

## Néhány hazai talaj oldható huminsav-komponensének frakcionálása gélszűréssel

FILEP GYÖRGY és TATÁR LÁSZLÓ

Országos Mezőgazdasági Minőségvizsgáló Intézet,  
Debrecen és Nyírségi Agrotechnikai Kutató Intézet,  
Nyíregyháza

A gélszűrést az utóbbi években mind gyakrabban használják a talaj humuszanyagainak vizsgálatánál is. Mivel a módszer lehetővé teszi a különböző oldószerekkel nyert kivonatok egyszerű frakcionálását, tisztítását, s molekulásúlyának meghatározását, alkalmazása nagymértékben hozzájárulhat a fontosabb humuszösszetevők egyes (kémiai, fizikai) tulajdonságainak részletesebb megismeréséhez.

A frakcionálással kapcsolatos külföldi munkák (1, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 14] tanulmányozásából kitűnik, hogy a humuszanyagok talajból történő extrakciójától, s a gélszűrés kivitelezésétől függően lényegesen eltérő eredményeket kaphatunk. A molekulaszűréssel elkülönített komponensek egymáshoz viszonyított aránya viszont — azonos kísérleti feltételek esetén is — függ a talaj képződésének körülményeitől, s a talaj kémiai, fizikai, biológiai sajátosságaitól. Ezért szükségesnek láttuk, hogy néhány hazai talaj huminsavkomponensének gélszűrési vizsgálatát elvégezve, a vizsgálandó anyag kivonásával és szétválasztásának lehetőségeivel kapcsolatosan további adatokat szolgáltatassunk.

### Anyag és módszer

Vizsgálatainkhoz három talajtípus — könnyebb mechanikai összetételű *karbonátos réti csernozjom*, *kilúgozott csernozjom* és gyengán podzolos *barna erdőtalaj* — felső rétegét használtuk. A 2 mm-es szitán átszitált légszáraz talajból meghatároztuk a pH-t, a  $\text{CaCO}_3$ -ot és a mechanikai összetételt, majd a humuszvizsgálatoknál szokásos előkészítés után mértük a talajok összes C-tartalmát [15].

A huminsavak kivonására munkánk során olyan módszert kerestünk, mellyel viszonylag nagy mennyiségű szerves anyagot oldhatunk ki a talajból, s emellett *a)* egyszerűen, gyorsan elvégezhető, *b)* jól reprodukálható eredményeket ad és *c)* a nyert szerves anyag frakció könnyen beilleszthető valamelyik ismert csoportosítási rendszerbe. Fenti követelményeknek — véleményünk szerint — leginkább a KONONOVA és BJELCSIKOVA [9] által ajánlott Na-pirofoszfát–NaOH-os eljárás felel meg. E módszerrel a szabad huminsavakat, valamint a Ca-hoz kötött, s a másfélszeres oxidok nem szilikátos formáihoz kapcsolódó humuszanyagokat lehet egyszeri, szobahőmérsékleten végzett kioldással megkapni. A kapott huminsav mennyiség tehát megfelel a dekalcinált talaj többszöri NaOH-os kezelése után TYURIN szerint kinyert komponenseknek. A választott módszerrel azonban elkerülhető a talaj hosszadalmas mésztelenítése, s egyszerűsödik az extrahálás.

A *Na-pirofoszfát + NaOH-os kivonat készítése*: 10 g légszáraz talajhoz 200 ml frissen készített 0,1 M-os elegyet (44,4 g/l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{g/l NaOH}$ ) adunk (pH = 13). Felrázzuk, s ledugaszolva egy éjszakán át (de legalább 16–18 óra hosszat) állni hagyjuk. Másnap reggel ismét felkeverjük, majd szűrjük (vagy centrifugáljuk): *I. szűrlet*. (Ha az oldat zavaros, ugyanazon szűrőn ismét átengedjük mindaddig, míg a szűrlet kitisztul).

