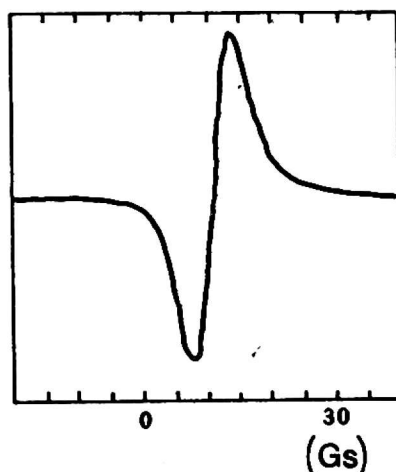


SYNTEZA SUBSTANCJI HUMUSOWYCH A WOLNE RODNIKI

Jerzy Pacha

Katedra Mikrobiologii, UŚl, Katowice

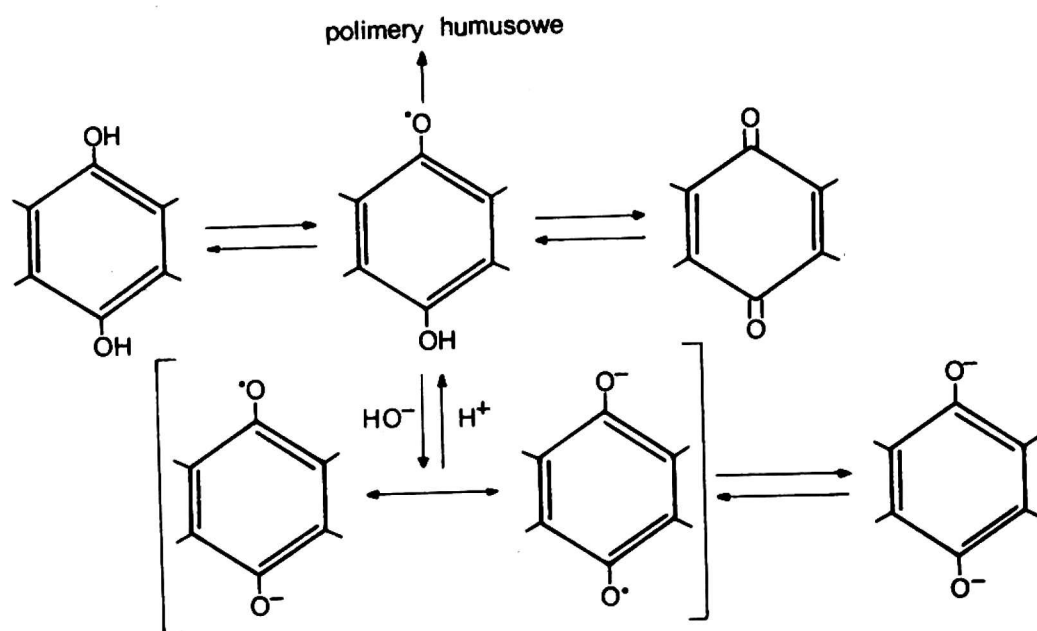
Substancje humusowe wraz z minerałami ilastymi decydują w głównej mierze o właściwościach sorpcyjnych gleby, a tym samym odpowiedzialne są przede wszystkim za utrzymaniem jej homeostazy [1]. Wszystkie frakcje humusu zawierają znaczne ilości wolnych rodników [7, 9, 11, 12]. Ich występowanie w związkach humusowych zostało po raz pierwszy stwierdzone za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego przez Rexa [4], który uważał, że są one semichinonami, tworzonymi przez odwodorowywanie lub oksydacyjne usuwanie wodoru z pierścieni aromatycznych zawierających grupy -OH, -NH₂ lub -SH. Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego kwasów humusowych i fulwowych składają się zwykle z pojedynczych linii pozbawionych rozszczepienia nadsubtelnego, przy czym wartość czynnika rozszczepienia g waha się od 2,0031 do 2,0045, szerokość linii od 2,0 do 5,0 G a koncentracja wolnych rodników w granicach $1,4 \times 10^{17}$ - $37,4 \times 10^{17}$ spinów/gram /rys. 1/.



Rys. 1. Widmo elektronowego rezonansu paramagnetycznego kwasu humusowego [5]

Substancje humusowe powstają w wyniku chemicznej i biologicznej degradacji reszt pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz syntezy przeprowadzanej de novo przez mikroorganizmy glebowe [2]. Niewiele jednak wiadomo o mechanizmach głównych reakcji, które zachodzą podczas syntezy tych związków. Ostatnie badania zdają się jednak wskazywać na to, że wykrywane w związkach humusowych wolne rodniki odgrywają istotną rolę w procesach ich tworzenia.

