
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LX, Nr

SECTIO E

2005

¹Katedra Chemii Środowiska, Wydział Rolniczy, Akademia Techniczno-Rolnicza
ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz

²Katedra Chemii Rolnej, AT-R
ul. Seminaryjna 5, 85-732 Bydgoszcz, Poland

Sławomir Smoliński¹, Ewa Spychaj-Fabisiak²

*Charakterystyka właściwości kwasów huminowych wydzielonych
z gleby inkubowanej z dodatkiem materiału roślinnego*

Characterization of humic acids properties exudated from the incubated soil
with an addition of plant material

ABSTRACT. Biological processes affecting soil fertility and productivity in land ecosystems are mainly based on transformations of organic matter, both native one and that introduced with post-harvest plant residues and animal decomposition. Therefore, the objective of the study, was to determine fundamental physico-chemical parameters of humic acids developed over the decomposition of plant residues in soil, both under aerobic and anaerobic conditions. The investigations were carried out in pots under laboratory conditions. The soil originated from a field not used for agricultural production. The samples were taken from three depths 0–10 cm, 10–20 cm and 20–30 cm and then separated to two parts, A and B. The A samples were supplemented with plant material at the ratio 50:1, mixed thoroughly and incubated. After that the samples were assayed for basic physico-chemical parameters. Humic acids isolated from those samples were assayed for elemental composition, susceptibility to oxidation with 1.5% H₂O₂ and optical properties of 0.02% solutions in 0.1 mol NaOH at the ranges: 400 nm, 464 nm, 600 nm and 664 nm.

KEY WORDS: differentiated oxygen conditions, humic acids properties.

Procesy biologiczne, kształtujące żyzność i urodzajność gleb w ekosystemach łądowych, opierają się głównie na transformacji materii organicznej, rodzimej oraz wprowadzonej w resztkach roślinnych i zwierzęcych. Przemiany resztek roślinnych w glebie, ich proces humifikacji oraz właściwości powstałych substancji humusowych są wynikiem złożonych procesów chemicznych i biochemicznych. Ocenia się, że 80–90% procesów metabolicznych decydujących

o procesach humifikacji i dostępności składników pokarmowych jest przeprowadzanych przez mikroorganizmy glebowe [Myśków 1981; Smyk 1984; Smyk 1985; Badura 1991].

W agrocenozach na procesy rozkładu i humifikacji, oprócz szeregu czynników przyrodniczych (pogoda, typ i właściwości gleby itp.), wpływ mają również czynniki agrotechniczne (uprawa gleby, nawożenie, płodozmian i inne) [Myśków 1981; Barabasz, Smyk 1997]. Czynniki te oddziałują na mikroflorę oraz mikrofaunę glebową, a przez to w sposób pośredni na procesy rozkładu i humifikacji resztek roślinnych [Myśków i in. 1986]. Dlatego celem podjętych badań było określenie podstawowych parametrów fizyko-chemicznych kwasów huminowych powstałych po rozkładzie resztek roślinnych w glebie w warunkach zróżnicowanego dostępu tlenu.

METODY

Badania przeprowadzono opierając się na laboratoryjnych doświadczeniach wazonowych z materiałem glebowym, który pobrano z ugoru na glebie płowej. Próbkę glebową wzięto z trzech głębokości: 0–10 cm, 10–20 cm i 20–30 cm i rozdzielono na dwie części A i B. Próbkę glebową oznaczoną jako A wzbogacono o materiał roślinny w proporcji 50:1 i dokładnie wymieszano. użytym materiałem roślinnym była drobno zmielona mieszanka traw. Oto podstawowe właściwości chemiczne materiału roślinnego:

C (g/kg)	N (g/kg)	P (g/kg)	C : N	C : P	pH _{H₂O}	pH _{KCl}
291,9	10,2	0,68	28,6	429,3	5,52	4,97