Az *I. szűrlet* az oldható huminsavakat és fulvósavakat tartalmazza. A huminsavak elválasztása céljából a szűrlet 150 ml-éhez 10%-os  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -et adunk több részletben, maradandó zavarosodásig, majd a kis humusztartalmú talajoknál további 10–20 ml, a nagyobb humusztartalmúaknál pedig 30 ml 10%-os  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -et adagolunk. Ezután 35–40 percig 80 °C-os vízfürdőre helyezük az oldatot, majd egy éjjelen (de legalább 14–16 órán) át szobahőfokon állni hagyjuk. Másnap kemény szűrőn szűrjük, s hideg 0,05 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -gyel utána mossuk, míg a lecsepegő mosófolyadék teljesen tiszta nem lesz. A szűrletet félretesszük (vagy elöntjük), a szűrőn maradt huminsav csapadékot pedig meleg 0,05 n NaOH kis részleteivel oldatba visszük, majd a szűrőt jól átmoszuk 0,05 n NaOH-val. Kihűlés után az egyesített szűrlet térfogatát 75 ml-re egészítjük ki: *II. szűrlet* (huminsav alapoldat).

Mindenekelőtt meghatározzuk az *I. szűrlet* (huminsav + fulvósav oldat) és a *II. szűrlet* (huminsav oldat) *C-tartalmát*. E célra az *I. szűrlet*-ből 10–15 ml-t, a *II. szűrlet*-ből 10–20 ml-t, 1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -gyel kezdődő zavarosodásig semlegesítünk, s vízfürdőn bepároljuk. A C-tartalmat a szárazmaradékból határozzuk meg.

Ezek után a különböző komponensek C-tartalma a következőképpen adódik:

$$\text{II. szűrlet} = \text{huminsav} - \text{C} = (\text{HS} - \text{C})$$

$$\text{I. szűrlet} - \text{C} = \text{össz. oldható-C} = (\text{HS} - \text{C} + \text{FS} - \text{C})$$

$$(\text{I. szűrlet} - \text{C}) - (\text{II. szűrlet} - \text{C}) = \text{FS} - \text{C}.$$

A *huminsavak frakcionálásához* — a vizsgálandó anyag várható molekulasúlyának nagyságrendjét, s a gélek frakcionálási tartományát szem előtt tartva — a Sephadex G-100-as gélt választottuk.

A gélagy készítése: a száraz gélt — időnként kevergetve — 3 napig desztillált vízben duzzasztottuk, majd a gél nagyobb részét egy öntéssel (20–30 cm magasságú deszt. vizet tartalmazó) 2,5 × 50 cm-es üvegcsőbe vittük, melynek alsó végén G-3-as szűrőlap, s e felett 3–4 mm vastagságú kvarchomok réteg volt. A további gél mennyiségeket, az első részletben betöltött anyag ülepedésével összehangolva, folyamatosan adagoltuk a csőbe, hogy megakadályozzuk az oszlop rétegződését. Ülepedés után 45 cm magas homogén géltöltet alakult ki, melynek tetejére szűrőpapírt helyeztünk.

Az oszlop állandóit (a  $V_0$  = külső és a  $V_i$  = belső térfogatot) a

$$V_0 = V_i - \frac{a}{d} (Sr + 1), \text{ illetve a}$$

$$V_i = \frac{a \cdot Sr}{2} \text{ összefüggések [10] felhasználásával számítottuk.}$$

A duzzadt gél fajsúlyát ( $d$ ; g/ml) piknométerrel, a pufferoldat fajsúlyát ( $\rho$ ; g/ml) areométerrel mértük.

A  $V_t$  teljes oszloptérfogatot a géllágy ismert geometriai adataiból kaptuk.

Az oszloptöltetet ( $a$ ; g) és a száraz gél által reverzibilisen megkötött folyadék mennyiségét ( $Sr$ ; g/g) pedig az alábbiak szerint határoztuk meg.

A duzzasztott gél egy részét keskeny szűrőtégelybe vittük, majd a tégelyt centrifugacsőbe rögzítve, percenként 2000 fordulatszám mellett állandó súlyig centrifugáltuk. A szűrőtégelyben visszamaradt anyagot lemértük ( $X_g$ ), majd 60 °C-on állandó súlyig szárítva ismét mértük ( $G$ ). A súlykülönbség egyenlő a gél által reverzibilisen megkötött folyadék mennyiségével, mely 1 g géltre vonatkoztatva az  $Sr$  értékét adja. Az  $a$ -t a fenti jellemzők segítségével fejeztük ki:

$$a = \frac{G \cdot V_t \cdot d}{X_g}$$

Az egyes komponensek megoszlási hányadosát ( $K_d$ ) a

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t}$$

egyenlet [10] adja, melyben  $V_e$  = az eluens térfogata, ml. Az oszlop fontosabb jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

