

УДК 631.417.2:631.461:543.42

ТРАНСФОРМАЦИЯ ГУМАТА НАТРИЯ И ГУМАТ-СИМАЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА В КУЛЬТУРЕ ПОЧВЕННЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ

И. А. КУЗНЕЦОВА, А. Ю. ТОМАЩУК, Т. Л. ВОЖИК, В. А. РАСКАТОВ,
С. И. СОЛОВЬЕВ, Ю. В. КРУГЛОВ, Р. А. ХМЕЛЬНИЦКИЙ

(Кафедра физической и коллоидной химии)

В условиях лабораторных опытов в культуре почвенных актиномицетов изучалась трансформация гумата натрия и его комплекса с симазинном. Методы пиролитической масс-спектрометрии и электронной микроскопии позволили установить, что включение симазина в макромолекулу гуминовой кислоты приводит к изменению ее стабильности и биodeградability. Гумат-симазинный комплекс под действием микроорганизмов быстрее подвергается деструкции, чем исходный гумат натрия.

Интенсивное применение в земледелии химических средств защиты растений привело к сложным экологическим последствиям: закрепление пестицидов в почве, длительное сохранение их токсичности, изменение физико-химических и биологических свойств почвы и др. Известно, например, что гербициды симм-триазинового ряда обладают высокой персистентностью и могут сохраняться в почве несколько лет [1, 2, 3, 6]. При систематическом многолетнем применении таких препаратов, как симазин, в почве уменьшается содержание гумуса [6, 7], поэтому необходимо выяснить, каковы причины данного явления и не существует ли взаимосвязь между потерей гумуса и применением пестицидов. Для решения этой сложной многофакторной задачи должен быть привлечен широкий круг исследователей различных областей знаний. Особый интерес представляют изучение взаимодействия органического вещества почвы с пестицидами, исследование биологических свойств образующихся комплексных соединений и оценка их биodeградability.

Известно, что основная роль в процессах превращения веществ в почве принадлежит почвенной микрофлоре. Среди групп микроорганизмов, осуществляющих процессы «синтеза — распада» гуминовых веществ, наибольшее значение имеют актиномицеты из рода *Nocardia* [8, 9]. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение процесса деградации гумата натрия и его комплекса с симазинном в культуре *Nocardia asteroides* 0795. Для проведения анализа использовали метод пиролитической масс-спектрометрии [12].

Объектами исследования служили лиофильно высушенные препараты гумата натрия и его комплекса с симазинном, приготовленные на основе торфяной гуминовой кислоты [10], химически чистый препарат симазина: 2-хлор-4,6-бис(этиламино)симм-триазин, m/z 201,7, m/z гуминовой кислоты порядка $4 \cdot 10^5$ Д (по белку).

В лабораторных опытах изучали трансформацию препаратов при

культивировании их с микроорганизмами на синтетической среде Вакмана с глицерином. Растворы гуминовых веществ смешивали со средой в соотношении 1 : 1. Концентрация гумата натрия была 90 мг/л, соотношение компонентов (по массе) в гумат-симазиновом комплексе составляла 100 : 1, что соответствовало насыщению молекулы гумата натрия гербицидом [4]. В качестве культуры-трансформатора была выбрана *Nocardia asteroides* 0795. Продолжительность опыта 40 дней. По окончании эксперимента клетки отделяли от среды центрифугированием (6000 об/мин по 20 мин), а затем супернатант отделяли от коллоидов и взвесей путем ультрацентрифугирования (40 000 об/мин 1 ч при 0°) на ультрацентрифуге С-1 (ФРГ). Полученные таким образом растворы подвергали лиофильному высушиванию на приборе «ОЕ-950» (ВНР) и хранили в эксикаторе для последующих исследований. Кроме этого, анализу подвергали приготовленные таким же образом лиофильные препараты культуральной жидкости, в которых содержались водорастворимые метаболиты микроорганизмов без гуминовых веществ.

Изучение лиофильных препаратов проводили методом пиролитической масс-спектрометрии на модифицированном приборе МХ 1303, снабженном пиролитической ячейкой и устройством для ускоренной регистрации масс-спектров. Пиролиз проводили в интервале температур 40—900°С (15°С/мин). Через каждые 2 мин снимали масс-спектр в диапазоне 12—400 массовых чисел. Подробно режим и методика расчета описаны в работе [10].