Próbkami glebowymi (po ok. 1 kg) napełniono kolejne pierścienie z PCV o wysokości 10 cm i średnicy 12 cm. Dolny pierścień oznaczony symbolami A₃ napełniono próbkami glebowymi pobranymi z głębokości 20–30 cm, środkowy pierścień A₂ napełniono materiałem pobranym z głębokości 10–20 cm, a górny pierścień A₁ napełniono materiałem pobranym z głębokości 0–10 cm. Natomiast materiału glebowego oznaczonego jako B nie wzbogacono w materiał roślinny (obiekt kontrolny). Napełniono nim w sposób analogiczny pierścienie z PCV, oznaczone jako: dolny B₃, środkowy B₂ i górny B₁. Tak przygotowane pierścienie umieszczono w krystalizatorach, napełnionych wodą do wysokości 2 cm. W czasie trwania inkubacji co 2–3 dni sprawdzano ilość wody, aby utrzymać jej stałą poziom. Inkubację prowadzono przez 120 dni w temperaturze 24°C przy wilgotności powietrza w termostacie 60%. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Po zakończeniu inkubacji z materiału glebowego przygotowano

próby zbiorcze (uśrednione). W badanym materiale glebowym oznaczono podstawowe parametry fizykochemiczne: zawartość węgla organicznego (C_{org}) autoanalizatorem TOC/IC firmy Skalar, azotu ogółem (N_t) metodą Kjeldahla, kwasowość czynną (pH_{H_2O}) i kwasowość wymienną (pH_{KCl}).

Pozyskany materiał glebowy stanowił źródło kwasów huminowych. Kwasy te izolowano metodą Schnitzera i Skinera [1968]. W otrzymanych preparatach kwasów huminowych (KH) oznaczono: skład pierwiastkowy autoanalizatorem CHN Perkin-Elmer, podatność na utlenianie 1,5% H_2O_2 [Gonet 1989] oraz właściwości optyczne 0,02% roztworów KH w 0,1 molowym NaOH w zakresie 400 nm, 464 nm, 600 nm i 664 nm (spektrofotometrem UV-VIS Perkin-Elmer).

WYNIKI

Resztki roślinne wprowadzone do materiału glebowego ulegają procesom rozkładu, humifikacji i mineralizacji, wywierając przez to określony wpływ na zawartość próchnicy. Tak więc mogą prowadzić do utrzymania równowagi bilansowej materii organicznej bądź też do jej naruszenia. Po 120 dniach inkubacji materiału glebowego z resztkami roślinnymi (A) i bez nich (B) określono podstawowe parametry fizykochemiczne (tab. 1). Próbki wariantu A zawierały więcej węgla (C_{org}) i azotu (N_t) niż próbki wariantu B (bez resztek roślinnych). Jednak system podsiąkowego nawadniania inkubowanego materiału glebowego wytworzył swoisty gradient. Materiał glebowy w dolnych pierścieniach zawierał mniej C_{org} i N_t niż materiał glebowy w górnych pierścieniach. Odwrotnie przedstawiał się gradient pH i kwasowości hydrolitycznej (tab. 1). Ponieważ głównym celem założonego doświadczenia inkubacyjnego było określenie właściwości kwasów huminowych powstałych w procesie rozkładu resztek roślinnych w warunkach tlenowych i ograniczonego dostępu tlenu, nie badano ubytku masy substratów.

Tabela 1. Podstawowe parametry fizykochemiczne materiału glebowego inkubowanego z materiałem roślinnym i bez materiału roślinnego
Table 1. Basic physico-chemical parameters of soil material incubated with plant material

Kombinacja Combination	pH_{H_2O}	pH_{KCl}	C_{org} (g/kg)	N_t (g/kg)	$C_{org}:N_t$
A ₁	6,63	6,40	2,12	0,18	11,8
A ₂	7,18	6,98	1,88	0,16	11,7
A ₃	7,50	7,15	1,74	0,14	12,4
B ₁	6,47	6,14	1,82	0,14	13,0
B ₂	6,76	6,32	1,48	0,12	12,3
B ₃	7,29	6,70	1,18	0,10	11,8

Tabela 2. Skład pierwiastkowy oraz wartości stosunków atomowych i stopień utlenienia wewnętrznego (ω) kwasów huminowych

Table 2. Elemental composition, atomic ratios and internal oxidation degree (ω) of humic acids

Kombinacja Combination	C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C	ω
A ₁	33,16	44,17	2,80	19,87	1,33	0,45	0,60	0,08	0,120
A ₂	33,51	44,85	2,83	18,81	1,34	0,42	0,56	0,08	0,038
A ₃	33,66	44,79	2,76	18,79	1,33	0,42	0,56	0,08	0,032
B ₁	34,22	43,23	2,71	20,38	1,26	0,47	0,59	0,08	0,165
B ₂	35,06	43,04	2,64	19,26	1,23	0,45	0,55	0,08	0,097
B ₃	34,34	43,96	2,60	19,12	1,28	0,43	0,56	0,08	0,061

Jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących kwasy huminowe jest ich skład pierwiastkowy, który można wykorzystać do identyfikacji oraz wnioskować o ich budowie. Wyniki analiz składu pierwiastkowego wyseparowanych kwasów huminowych przedstawiono w tabeli 2. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że procentowy udział C, N i H był podobny w analizowanych kwasach huminowych. Nawet wzbogacenie materiału glebowego resztkami roślinnymi nie spowodowało znaczących zmian w składzie pierwiastkowym wyseparowanych kwasów huminowych. Resztki roślinne stanowią niewątpliwie dodatkowe źródło azotu w procesie humifikacji, jednak nie znalazło to odzwierciedlenia w zawartości tego pierwiastka w badanych kwasach huminowych. Aleksandrowa [1980] i Sotakova [1982] podkreślają, że proces humifikacji resztek roślinnych bogatych w azot nie wzbogaca znacząco powstałych kwasów huminowych w ten pierwiastek. Proces humifikacji jest w równowadze z procesami rozkładu i mineralizacji. Dlatego wprowadzenie dodatkowej materii organicznej przyspiesza te procesy, a nie zmienia ich charakteru.

Na podstawie składu pierwiastkowego obliczono wartości stosunków H/C, O/H, O/C i N/C oraz stopień utlenienia wewnętrznego ω (tab. 2). Stosunek H/C określa aromatyczność kwasów huminowych. Według Kononowej [1968] zmniejszanie się wartości tego stosunku w czasie humifikacji świadczy o wzrastającej aromatyzacji substancji humusowych. Van Krevelen [1950] podaje, że wartość stosunku H/C między 0.7 a 1.5 odpowiada układom aromatycznym sprzężonym z łańcuchami alifatycznymi (do 10 atomów C). Na tej podstawie można stwierdzić, że badane kwasy huminowe charakteryzuje średni udział struktur aromatycznych. W kwasach humusowych wyseparowanych z materiału glebowego A i B wartości stosunków H/C wahały się od 1,23 do 1,34.

Proces humifikacji resztek roślinnych jest ściśle powiązany ze wzrostem zawartości tlenu i spadkiem zawartości wodoru [Kononowa 1968; Sotakova 1982;

Gonach i in. 1978]. Zmianom tym towarzyszą na ogół zmiany wartości stosunków atomowych O/H i O/C. Im wyższa jest wartość stosunku O/H, tym większy stopień humifikacji cząsteczek kwasów huminowych [Orłow 1974; Gonach i in. 1978]. Wartość tego stosunku w cząsteczkach kwasów huminowych izolowanych z materiału glebowego inkubowanego bez resztek roślinnych była nieznacznie wyższa niż w kwasach huminowych izolowanych z materiału glebowego inkubowanego z resztkami roślinnymi (tab. 2). Wartość stosunku O/C jest wskaźnikiem ich stopnia utlenienia [Orłow 1974]. Wartości stosunków O/C w badanych kwasach huminowych była podobna dla kwasów izolowanych z materiału glebowego inkubowanego z resztkami roślinnymi i bez tych resztek (tab. 2). Dlatego słuszną wydaje się hipoteza Orłowa [1974], że bardziej obiektywnym wskaźnikiem stopnia utlenienia wewnętrznego cząsteczek kwasów huminowych jest wartość ω . Stopień utlenienia wewnętrznego obliczono na podstawie wzoru $\omega = [(2O+3N)-H]/C$ [Żdanow 1965]. Wzór ten uwzględnia zarówno połączenia węgla z wodorem, jak i węgla z azotem oraz węgla z tlenem. Na podstawie uzyskanych wartości stopnia utlenienia wewnętrznego można stwierdzić, że był on największy w górnych pierścieniach (A_1 i B_1), a najmniejszy w dolnych (A_3 i B_3) (tab. 2). W dolnych pierścieniach (o ograniczonym dostępie tlenu) przeważały procesy anaerobowe. W tych warunkach procesy mineralizacji (zachodzące w warunkach tlenowych) ulegały zahamowaniu. Natomiast procesy rozkładu i humifikacji zachodziły dalej, mimo środowiska anaerobowego. Prowadziło to do powstania kwasów huminowych bogatych w związki alifatyczne o niskim stopniu utlenienia.

Wprowadzenie resztek roślinnych do materiału glebowego wpływało również na wartości ω dla izolowanych kwasów huminowych. Resztki roślinne w procesie humifikacji przyczyniały się do powstania „młodych kwasów huminowych”. W materiale glebowym inkubowanym bez resztek roślinnych mikrobiologiczne procesy rozkładu i mineralizacji materii organicznej prowadziły do ubytku wielu związków alifatycznych. W konsekwencji kwasy huminowe izolowane z tego materiału wykazywały wyższy stopień utlenienia wewnętrznego (tab. 2).

