование ММР не только выделенных препаратов, но и органического вещества (ОВ) исходных водных вытяжек почвы. Полученные результаты на примере  $\text{П}_{\text{ЛЕС}}^{\text{Д}}$  почвы в сопоставлении с данными для ГК и ФК щелочного экстракта приведены на рис. 1. Сравнение гель-хроматограмм ОВ исходной вытяжки почвы и выделенного препарата показывает, что сорбция на ХАД-2 позволяет отделить водорастворимые гумусовые кислоты от полисахаридов (высокомолекулярный пик на хроматограмме ОВ с детекцией по органическому

углероду, который не имеет УФ-поглощения). При этом по положению максимума и форме пика выделяемый препарат весьма сходен с низкомолекулярным пиком на

Таблица 2

Источник происхождения и химическая характеристика использованных препаратов гумусовых кислот.

Препарат	Источник	Содержание элементов, ат. %				M <sub>w</sub> , КДа	Распределение углерода, %			
		C	H	N	O		C <sub>C=O</sub>	C <sub>COO</sub>	C <sub>Ar</sub>	C <sub>Alk</sub>
<b>Гумусовые кислоты природных вод и водных экстрактов почв и торфов</b>										
WBW1	водная вытяжка П <sup>Д</sup> <sub>ЛЕС</sub>	28,3	33,1	0,1	38,7	6,25				
WBP1	водная вытяжка П <sup>Д</sup> <sub>ПАХ</sub>	29,0	42,7	0,1	28,3	7,18				
WBG1	водная вытяжка П <sup>Д</sup> <sub>ОГ</sub>	28,0	48,4	0,1	23,4	7,97				
FMX2	р Москва	31,5	39,2	1,4	27,9	6,36	2	19	36	43
HTW	ОВ водного экстракта верхового торфа	29,6	45,8	0,6	23,4	6,70	4	13	39	46
TTW	ОВ водного экстракта низинного торфа	29,2	44,2	0,6	26,0	5,53				
HO13HA	ГК болотных вод					12,8				
<b>ФК почв</b>										
FBG	П <sup>Д</sup> <sub>ОГ</sub>	41,7	38,4	2,4	17,6	11,3				
FGW	Л <sub>ЛЕС</sub>	41,2	40,3	2,7	15,8	11,7				
FBW1	П <sup>Д</sup> <sub>ЛЕС</sub>	35,2	38,4	1,4	25,1	10,2	4	20	34	43
FBP1	П <sup>Д</sup> <sub>ПАХ</sub>	33,8	39,0	1,8	25,4	8,84	2	25	26	47
FBG1	П <sup>Д</sup> <sub>ОГ</sub>	34,8	38,1	1,8	25,4	11,7	3	18	41	37
<b>ГК почв</b>										
HBW	П <sup>Д</sup> <sub>ЛЕС</sub>	31,8	41,1	2,6	23,8	15,9	1	17	45	38
HBP	П <sup>Д</sup> <sub>ПАХ</sub>	37,3	38,9	2,1	21,2	17,1	2	16	44	38
HVG	П <sup>Д</sup> <sub>ОГ</sub>	32,6	42,6	2,3	22,2	18,3	1	15	46	38
HBW1	П <sup>Д</sup> <sub>ЛЕС</sub>	32,6	44,3	2,3	20,8	14,5	4	20	33	40
HBP1	П <sup>Д</sup> <sub>ПАХ</sub>	32,2	43,8	2,8	21,2	16,6	3	21	26	50
HVG1	П <sup>Д</sup> <sub>ОГ</sub>	34,7	42,0	1,8	21,6	14,2	2	19	42	37
HGW	Л <sub>ЛЕС</sub>	29,7	38,9	2,4	28,4	17,4	1	19	47	33
HGP	Л <sub>ПАХ</sub>	31,6	40,0	2,5	25,4	15,4	3	14	46	37
HS	Ч <sup>Луг</sup>	38,7	36,4	2,7	21,3	17,8	2	14	57	28
HST	Ч <sup>Г</sup>	40,6	32,8	2,4	23,7	12,7	3	15	54	28
SEL	Ч <sup>Г</sup>	32,0	43,6	2,1	21,7	14,4	1	18	45	36
<b>Гумусовые кислоты торфов</b>										
HTL	сумма ГК и ФК верхового сосново- пушицевого торфа	35,6	40,6	1,3	22,2	18,3	2	15	45	17
TTL	сумма ГК и ФК низинного древесного торфа	36,1	40,2	1,5	21,7	21,0	3	15	45	17
T4	сумма ГК и ФК верхового сфагнового торфа	34,1	41,7	1,5	22,4	19,6	1	16	43	16
H8	ГК торфа	36,6	43,6	1,0	18,9	11,7	2	16	55	13
HTO	Коммерческие ГК НПО Биолар	35,8	42,7	1,6	19,9	20,0	3	13	44	40
<b>ГК бурых углей</b>										
AGK	Коммерческие ГК АО	38,0	37,9	0,4	23,3	15,6	1	17	58	21

RNA	Спецбиотех ГК бурого угля	39,0	38,9	0,7	21,4	16,4	3	18	66	11
-----	------------------------------	------	------	-----	------	------	---	----	----	----

хроматограмме ОВ. Следовательно, использованный в работе метод выделения позволяет получать препараты водорастворимых гумусовых кислот близких к реально существующим в почвенном растворе. Для всех трех почв наблюдали одинаковую тенденцию снижения  $M_w$  в ряду: ГК > ФК > сумма ГК и ФК водной вытяжки.

Применение кластерного анализа к блоку данных по элементному составу и средневесовым молекулярным массам, которые были определены для всех исследованных препаратов, позволило выделить 4 класса препаратов со сходными свойствами (рис. 2). Как видно из рисунка, распределение по классам отражает различия входящих в них препаратов гумусовых кислот по источнику происхождения и соотношению ГК:ФК. В связи с этим дальнейшей работе было уделено внимание специфике связывания и детоксикации атразина гумусовыми кислотами, присущей не только индивидуальным препаратам, но и их классам, приведенным на рис. 2.