Исследование выделения продуктов пиролиза по термическим кривым, построенным на основании данных об интенсивности характеристических пиков, позволило выявить изменения, произошедшие с исходными препаратами под действием микроорганизмов. Так были получены сравнительные характеристики гумата натрия и гумат-симазинового комплекса до и после трансформации в культуре *Nocardia*.

Как видно на рис. 1, процесс декарбоксилирования исходных препаратов протекает в широком интервале температур. Следует отметить увеличение интенсивности максимумов после взаимодействия с *Nocardia* и смещение их в низкотемпературную область по сравнению с исходными веществами. Это указывает на увеличение относительного количества нестабильных группировок и уменьшение относительного количества стабильных фрагментов макромолекулы, что является результатом жизнедеятельности микроорганизмов. Ранее нами отмечалось [11], что у комплекса указанные процессы протекают легче и с большей скоростью,

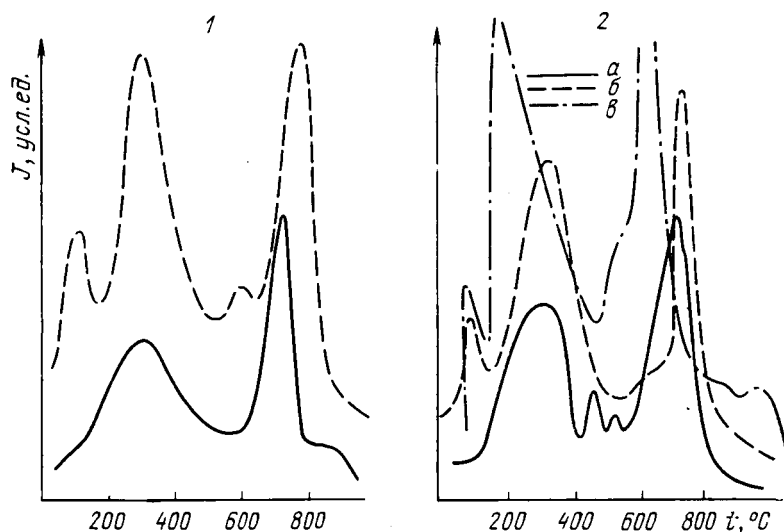


Рис. 1. Термограмма выделения углекислоты.

1 — препарат гумата натрия; 2 — препарат гумат-симазинового комплекса; а — исходный; б — после микробной трансформации; в — микробных метаболитов.

чем у гумата натрия. После культивирования с микроорганизмами во всех исследуемых вариантах характер динамики выделения CO_2 примерно одинаковый. У гумата натрия, комплекса и микробных метаболитов кривая декарбоксилирования имеет три основных максимума. Кроме того, у гумата натрия сохраняется еще один максимум небольшой интенсивности при 560—590 °С, а у комплекса и метаболитов примерно в той же области имеется плечо. Максимумы при 100 °С примерно одинаковой интенсивности обнаруживаются у всех анализируемых препаратов после культивирования с *Nocardia* и отсутствуют в исходных препаратах гумата натрия и комплекса. На основании этого можно сделать вывод, что данные максимумы выделения CO_2 в низкотемпературной области относятся только к микробным метаболитам. Основные же интенсивные максимумы метаболитов *Nocardia* (при 220 и 680 °С) сдвинуты в низкотемпературную область по сравнению с максимумами выделения CO_2 гуминовых веществ (280 °С у гумата натрия и 340—370 °С у комплекса во втором температурном интервале и 740—770 °С в высокотемпературном интервале). Это может служить доказательством того, что рассматриваемые кривые характеризуют динамику выделения CO_2 именно гуминовых веществ, а не микробных метаболитов.

Полученные нами данные о более «разрыхленной» структуре макромолекулы гумат-симазинового комплекса [11] дали возможность предположить, что он будет легче подвергаться микробной деградации. Это подтверждают также экспериментальные кривые декарбоксилирования комплекса после взаимодействия его с *Nocardia*.