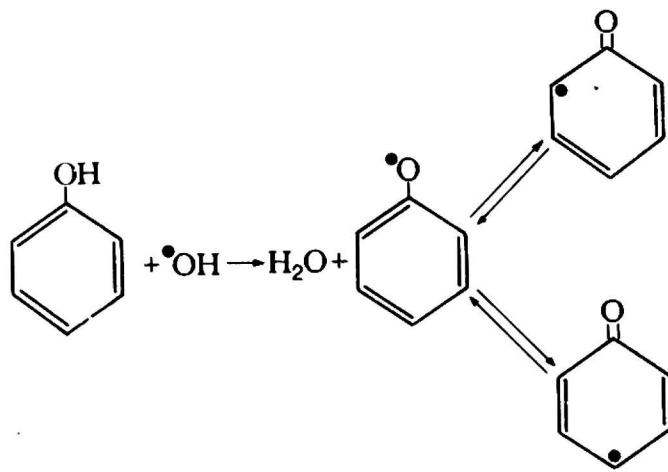
Mathur i Schnitzer [3] syntetyzowali analogi kwasów humusowych z fenoli, chinonów i kwasu salicylowego poprzez utlenianie chemiczne. Utleniaczami, w wyniku działania których uzyskane kwasy humusowe były pod względem chemicznym najbardziej zbliżone do naturalnych, okazały się Ag_2O oraz $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, związki znane z tego, że uczestniczą w reakcji łączenia się fenoli z przeniesieniem jednego elektronu. Reakcją początkową jest tutaj tworzenie semichinonów i jonów seminichininowych, które następnie tworzą bardziej złożone związki. Schnitzer i Lévesque [6] wykazali poza tym, że zawartość wolnych rodników w torfach o różnym stopniu rozkładu jest wprost proporcjonalna do indeksu pirofosforanowego lub stopnia rozkładu. Stwierdzono również, że zawartość wolnych rodników w jednostce wagi wzrastała w miarę jak torf stawał się coraz bardziej zhumifikowany lub też im więcej kwasu humusowego było w nim wytworzone. Ilość wolnych rodników była także wprost proporcjonalna do ilości związków fenolowych, ekstrahowanych za pomocą 0,5 N NaOH. Produkty chemicznej degradacji, za pomocą tlenku miedzi, ekstraktów pirofosforanowych materiału bardziej zhumifikowanego zawierały więcej wolnych rodników niż produkty degradacji materiału mniej zhumifikowanego. Na podstawie tych obserwacji można więc przyjąć, że tworzenie się kwasów humusowych poprzez oksydacyjną polimeryzację zapoczątkowane jest tworzeniem się rodników semichinonowych, które w środowisku alkalicznym stabilizują się jako jony. Fenole utleniane są do semichinonu w wyniku reakcji przeniesienia jednego elektronu. W przypadku przeniesienia drugiego elektronu semichinon mógłby zostać utleniony do chinonu, lecz jak można przypuszczać, reakcja taka raczej nie zachodzi, gdyż w przeciwnym razie miałyby miejsce nagromadzenie się chinonów w kwasach humusowych, co nie jest obserwowane. Tak więc większa część rodników semichinonowych, które w normalnych warunkach są bardzo nietrwałe, łączy się między sobą i tworzy stałe polimery kwasów humusowych /rys. 2/.



Rys. 2. Synteza substancji humusowych [5]

Z tego względu, że łączenie się rodników nie wymaga energii aktywacyjnej w przeciwieństwie reakcji przebiegających z przeniesieniem elektronu, będzie miało miejsce raczej łączenie się semichinonów niż tworzenie chinonów [5]. Wolne rodniki są bardzo łatwo tworzone w wyższym pH, występują one jednak w roztworach wodnych oraz w stałych kwasach humusowych i fulwowych w pH charakterystycznym dla większości gleb [8].

Mimo roli, jaką wolne rodniki odgrywają w syntezie substancji humusowych, ich pochodzenie jest wciąż przedmiotem przypuszczeń. Jak stwierdzono, wolne rodniki mogą powstawać abiotycznie w wyniku napromieniowania gleby lub też jej alkalizacji [8]; także mineralne ilaste katalizują tworzenie stałych rodników organicznych oraz polimeryzację prostych cząsteczek aromatycznych, w tym tworzenie się substancji humusowych [14, 15]. Głównym źródłem wolnych rodników w glebie są jednak reakcje enzymatyczne, przeprowadzane przez enzymy mikroorganizmów żyjących w glebie, tj. grupę monooksygenaz monofenolowych /1.14, 18.1/ zawierających w centrum aktywnym miedź oraz grupę peroksydaz /1.11.1.7/ posiadających żelazo [10]. Suflita i współpracownicy stwierdzili, że także ekstrakty glebowe zdolne są katalizować reakcje łączenia się związków fenolowych z jednoczesnym utlenianiem oraz tworzenie wolnych rodników. Autorzy ci uważają, że reakcja tworzenia wolnych rodników z substratów fenolowych zapoczątkowana jest przez wolne rodniki wodorotlenowe, które usuwają atomy wodoru ze związków feno-



Rys. 3. Proponowany mechanizm tworzenia wolnych rodników przez ekstrakt glebowy [13]

lowych /rys. 3/. Źródło rodników wodorotlenowych nie jest jednak dokładnie znane, wydaje się, że mogą one pochodzić bezpośrednio lub pośrednio z cząsteczki H_2O lub też ich źródłem może być protonacja ^-O .