Gélszűréshez minden esetben a huminsav alapoldatok (II. szűrlet) 10 ml-ét használtuk. Az átfolyási sebességet 30 ml/óra (1,415 ml/cm<sup>2</sup>/óra) értékre állítottuk be. Az eluátum extinkcióját a huminsavak jellemzésére ajánlott [12, 9] hullámhosszak és a vizsgálandó anyag általunk mért fényabszorpciós görbéinek figyelembevételével 3 különböző hullámhossznál határoztuk meg. A fényabszorpciós görbék (1. ábra) a hullámhosszúság növekedésekor folytonosan csökkenő tendenciát mutatnak, s 200–700 nm között jellemző maximum nem tapasztalható, ezért UV-ben a hirtelen csökkenést követő meredek szakasz felső harmadában (254 nm), a látható tartományban pedig az enyhe lejtésű szakasz kezdetét és végét reprezentáló hullámhosszúságoknál (465 és 665 nm) történt a mérés. A SCHEFFER [12] és WELTE [cit. 9] által javasolt  $E_{465} : E_{665}$  arányt KONONOVA és BJELCSIKOVA [9] megfelelőnek tartja a huminsavak kondenzáltsági fokának jellemzésére, mely összefüggésben van a talajképződés körülményeivel.

1. táblázat

A vizsgálatokhoz használt Sephadex G-100-as géloszlop fizikai állandói

(1) Jellemző megnevezése	(2) Értéke
Oszloptérfogat: $V_t$ , ml	214
Duzzadt gél fajsúlya: $d$ , g/ml	1,03
Oszloptöltet: $a$ , g	12,6
1 g xerogél által reverzibilisen megkötött folyadék mennyisége: $Sr$ g/g	10,08
A trisz pufferoldat fajsúlya 25 °C-on: $\rho$ , g/ml	1,01
$V_t$ (a géllágy külső térfogata) ml	78,5
$V_0$ (a géllágy belső térfogata) ml	125,8

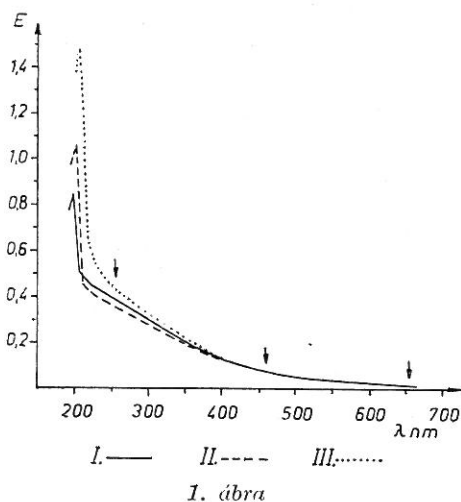
Megemlítjük, hogy az 1. ábra görbéit Perkin—Elmer 402 típusú regisztráló fotométeren, 1 mm-es küvetta vastagságnál vettük fel, a Sephadex oszlopról leoldott frakciósorozatok mérését viszont *UV*-ben Spektromom 201, a látható tartományban pedig Spekol (EK-1) fotométeren végeztük, 10 mm-es küvetttával.

### Vizsgálati rész

A kiválasztott talajok néhány jellemzőjét a 2. táblázat mutatja. Az adatok szerint az alkalmazott kivonószer az összes szerves anyagnak mintegy 50%-át oldotta ki a talajból. A huminsav összes mennyisége legnagyobb a csernozjomnál. A HS/FS arány pedig — irodalmi megállapításokkal egyezően — a podzolos talajnál a legkisebb.

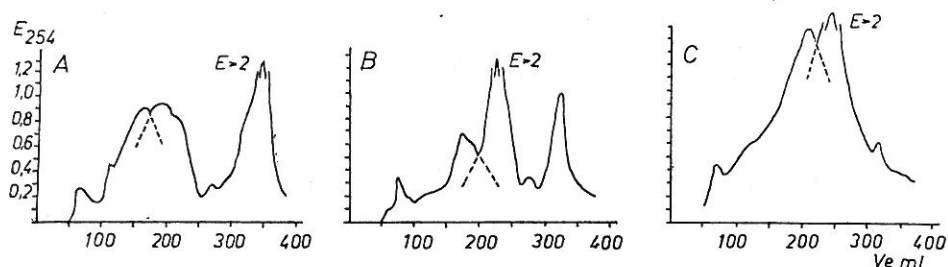
Mivel az elúciós diagram alakja összefüggésben van az eluálószer milyenségével [13], előkísérletként tanulmányoztuk a huminsavkivonatok leoldódását különböző eluálószer alkalmazása mellett. A mérési eredményeket a 2. ábra szemlélteti.