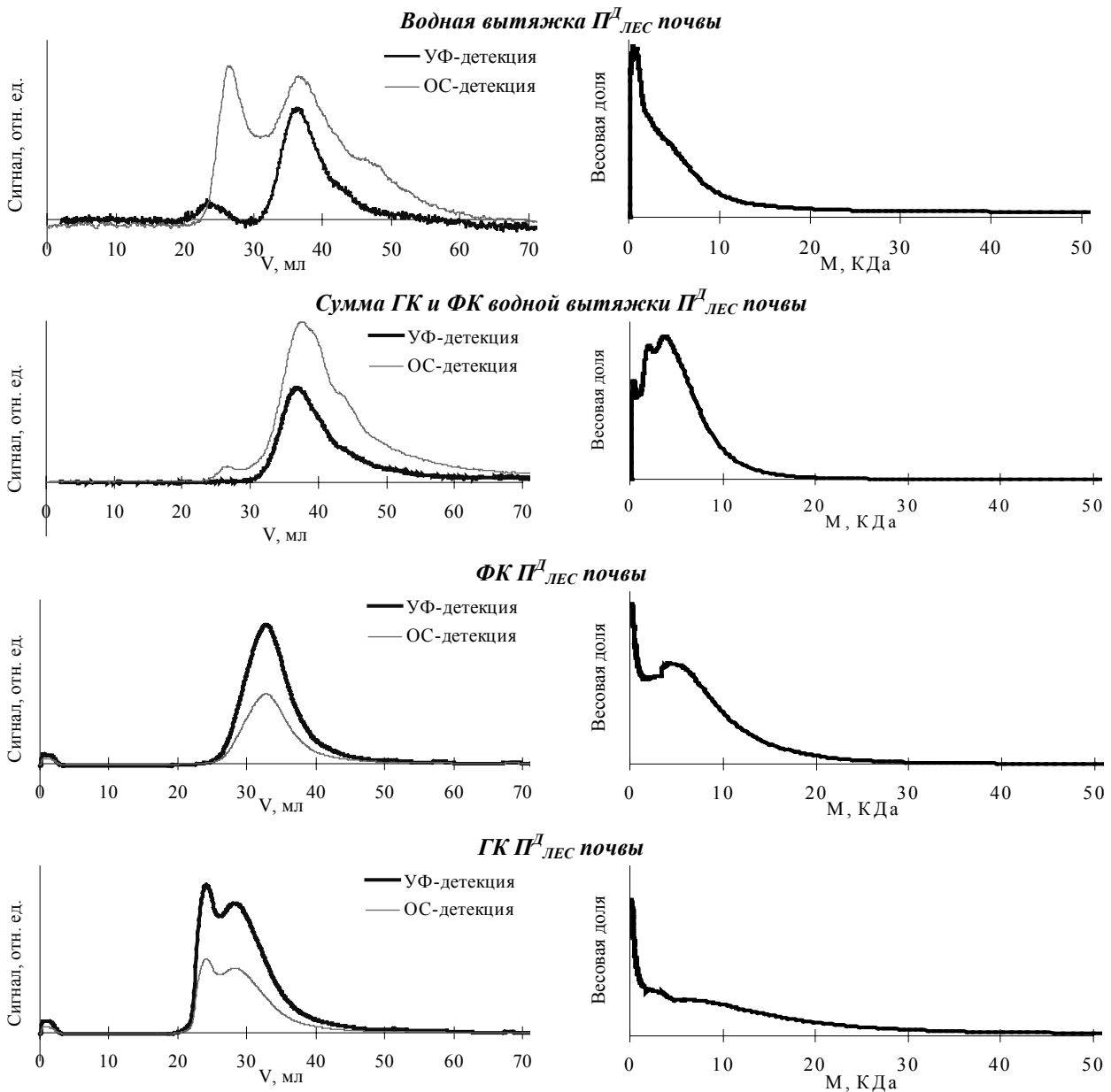




Рис. 1. Гель-хроматограммы и соответствующие им ММР препаратов ОВ водной вытяжки и гумусовых кислот П<sup>Д</sup><sub>ЛЕС</sub> почвы.

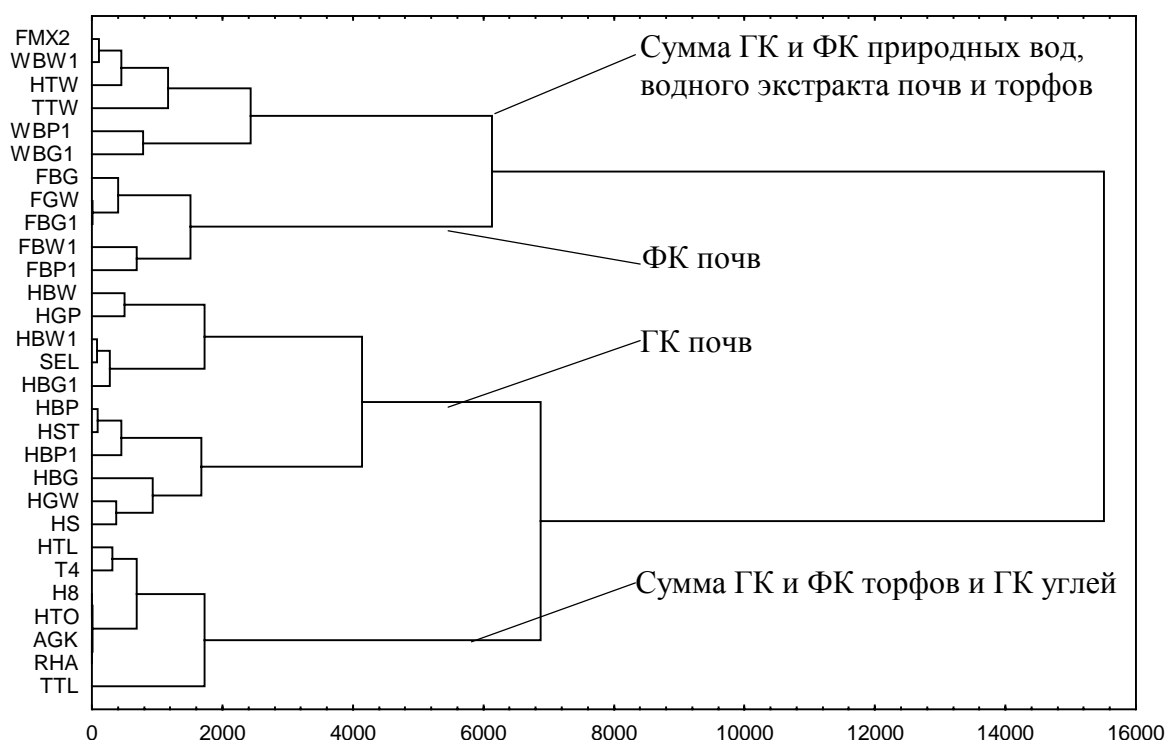


Рис. 2. Распределение препаратов гумусовых кислот по группам на основе кластерного анализа.

### Изучение связывающей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину

Связывание атразина гумусовыми кислотами в растворе можно условно описать уравнением:



Данной реакции соответствует следующая константа равновесия:

$$K_{OC} = \frac{[A-HS]}{[A] \times [HS]} \quad (2)$$

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

Ввиду того, что в условиях эксперимента общая концентрация гумусовых кислот ( $C_{HS}$ ) намного больше таковой атразина ( $C_A$ ), можно принять  $[HS] = C_{HS}$ . Учитывая, что  $[A-HS] = C_A - [A]$ , выражение (2) можно преобразовать в следующее:

$$\frac{C_A}{[A]} + 1 = K_{OC} \times C_{HS} \quad (3)$$

Согласно полученному уравнению  $K_{OC}$  можно рассчитать как тангенс угла наклона зависимости  $(C_A/[A] + 1)$  от  $C_{HS}$ . Следовательно, для определения  $K_{OC}$  необходимо было определить концентрацию несвязанного атразина. Для этой цели

проводили разделение свободного и связанного атразина методом ультрафильтрации, пропуская раствор атразина и гумусовых кислот через мембранный фильтр с диаметром пор 1000 Да. Для проведения экспериментов были выбраны следующие условия:  $C_A = 1 \times 10^{-5}$  моль/л;  $C_{HS} = (1,5 - 6,5) \times 10^{-4}$  кг ОС/л; pH 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.

Типичные графики указанной зависимости для исследованных препаратов гумусовых кислот приведены на рис. 3. Полученные значения  $K_{OC}$  даны в табл. 3. 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. Как видно из таблицы, 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<sup>Д</sup> почв.

