



УДК 543.544.45: 631.417: 631.879.41: 631.879.42

Исследование методом ВЭЖХ физико-химических свойств гуминовых кислот компостов и вермикомпостов разного периода созревания

Юшкова Е.И.

Орловский государственный университет, медицинский институт, Орел

Павловская Н.Е.

Орловский государственный аграрный университет, Орел

Даниленко А.Н.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН

Поступила в редакцию 27.07.2009 г.

Аннотация

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии исследованы гуминовые кислоты выделенные из конского компоста и вермикомпостов на его основе разного периода созревания. Все хроматограммы содержали по три пика. ГК, относящиеся к хроматографическим пикам 1 и 2, элюировались с колонки водным раствором фосфатного буфера, являлись гидрофильными, а ГК пика 3 элюировались водным раствором ацетонитрила, являлись гидрофобными. Относительная ароматичность суммарных фракций снижалась в ряду: контроль (0,59) > образец-зимний (0,49) > образец летний (0,33), что свидетельствует о более высокой степени гумификации летнего образца вермикомпоста.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, вермикомпост, ВЭЖХ, фракционный состав, относительная ароматичность.

Humic acids (HA) isolated from the horse composts and vermicomposts of different period of matured were studied by high-performance liquid chromatography (HPLC) method. All chromatograms contained three peaks. HA corresponding to the first and the second peaks were hydrophilic and were eluted from the column with water solution of phosphate buffer, whereas HA, which corresponded to the third peak, were hydrophobic and were eluted with acetonitril. Relative aromaticity of total factions were lowering in series: control (0,59) > winter-sample (0,49) > summer-sample (0,33), which indicated the greater degree of humification of summer-sample of vermicompost.

Key words: humus asids, vermicompost, HPLC, factional composition, relatively aromaticity

Введение

Трансформация органических отходов различного происхождения в стабильные гуминоподобные вещества, в настоящее время, является

принципиальной задачей процесса вермикомпостирования. Вермикомпосты представляют собой исключительно полезное агрономическое сырье, способное улучшить физико-химические параметры почвы и поднять урожайность сельскохозяйственных культур. Одной из основных проблем при компостировании и вермикомпостировании органических отходов является создание оптимальных условий для их трансформации в гуминоподобные продукты, которые по своим параметрам должны быть максимально приближены к природным гуминовым веществам (ГВ). Информация о качественном и количественном составе фракций ГВ, формирующихся в процессе вермикомпостирования, представляет значительную ценность для оценки агроэкономического использования вермикомпостов.

ГВ представляют собой взаимосвязанную систему фракций гуминовых, гиматомелановых кислот и фульвокислот (ФК). Наиболее изученной является фракция гуминовых кислот (ГК), физиологическое действие которых является общепризнанным.

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном исследовании компостов и полученных на их основе вермикомпостов различного периода созревания. Для решения поставленной задачи, выделенные ГК анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Теоретическая часть

Значительное варьирование показателей гумусного состояния вермикомпостов указывает на то, что этот процесс в отдельных изученных партиях, видимо, имеет разную степень завершенности. Оценить это трудно, так как еще не разработан однозначный параметр оценки возможных уровней стабильности, устойчивости и зрелости компостов и вермикомпостов [1]. Для оценки зрелости или завершенности процесса гумификации используют различные критерии [2-5], основанные на содержании ГВ в компостах и их физико-химических свойствах.

Для мониторинга и количественной оценки созревания гуминоподобных веществ в настоящее время применяют различные физико-химические методы, такие как ИК-, УФ-, флуоресцентная спектроскопия, ^{13}C ЯМР-спектроскопия, ВЭЖХ, гель-хроматография и др.

Так сочетание эксклюзивной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле [6] показало, что при созревании компостов в ГК происходит значительное увеличение содержания высокомолекулярной фракции, т.е. ГВ по весовому содержанию электрофоретических фракций постепенно приближаются к почвенным. Данные эксклюзивной хроматографии и электрофореза дали возможность провести количественную оценку изменения содержания фракций гуминоподобных веществ и выявить направление процесса гумификации при компостировании органических отходов. Полученные результаты позволяют решить вопрос о степени трансформации и тождественности компостных гуминоподобных веществ почвенным ГК.