Az ábrákból első ránézésre megállapítható, hogy a különböző eluálószerekkel nyert görbék alakja eltérő. A 0,05 M lúgos Na-pirofoszfát oldattal kapott diagramon feltűnően nagy a  $V_0 + V_i$  térfogatú oldószerek nem eluálható mennyiség (legutolsó csúcs). Desztillált (ionmentesített) vizes elúcióval 5 jól megkülönböztethető maximum jelenik meg, s az ötödik csúcs lényegesen kisebb, mint a Na-pirofoszfátos leoldásnál. A sósavas trisz (trihidroxiamino-metán) puffer (pH = 8,5) alkalmazásával az utolsó csúcs csaknem eltűnik, s a  $V_0 + V_i$  térfogatnak megfelelő mennyiséggel az anyag legnagyobb része eluálható.



I. ábra  
A huminsavkomponensek fényabszorpciós görbéi. I. Karbonátos réti csernozjom (5-szörös hígítás). II. Kilúgzott csernozjom (10-szeres hígítás). III. Podzolos barna erdőtalaj (eredeti kivonat)

amino-metán) puffer (pH = 8,5) alkalmazásával az utolsó csúcs csaknem eltűnik, s a  $V_0 + V_i$  térfogatnak megfelelő mennyiséggel az anyag legnagyobb része eluálható.



2. ábra

Karbonátos réti csernozjom talaj huminsav alapoldatának frakcionálása különböző eluálószerrel felhasználásával. A) 0,05 M lúgos Na-pirofoszfát (pH = 11,5). B) Ionmentesített víz. C) Trisz puffer (pH = 8,5)

2. táblázat

A vizsgált talajok néhány jellemző adata

(1) Talajtípus, származási hely	(2) Minta-vétel mélysége, cm	pH		(3) Fizikai agyag	(4) Fizikai homok	CaCO <sub>3</sub>	(5) Összes C	(6) Huminsav C	(7) Fülvósav C	(8) Összes oldható C	(9) HS+FS az összes C %-ában	(10) HS/FS arány
		H <sub>2</sub> O	KCl									
						%	g/100 g talaj					
a) Karbonátos réti csernozjom, Debrecen	0-25	8,4	7,6	32,5	67,5	2,2	1,18	0,28	0,22	0,49	41,5	1,27
b) Kilúgzott csernozjom, Ebes	0-22	6,8	5,9	49,25	50,75	—	1,95	0,50	0,39	0,87	44,6	1,33
c) Gyengén podzolos barna erdőtalaj, Mikóháza	0-25	7,3	6,3	59,05	40,95	—	0,77	0,12	0,25	0,37	48,1	0,48

Ezen eredményeket figyelembe véve a továbbiakban desztillált vízzel és sósavas trisz pufferrel [4] végeztük a frakcionálást.

A frakciók túlnyomó többsége (az 1. kivételével) az eluálás folyamán jól látható, határozottan megkülönböztethető az oszlopon. A 3. ábrán az 1. frakció leoldása utáni állapotot tüntettük fel a kilúgzott csernozjom talajnál. Természetesen a frakciók egymáshoz viszonyított helyzete és szélessége az eluálás előrehaladásával jelentősen változik. Így lehetséges, hogy egyes sávok nem az ábrázolt csoportosításban hagyják el az oszlopot, s pl. a 3. frakció világosabb alsó sávja az oszlop elhagyásakor már a 2. frakció részeként jelenik meg az oldatban. Ezért a vázlaton jelölt állapot frakciókba osztása bizonyos mértékig szubjektív.