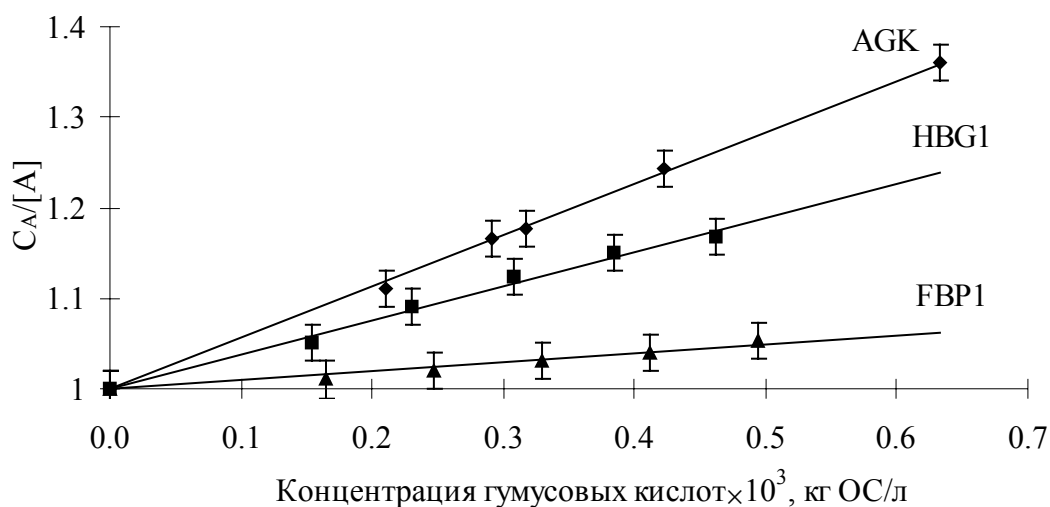


Рис. 3. Типичные графики зависимости  $(C_A/[A]+1)$  от концентрации гумусовых кислот

Полученные значения  $K_{OC}$  использовали для выявления взаимосвязи между связывающей способностью и структурой гумусовых кислот (табл. 2). Корреляционный анализ показал наличие связи между  $K_{OC}$  и двумя взаимозависимыми параметрами, характеризующими степень ароматичности гумусовых кислот. Коэффициенты корреляции ( $r$ ) для пар переменных " $C_{Ar} - K_{OC}$ " и " $C_{Ar}/C_{Alk} - K_{OC}$ " составили 0,91 и 0,87, соответственно. Наличие данной взаимосвязи подтверждает важную роль ароматических фрагментов гумусовых кислот в процессе взаимодействия с атразином. Коэффициент корреляции между  $M_w$  препаратов гумусовых кислот и  $K_{OC}$  составил 0,73. Это может свидетельствовать о

преимущественном связывании атразина с более высокомолекулярными фракциями гумусовых кислот.

Таблица 3

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
<b><i>ОВ водного экстракта торфа</i></b>			<b><i>ГК почв</i></b>		
НТW	87	0,17	<b><i>ГК дерново-подзолистых почв</i></b>		
<b><i>ФК почв</i></b>			НВW	380	0,63
FBW1	192	0,49	НВG	400	0,68
FBP1	110	0,21	НВW1	281	0,50
FBG1	275	0,49	НBP1	181	0,34
<b><i>Сумма ГК и ФК торфов</i></b>			НBG1	380	0,65
НТО	300	0,51	<b><i>ГК серых лесных почв и черноземов</i></b>		
T4	377	0,62	НGW	575	0,90
<b><i>ГК бурого угля</i></b>			НST	404	0,63
AGK	575	0,75	НS	501	0,75
			SEL	444	0,72

Погрешность определения величин  $K_{OC}$  и  $S$  составила 6%.

#### **Получение адсорбционных комплексов гумусовых кислот с каолинитом**

В связи с тем, что в почвенном профиле подавляющая часть гумусовых кислот находится не в растворенном, а в адсорбированном на минералах состоянии, необходимо было провести соответствующие модельные эксперименты по связыванию атразина на адсорбционных комплексах гумусовых кислот. Получение таких комплексов потребовало предварительного исследования адсорбционного поведения выделенных препаратов гумусовых кислот на глинистых минералах, в качестве которого был выбран каолинит - представитель группы глинистых алюмосиликатов, широко представленных в илистых и коллоидных фракциях почв.

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. 4).

Как видно из рисунка, наименьшей адсорбционной способностью характеризовались ФК, а наибольшей - ГК торфа. ГК бурого угля и почв занимали промежуточное положение. Изотермы адсорбции были аппроксимированы уравнением изотермы Ленгмюра, позволяющего рассчитать константу адсорбции ( $K$ )

и максимальную адсорбцию гумусовых кислот на каолините (b). Полученные значения K и b приведены в табл. 4.

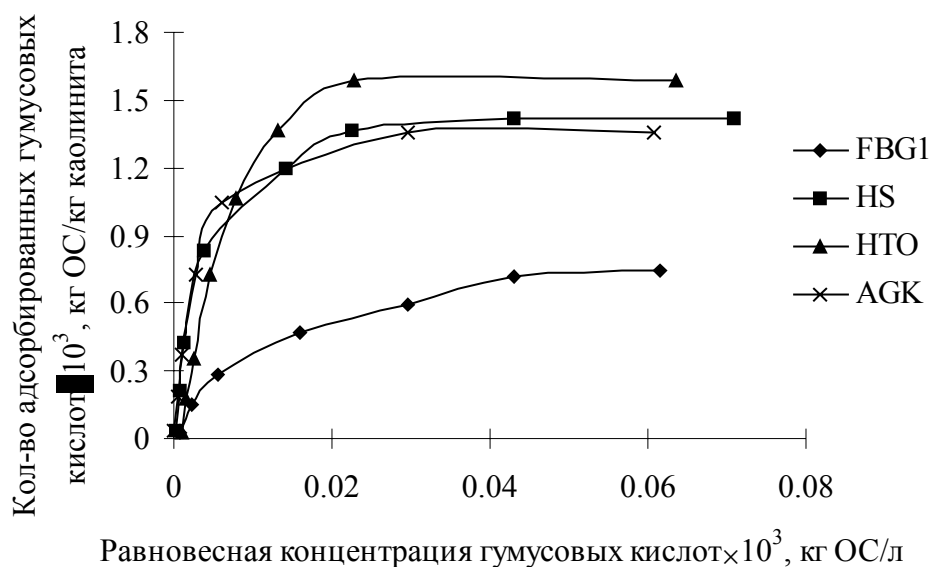


Рис. 4. Типичные изотермы адсорбции гумусовых кислот на каолините.