Авторами работы [7] выявлено увеличение степени ароматичности и поликонденсации и уменьшение доли алифатических пептидных и липидных компонентов в процессе компостирования. Показано, что молекулы ГК могут быть расценены как ассоциации молекул гуминовых подъединиц аналогичной химической природы.

Динамика качественного изменения ГК изучалась в ходе компостирования биоотходов [8]. Авторы пришли к выводу, что в начале компостирования ГК в

основном состояли из алифатических фрагментов, которые заменились на ароматические в ходе компостирования.

Таким образом, в настоящее время продолжают попытки изучения структурного состава и свойств ГК различного происхождения.

Эксперимент

Для получения ГК и исследования их физико-химических характеристик были использованы образцы биогумуса (вермикомпоста) червя «Старатель»: зимний, полученный с января по апрель, и летний, полученный с апреля по октябрь 2005 г. Контролем служил конский компост (80%), выдержанный в течение 6 месяцев, с добавлением извести (5%) и клетчатки (15%). Образцы вермикомпостов и контрольный образец были тщательно растерты в фарфоровой ступке и просеяны через сито с диаметром отверстий 3 мм. Из просеянных образцов отобраны пробы по 5 г и определена их влажность методом высушивания до постоянного веса (три повторности). Влажность контрольного, зимнего и летнего образцов оказалась равной - 7,4%, 3,5% и 27,9% соответственно.

Из образцов были взяты навески с расчетом, чтобы в них содержалось по 5 г сухого вещества. К навескам, помещенным в центрифужные стаканы, было добавлено по 50 мл 0,1 N раствора HCl. Суспензии были перемешаны в течение 30 мин магнитной мешалкой и отцентрифугированы при 2500 g в течение 20 мин. При такой процедуре в экстракт переходили соли и карбоксигидраты. Масса извлеченных в раствор веществ, определенная методом высушивания до постоянного веса, составила: для зимнего и летнего образцов по 0,23 г, а для компоста – 0,29 г.

После центрифугирования, супернатанты отбрасывали, а осадки помещали в колбы со шлифом, добавляли по 50 мл 0,1 M раствора NaOH и доводили pH до 12,5 1 M раствором NaOH при перемешивании, контролируя pH на pH-метре. Через растворы пропускали азот, колбы закрывали и суспензии оставляли на 24 часа для экстракции ФК и ГК.

После экстракции суспензии центрифугировали при 2500g в течение 20 мин. Осадки использовали для дальнейших процедур экстракции. Супернатанты собирали в колбы со шлифом, предварительно измерив их объем, оттитровывали с помощью бюретки 6 N HCl до pH 1,5 (для разделения ФК и ГК), пропускали через них азот и оставляли на 20 часов. По истечении указанного времени, образовавшиеся осадки ГК отделяли от надосадочной жидкости центрифугированием в течение 20 мин при 2500g. Осадки, содержащие ГК, помещали в предварительно взвешенные бюксы и высушивали над P₂O₅ в эксикаторе под вакуумом.

Выше описанная процедура экстракции ГК была проведена 11 раз. Полнота экстракции была проверена с использованием метода ВЭЖХ. Условия хроматографирования: колонка-Macrosphere C8(300A) (250 x 4.6), скорость потока-1 мл/мин, объем пробы наносимой на колонку-100мкл (с = 1,0 мг/мл для 1 экстракта и с = 0,5 мг/мл для 9 экстракта), детектирование при 220 нм и 280 нм. Изократический режим 0-10 мин элюент А; градиентный режим 10-30 мин от 100% А до 90% В; изократический режим 30-40мин элюент В. Элюент А-10 mM К-фосфатный буфер, pH7,6 ; Элюент В – 100% ацетонитрил.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Specord UV/VIS (Carl Zeiss, Jena) в 1 см кварцевых кюветах, с=32 мг/мл.