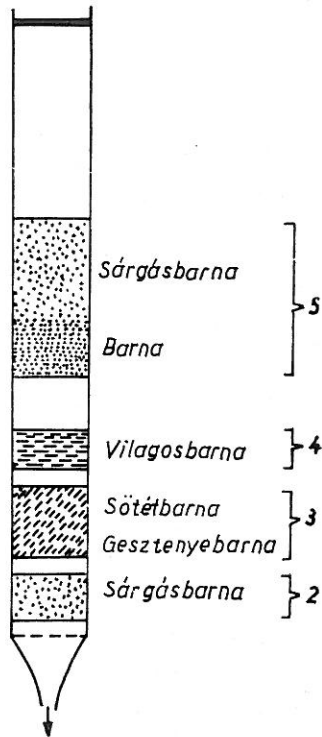
*Desztillált vizes elúció.* A 4. ábra adatai azt mutatják, hogy a desztillált vízzel végzett elúció folyamán, mindhárom talajtípus huminsavkivonatából 5 frakciót sikerült elkülöníteni. Az elúciós diagramok alakja azonban a talajtípustól függően más és más, s ez a frakciók egymáshoz viszonyított arányában, illetve a huminsavmolekulák méret szerinti összetételében meglévő különbségekre utal. Legnagyobb fényabszorpciót mindegyik talajnál a 3. frakció mutatott. A kilúgzott csernozjom esetén az 1. és 2. frakció viszonylagos mennyisége azonban nagyobb, s ez a két csúcs jobban összefonódik, mint a másik két típusnál. A 4. frakció minden esetben kicsi. Szembetűnő, hogy a podzolos talaj 1. frakciója (a gél által kizárt molekulák mennyisége) viszonylag nagyra adódott. Ez alátámasztja azt a megfigyelést [13], hogy kis mintakonzentrációnál a gélmatrix töltéseinek taszító hatása fokozottabb mértékben érvényesülhet, amelynek következtében kevesebb molekula tud bejutni a gélfázisba, s relative nagyobb mértékű kizárás mutatkozik.

Az E<sub>254</sub> és E<sub>465</sub> és E<sub>665</sub>-on mért értékek diagramjai egymással összhangban vannak, s a maximumok jól elkülönülnek. Az egyes frakciók eluálási tartományainak kijelölése legjobban az E<sub>254</sub> értékek segítségével valósítható meg.

A frakciók 465 és 665 nm-nél mért extinkciós értékeinek hányadosa nemcsak a különböző típusú talajoknál tér el, hanem egy-egy talaj huminsav

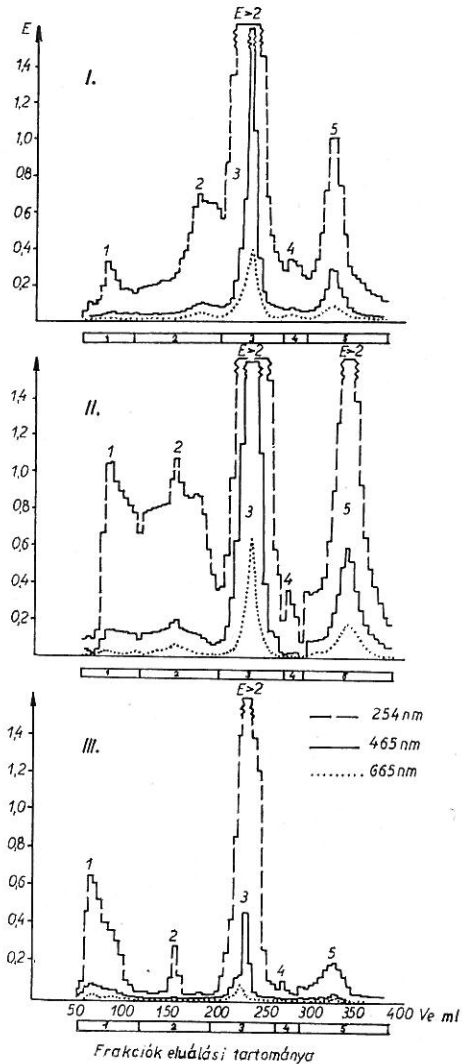
frakcióinál is változó. Típusra jellemző összefüggéseket azonban a végzett néhány mérés alapján nem találtunk.

Annak ellenére, hogy a deszt. vizes elució alkalmával az oldott anyag adszorpciója befolyásolhatja az anyag molekula méret szerinti eloszlását [7, 13], a körülmények pontos betartása esetén (felvitt mennyiség, átfolyási sebesség, a leoldás detektálása, oszlopméret), a leírtaknak megfelelően végrehajtott frakcionálás jól reprodukálható eredményeket ad. Így ez a megoldás alkalmasnak látszik a különböző típusú talajok huminsav összetételében mutatkozó minőségi eltérések megítélésére, illetve a huminsav-komponensek összehasonlítására. A gél-oldott anyag kölcsönhatás ugyanis lazább géleknél (így a G-100-nál is) kevésbé jelentős, más-



3. ábra

A talaj huminsavfrakciójainak megoszlása a géloszlopon az 1. frakció eluálása után (csernozjom talajnál).