Gęstość optyczna substancji humusowych zależy od ich budowy chemicznej. Przyjmuje się, że wartość absorbancji przy długości fali 400–464 nm określa zawartość substancji w początkowym stadium humifikacji, natomiast wartość absorbancji przy 600–664 nm określa zawartość substancji w końcowym stadium humifikacji. Ze wzrostem skondensowania jądra aromatycznego cząsteczek oraz ze wzrostem ich masy cząsteczkowej wzrasta gęstość optyczna, a maleje wartość stosunku $A_{464}:A_{664}$ [Gonet 1989]. Gęstości optyczne alkalicznych roztworów badanych kwasów huminowych wyrażone wartościami absorbancji oraz wartości stosunków $A_{464}:A_{664}$ i $\Delta \log K$ przedstawiono w tabeli 3.

Wyższymi wartościami stosunków $A_{464}:A_{664}$ cechowały się kwasy huminowe izolowane z materiału glebowego inkubowanego z resztkami roślinnymi. Wskazuje to na mniejszy ich stopień humifikacji niż kwasów huminowych izolowanych z materiału glebowego inkubowanego bez resztek roślinnych. Zróżnicowane były również wartości $A_{464}:A_{664}$ dla kwasów huminowych izolowanych z materiału glebowego inkubowanego w poszczególnych pierścieniach. Materiał glebowy inkubowany w dolnych pierścieniach zawierał kwasy huminowe o wyższych wartościach stosunków $A_{464}:A_{664}$ (tab. 3).

Tabela 3. Parametry spektrofotometryczne kwasów huminowych
Table 3. Optical properties of humic acids

Kombinacja Combination	A_{400}	A_{600}	$\Delta\log K$	A_{464}	A_{664}	$A_{464}:A_{664}$
A ₁	0,835	0,170	0,69	0,487	0,105	4,64
A ₂	0,794	0,167	0,68	0,435	0,086	5,06
A ₃	0,813	0,148	0,74	0,418	0,082	5,10
B ₁	0,746	0,136	0,70	0,360	0,076	4,74
B ₂	0,775	0,144	0,80	0,398	0,083	4,80
B ₃	0,765	0,175	0,64	0,389	0,079	4,92

Kumada [1975] zaawansowanie procesu humifikacji wiąże z wartością współczynnika $\Delta\log K$. Podzielił on kwasy huminowe na trzy podstawowe typy: typ A – do którego zaliczył kwasy huminowe o wysokim stopniu humifikacji, kiedy $\Delta\log K$ osiąga wartość do 0,6, typ B – do którego zaliczył kwasy huminowe o średnim stopniu humifikacji, kiedy wartości $\Delta\log K$ wynoszą od 0,6 do 0,8 i typ R – do którego zaliczył kwasy o małym stopniu humifikacji, kiedy $\Delta\log K$ przyjmuje wartości od 0,8 do 1,1. Uzyskane w niniejszej pracy wartości $\Delta\log K$ (różnicy logarytmów absorbancji przy długościach fal 400 nm i 600 nm) przedstawiono w tabeli 3. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że współczynniki $\Delta\log K$ obliczone dla wszystkich badanych kwasów huminowych mieściły się w przedziale od 0,6 do 0,8, były więc kwasami typu B o średnim stopniu humifikacji.

Dotychczasowe badania wykazały, że bardziej podatna na utlenianie jest alifatyczna część kwasów huminowych, a ich część aromatyczna jest bardziej oporna. Zmiany właściwości optycznych kwasów huminowych pod wpływem utleniania mogą być spowodowane zmniejszeniem ich masy, całkowitym utlenieniem, zmianami ilościowymi i jakościowymi tlenowych grup funkcyjnych, a także selektywnym utlenianiem elementów struktur alifatycznych i aromatycznych [Orłowski 1974; Gonet 1989]. Określenie podatności na utlenianie analizo-

Tabela 4. Parametry spektrofotometryczne kwasów huminowych przed i po ich utlenieniu
 Table 4. Optical properties of humic acids after their oxidation

