

Bożena DEBSKA¹, Magdalena BANACH-SZOTT¹ i Małgorzata DRĄG¹

POLIDYSERSYJNOŚĆ I WŁAŚCIWOŚCI HYDROFILOWE I HYDROFOBOWE KWASÓW HUMINOWYCH GLEB POD TOPOLAMI

POLYDISPERSITY AND THE HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC PROPERTIES OF HUMIC ACIDS OF SOILS UNDER DIFFERENT USE

Abstrakt: Celem pracy było określenie stopnia polidispersyjności oraz właściwości hydrofilowo-hydrofobowych kwasów huminowych gleb spod plantacji topolowych oraz gleb użytkowanych rolniczo. Do badań wykorzystano próbki gleb płowych, glejowych i rdzawych pobrane na obszarze centralnej i zachodniej części Polski, z różnowiekowych - 7, 17, 30, 32, 45 i 57 lat - plantacji topolowych, założonych na gruntach porolnych oraz próbki gleb uprawnych i gleby łąkowej. Próbkę pobierano z głębokości 0÷7,5 i 7,5÷25 cm. Z próbek gleb wyizolowano kwasy huminowe (KH) ogólnie przyjętą metodą IHSS. Wykazano, że kwasy huminowe niezależnie od sposobu zagospodarowania cechują się większym udziałem frakcji hydrofobowych (HOB) niż hydrofilowych (HIL). Kwasy huminowe pod plantacjami topolowymi cechowały się większymi wartościami stosunku HIL/HOB w porównaniu z KH gleb uprawnych i gleby łąkowej. KH warstwy powierzchniowej, niezależnie od sposobu zagospodarowania, cechowały się większymi wartościami HIL/HOB w porównaniu z KH warstwy głębszej. Udział powierzchni piku w widmach HPSEC kwasów huminowych związanego z obecnością molekuł o większych rozmiarach wahał się w przedziale od 0 do 26,2%, dlatego dominujący okazał się pik II o dłuższym czasie retencji, charakterystyczny dla molekuł o mniejszych rozmiarach.

Słowa kluczowe: plantacje topolowe, kwasy huminowe HPLC, HPSEC

Kwasy huminowe (KH) stanowią grupę specyficznych związków organicznych powstających w skomplikowanych procesach biochemicznej kondensacji i polimeryzacji produktów rozkładu resztek pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz produktów przemian materii mikroorganizmów [1-3]. W związku z tym powstanie dwóch identycznych struktur jest praktycznie niemożliwe. Budowa (połączenia aromatyczne, łańcuchy alifatyczne, grupy funkcyjne) i właściwości kwasów huminowych sprawiają, że biorą one udział we wszystkich procesach zachodzących w glebie i wpływają na jej właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne [2, 4].

Jak wynika z doniesień literaturowych [4], właściwości substancji humusowych są cechą charakterystyczną dla danego typu gleby, jednak w pewnym zakresie mogą być modyfikowane poprzez sposób użytkowania gleb. W glebach uprawnych dużą rolę w kształtowaniu właściwości substancji humusowych odgrywają resztki pozbiornowe pozostawione corocznie po sprzęcie uprawianych roślin, a w glebach leśnych opad roślinny. Jak wynika z doniesień literaturowych [1, 4, 5], skład chemiczny materiałów roślinnych jest jednym z podstawowych czynników kształtujących właściwości powstających substancji humusowych oraz przebieg procesu humifikacji. Jednym z parametrów zmieniających się w procesie humifikacji jest stopień polidispersyjności molekuł substancji humusowych [1, 6] oraz udział frakcji hydrofobowych i hydrofilowych [6-8]. Powyższe parametry są ważne z ekologicznego punktu widzenia, gdyż wzajemne

¹ Wydział Rolniczy, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz, tel. 052 374 95 11, fax 052 374 95 05, email: debska@utp.edu.pl, magdybe@poczta.fm, mdrag@utp.edu.pl

proporcje tych frakcji decydują o rozpuszczalności kwasów huminowych, a w konsekwencji o ich migracji w głąb profilu glebowego.

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości hydrofilowo-hydrofobowych oraz stopnia polidispersyjności kwasów huminowych różnych typów gleb pod plantacjami topolowymi oraz sąsiadujących z tymi plantacjami gleb użytkowanych rolniczo.