Обсуждение результатов

Содержание ГК в экстрактах определено по сухому весу. Из таблицы 1 видно, что наибольшее суммарное количество ГК экстрагировано из контрольного образца (компост). Сумма экстрагированных ГК составляет: для контрольного образца - 1,02 г, для зимнего образца - 0,81 г, для летнего - 0,65 г. Из литературы известно, что при росте степени гумификации снижается экстрагируемость ГВ [9]. Выше приведенные данные свидетельствуют о том, что степень гумификации зимнего и летнего образцов выше, чем компоста.

Для получения интегральной характеристики ГК были сняты спектры растворов ГК (экстракт-1), полученных из зимнего, летнего и контрольного образцов, в ультрафиолетовой области. На рисунке 1 приведены спектры исследованных растворов.

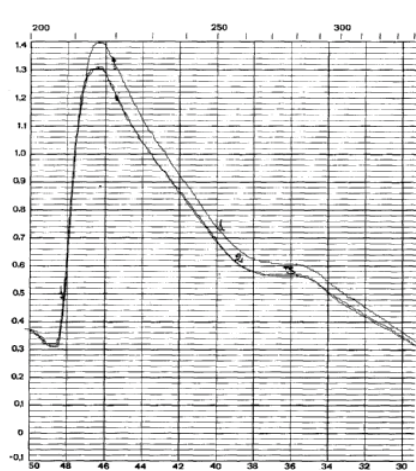


Рис. 1. УФ - спектр гуминовых кислот (экстракт-1). 1 – образец контроль (компост); 2 – образец зимний (биогурус); 3 – образец летний (биогурус).

Из рисунка видно, что УФ-спектры для растворов ГК, полученных из всех образцов имеют по два максимума при 215 и 280 нм, и для зимнего и летнего образцов полностью идентичны (как по форме, так и по интенсивности). Спектр раствора ГК, полученного из компоста полностью идентичен спектрам зимнего и летнего образцов, однако, его интенсивность при 215 нм на 8% выше.

Из спектров было определено отношение оптической плотности при 280 нм к оптической плотности при 220 нм – D^{280}/D^{220} , которое характеризует относительное изменение содержания ароматических групп в ГК. Для раствора ГК, полученного из компоста - $D^{280}/D^{220} = 0,45$; а для растворов ГК, полученных из зимнего и летнего образцов - $D^{280}/D^{220} = 0,47$. Из этих данных следует, что относительная ароматичность зимнего и летнего образцов незначительно выше (на 4%), чем компоста. Данные по ароматичности, полученные на основании УФ-спектров, не соответствуют данным, полученным на основании хроматографического исследования ГК. В последнем случае относительная ароматичность снижается (табл. 2). Это несоответствие связано с тем фактом, что при спектрометрическом исследовании ГК в растворе находятся в агрегированном состоянии, однако, при хроматографии эти агрегаты разрушаются. В связи с выше сказанным, данные хроматографического исследования являются более объективными.

На рисунках 2-7 приведены хроматограммы растворов ГК, полученных из вермикомпостов зимнего и летнего образцов и компоста (контроль). Анализ показал, что все хроматограммы содержат по 3 пика. ГК, относящиеся к хроматографическим

пикам 1 и 2, элюировались с колонки водным раствором фосфатного буфера, являлись гидрофильными, а ГК пика 3 элюировались водным раствором ацетонитрила, являлись гидрофобными.

Таблица 1. Выход гуминовых кислот при экстракции

№ экст-ракта	Наименование образца	Вес экстрагируемых ГК, мг	* % экстрагируемых ГК	Примечание
1	контроль	308	31,0	Цвет торфа
	зимний	300	37,0	Цвет угля
	летний	259	39,8	Цвет угля
2	контроль	274	27,4	Цвет торфа
	зимний	230	28,4	Цвет угля
	летний	190	29,2	Цвет угля
3	контроль	197	19,7	Цвет торфа
	зимний	130	16,0	Цвет угля
	летний	105	16,2	Цвет угля
4	контроль	80	8,0	Цвет торфа
	зимний	65	8,0	Цвет угля
	летний	35	5,4	Цвет угля
5	контроль	58	5,8	Цвет торфа
	зимний	28	3,5	Цвет угля
	летний	24	3,7	Цвет угля
6	контроль	28	2,8	Цвет торфа
	зимний	16	2,0	Цвет угля
	летний	9	1,4	Цвет угля
7	контроль	21	2,1	Цвет торфа
	зимний	12	1,5	Цвет угля
	летний	10	1,5	Цвет угля
8	контроль	18	1,8	Цвет торфа
	зимний	10	1,5	Цвет угля
	летний	8	1,2	Цвет угля
9	контроль	16	1,6	Цвет торфа
	зимний	9	1,1	Цвет угля
	летний	8	1,2	Цвет угля
10	контроль	15	1,5	Цвет торфа
	зимний	9	1,1	Цвет угля
	летний	8	1,2	Цвет угля
11	контроль	3	0,3	Цвет торфа
	зимний	-	-	Цвет угля
	летний	-	-	Цвет угля