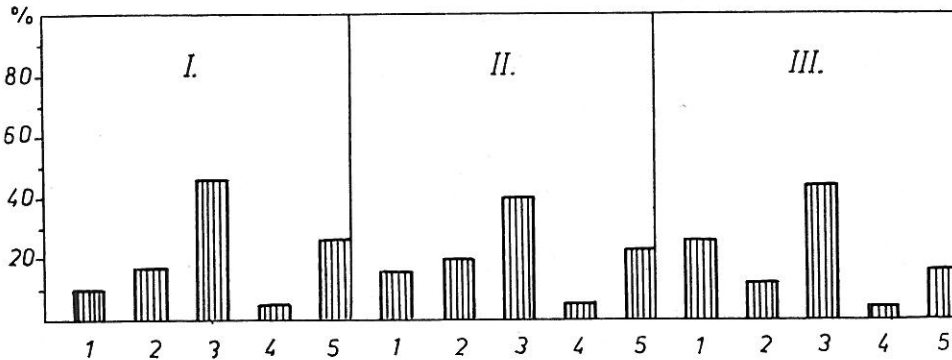


4. ábra

A huminsavkivonatok elució diagramjai desztillált vizes elució esetén. I. Karbonátos réti csernozjom. II. Kilúgzott csernozjom. III. Podzolos barna erdőtalaj. 1—5 a frakciók száma, 254, 465 és 665 nm-nél mérve

részt az adszorpció a frakciók számát nem változtatta meg, s azok eluálási tartományát sem torzította el egyik mintánál sem, a másik talajtípus diagramjaihoz viszonyítva. Még jobb összehasonlítási alapot adhat a deszt. vizes elúció akkor, ha a kivonat C-tartalmának ismeretében, mindegyik mintánál azonos össz. C-tartalmú részletek felvitelére törekszünk.

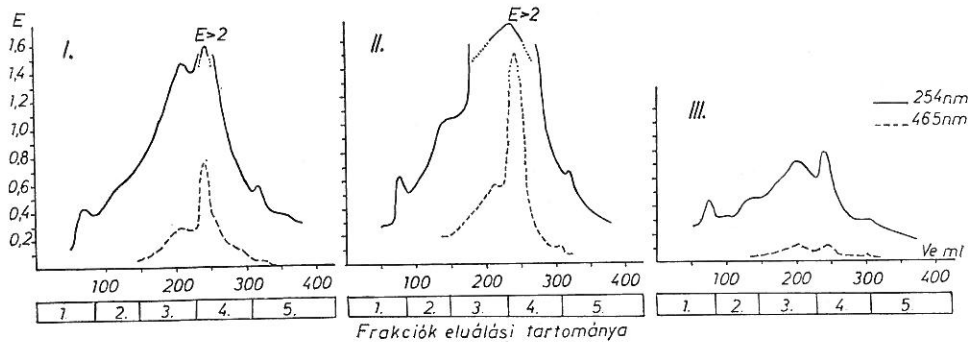
Az egyes frakciókban megjelenő anyagmennyiségekről közelítő tájékoztatást ad a komponensek relatív C-tartalmát feltüntető 5. ábra.



5. ábra

A frakciók relatív C-tartalma (desztillált vizes elúció). I. Karbonátos réti csernozjom. II. Kílúgzott csernozjom. III. Podzolos barna erdőtalaj. Független tengely: eluált mennyiség, %. 1-5 a frakciók sorrendje