Выделение неароматических продуктов пиролиза (рис. 2) гуминовых веществ до и после культивирования их с микроорганизмами различное. В результате микробной трансформации резко увеличивается выход алифатических фрагментов в низкотемпературной области. У гумата натрия вместо исходной многоступенчатой кривой с многими эффектами выделения неароматических фрагментов имеется кривая с двумя интенсивными максимумами (при 160 и 460 °С) и тремя более слабыми максимумами в высокотемпературной области. Интенсивность выделения алифатических продуктов пиролиза у гумат-симазинового комплекса и после трансформации значительно больше, чем у гумата натрия. Максимальная интенсивность характерна для выделения продуктов в низкотемпературной области при 160 °С. Сравнивая картину выделения алифатических продуктов пиролиза гумата натрия и его комплекса с симазинном, следует подчеркнуть, что кривая выделения продуктов пиролиза у гумата натрия до и после микробной трансформации имеет более сложный характер, чем у комплекса. Это указывает на сохранение у гумата натрия более развитой алифатической цепи и более прочной ее связи с окружающими фрагментами. Интенсивность процесса значительно выше в вариантах с комплексом, что свидетельствует о более легкой его деструкции микроорганизмами.

Кривая выделения неароматических продуктов пиролиза метаболитов *Nocardia* также имеет сложный ступенчатый характер, но интенсивность большинства максимумов незначительная, кроме основного максимума при 460 °С, который совпадает с максимумами выделения алифатических продуктов гуминовых веществ после микробной трансформации.

При выделении ароматических продуктов пиролиза в качестве особенности гумата натрия можно отметить наличие максимума при 100 °С, который наблюдается и в исходном соединении. Это свидетельствует о том, что в состав макромолекулы входят нестабильные ароматические фрагменты (рис. 3). После взаимодействия с микроорганизмами указанные различия между гуматом натрия и комплексом сохраняются, хотя относительная интенсивность данного максимума (при 100 °С) уменьшается вдвое. Характер кривой выделения ароматических продуктов пиролиза у комплекса до и после трансформации сходен, однако интенсивность основного максимума при 460 °С после микробного воздействия также уменьшается вдвое. Это указывает, на то, что относительное коли-

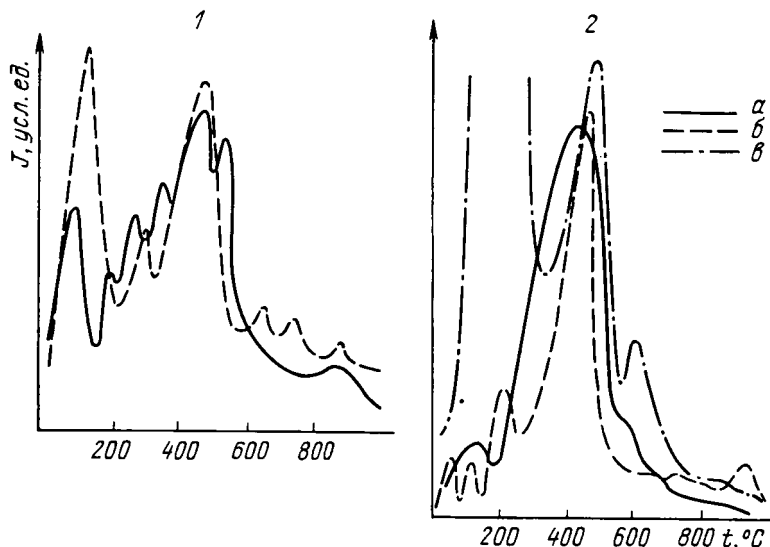


Рис. 2. Термограмма выделения алифатических продуктов пиролиза.
Обозначения те же, что на рис. 1.

чество ароматических фрагментов в макромолекуле гулат-симазинового комплекса снижается за счет активности микроорганизмов, использующих главным образом одноядерные фрагменты макромолекулы.

Для образцов культуральной жидкости основной максимум выделения ароматических продуктов пиролиза сдвинут в низкотемпературную область (400—430 °С) и имеет значительно меньшую интенсивность.