*Процент экстрагируемых гуминовых кислот от суммарной массы экстрагируемой за 11 экстракций.

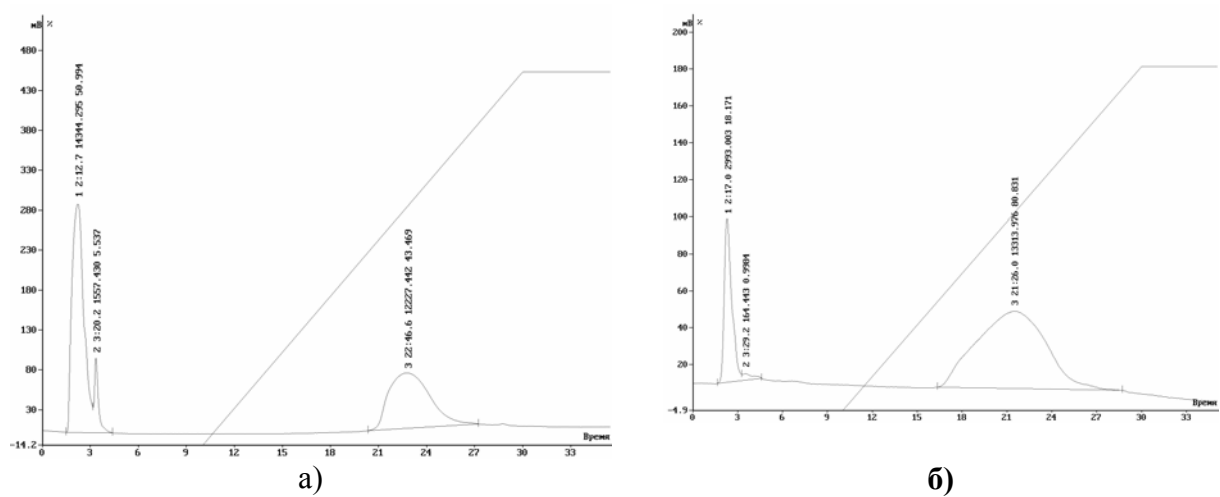


Рис. 2. Хроматограмма гуминовых кислот (1-ый экстракт) контрольного образца – компост ($c=1,0$ мг/мл), а) детектирование при 220 нм, б) детектирование при 280 нм