Materiał i metody

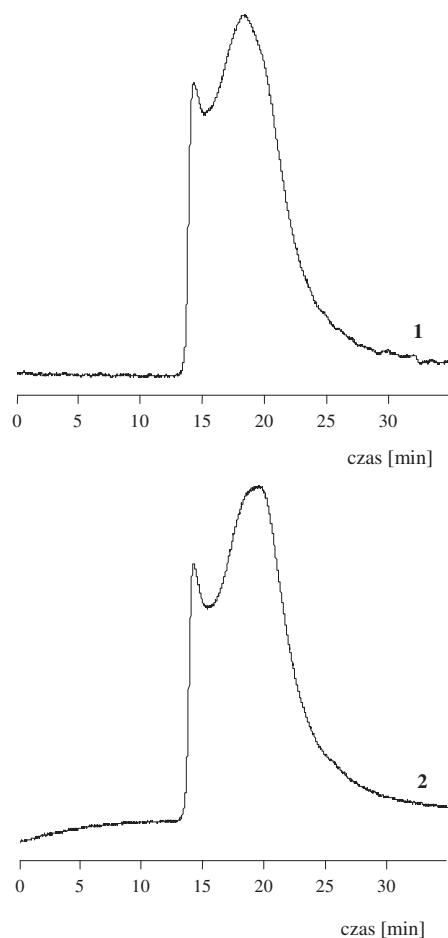
Do badań wykorzystano kwasy huminowe wyizolowane z próbek gleb pływych, glejowych i rdzawych, pobranych na obszarze centralnej i zachodniej części Polski, z różnowiekowych - 7, 17, 30, 32, 45 i 57 letnich - plantacji topolowych, założonych na gruntach porolnych oraz próbki gleb uprawnych i gleby łąkowej. Próbki pobierano z głębokości 0÷7,5 i 7,5÷25 cm. Kwasy huminowe wyizolowano ogólnie przyjętą metodą IHSS. Dla wyseparowanych kwasów huminowych o zawartości popiołu nieprzekraczającej 2% wykonano analizy:

- rozdziału na frakcje makro- i małomolekularne, metodę wysokosprawnej chromatografii ciekowej wykluczania (HPSEC) przy użyciu chromatografu ciekowego firmy PerkinElmer Series 200 wyposażonego w detektor DAD, na kolumnie BioSep-SEC-S 3000 o wymiarach 600 x 7,8 mm (prekolumna BioSep-SEC-S3000 o wymiarach 35 x 7,8 mm). Na podstawie uzyskanych chromatogramów wyznaczono następujące pola powierzchni: S0 - całkowita powierzchnia, S1 - powierzchnia pod pierwszym pikiem, S2 - powierzchnia pod drugim pikiem, a także stosunek powierzchni pików pierwszego do drugiego S1/S2 [6, 9, 10];
- rozdziału na frakcje hydrofobowe i hydrofilowe chromatografem HPLC series 200 firmy PerkinElmer. Zastosowano kolumnę analityczną X-Terra C18 o rozmiarach cząstek 5 μm i wymiarach 250 x 4,6 mm I.D. Stężenie KH w 0,01 M NaOH wynosiło 2 g/dm³. Nastrzyk - 100 mm³, detekcja - $\lambda = 254$ nm. Na podstawie wyznaczonych powierzchni pod pikami obliczono w molekułach kwasów huminowych udział frakcji hydrofilowych (HIL) i frakcji hydrofobowych (HOB-1, HOB-2) oraz parametr HIL/(HOB-1+HOB-2) [6-8, 11, 12].