Таблица 4

Параметры адсорбции и десорбции гумусовых кислот на каолините

Препарат	Адсорбция		Н	кол-во прочно связанных гумусовых кислот, г ОС/кг каолинита
	$K \times 10^{-3}$ , л/кг ОС	b, г ОС/кг каолинита		
<b>ГК болотных вод</b>				
НО13НА	0,29	1,12	4,9	1,20
<b>ФК почв</b>				
FBW1	0,07	0,92	2,3	0,56
FBG1	0,09	0,89	2,1	0,57
<b>ГК почв</b>				
<b>ГК дерново-подзолистых почв</b>				
НВW	0,11	2,16	11,1	1,40
НВW1	0,18	2,40	12,7	1,51
<b>ГК черноземов</b>				
НС	0,26	1,55	5,2	1,36
НСТ	0,31	1,49	3,9	1,39
<b>ГК торфов и бурых углей</b>				
<b>ГК торфов</b>				
НТО	0,11	2,21	12,4	1,65
Н8	0,19	1,80	9,0	1,77
<b>ГК бурых углей</b>				
AGK	0,36	1,49	1,2	1,31
RNA	0,15	1,80	2,2	1,28

Погрешность определения K и b составила 5%, ОС - 3%.

Корреляционный анализ указанных адсорбционных характеристик и данных по свойствам препаратов гумусовых кислот (табл. 2) выявил взаимосвязь между парами переменных "C<sub>Аг</sub> - К" (r = 0,66) и "M<sub>w</sub> - b" (r = 0,72). 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 предпочтительной сорбции высокомолекулярных фракций гумусовых кислот. Для проверки этого предположения были измерены M<sub>w</sub> четырех препаратов гумусовых кислот до и после их адсорбции на каолините (табл. 5).

Таблица 5

M<sub>w</sub> препаратов гумусовых кислот до и после адсорбции на каолините

Препарат	M <sub>w</sub> до адсорбции,	M <sub>w</sub> после адсорбции,	
	КДа	КДа	% от начальной
FBW1	9,06	8,47	93
HST	12,7	11,2	88
RHA	16,4	14,5	88
AGK	13,6	13,2	97

Погрешность определения M<sub>w</sub> составляет 3%.

Данные таблицы подтверждают высказанное предположение. Во всех случаях после адсорбции средневесовая молекулярная масса уменьшилась на 3 - 12%.

Как видно из табл. 4, по величине максимальной адсорбции на каолините исследованные препараты гумусовых кислот образуют следующий ряд: ФК почв < ГК черноземов < ГК торфов и углей < ГК П<sup>Д</sup> почв. По значениям К препараты располагаются в несколько иной последовательности: ФК почв < ГК торфов < ГК П<sup>Д</sup> почв и углей < ГК черноземов, т.е. увеличение константы адсорбции не всегда сопровождается возрастанием b.

В связи с тем, что для проведения экспериментов по взаимодействию атразина с адсорбционными комплексами гумусовых 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. 5). 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.

Как видно из рисунка, адсорбция гумусовых кислот на каолините является лишь частично обратимой. Для количественной характеристики обратимости адсорбции был использован коэффициент гистерезиса Н (табл. 4), рассчитываемый как отношение степенных показателей уравнения изотермы Фрейндлиха:

$$H = \frac{n_f}{n_{fd}} \quad (4)$$

где  $n_f$  и  $n_{fd}$  коэффициенты уравнения Фрейндлиха для изотерм адсорбции и десорбции, соответственно. Полученные значения  $N$  приведены в табл. 4.

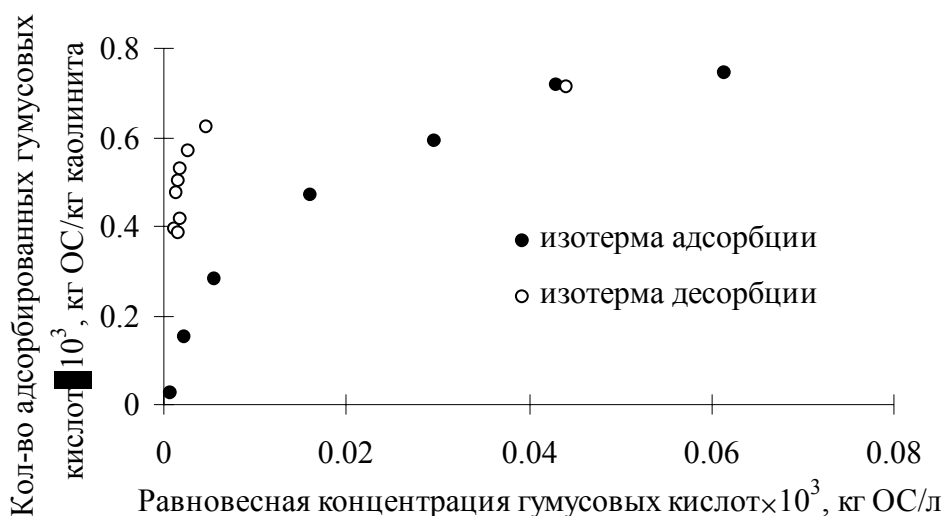


Рис. 5. Типичные изотермы адсорбции-десорбции гумусовых кислот на каолините

Как видно из табл. 4, по величине гистерезиса изученные препараты можно расположить в следующий ряд: ФК почв  $\approx$  ГК бурых углей  $<$  ГК черноземов  $<$  ГК торфов  $\approx$  ГК П<sup>Д</sup> почв. На основании корреляционного анализа нами было установлено, что с ростом  $M_w$  необратимость адсорбции гумусовых кислот на каолините возрастает ( $r=0,64$ ).

Результирующим показателем различного адсорбционно-десорбционного поведения гумусовых кислот является содержание ОС в адсорбционном комплексе с каолинитом после проведения десорбции. Его измеряли путем отжига лиофильно высушенных комплексов (после экспериментов по десорбции) в кварцевой трубке при  $t=900^\circ\text{C}$ . Результаты приведены в табл. 4. Как видно, содержание ОС возросло в следующем ряду: ФК почв  $<$  ГК бурых углей  $<$  ГК черноземов  $<$  ГК П<sup>Д</sup> почв  $<$  ГК торфов. При этом содержание ОС коррелировало с  $M_w$  гумусовых кислот ( $r=0,67$ ), коэффициентом гистерезиса  $N$  ( $r=0,66$ ) и максимальной адсорбцией  $b$  ( $r=0,82$ ).

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

### Исследование связывающей способности адсорбционных комплексов гумусовые кислот с каолинитом по отношению к атразину

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  $(2 - 20) \times 10^{-6}$  моль/л, 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. 6. Линейность полученных изотерм во всем диапазоне использованных концентраций атразина свидетельствует, что полученные зависимости принадлежат к начальному участку изотермы, где она может быть описана уравнением вида:

$$A_s = K_d \times [A] \quad (5)$$

где  $A_s$  (моль/кг сорбента) и  $[A]$  (моль/л) - количество адсорбированного атразина, нормированное на массу сорбента, и его равновесная концентрация, соответственно;  $K_d$  - коэффициент распределения, который в данных условиях эквивалентен константе адсорбции.  $K_d$  рассчитывали как тангенс угла наклона изотермы адсорбции атразина. При расчете константы связывания атразина с адсорбированными гумусовыми кислотами проводили нормирование  $K_d$  на содержание ОС в адсорбционном комплексе:

$$K_{OC}^* = \frac{K_d}{OC, \%} \times 100, \quad (6)$$

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. 6.

Как видно из таблицы, 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  $C_{Ar}$  и  $C_{Ar}/C_{Al}$  ( $r = 0,76$  и  $0,74$ , соответственно) свидетельствует о большой роли ароматических участков на поверхности адсорбционного комплекса каолинита с гумусовыми кислотами в их взаимодействии с атразином. По значениям  $K_{OC}^*$  исследованные препараты гумусовых кислот в иммобилизованном состоянии образуют следующий ряд: ГК торфов < ГК почв  $\approx$  ФК почв < ГК бурых углей.