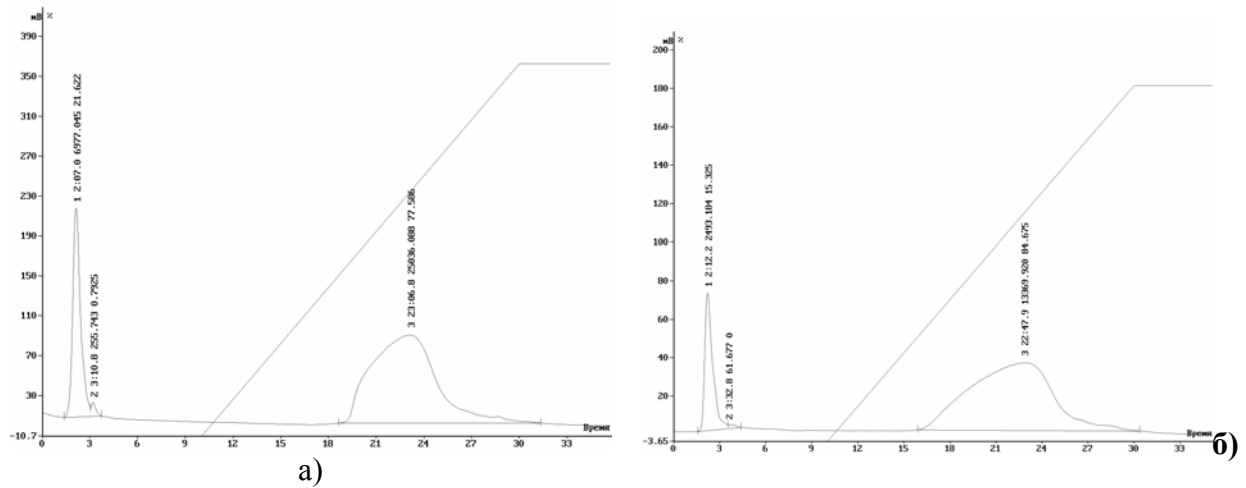


Рис. 3. Хроматограмма гуминовых кислот (1-ый экстракт) биогумуса образец-зимний ($c = 1,0$ мг/мл), а) детектирование при 220 нм, б) детектирование при 280 нм

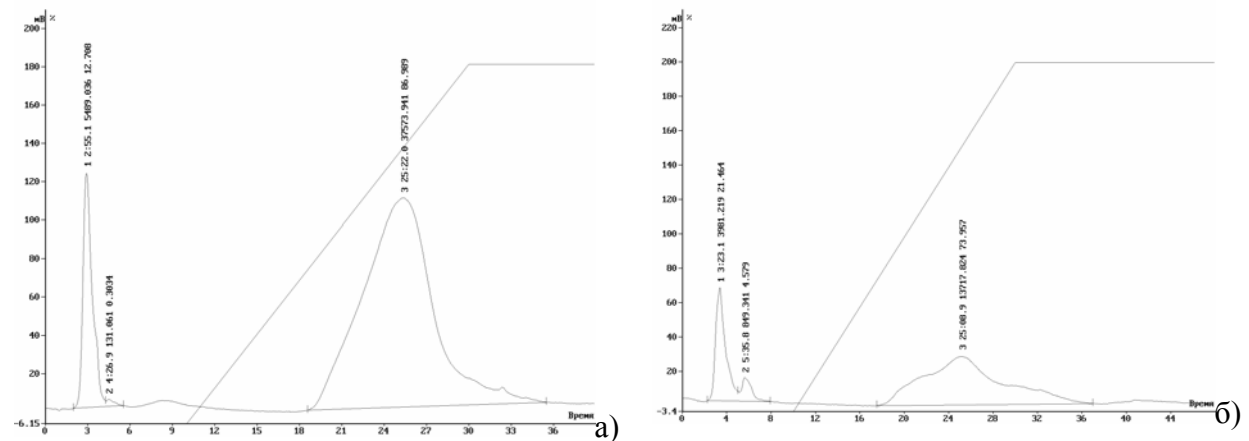


Рис. 4. Хроматограмма гуминовых кислот (1-ый экстракт) биогумуса образец-летний ($c = 1,0$ мг/мл), а) детектирование при 220 нм, б) детектирование при 280 нм