Wyniki i ich omówienie oraz analiza

Stopień polidispersyjności molekuł kwasów huminowych

Zarówno zastosowane warunki pomiarowe, jak i dobór kolumny (TSK GEL 3000SW) pozwalają na rozdział wyizolowanych kwasów huminowych ze względu na rozmiar molekuł. Pierwszy pik (czyli ten o krótszym czasie retencji) kryje pod swoją powierzchnią cząstki o większych rozmiarach, zaś pik o dłuższym czasie retencji jest charakterystyczny dla cząstek o mniejszych rozmiarach [6, 9, 10]. Rozdział analizowanych kwasów huminowych nie był wyraźnie zaznaczony, a w niektórych przypadkach otrzymano jeden szeroki pik bez wyraźnych tendencji do rozdziału występujący w przedziale od ok. 12,0 do ok. 28,0 min (rys. 1). W widmach kwasów huminowych, w których wyodrębniono dwie frakcje, pierwszy pik występował w zakresie od ok. 12 do ok. 15,5 min, a drugi w zakresie 15,5÷28,0 min (rys. 1). Otrzymane zależności wskazują na dużą polidispersyjność omawianych KH.



Rys. 1. Przykładowe chromatogramy HPSEC kwasów huminowych (1 - gleba płowa - wiek topoli 32 lata; 2 - gleba płowa - uprawna)
Fig. 1. Selected HPSEC chromatograms spectra of humic acids (1 - Luvisols - years of poplar plantation - 32; 2 - Luvisols - arable soil)

Dla kwasów huminowych, których przebieg chromatogramów umożliwił wyodrębnienie dwóch frakcji, obliczono powierzchnie pod pikami i ich udziały. Udział powierzchni pików związanych z obecnością makromolekularnych frakcji kwasów huminowych (S1) w widmach HPSEC wahał się w przedziale od 6,3 do 26,2%, w związku z tym dominujący był pik II, o czym również świadczą otrzymane wartości stosunku powierzchni pików S1/S2 (tab. 1). Na podstawie wartości stosunku S1/S2 można stwierdzić, że polidispersyjność KH z jednej strony zależy od typu gleby, z drugiej od sposobu zagospodarowania. Uprawa topoli w pewnym zakresie modyfikowała wartości parametru S1/S₂, na ogół KH warstwy powierzchniowej pod topolami cechowały się większymi wartościami omawianego parametru w porównaniu z KH warstwy powierzchniowej gleb uprawnych.

Tabela 1

Parametry rozdzielania kwasów huminowych metodą HPSEC

Table 1

Parameters of chromatographic resolution of humic acids HPSEC methods

Gleba (Soil)		Głębokość (Depth)	S ₁	S ₂	S _{1/2}
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	19,2	80,8	0,238
	1	7,5÷25 cm	19,5	80,5	0,242
Luvisols	2	0÷7,5 cm	26,2	73,8	0,355
	2	7,5÷25 cm	17,4	82,6	0,211
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	11,5	88,5	0,130
	1	7,5÷25 cm	8,9	91,1	0,100
Gleysols	2	0÷7,5 cm	-*	-*	-*
	2	7,5÷25 cm	-*	-*	-*
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm			
	1	7,5÷25 cm	11,0	89,0	0,124
Gleysols	2a	0÷7,5 cm	8,6	91,4	0,094
	2a	7,5÷25 cm	-*	-*	-*
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	21,5	78,5	0,274
	1	7,5÷25 cm	13,8	86,2	0,160
Luvisols	2	0÷7,5 cm	15,0	85,0	0,176
	2	7,5÷25 cm	18,8	81,2	0,232
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	10,4	89,6	0,116
	1	7,5÷25 cm	13,5	86,5	0,156
Gleysols	2	0÷7,5 cm	11,8	88,2	0,134
	2	7,5÷25 cm	13,0	87,0	0,149
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	9,9	90,1	0,110
	1	7,5÷25 cm	15,3	84,7	0,181
Luvisols	2	0÷7,5 cm	7,6	92,4	0,082
	2	7,5÷25 cm	11,0	89,0	0,124
Gleba rdzawa	1	0÷7,5 cm	17,4	82,6	0,211
	1	7,5÷25 cm	9,4	90,6	0,104
Arenosols	2	0÷7,5 cm	8,4	91,6	0,092
	2	7,5÷25 cm	6,3	93,7	0,07