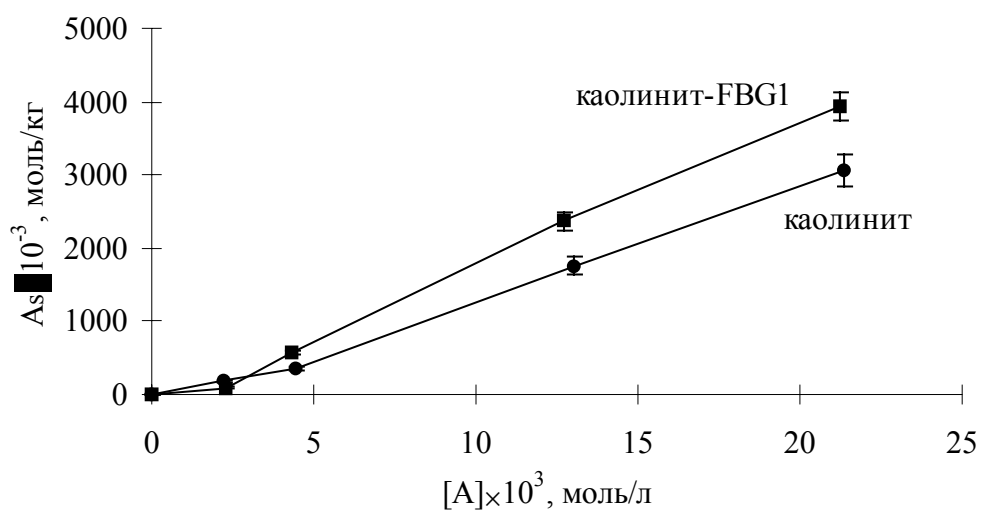


Рис. 6. Типичные изотермы адсорбции атразина на каолините и адсорбционном комплексе каолинит-гумусовые кислоты.



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

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

Погрешность определения  $K_d$ ,  $K_{OC}^*$  составила 5%.

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  $S_{Ag}$ , отмеченное ранее для  $K_{OC}$ , при наличии тесной корреляции с суммой карбоксильных и фенольных групп в гумусовых кислотах ( $r = 0,85$ ), не обнаруженной для растворенных гумусовых кислот. Сравнение полученных значений  $K_{OC}^*$  и  $K_{OC}$  (табл. 3) позволяет сделать вывод, что связывающая способность иммобилизованных на каолините гумусовых кислот по отношению к атразину значительно превышает такую для растворенных.

Гистерезис сорбции-десорбции атразина варьировал в зависимости от свойств адсорбированного препарата гумусовых кислот (табл. 6). Для чистого каолинита был получен наименьший коэффициент гистерезиса, близкий к единице ( $H = 1,21$ ), 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  $H$  были характерны для адсорбционных комплексов каолинита с ГК торфов. Наличие положительной корреляции между содержанием кислорода в препаратах гумусовых кислот (О/С) и коэффициентом гистерезиса ( $r = 0,75$ ) свидетельствует об участии кислородсодержащих групп иммобилизованных гумусовых кислот в связывании атразина. По результатам проведенных экспериментов было рассчитано количество прочно сорбированного атразина (табл. 6). Увеличение этого показателя наблюдали в следующем ряду иммобилизованных гумусовых кислот: ГК торфов < ГК черноземов  $\approx$  ГК бурых углей  $\approx$  ГК П<sup>Д</sup> почв < ФК почв.

### Исследование детоксицирующей способности растворенных гумусовых кислот по отношению к атразину

Исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот в водной среде проводили методом биотестирования с использованием в качестве тест-объекта одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*. Тест-откликом служил показатель  $F_v/F_m$  кривой индукции флуоресценции, характеризующий фотосинтетическую активность водоросли. Концентрация атразина составляла  $6,7 \times 10^{-7}$  моль/л, концентрация гумусовых кислот -  $(0,6 - 5) \times 10^{-6}$  кг ОС/л. Регистрацию фотосинтетической активности хлореллы проводили через 3 часа культивирования. Перед регистрацией кривой индукции флуоресценции культуру водоросли выдерживали в темноте в течение 1 мин. При расчете показателя  $F_v/F_m$  учитывали собственную флуоресценцию гумусовых кислот. Токсический эффект атразина ( $T_A$ ) оценивали как относительное уменьшение тест-отклика в присутствии гербицида ( $R_A$ ) по сравнению с тест-откликом в контроле ( $R_0$ ):

$$T_A = \frac{R_0 - R_A}{R_0} \times 100\% \quad (7)$$

Так как изменение уровня токсичности атразина в присутствии гумусовых кислот может быть обусловлено их собственным воздействием на тест-организмы, то соответствующий токсический эффект ( $T_{HS+A}$ ) рассчитывали с использованием в качестве контроля тест-отклика в присутствии гумусовых кислот ( $R_{HS}$ ):

$$T_{HS+A} = \frac{R_{HS} - R_{HS+A}}{R_{HS}} \quad (8)$$

Детоксицирующую способность ( $D$ ) препаратов гумусовых кислот оценивали как относительное уменьшение токсического эффекта атразина в присутствии гумусовых кислот по сравнению с исходным токсическим эффектом атразина:

$$D = \frac{T_A - T_{HS+A}}{T_A} = \left( 1 - \frac{R_{HS} - R_{HS+A}}{R_{HS}} \Big/ \frac{R_0 - R_A}{R_0} \right) \times 100\% \quad (9)$$

Такой способ расчета позволяет оценить величину детоксицирующего эффекта, вызываемого уменьшением концентрации свободного токсиканта, на фоне собственного воздействия гумусовых кислот на тест-организмы. То есть, значение коэффициента  $D$  зависит только от связывающей способности гумусовых кислот по отношению к атразину.

Как показали проведенные эксперименты, внесение гумусовых кислот приводило к снижению токсического эффекта атразина. В большинстве случаев кривые детоксикации (зависимость коэффициента  $D$  от концентрации гумусовых кислот) имели S-образную форму с выходом на плато при концентрации гумусовых кислот  $3 \times 10^{-6}$  кг ОС/л (рис. 7). Исключение составили препараты водных экстрактов из торфа НТW и ТТW, для которых наблюдали линейную зависимость  $D$  от концентрации гумусовых кислот.