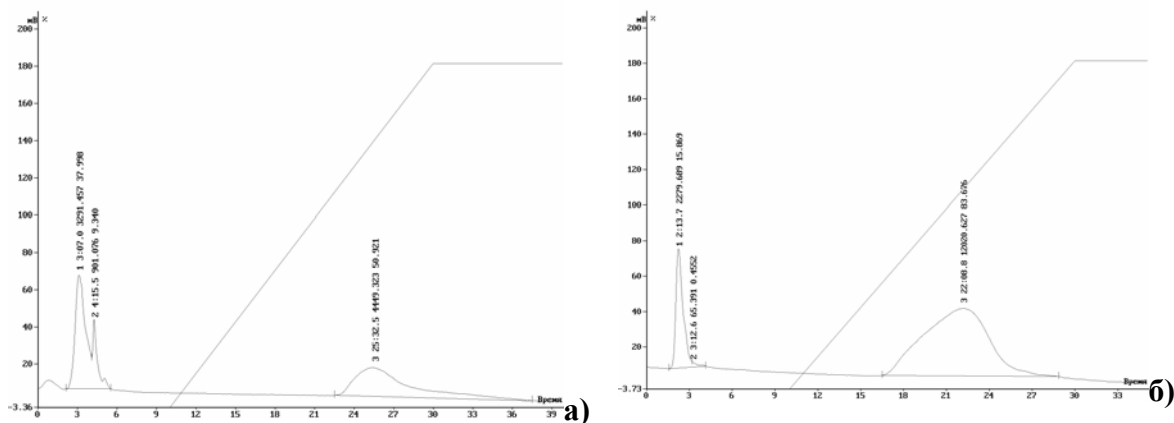


Рис. 5. Хроматограмма гуминовых кислот (9-ый экстракт) контрольного образца – компост ($c = 0,5$ мг/мл), а) детектирование при 220 нм, б) детектирование при 280 нм

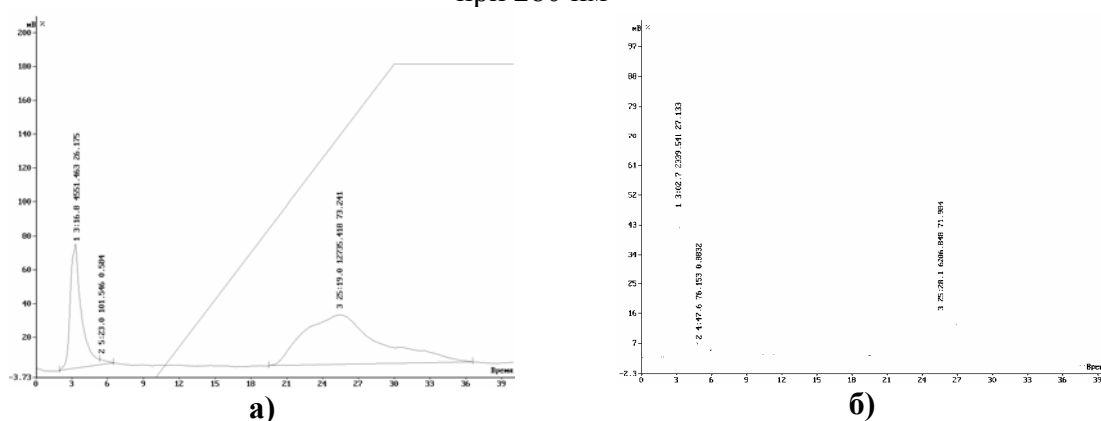


Рис. 6. Хроматограмма гуминовых кислот (9-ый экстракт) биогумуса образец зимний ($c = 0,5$ мг/мл), а) детектирование при 220 нм, б) детектирование при 280 нм