* - brak rozdzielania pików

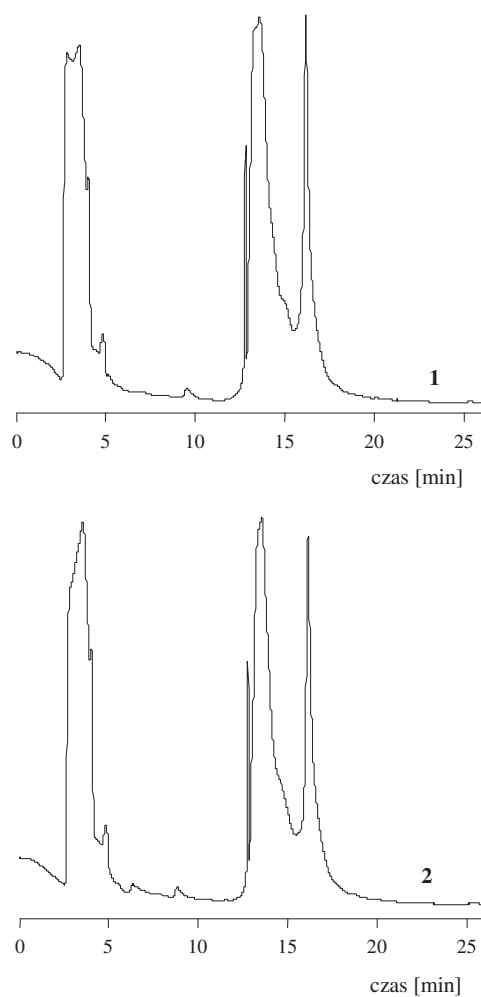
* - no resolution of peak

Właściwości hydrofobowo-hydrofilowe molekuł kwasów huminowych

W molekułach analizowanych kwasów huminowych wyodrębniono frakcje hydrofilowe (HIL) i hydrofobowe (HOB-1 i HOB-2). Piki mieszczące się na chromatogramach (rys. 2) w zakresie od 2,5 do 5,5 min odpowiadają frakcjom hydrofilowym, a piki występujące w przedziale 12,5÷18,5 min odpowiadają frakcjom hydrofobowym (HOB) [7, 11, 12]. Ze względu na słaby rozdzielanie pików odpowiadających frakcjom hydrofilowym potraktowano je jako jedną frakcję hydrofilową - HIL. W przedziale 12,5÷18,5 min wyodrębniono 2 zakresy: jeden w przedziale 12,5÷15,5 min określono jako HOB-1 i drugi w zakresie 15,5÷18,5 min oznaczono jako HOB-2.

Udział frakcji hydrofilowych w analizowanych kwasach huminowych wahał się w granicy od 38,00 do 48,97% (tab. 2), a więc badane KH cechowały się przewagą frakcji hydrofobowych nad hydrofilowymi. KH warstwy powierzchniowej gleb pod plantacjami topolowymi charakteryzowały się na ogół większym udziałem frakcji hydrofilowych i mniejszym hydrofobowych w porównaniu z KH warstwy powierzchniowej gleb

uprawnych. Wyjątek stanowiły kwasy huminowe plantacji najstarszej oraz plantacji 30-letniej, dla której odnośnikiem była łąka, gdzie zaobserwowano zależność odwrotną. W większości wariantów KH wyizolowane z próbek gleb pobranych z warstwy 7,5÷25 cm w porównaniu z KH warstwy powierzchniowej miały mniej frakcji o właściwościach hydrofilowych i więcej o hydrofobowych.



Rys. 2. Przykładowe chromatogramy RP-HPLC kwasów huminowych (1 - gleba płowa - wiek topoli 32 lata; 2 - gleba płowa - uprawna)
Fig. 2. Selected chromatogram RP-HPLC of humic acids (1 - Luvisols - years of poplar plantation - 32; 2 - Luvisols - arable soil)

Konsekwencją zmian udziału poszczególnych frakcji były obliczone wartości stosunku HIL/HOB (tab. 2). I tak kwasy huminowe warstw głębszych charakteryzowały się

mniejszymi wartościami HIL/HOB w porównaniu z KH warstw powierzchniowych. Odwrotną zależność zanotowano dla plantacji najstarszej i najmłodszej. Może to świadczyć o nasilonej migracji frakcji hydrofilowej - jako dobrze rozpuszczalnej - w głąb profilu glebowego, co może być związane również z właściwościami fizykochemicznymi badanych gleb. Natomiast KH warstwy powierzchniowej gleb pod plantacjami topolowymi cechowały się większymi wartościami parametru HIL/HOB w porównaniu z KH gleb uprawnych. Wyjątkiem były KH plantacji najstarszej oraz KH gleby łąkowej. Należy również podkreślić, że różnice, jakie otrzymano dla KH gleby pod plantacjami topolowymi między warstwą powierzchniową i warstwą 7,5÷25 cm, były większe niż między KH poszczególnych warstw w glebach uprawnych. Jest to prawdopodobnie wynikiem zabiegów agrotechnicznych - głównie orki - stosowanych na polach uprawnych.