При пиролизе гулат-симазинового комплекса после культивирования его с *Nocardia* уменьшается выделение ароматических фрагментов и увеличивается выход алифатических структур. Последние могут высвобождаться, по-видимому, как за счет разрушения ароматических структур, так и при высвобождении алифатических фрагментов молекулы.

Таким образом, применение метода ПМС позволило установить наличие существенных трансформационных преобразований в макромолекуле гуминовой кислоты при взаимодействии ее с культурой почвенных

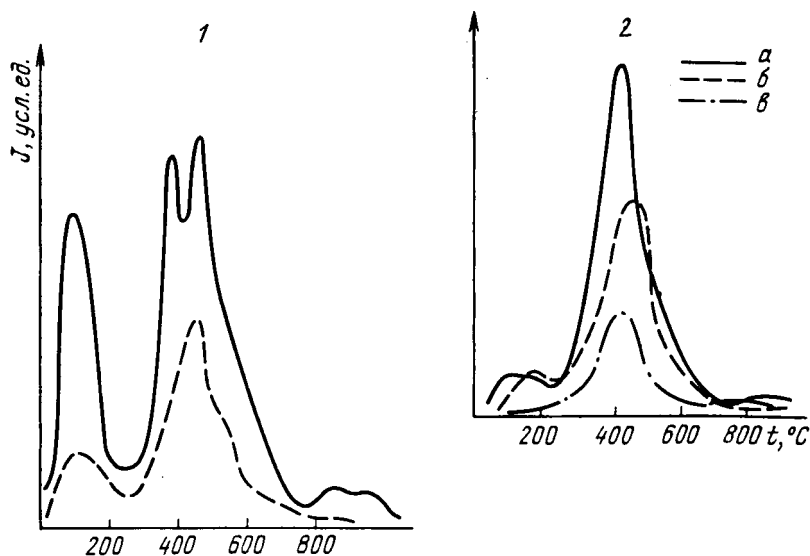


Рис. 3. Термограмма выделения ароматических продуктов пиролиза.
Обозначения те же, что на рис. 1.

актиномицетов *Nocardia asteroides* 0795. Наиболее значительные изменения наблюдаются при введении симазина, т. е. в случае гумат-симазинного комплекса.

При исследовании структуры гумусовых веществ почвы электронно-микроскопическим методом основное внимание уделяется их форме, размеру агрегатов, характеру их связи и степени агрегации исходных препаратов [13—15].

Работ, посвященных изменению структуры гумусовых веществ в процессе их взаимодействия с различными гербицидами при участии микроорганизмов, практически нет. Между тем сведения подобного рода очень важны для установления микроморфологических изменений, происходящих в гумусовых веществах, а также для понимания отдельных биологических свойств комплексных соединений.

Исследование морфологии поверхности препаратов проводили на РЭМ ВС-300 (ЧССР) при $\times 1000$ —30000. Методика подготовки препаратов подробно описана в работе [11].

Просмотр наиболее удачных фотоснимков, полученных с помощью РЭМ, позволяет судить о существенном разнообразии морфологических структурных форм, образовавшихся в результате взаимодействия исходного гумата натрия с симaziном при участии почвенных микроорганизмов.

Наши исследования показали, что волокнистая масса исходного препарата гумата натрия состоит из включений, беспорядочно переплетенных между собой (рис. 4, а). Иногда это овальные чешуйки или крупные агрегаты округлой и неправильной формы. Между агрегатами находятся поровые пространства неправильной формы и в виде мелких трещин. В большинстве случаев образования рыхлого сложения представлены удлиненно-пластинчатыми и листовидными структурами, которые имеют форму изогнутых пластинок, иногда плотно прилегающих друг к другу, и образуют крупные блоки-агрегаты (рис. 4, б). На поверхности последних встречаются тонкие, мельчайшие, со слегка изог-