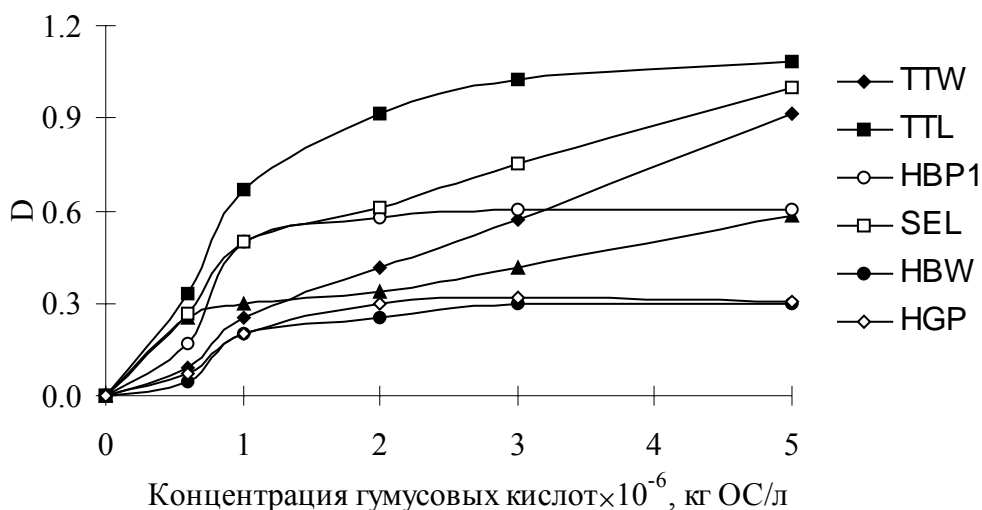


Рис. 7. Примеры кривых детоксикации атразина гумусовыми кислотами различного происхождения.

При условии, что собственное воздействие гумусовых кислот на тест-организмы не изменяется при внесении атразина, из кривых детоксикации можно рассчитать эффективную константу связывания атразина ( $K_{OC}^{tox}$ ). Для вывода уравнения данной константы примем, что токсичность пропорциональна концентрации несвязанного атразина, тогда можно записать:

$$T_A = k \times C_A \quad (10)$$

$$T_{HS+A} = k \times [A] \quad (11)$$

где  $k$  - угловой коэффициент графика диапазона токсичности атразина.

Подставляя (10) и (11) в уравнение (9), и выражая  $C_A/[A]$  через  $K_{OC}^{tox}$  и  $C_{HS}$  аналогично (3), получаем:

$$D = \frac{K_{OC}^{tox} \times C_{HS}}{1 + K_{OC}^{tox} \times C_{HS}} \quad (12)$$

$K_{OC}^{tox}$  рассчитывали путем аппроксимации экспериментальных зависимостей  $D$  от концентрации гумусовых кислот уравнением (12). Полученные значения  $K_{OC}^{tox}$  приведены в табл. 7. На основании  $K_{OC}^{tox}$  было рассчитано количество атразина  $S^{tox}$ , связанного гумусовыми кислотами при их максимальной использованной концентрации (табл. 7).

Таблица 7

Эффективные константы связывания  $K_{OC}^{tox}$  атразина гумусовыми кислотами и количество связанного атразина  $S^{tox}$

Препарат	$K_{OC}^{tox}$ , л/кг ОС	$S^{tox}$ , г/кг ОС	Препарат	$K_{OC}^{tox}$ , л/кг ОС	$S^{tox}$ , г/кг ОС
<b>Сумма ГК и ФК природных вод</b>			<b>ГК почв</b>		
FMX2	$2,9 \times 10^5$	240	<b>ГК дерново-подзолистых почв</b>		
HTW	$5,8 \times 10^5$	280	НВW	$1,2 \times 10^5$	150
TTW	$4,5 \times 10^5$	300	НВP	$1,4 \times 10^5$	170
WBW1	$2,1 \times 10^6$	370	НВG	$1,0 \times 10^4$	20
WBP1	$1,8 \times 10^6$	360	НВW1	$5,6 \times 10^5$	290
WBG1	$1,9 \times 10^6$	360	НВP1	$5,5 \times 10^5$	300
<b>ФК почв</b>			НВG1	$5,6 \times 10^5$	300
FBG	$1,4 \times 10^5$	80	<b>ГК серых лесных почв</b>		
FGW	$5,3 \times 10^5$	80	НГW	$2,0 \times 10^5$	200
FBW1	$5,0 \times 10^4$	90	НГP	$1,4 \times 10^5$	170
FBP1	$5,0 \times 10^4$	170	<b>ГК черноземов</b>		
FBG1	$6,0 \times 10^4$	290	НС	$2,9 \times 10^5$	240
<b>Сумма ГК и ФК торфяков</b>			НСТ	$3,7 \times 10^5$	260
НТL	$5,7 \times 10^5$	300	SEL	$7,1 \times 10^5$	310
ТТL	$1,3 \times 10^6$	350	<b>ГК бурого угля</b>		
Т4	$8,9 \times 10^5$	350	АГK	$7,4 \times 10^5$	350

Погрешность определения  $K_{OC}^{tox}$  и  $S^{tox}$  составила 15%

Как видно из таблицы, 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 части П<sup>Д</sup> почв. ОВ водного экстракта торфяков и препараты ФК почв практически не снижали токсичность атразина.

Сравнение  $K_{OC}$  и  $K_{OC}^{tox}$  (табл. 3 и 7) 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 [1]) ( $r = 0,93$ ), в то время как для  $K_{OC}$  наиболее тесная корреляция наблюдалась с содержанием  $C_{Ar}$  в гумусовых кислотах. Следовательно, в данном случае связывание атразина гумусовыми кислотами не является основным фактором, определяющим величину коэффициента  $D$ . По-видимому, в условиях внесения атразина преобладающим фактором является стимулирующие свойства гумусовых кислот, проявляющиеся только при неблагоприятных условиях среды. Действительно,

в ряде экспериментов нами было отмечено значительное увеличение фотосинтетической активности хлореллы при внесении гумусовых кислот. При этом обязательным условием проявления стимулирующего действия гумусовых кислот являлось снижение показателя Fv/Fm контрольного варианта вследствие негативных изменений условий культивирования (например, снижения температуры) (рис. 9).

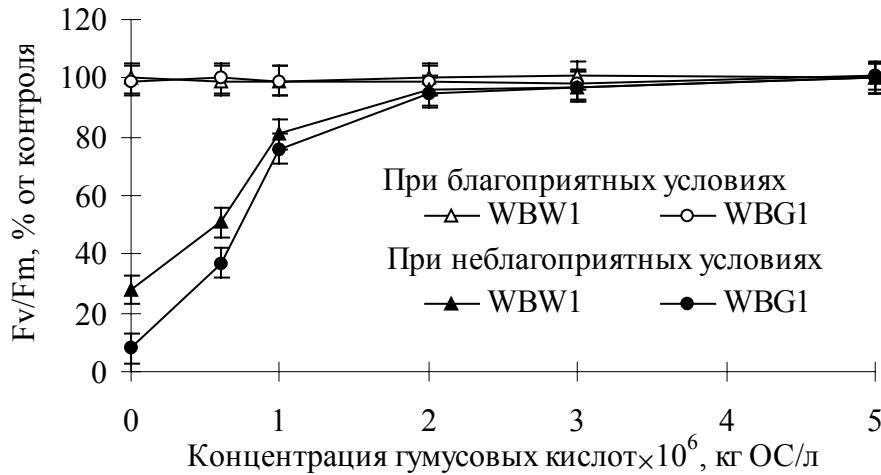


Рис. 9. Изменение воздействия гумусовых кислот на фотосинтетическую активность *Chlorella vulgaris* при снижении температуры культивирования с 35°C (благоприятные условия) до 25°C (неблагоприятные условия)

Подобные эффекты, свидетельствующие о способности гумусовых кислот повышать общую неспецифическую сопротивляемость организмов, наблюдали и другие исследователи [2]. Возможным механизмом, объясняющим стимулирующее воздействие гумусовых кислот при неблагоприятных условиях среды, является увеличение проницаемости клеточных мембран при изменении внешних условий, в наших экспериментах - внесение атразина. Наличие тесной корреляции между  $K_{OC}^{tox}$  и содержанием в гумусовых кислотах низкомолекулярной фракции (<5 КДа) свидетельствует в пользу данного механизма. При этом восстановление фотосинтетической активности, по-видимому, происходит по “шунтирующему типу” [3], т. е. за счет участия поступивших в клетку гумусовых кислот в процессах переноса электронов по ЭТЦ, нарушенной атразином. В качестве возможных переносчиков электронов могут выступать хинонные фрагменты гумусовых кислот.