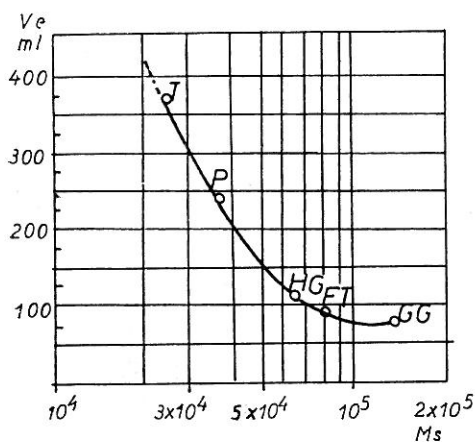
*Trisz pufferrel végzett elúció.* Mivel megfelelő lúgos puffer (pl. trisz) alkalmazásakor a felvitt anyagmennyiség, s az adszorpció lényegesen nem módosítják az anyag molekulásúly szerinti megoszlását [13], a továbbiakban megkíséreltük a huminsav kivonatok molekulásúly összetételének megállapítását. A trisz pufferes gélkromatográfia eredményét a 6. ábra mutatja. A görbékre általában jellemző az anyag megközelítően folytonos eloszlása. A minta nagy része a  $V_0 + V_1$ -hez közeli térfogatnak megfelelő eluálással leoldódik, s az utolsó komponens mindhárom talajnál egészen kis mennyiségű.



6. ábra

A vizsgált talajok huminsavainak trisz pufferes eluációja, 254 és 465 nm-nél mérve. I. Karbonátos réti csernozjom. II. Kílúgzott csernozjom. III. Podzolos barna erdőtalaj

A molekulásúly meghatározásánál a legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy azonos, vagy egymáshoz közeli molekulásúlyú komponensekből álló huminsav standardok nem ismeretesek, így az oszlopot csak másodlagos standardokkal (pl. fehérjékkel) lehet hitelesíteni. A fehérjék struktúrája, s szűrési tulajdonságai azonban feltehetően eltérnek a huminsavakétól, ezért ez



7. ábra

Kalibrációs görbe a huminsavkomponensek molekulásúlyának megállapításához. T = tripszin, P = pepszin, HG = humán hemoglobin, FT = alkáli foszfatáz, GG = humán szérum  $\gamma$ -globulin. (Sephadex G-100; trisz pufferes elúció.)

három talajra jellemzőnek tekintjük, bár az egyes komponensek mennyisége talajtípusonként változó.

Tekintettel arra, hogy az  $E_{254}$  értékek nem egy esetben 2-nél nagyobbak adódtak, a csúcsok helyének pontos megállapítása céljából a 465 nm-nél mért adatokat is ábrázoltuk. A két hullámhossznál kapott diagram egybevetésével már kielégítően megjelölhettük a csúcsok helyét.

A talajok Na-pirofoszfát + Na-hidroxid eleggyel kivonható huminsavainak molekulásúly-eloszlását a 3. táblázatban közöljük. A táblázatból látható,

3. táblázat

## A huminsavkomponensek molekulásúlya

(1) Frakció jele	(2) Ms tartomány	(3) Ms-érték a csúcsoknál	$K_d$
HS <sub>1</sub>	> 90 000	> 100 000	< 0
HS <sub>2</sub>	90 000 – 51 300	56 300	0,42
HS <sub>3</sub>	51 300 – 36 500	38 500	1,05
HS <sub>4</sub>	36 500 – 28 000	≈ 34 500	1,29
HS	< 28 000	≈ 27 500	1,90



hogy a fentiek szerint, egyszeri frakcionálás után, 5 különböző molekulásúly-értéket sikerült megállapítani. Az 5. frakciónál azonban, ahol a  $K_d \gg 1$ , a kapott molekulásúlyt csupán közelítő, tájékoztató értéknek tekinthetjük. Hangsúlyozni kell továbbá, hogy a közölt adatok az egyes huminsavcsoportok molekulásúlyának becsült értékei, s így a talajból kivont eredeti huminsavelegyre jellemző szakirodalmi átlagoktól esetenként jelentősen eltérhetnek.

Vizsgálataink végső soron azt bizonyítják, hogy a talaj huminsavkomponense különböző molekulásúlyú frakciókat tartalmaz, s mindegyik vizsgált talaj huminsavkivonatában hasonló molekulásúlyú összetevők szerepelnek, de típusonként eltérő arányban.

### Összefoglalás

Három talajtípus — karbonátos réti csernozjom, kilúgzott csernozjom s gyengén podzolos barna erdőtalaj — 0,1 M Na-pirofoszfát + NaOH eleggyel nyert huminsavkivonatát frakcionáltuk 2,5 × 45 cm-es, Sephadex G-100 oszlopon. Eluálószerként desztillált vizet és 8,5 pH-jú sósavas trisz puffert használtunk.