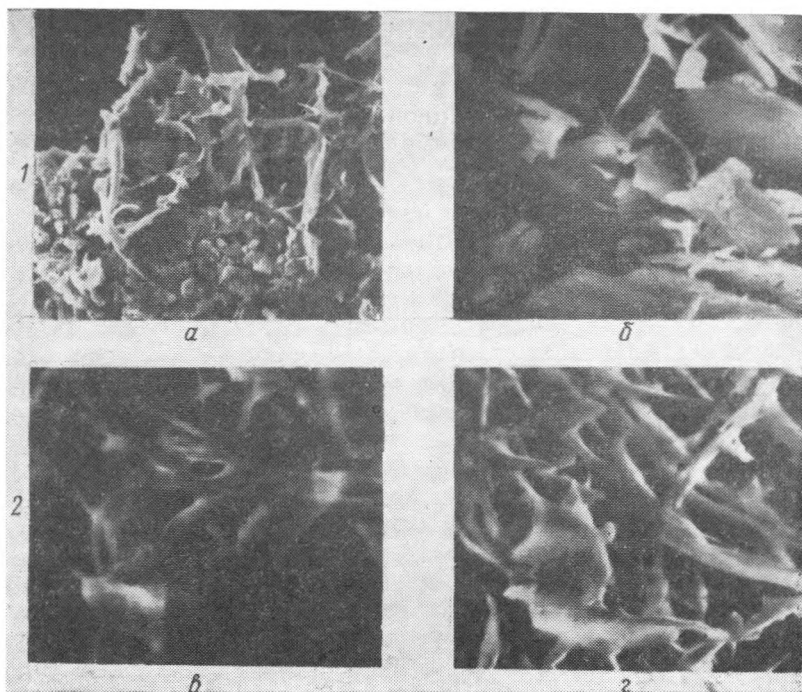


Рис. 4. Морфология поверхности препарата гумата натрия при различных увеличениях.

1 — исходный препарат; 2 — после микробной трансформации; а и в — при $\times 1000$; б и г — при $\times 30\ 000$.

гнутыми краями микроструктуры, различающиеся по форме и размерам.

У препарата гумата натрия в результате воздействия микроорганизмов поверхность спутанно-волокнутой массы, состоящей из утолщенных, непрозрачных, вытянутых микро- и макроволокон или пучков волокон, более рыхлая, чем у исходного гумата натрия (рис. 4, в, г).

На растровых фотографиях отчетливо видны изолированные агрегаты и волокна с плохо ограниченными концами, структура их поверхности ноздреватая. Отдельные участки волокон имеют форму тонких изогнутых пластинок, которые формируют как бы тонкосплетенную сеть, иногда губчатого строения. На поверхности волокнутой массы наблюдаются остатки листоподобных и чешуйчатых структур. Поверхность большинства их волокнутой, с острыми извилистыми краями. Они расположены беспорядочно, что обуславливает рыхлое сложение всей поверхности препарата.

Таким образом, под влиянием микроорганизмов существенно изменяется микроструктура исходного препарата, в итоге на поверхности препарата появляются сетчатые и ноздреватые структуры за счет разрушения листоподобных и чешуйчатых структур в виде крупных блоков-агрегатов.

Представленные на рис. 5 (а, б) препараты гумат-симазинового комплекса имеют более развитую поверхность, чем исходные препараты гумата натрия. Поверхность агрегатов крупного сложения мелкобугристая. Обилие микро- и макропор в общей массе препарата гумат-симазина обуславливает высокую степень пористости, а это, в свою очередь, ведет к образованию (формированию) сетчатой структуры всей поверхности препарата (рис. 5, б). Следует отметить различия в структурной упаковке (комплектности) агрегатов гумат-симазина. Эти агрегаты представляют собой скопления изогнутых, плоских, а иногда объемных губчатых структур разнообразной формы и размера. На поверхности их структур формируются скопления микрочастиц различной формы, размер которых в 100—150 раз меньше, чем самого агрегата, что особенно четко прослеживается на микроучастках с поперечной трещиноватостью.

Следовательно, введение симазина в исходный препарат гумата натрия приводит к разрушению сложных поверхностных образований, в результате образуется микропористость с формированием сетчатых и губчатых структур. Подобные частичные структурные преобразования наблюдаются после воздействия микроорганизмов на исходный препарат гумат натрия.