Tabela 2

Udział frakcji hydrofilowych i hydrofobowych w molekułach kwasów huminowych

Table 2

Share of hydrophilic and hydrophobic fractions in molecules of humic acids

Gleba (Soil)		Głębokość (Depth)	HIL	HOB-1	HOB-2	ΣHOB	HIL/HOB
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	44,34	25,96	29,70	55,66	0,798
	1	7,5÷25 cm	47,34	21,52	31,14	52,66	0,902
Luvisols	1	0÷7,5 cm	40,14	40,71	19,15	59,86	0,673
	2	7,5÷25 cm	38,79	44,02	17,19	61,21	0,634
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	43,31	24,16	32,53	56,69	0,765
	1	7,5÷25 cm	41,55	43,89	14,56	58,45	0,711
Gleysols	17 lat	0÷7,5 cm	39,01	46,73	14,26	60,99	0,640
	2	7,5÷25 cm	39,41	47,04	13,56	60,59	0,652
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	44,23	32,00	23,76	55,77	0,800
	1	7,5÷25 cm	40,44	36,80	22,76	59,66	0,677
Gleysols	30 lat	0÷7,5 cm	47,68	25,24	27,08	52,32	0,915
	2a	7,5÷25 cm	44,74	43,09	12,16	55,26	0,812
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	44,11	21,85	34,04	55,89	0,789
	1	7,5÷25 cm	38,02	43,81	18,17	61,98	0,614
Luvisols	32 lata	0÷7,5 cm	39,88	40,84	19,28	60,12	0,663
	2	7,5÷25 cm	38,00	43,91	18,09	62,00	0,613
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	48,97	22,05	28,98	51,03	0,964
	1	7,5÷25 cm	43,88	40,18	15,94	56,12	0,783
Gleysols	32 lata	0÷7,5 cm	44,10	39,24	16,66	55,90	0,789
	2	7,5÷25 cm	43,48	41,32	15,19	56,52	0,770
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	43,70	38,77	17,53	56,30	0,777
	1	7,5÷25 cm	42,13	43,03	14,85	57,87	0,728
Luvisols	45 lat	0÷7,5 cm	41,03	42,31	16,67	58,97	0,696
	2	7,5÷25 cm	40,94	41,08	17,98	59,06	0,696
Gleba rdzawa	1	0÷7,5 cm	41,72	42,44	15,84	58,28	0,716
	1	7,5÷25 cm	44,96	40,55	14,48	55,04	0,818
Arenosols	57 lat	0÷7,5 cm	44,70	30,71	24,59	55,30	0,812
	2	7,5÷25 cm	41,79	42,20	16,01	58,21	0,718

1 - plantacja topoli (poplar plantation), 2 - gleba uprawna (arable soil), 2a - gleba łąkowa (meadow soil)

Otrzymane wartości udziału frakcji hydrofilowych i hydrofobowych potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia, że właściwości kwasów huminowych są cechą

charakterystyczną dla danego typu gleby, ale mogą być modyfikowane sposobem zagospodarowania gleb.

Wnioski

1. Kwasy huminowe niezależnie od sposobu zagospodarowania cechują się większym udziałem frakcji hydrofobowych niż hydrofilowych. Kwasy huminowe pod plantacjami topolowymi cechowały się większymi wartościami stosunku HIL/HOB w porównaniu z KH gleb uprawnych i gleby łąkowej. KH warstwy powierzchniowej, niezależnie od sposobu zagospodarowania, cechowały się większymi wartościami HIL/HOB w porównaniu z KH warstwy głębszej.
2. Udział powierzchni pików w widmach HPSEC kwasów huminowych związanego z obecnością cząstek o większych rozmiarach wahał się w przedziale od 0 do 26,2%, w związku z tym dominujący okazał się pik II, o dłuższym czasie retencji, charakterystyczny dla cząstek o mniejszych rozmiarach.