Для проверки предложенной гипотезы нами были поставлены эксперименты по исследованию влияния гумусовых кислот на токсичность атразина при высоких значениях pH=8, исключающих образование комплексов атразина с гумусовыми кислотами. При этом в качестве тест-объекта были выбраны хлоропласты, представляющие собой органеллы, не отделенные от тестируемого раствора плазмалеммой. В этом случае единственным механизмом детоксикации может являться способность гумусовых кислот восстанавливать электронный транспорт.

Для проведения экспериментов в раствор, содержащий атразин ( $1,8 \times 10^{-6}$  моль/л) и гумусовые кислоты ( $10^{-5}$  кг ОС/л), вносили предварительно выделенные хлоропласты ячменя. Растворы с хлоропластами помещали в темноту и через 1 минуту регистрировали фотосинтетическую активность. Результаты экспериментов приведены на рис. 8.



Рис. 8. Детоксицирующее действие гумусовых кислот по отношению к атразину, тест-объект - хлоропласты ячменя.

Как видно из рисунка, все исследованные препараты гумусовых кислот обладали детоксицирующим действием. Величина коэффициента D коррелировала с содержанием хинонных фрагментов в молекулах гумусовых кислот ( $r=0,72$ ). Это может служить подтверждением протекания детоксикации атразина гумусовыми кислотами по вышеописанному механизму. Установленная взаимосвязь между детоксицирующей способностью гумусовых кислот по отношению к хлорелле и хлоропластам ( $r=0,68$ ) может косвенно подтверждать одинаковый механизм детоксикации в обоих случаях.

Таким образом, наблюдаемую детоксикацию атразина гумусовыми кислотами в водной среде следует объяснять скорее повышением неспецифической сопротивляемости организмов в присутствии гумусовых кислот, чем связыванием атразина в нетоксичные комплексы. При этом ведущую роль в восстановлении фотосинтетической активности, по-видимому, играют хинонные фрагменты гумусовых кислот

### **Исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину в почве.**

Исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину в почве проводили методом лабораторных вегетационных экспериментов на образцах дерново-подзолистых почв, которые использовали для выделения

препаратов гумусовых кислот (табл. 1). Тест-объектом служили растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.*, тест-откликом - сырая надземная биомасса. Расчет коэффициента D проводили аналогично экспериментам в водной среде (9).

Эксперименты по установлению диапазонов гербицидного действия атразина (рис. 10) выявили его неодинаковую эффективность на П<sup>Д</sup> почвах. По-видимому, это объясняется различиями в свойствах почв (табл. 1). Так, минимальная токсичность атразина была зафиксирована на П<sup>Д</sup><sub>ЛЕС</sub> почве, характеризующейся самым большим содержанием ОС (4,3%) и самым низким рН водной вытяжки (5,0). Максимальный уровень токсичности атразина был отмечен на П<sup>Д</sup><sub>ПАХ</sub> почве, где было обнаружено минимальное содержание ОС (1,5%) и самый высокий рН (7,8). П<sup>Д</sup><sub>ОГ</sub> 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.

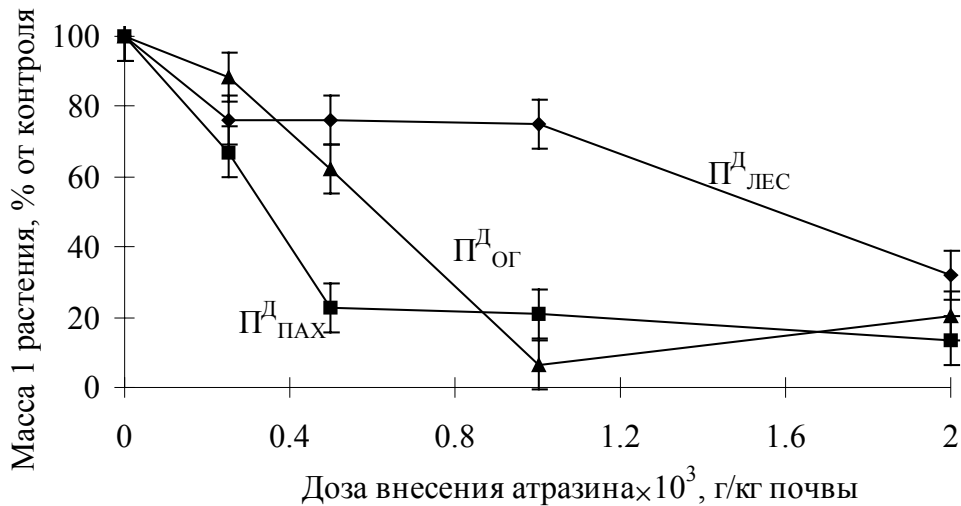


Рис. 10. Диапазон гербицидного действия атразина на трех П<sup>Д</sup> почвах различного сельскохозяйственного использования.

Для оценки детоксицирующей способности гумусовых кислот были проведены вегетационные эксперименты на выбранных почвах с внесением серий возрастающих доз коммерческого препарата АГК. Рабочая концентрация атразина была выбрана на основании диапазонов токсичности (рис. 11) и составила 10<sup>-3</sup> г/кг почвы. Влияние препарата АГК на уровень токсичности атразина показано на рис. 13.

Как видно из рисунка, препарат АГК проявил различную детоксицирующую способность по отношению к атразину на разных П<sup>Д</sup> почвах. Наибольшее значение коэффициента D было зафиксировано в условиях П<sup>Д</sup><sub>ЛЕС</sub> почвы (0,52), а наименьшее - на П<sup>Д</sup><sub>ПАХ</sub> почве (0,14). Вероятно, это связано с разной эффективностью действия гербицида на исследованных почвах (рис. 11). Так, внесение атразина в дозе 1 мг/кг почвы вызывало 25% снижение сырой надземной биомассы в варианте П<sup>Д</sup><sub>ЛЕС</sub> почвы, 93% - П<sup>Д</sup><sub>ПАХ</sub> и 80% - для П<sup>Д</sup><sub>ОГ</sub> 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.

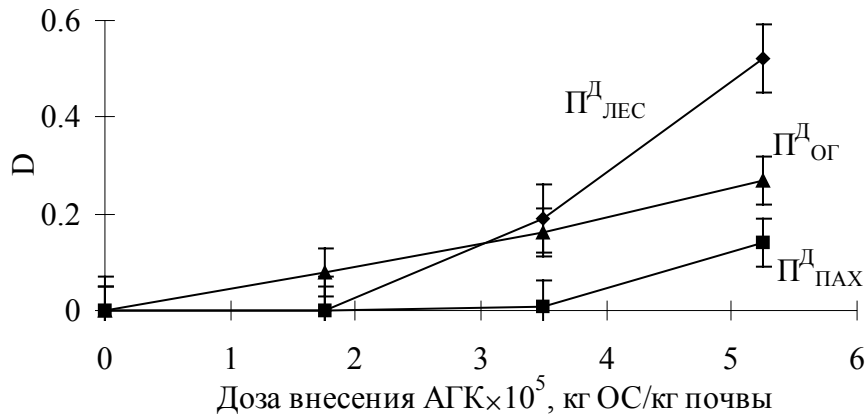


Рис. 11. Детоксицирующая способность препарата АГК по отношению к атразину в условиях вегетационного эксперимента на  $\text{ПД}$  почвах.