Существенные трансформационные преобразования микроструктуры препаратов происходят при воздействии почвенных актиномицетов на гумат-симазинов комплекс (рис. 5, в, г, д). Структура этих препаратов характеризуется отсутствием четко выраженной изолированности мелких агрегатов и слабой их прокрашенностью. Присутствие тонкосплетенной сети, состоящей из переплетенных между собой волокон и узлов (пучков) волокон, свидетельствует о сохранении развитой волокнутой поверхности, но толщина волокон намного меньше, чем у исходных препаратов гумат-симазина. Узловые участки волокон в этом случае являются как бы «мостиками» или «перемычками» компактных скоплений на всей поверхности препарата между ранее существовавшими крупными агрегатами гумат-симазинового комплекса. Отдельные макроструктуры препарата представлены крупными листоподобными формами, возможно, менее подвергнутыми влиянию микробиологического процесса. Однако отдельные микроучастки этих структурных форм (рис. 5, г) позволяют судить о наложении микробиологического процесса, приводящего к изменению поверхности препарата. В данном случае форма и расположение волокон во многом определяются содержанием и размером исходного строительного материала внутренних частей самих агрегатов. Для сравнения на рис. 5 (е) приведена микрофотография культуральной жидкости, на которой выращивались микроорганизмы.

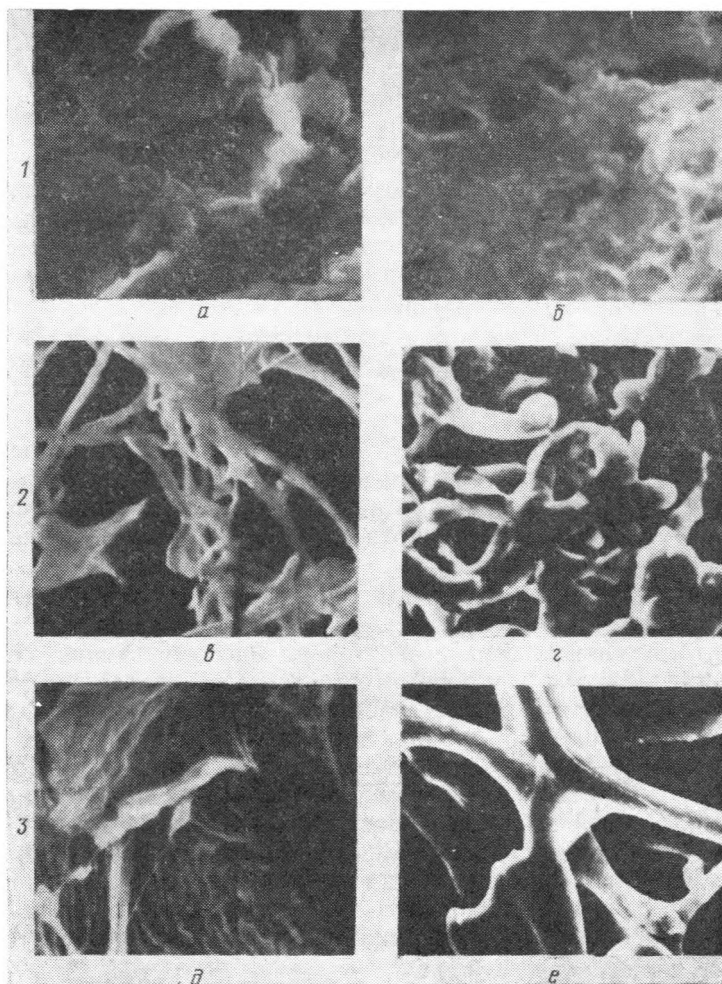


Рис. 5. Морфология поверхности препаратов гумат-симазинового комплекса при различных увеличениях.

1 — исходный препарат; 2 — после микробной трансформации; 3 — микробных метаболитов; а, в и д — при $\times 1000$; б, г и е — при $\times 30\ 000$.

Таким образом, применение метода электронной микроскопии дает возможность выявить некоторые структурные изменения, происходящие при трансформации гуминоподобных комплексов.

Выявленные структуры пластинчатого и листовидного вида под действием почвенных микроорганизмов переходят в тонкосплетенную сеть губчатого и ноздреватого строения. При этом на отдельных участках волокнистой массы еще наблюдаются остатки листовидных и чешуйчатых структур. Они беспорядочно расположены на всей поверхности препарата, образуя рыхлую массу.