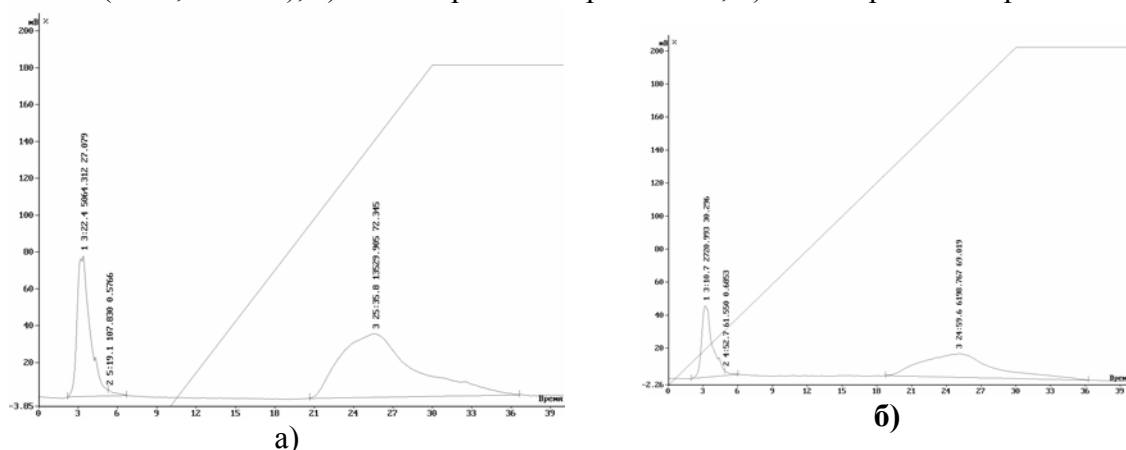


Рис. 7. Хроматограмма гуминовых кислот (9-ый экстракт) биогумуса образец летний ($c = 0,5$ мг/мл), а) детектирование при 220 нм, б) детектирование при 280 нм

В таблице 2 суммированы хроматографические данные ГК из трех образцов: контрольный, зимний, летний (1-я и 9-я экстракции).

Из таблицы (столбец 5, 1-й экстракт) следует, что относительная концентрация ГК пика 3 возрастала в ряду: контроль (43%) < образец зимний (77%) < образец летний (87%), в то же время относительное содержание ароматических групп снижалось в 4 раза (столбец 8): контроль (1,09) > образец-зимний (0,53) >

образец-летний (0,32). Это свидетельствует о росте степени гумификации в следующей последовательности: образец - летний > образец-зимний > контроль.

Таблица 2. Данные хроматографического анализа гуминовых кислот (1-я и 9-я экстракция) для образцов: контроль, зимний и летний

Наименование образца	№ пика	Площадь под пиком (S) при 220 и (280)нм, мв · сек	Концентрация, при 220 и (280) нм, %	$S_3^{220}/\Sigma S^{220} \times 100, \%$	$\Sigma S^{280}/\Sigma S^{220}$	$S_{1,2}^{280}/S_{1,2}^{220}$	S_3^{280}/S_3^{220}
1	2	3	4	5	6	7	8
контроль (1-ый экстракт)	1	14344(2993)	51(18)	43	0,59	0,20	1,09
	2	1557(164)	6(1)				
	3	12227(13314)	43(81)				
	ΣS	28128(16471)	100(100)				
зимний (1-ый экстракт)	1	6977(2493)	22(15,6)	77	0,49	0,35	0,53
	2	256(62)	1(0,4)				
	3	25036(13370)	77(84)				
	ΣS	32269(15925)	100(100)				
летний (1-ый экстракт)	1	5489(2280)	13(1,5)	87	0,33	0,42	0,32
	2	131(65)	0,3(0,5)				
	3	37574(12021)	86,7(84)				
	ΣS	43194(14366)	100(100)				
контроль (9-й экстракт)	1	3981(3291)	21,5(37)	74	0,47	0,87	0,32
	2	849(901)	5(11)				
	3	13717(4449)	74,5(52)				
	ΣS	18547(8641)	100(100)				
зимний (9-й экстракт)	1	4551(2340)	26(28)	73	0,50	0,52	0,49
	2	102(76)	1(1)				
	3	12735 (6207)	73(71)				
	ΣS	17458(8672)	100				
летний (9-й экстракт)	1	5064(2721)	27(30)	72	0,46	0,54	0,48
	2	108(66)	1(1)				
	3	13530(6199)	72(69)				
	ΣS	18702(8986)	100(100)				

Такой же вывод можно сделать и из визуальных наблюдений. В таблице 1 приведены данные о цвете ГК полученных, в частности, при 1-й экстракции. Так цвет ГК, выделенных из компоста соответствует цвету торфа (коричневый), а для образцов зимнего и летнего - цвету угля (черный).

Анализ полученных результатов показал (таблица 2, столбец 6), что относительная ароматичность суммарных фракций снижалась в ряду: контроль (0,59) > образец-зимний (0,49) > образец летний (0,33), что также согласуется с выше приведенными выводами.

В то же время относительная ароматичность ГК хроматографических пиков 1 и 2 возрастала (в 2 раза) при снижении их процентного содержания в образцах (таблица 2, столбец 7).