Literatura

- [1] Aleksandrowa L.N.: *Organiczeskoje wieszczestwa poczwy i processy jego transformacji*. Nauka, Leningrad 1980.
- [2] Dziadowiec H.: *Ecological role of soil organic matter (in Polish)*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 1993, **411**, 269-281.
- [3] Gonet S.S.: *Próchnica, substancje humusowe, węgiel organiczny - definicje, komentarze i metody oznaczania*. [w:] Substancje humusowe w glebach i nawozach. Dębska B. i Gonet S.S. (red.). PTSH, Wrocław 2003, 21-29.
- [4] Gonet S.S.: *Habitat and anthropogenic factors determining status of soil organic matter (in Polish)*. Humic Subst. Environ., 1997, **1**, 17-24.
- [5] Howard P.J.A., Howard D.M. i Lowe L.E.: *Effects of tree species and soil physico-chemical conditions on the nature of soil organic matter*. Soil Biol. Biochem., 1998, **30**(3), 285-297.
- [6] Dębska B., Drąg M. i Banach-Szott M.: *Molecular size distribution and hydrophilic and hydrophobic properties of humic acids isolated from forest soil*. Soil Water Res., 2007, **2**(2) 45-53.
- [7] Dębska B.: *Właściwości substancji humusowych gleby nawożonej gnojowicą*. Rozprawy 110, Wyd. Uczeln. Akad. Techn.-Roln., Olsztyn 2004.
- [8] Banach-Szott M. i Dębska B.: *Chromatographic separation of humic acids of a forest soil*. [w:] Humic Substances Linking Structure to Functions. Frimmel F.H. i Abbt-Braun G. (red.). TH, Karlsruhe 2006, 225-228.
- [9] Nissinen T.K., Miettinen I.T., Martikainen P.J. i Vartiainen T.: *Molecular size distribution of natural organic matter in raw and drinking waters*. Chemosphere, 2001, **45**, 865-873.
- [10] Vartiainen T., Liimatainen A. i Kauranen P.: *The use of TSK size exclusion columns in determination of the quality and quantity of humus in raw waters and drinking waters*. Sci. Total Environ., 1987, **62**, 75-84.
- [11] Woelki G., Friedrich S., Hanschmann G. i Salzer R.: *HPLC fractionation and structural dynamics of humic acids*. Fresenius J. Anal. Chem., 1997, **357**, 548-552.
- [12] Preuße G., Friedrich S. i Salzer R.: *Retention behavior of humic substances in reversed phase HPLC*. Fresenius J. Anal. Chem., 2000, **368**, 268-273.

POLYDISPERSITY AND THE HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC PROPERTIES OF HUMIC ACIDS OF SOILS UNDER DIFFERENT USE

Abstract: The aim of the present paper was to determine the degree of polydispersity and the hydrophilic and hydrophobic properties of humic acids of soils under poplar plantations and soils under agricultural use. The research involved soil sampled in the central and western part of Poland (Luvisols, Gleysols, Arenosols) from poplar plantations of different age (7, 17, 30, 32, 45 and 57 year-old) established on post-arable land and soil

sampled from arable land and meadow soil. The soils were sampled at the sampling depth of 0÷7.5 and 7.5÷25 cm. From the soil samples there were isolated humic acids (HAs) with the commonly applied method recommended by IHSS. It was shown that humic acids, irrespective of the soil use, demonstrate a higher share of hydrophobic fractions than the hydrophilic ones. Humic acids under poplar plantations revealed higher values of the HIL/HOB ratio as compared with HAs of arable soils and meadow soil. HAs of the surface layer, irrespective of the use, showed higher HIL/HOB values as compared with HAs of the deeper layer. The share of the peak area in HPSEC spectra of humic acids connected with the presence of molecules larger in size ranged from 0 to 26.2%, and thus the second peak appeared to be dominant, of a longer retention time, characteristic for molecules of smaller in size.

Keywords: poplar plantations, humic acids, HPLC, HPSEC