Допуская, что снижение токсичности атразина в присутствии препарата АГК обусловлено только взаимодействием препарата с гербицидом, можно рассчитать константу связывания  $K_{\text{ОС}}^{*\text{tox}}$  атразина с АГК в соответствии с (12). Полученные значения составили  $2,1 \times 10^4$ ;  $0,3 \times 10^4$  и  $0,7 \times 10^4$  л/кг ОС для  $\text{ПД}_{\text{ЛЕС}}$ ,  $\text{ПД}_{\text{ПАХ}}$  и  $\text{ПД}_{\text{ОГ}}$ , соответственно. На основании констант было рассчитано количество связанного атразина  $S^{*\text{tox}}$  при максимальной использованной дозе гумусовых кислот, которое составило 10,3; 1,6 и 3,5 г/кг ОС для  $\text{ПД}_{\text{ЛЕС}}$ ,  $\text{ПД}_{\text{ПАХ}}$  и  $\text{ПД}_{\text{ОГ}}$ , соответственно. Найденные значения констант связывания  $K_{\text{ОС}}^{*\text{tox}}$  и  $S^{*\text{tox}}$  для препарата АГК оказались близки к полученным при изучении сорбции атразина гумусовыми кислотами, адсорбированными на каолините (табл. 6). Таким образом, основным фактором, определяющим детоксикацию атразина в почве, является связывание гербицида адсорбированными гумусовыми кислотами.

### Список цитируемой литературы

1. 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. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, т. 8, 117-121, 1983
2. Христева Л.А. Действие физиологически активных гуминовых кислот на растения при неблагоприятных внешних условиях. В кн.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 4, 5-23, 1973
3. 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



## 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  $K_{\text{ОС}}$  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  $K_{\text{ОС}}^*$  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  $K_{\text{ОС}}^{\text{tox}}$  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  $K_{\text{ОС}}^{\text{tox}}$  не зависит от содержания ароматических фрагментов в гумусовых кислотах и возрастает по мере увеличения содержания низкомолекулярной фракции.
5. Эффективные константы связывания  $K_{\text{ОС}}^{\text{tox}}$  на два-три порядка превосходят  $K_{\text{ОС}}$  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  $K_{\text{ОС}}^{*\text{tox}}$  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 РАБОТ

1. Perminova I.V., Lebedeva G.F., Kovalevskiy D.V., Kulikova N.A., Philippova O.I., Danchenko N.N. Humic acids as natural detoxcants. Transactions of the 7th International Meeting of the IHSS July 3-8 1994. St.Augustine, Trinidad&Tobado Teil 2. P. F7-F8
2. Петросян В.С., Перминова И.В., Ковалевский Д.В., Данченко Н.Н., Ященко Н.Ю., Лебедева Г.Ф., Куликова Н.А., Филиппова О.И., Венедиктов П.С., Полюнов В.А. Детоксикация тяжелых металлов, полиароматических углеводородов и пестицидов гумусовыми веществами в водах и почвах. Материалы международного конгресса "Вода и экология". Москва. 6-9 сент. 1994 г. Том IV. с 1136-1143
3. D.V. Kovalevsky, N.Yu.Yashchenko, N.N.Danchenko, A.V.Kudryavtsev, D.M.Zhilin, V.S.Petrosyan, N.A.Kulikova, O.I.Philippova, G.F.Lebedeva. Humic substances as natural detoxicants. In.:Humic substances and organic matter in soil and water environments: characterization, transformations and interactions. 1996. Ed.:C.E.Clapp, M.H.B.Hayes, N.Senesi, S.M.Griffith. St.Paul, MN, USA, 399-406
4. Куликова Н. А. Физиологическая активность подвижных фракций органического вещества торфа. Тезисы международной научная конференции "Ломоносов-96". Москва. 1996. С. 42.
5. Куликова Н.А., Перминова И.В., Лебедева Г.Ф., Маторин Д.Н. Влияние органического вещества водной и щелочной вытяжек торфа на фотосинтез растений. Вестник Моск. Ун-та, сер. 16, Биология. 1997. ? 2. С. 36-41.
6. Куликова Н.А. Молекулярно-массовое распределение почвенного водорастворимого органического вещества. Тезисы международной научной конференции "Ломоносов-98". Москва. 1998. С. 43.
7. Perminova I.V., Yaschenko N.Yu., Anisimova M.A., Kulikova N.A. 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. 17.
8. Perminova I.V., Yaschenko N.Yu., Petrosyan V.S., Anisimova M. A., Kulikova N.A, Lebedeva G.F, Matorin D.N., Venediktov P.S. Impact of humic substances on toxicity of polyaromatic hydrocarbons and herbicides. In: Proceedings of 1997 ASA, CSSA, SSSA Annual Meeting (в печати)
9. Anisimova M.A., Kulikova N.A., Perminova I.V., Lebedeva G.F. Detoxifying ability of different soils and extracted from them humic acids in relation to atrazine. Summ. of the 16th World Congress of Soil Science, Montpellier, France, 20-26 August 1998, Vol. 1, p. 137.
10. Anisimova M.A., Kulikova N.A., Perminova I.V., Lebedeva G.F. Detoxifying ability of different soils and extracted from them humic acids in relation to atrazine. Proceedings of the 16th World Congress of Soil Science, Montpellier. (в печати)
11. Balcke G.U., Kulikova N.A., Kopinke F.-D. Long term kinetics of PAH binding on humic acids. Abstracts of 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, 25-29 May 1999. Leipzig, Germany, p. 109
12. Perminova I.V., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Yaschenko N.Yu., Petrosyan 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 1999. Leipzig, Germany, p. 111
13. Perminova I.V., Kulikova N.A., Lebedeva G.Ph. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of atrazine on kaolinite. Abstracts of 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, 25-29 May 1999. Leipzig, Germany, p. 159

**ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ**

Автор выражает глубокую признательность:

- Сотрудникам кафедры биофизики Биологического факультета МГУ д.б.н. Венедиктову П.С. и д.б.н. Маторину Д.Н. за оказанную помощь в организации токсикологических экспериментов и обсуждении результатов.
- Сотрудникам кафедры водной химии Университета Карлсруэ, Германия, проф. F. Frimmel и S. Hesse за оказанную помощь при проведении геле-хроматографических анализов.
- Сотруднику центра по изучению окружающей среды, Лейпциг, Германия, G. Balcke за неоценимую помощь при проведении экспериментов и обсуждении результатов.

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

- Российскому Фонду фундаментальных исследований (гранты ?96-04-49838 и ?98-03-33186а),
- Фонду INTAS (грант INTAS-1997 ?1129)
- Leonardo Buro Part Sachsen
- Robert Havemann Scholarship