Введение симазина в препарат гумата натрия способствует образованию компактных агрегатов с пористой поверхностью, при этом формируется структура губчатого строения. Частично разрушаются компактные агрегаты, и на их поверхности образуются микрочастицы различных форм и размеров. Дальнейшие преобразования гумат-симазинового комплекса происходят под воздействием микробиологического процесса. Гумат-симазиновый комплекс легче подвергается дальнейшей деградации с образованием волокон сетчатого строения. Предполагается, что последние являются исходным строительным материалом внутренней структуры крупных компактных блоков-агрегатов гумат-симазинового комплекса.

Полученный экспериментальный материал позволяет заключить, что при взаимодействии с микроорганизмами в макромолекуле гуминовой кислоты происходят изменения, ведущие к ее деградации, причем введение симазина способствует ее более быстрому разрушению. Все изложенное выше подтверждает сделанные нами ранее выводы об уменьшении стабильности комплекса по сравнению со стабильностью гумата натрия. Поэтому естественно, что гумат-симазинный комплекс легче подвергается микробной деградации, что приводит к более быстрому и глубокому разрушению гуминовой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агапов В. И. Динамика, пространственное распределение и моделирование содержания симазина в почке. — Автореф. канд. дис. М., 1985. — 2. Агапов В. И., Лебедева Г. Ф. Связь динамики содержания симазина в почве с гидротермическими условиями. — *Агрохимия*, 1986, № 1, с. 91—95. — 3. Кавалюлайте И. Защита растений в республиках Прибалтики и Белоруссии, 1981, № 1, Вильнюс, с. 34—35. — 4. Круглов Ю. В., Кузнецова И. А., Гордиенко С. А. Взаимодействие гербицида симазина и гумусовых веществ. — Докл. VIII Межд. симпозиума, т. 2. Доклады о гумусе. Прага, 1985, с. 481—482. — 5. Орлов Д. С., Тихомирова Ф. А., Амосова Я. М. Современные методы исследования и характеристики почвенного гумуса. — *Вестн. МГУ*, 1985, № 1, Сер. 17, Почвоведение, с. 3—13. — 6. Самгин Л. А. Накапливание и передвижение триазинных гербицидов в почве. — М.: ВНИИТЭИСХ, 1975. — 7. Сюняев Х. Х., Кретова Л. Г., Хегай Т. А. и др. Сорбция и разложения ^{14}C -симазина в почвах черноземного типа. — *Изв. ТСХА*, 1983, вып. 5, с. 75—82. — 8. Теппер Е. З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. — М.: Наука, 1986. — 9. Теппер Е. З., Максимова Е. Н., Глас Фарзат К. С. Микроорганизмы, их роль в плодородии почвы и охране окружающей среды. М., 1985. — 10. Томашук А. Ю. Исследование состава, свойств и структурных особенностей гуминовых кислот черноземов Северного Казахстана. — Автореф. канд. дис. М., 1982. — 11. Томашук А. Ю., Кузнецова И. А., Вожик Т. Л. и др. Исследование продуктов взаимодействия гумата натрия и симазина методами пиролитической масс-спектрометрии и сканирующей электронной микроскопии. — *Изв. ТСХА*, 1988, вып. 2, с. 169—174. — 12. Хмельницкий Р. А., Лукашенко И. М., Бродский Е. С. Пиролитическая масс-спектрометрия высокомолекулярных соединений. — М.: Химия, 1980. — 13. Dogado E., Polo A., Galvan J. — *An edafol y agrobiol.*, 1975, vol. 34, N 1—2, p. 41—45. — 14. Varadachari Chadriha, Barmen Alohe K., Chosh Ku al. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, 1983, vol. 31, N 1, p. 28—30. — 15. Visser S. A. — *Pedologie*, 1982, vol. 32, N 2, p. 163—174.

Статья поступила 12 мая 1988 г.

SUMMARY

Transformation of sodium humate and its complex with simazine was studied in laboratory experiments in soil actinomyces culture. Using pyrolytic mass spectrometry and electronic microscopy, it has been found that inserting simazine into humic acid macromolecule changes its stability and biodegradability. Under the action of microorganisms, humate-simazine complex is more rapidly destroyed than source sodium humate.