В таблице 2 также приведены хроматографические данные для ГК 9-ого экстракта. Видно, что относительное содержание фракции 3 (столбец 5) остается постоянным и равным 73% в ряду образцов: контроль, зимний, летний, но относительное содержание ароматических групп в противоположность экстракту 1 при этом возрастает (столбец 8) приблизительно в 1,5 раза в ряду: контроль < образец - зимний < образец - летний. Из таблицы 2 (столбец 6) также видно, что относительная ароматичность суммарных фракций остается практически постоянной и равной приблизительно 0,47, в то же время относительная ароматичность ГК хроматографических пиков 1 и 2 (столбец 7) снижается в ряду: контроль (0,87) > образец - зимний (0,52) \approx образец - летний (0,54).

Заключение

Суммируя данные таблицы 2, с учетом того, что 1-й экстракт дает выход от 30 до 40% ГК от их массы, экстрагируемой за 11 экстракций, можно заключить, что летний образец характеризуется меньшей относительной ароматичностью по сравнению с зимним и контрольным образцами. Этот факт свидетельствует о более высокой степени его гумификации. По степени гумификации образцы можно расположить в ряд контроль < образец - зимний < образец - летний. Этот вывод согласуется с выводом, сделанным на основании данных по выходу ГК при их экстракции (таблица 1).

Содержание ароматических фракций может служить, в какой – то мере, показателем степени гумификации вермикомпостов при их качественной оценке. Однако для компетентного заключения о степени гумификации необходимо рассматривать как можно больше возможных показателей.

Список литературы

1. Бирюкова О.Н., Суханова Н.И. Характеристика органического вещества вермикомпостов// Материалы 2-ой Международной научно-практической конференции «Дождевые черви и плодородие почв». Владимир, 17-19 марта 2004, С. 167-169.
2. Adani F., Genevini P.L., Gasperi F., Zorzi F. Organic matter evolution index (OMEI) as a measure of composting efficiency// Compost Sci.Util. 1997. V. 5. P. 53-62.
3. Bernal M.P., Paredes C., Sanchez-Monedero M.A., Cegarra J. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. Bioresour// Technol. 1998. № 63 (1). P. 91- 99.
4. Chefetz B. Adani F., Genevini P., Tambone F., Hadar Y., Chen Y. Humic-acid transformation during composting of municipal solid waste// Journal of Environmental Quality. 1998. № 27 (4). P. 794-800.
5. Garcia C., Hernandez T., Costa F. Study on water extract of sewage-sludge composts // Soil Science and Plant Nutrition. 1991. № 37 (3). P. 399-408.
6. Трубецкой О.А., Чиаватта К., Трубецкая О.Е. Электрофоретический мониторинг созревания гуминоподобных веществ в процессе компостирования органических отходов// Материалы 2-й Международной научно-практической конференции «Дождевые черви и плодородие почв» Владимир, 17-19 марта 2004г. С. 271-272.

7. Amir S., Hafidi M., Baily J.R., Revel G.C. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions // *Agronomie*. 2003 № 23. P. 269-275.

8. Veeken A., Nierop K., de Wilde V., Hamelers B. Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. // *Bioresource Technology*. 2000. № 72 (1). P. 33-41.

9. Garcia C., Hernandez T., Costa F. Changes in carbon fractions during composting and maturation of organic wastes // *Environ. Manage.* 1991. V.15. P. 433-439.

Павловская Нинэль Ефимовна – д.б.н., профессор, заведующая кафедрой биотехнологии Орел ГАУ, тел. (462)764079

Юшкова Елена Ильинична – к.х.н., доц., доцент кафедры фармакологии и биологической химии ОГУ, тел. (462)432181

Даниленко Анатолий Николаевич – с.н.с. Института биохимической физики Российской Академии наук, Москва, тел. (495) 3383964

Pavlovskaya Ninel E. – professor, head of the department of Biotechnology, Orel State Agriculture University

Yushkova Elena I. – cand. Chem. Sci., the senior lecturer faculty of Pharmacology and Biochemistry of Medical Institute, Orel State University, tel. (462)432181, E-mail: kin1@orel.ru

Danilenko Anatoliy N. – senior research worker of N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, E-mail: adanilenko@yandex.ru