Katalitazory ekstrahowane z gleby wydają się przeprowadzać reakcję za pomocą tych samych mechanizmów jak oksydazy fenolowe z grzybów.

LITERATURA

1. Burns R.G.: Microbial adhesion to soil surfaces: consequences for growth and enzyme activities. /w:/ Microbial Adhesion to Surfaces; Ed. R. C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter, B. Vincent; E. Horwood, Chichester, 249-262, 1980.
2. Haider K., Martin J.P., Filip Z.: Humus Biochemistry. /w:/ Soil Biochemistry, Vol. 4, Ed. E. A. Paul, A. D. Mc Laren; M. Dekker, Inc., New York, 195-244, 1975.
3. Mathur S.P., Schnitzer M.: Soil Sci. Soc. Am. J., 42/4, 591-596, 1978.
4. Rex R.: Nature, 188, 1185-1186, 1960.
5. Schnitzer M.: Proc. Int. Peat Symp., Bemidji, Monnesota, October 21-23, 17-44, 1981.
6. Schnitzer M., Lévesque M.: Soil Sci., 127/3, 140-145, 1979.
7. Schnitzer M., Skinner S.I.M.: Soil Sci., 108/6, 383-390, 1969.
8. Senesi N., Schnitzer M.: Soil Sci., 123/4, 224-234, 1977.

9. Senesi N., Schnitzer M.: Free radicals in humic substances. /w:/ Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. 2, The Terrestrial Environment; Ed. W.E.Krumbein; Ann.Arbor Sci.Publ. Inc., Ann.Arbor, 467-481, 1978.
10. Sjoblad R.D., Bollag J.M.: Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms./w:/ Soil Biochemistry, Vol. 5, Ed. E. A. Paul, J. N. Ladd; M. Dekker, Inc., New York, 113-152, 1981.
11. Steelink C.: Geochim. Cosmochim. Acta, 28, 1615-1622, 1964.
12. Steelink C., Tollin G.: Free radicals in soil./w:/ Soil Biochemistry, Vol. 1, Ed. A. D. McLaren, G. H. Peterson; M. Dekker, Inc., New York, 147-169, 1967.
13. Suflita J.M., Loll M.J., Snipes W.C., Bollag J.M.: Soil Sci., 131/3, 145-150, 1981.
14. Wang Th.S.C., Li S.W., Ferng Y.L.: Soil Sci., 126/1, 15-21, 1978.
15. Wang Th.S.C., Li S.W., Huang P.M.: Soil Sci., 126/2, 81-86, 1978.

Ежи Паха

Синтез гумусных веществ и свободные радикалы

Резюме

Гумусные вещества содержат сравнительно много устойчивых свободных радикалов, которые, по всей вероятности, играют важную роль в процессе их образования. Предположительно одним из этапов синтеза гуминовых кислот из простых фенолов и феноловых кислот является образование семихиновых радикалов сравнительно лабильных и соединяющихся друг с другом, образуя устойчивые полимеры гуминовых кислот. Свободные радикалы образуются в почве путем химической и биологической дегидрогенизации феноловых групп ОН. Почва содержит экстрагированные, термолабильные катализаторы, которые могут образовывать свободные радикалы во время инкубации с феноловыми субстратами. Эта

реакция инициируется, как кажется, гидроксильными радикалами, благодаря которым от феноловых субстратов отделяется атом водорода.

Источники гидроксильных радикалов все еще предположительны. Однако не исключена возможность, что они могут происходить непосредственно или опосредованно из частиц воды или молекулярного кислорода.

Почвенные катализаторы проводят реакции, по всей вероятности, с помощью тех же механизмов, как и феноловые оксидазы из грибов.

Jerzy Pacha

SYNTHESIS OF HUMIC SUBSTANCES AND FREE RADICALS

S u m m a r y

Humic compounds contain relatively high concentration of stable free radicals which most likely play important role in the process of humic acid formation. It appears that the rate-determining step in the synthesis of humic acid from simple phenols and phenolic acids is the formation of semiquinone radicals which are normally relatively unstable and couple with each other to form a stable humic acid polymer. Free radicals in soils are formed by the chemical and/or biological dehydrogenation of phenolic OH groups. Soil contains extractable, heat-labile catalysts that can generate free radicals when incubated with phenolic substrates. This reaction appeared to be initiated by hydroxy radicals that abstract a hydrogen atom from phenolic substrates. The source of the hydroxy radicals is still a matter of speculations. They may be derived directly or indirectly from an H_2O molecule or from molecular oxygen. The soil catalyst seems to have the same reaction mechanism as a fungal phenoloxidase.