Kombinacja Combination	A_{464}	A_{464}^{ox}	A_{664}	A_{664}^{ox}	ΔA_{464}^{ox}	ΔA_{664}^{ox}	$A_{4:6}^{ox}$
A ₁	0,206	0,073	0,037	0,013	64,56	64,87	1,00
A ₂	0,227	0,092	0,055	0,039	59,47	29,09	2,04
A ₃	0,218	0,061	0,028	0,022	72,02	21,49	3,35
B ₁	0,195	0,056	0,038	0,013	71,28	65,79	1,08
B ₂	0,186	0,052	0,026	0,016	72,04	38,46	1,87
B ₃	0,180	0,045	0,042	0,031	75,00	26,19	2,86

wanych kwasów huminowych jest jeszcze jednym dowodem wskazującym na różnicowanie, które wynika z warunków ich powstawania. Kwasy huminowe izolowane z materiału glebowego inkubowanego w dolnych pierścieniach (A₃ i B₃) są bardziej podatne na utlenianie (tab. 4). Wprowadzenie resztek roślinnych do materiału glebowego prowadziło do powstania kwasów huminowych bardziej podatnych na utlenianie. Większą oporność na utlenianie wykazały kwasy huminowe izolowane z materiału glebowego inkubowanego bez resztek roślinnych (tab. 4). Uzyskane wyniki potwierdzają sugerowaną przez Goneta [1989] zależność podatności na utlenianie kwasów huminowych od wprowadzonych do gleby resztek roślinnych.

WNIOSKI

1. Na podstawie analizy składu pierwiastkowego badanych kwasów huminowych można stwierdzić, że procentowy udział C, N i H jest podobny, a czynnikiem różnicującym te kwasy jest zawartość tlenu.
2. Wartości stosunków H/C, O/H, O/C, N/C oraz stopień utlenienia wewnętrznego i podatność na utlenianie H₂O₂ wskazują na wyższy stopień humifikacji i na większy udział struktur aromatycznych w kwasach huminowych izolowanych z materiału glebowego inkubowanego w górnych pierścieniach niż w dolnych.
3. Parametry spektrofotometryczne badanych kwasów huminowych, wyrażone wartościami $\Delta \log K$, wskazują na średni stopień ich humifikacji.

PIŚMIENNICTWO

- Aleksandrowa L.N. 1980. Organiczeskoje wieszczestwa poczwy i procesy jego transformacji. Nauka, Leningrad.
- Badura L. 1991. Pojęcie ekosystemu w ekologii mikroorganizmów. Kosmos 40, 2/3, 257–264.

- Barabasz W., Smyk B. 1997. Mikroflora gleb zmęczonych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 452, 37–50.
- Gonach A.M., El-Halafawi M.H., El-Essawi T.M. 1978. Some chemical characteristics of humic acids isolated from different sources. Alex. J. Agric. Res. 26, 3, 747–754.
- Gonet S.S. 1989. Właściwości kwasów huminowych gleb o zróżnicowanym nawożeniu, Rozprawa Nr 33, ATR Bydgoszcz.
- Kononowa M.M. 1968. Substancje organiczne gleby, ich budowa właściwości i metody badań. PW-RiL, Warszawa.
- Kumada K. 1975. The chemistry of soil organic matter. Food and Fertilization Technology Centre 22, 10–36.
- Myśków W. 1981. Próby wykorzystania wskaźników aktywności mikrobiologicznej do oceny żyzności gleby. Postępy Mikrobiol. 3/4, 173–192.
- Myśków W., Jaszczewska B., Stachyra A., Naglik E. 1986. Substancje organiczne gleby – ich rolnicze i ekologiczne znaczenie. Roczn. Gleb. 37, 2/3, 15–35.
- Orłow D.S. 1974. Guminowyje kisloby poczw. IMU Moskwa.
- Schnitzer M., Skinner S.J.M. 1968. Alkali versus acid extraction of soil organic matter. Soil Sci. 105, 6, 392–396.
- Smyk B. 1984. Mikroorganizmy a produktywność biologiczna gleb. Studia Ośrodka Dokumentacji Fizjograficznej, 12, 49–95.
- Smyk B. 1985. Mikroorganizmy a stabilność ekosystemów glebowych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 306, 127–140.
- Sotakova S. 1982. Organicka humota a urodnost pody. Priroda, Bratislava.
- Van Krevelen D.W. 1950. Graphical-statistical method for investigation of the structure of coal. Fuel. 26, 269–284.
- Ždanow J.A. 1965. Srednjaja stepen oksigenija ugljeroda i nezamenimost aminokislot. Biochimija 30, 1257–1259.