A desztillált vizes elúcióval 5 frakcióra sikerült elválasztani a talaj huminsavkomponensét. A frakcionálás reprodukálhatónak bizonyult, s a vizsgálati körülmények azonossága esetén alkalmasnak látszik a különböző típusú talajok huminsavösszetételében mutatkozó minőségi eltérések megítélésére.

A huminsavak trisz pufferes elúciójával kapott diagramokat felhasználtuk a huminsavösszetevők molekulásúlyának közelítő megállapításához. E célból másodlagos standardokkal (ismert molekulásúlyú fehérjékkel) kalibráltuk az oszlopot, majd a huminsavak gélszűrésével azonos kísérleti feltételek mellett készített kalibrációs görbe segítségével következtettünk a frakciók molekulásúlyára. Vizsgálataink szerint a talajok oldható huminsavkomponensében hasonló molekulásúlyú összetevők szerepelnek, de típusonként eltérő arányban.

### Irodalom

- [1] BAILLY, J. R. & MARGULIS, H.: Études de quelques acides humiques sur gel de dextrane. *Plant and Soil*. **29**. 343–361. 1968.
- [2] CAMERON, R. S., SWIFT, R. S., THORNTON, B. K. & POSNER, A. M.: Calibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acid. *J. Soil Sci.* **23**. 342–349. 1972.
- [3] DELL'AGNOLA, G. & FERRARI, G.: Molecular sizes and functional groups of humic acid substances extracted by 0,1 M pyrophosphate from soil aggregates of different stability. *J. Soil Sci.* **22**. 342–349. 1971.
- [4] DÉVÉNYI, T. & GERGELY, J.: Aminosavak, peptidek, fehérjék. *Medicina*, Budapest. 1963.
- [5] DUBIN, V. N. & FILKOV, V. A.: Frakcionirovanie guminovüh kiszlot nekotorüh pocsv Moldavii fil'traciej cserez szefadekszüt. *Pocsvovedenie*. (5.) 85–102. 1968.
- [6] GANZSARA, N. F.: Frakcionirovanie guminovüh veseseszty pocsv metodom gelevoj fil'tracii. *Dokl. TSHZA*. **149**. 95–96. 1969.
- [7] GELOTTE, B.: Studies on gel filtration. *J. Chromatogr.* **3**. 303–342. 1960.
- [8] HAYES, M. H. B.; STACEY, M. & STANDLEY, J.: Studies on the fractionation of humification products of ryegrass in sand columns. *Geoderma*. **7**. 105–111. 1972.
- [9] KONONOVA, M. M. & BJELCSIKOVA, N. P.: Uszkorennüj metodü opredelenija szosztava gumusza mineralnüh pocsv. *Pocsvovedenie*. (10) 75–87. 1961.
- [10] KREMNER, T.: Gélszűrés. A biokémia modern módszerei. *Magyar Kém. Egy. Biokémiai Szakoszt.* Budapest. 1968.

- [11] MEHTA, N. C.; DUBACH, P. & DEUEL, H.: Untersuchungen über die Molekulargewichtsverteilung von Huminstoffen durch Gelfiltration on Sephadex. *Z. Pfl Ernähr. Düng. Bodenk.* **102**. 128—137. 1963.
- [12] SCHEFFER, F.: Neuere Erkenntnisse in der Humusforschung. *Trans. Vth Intern. Congr. Soil Sci., Leopoldville.* **1**. 208. 1954.
- [13] SWIFT, R. S. & POSNER, A. M.: Gel chromatography of humic acid. *J. Soil Sci.* **22**. 237—249. 1971.
- [14] SZIMAKOV, V. N. & ALJABINA, G. A.: Izucsenie frakcionnogo szosztava guminovüh kizslot nekotorüh tipov pocsv metodom gel'filtracii. *Pocsvovedenie.* (7) 63—66. 1972.
- [15] Talaj- és trágyavizsgálási módszerek. *Mezőgazd. Kiadó. Budapest.* 1962.

*Érkezett: 1973. április 10.*

## Fractionation of the Soluble Humic Acid of Some Hungarian Soils by Gel-Filtration

G. FILEP and L. TATÁR

National Institute for Agricultural Quality Testing, Debrecen, and Agrotechnical Research Institute of Nyírség Region, Nyíregyháza (Hungary)

### Summary

Humic acids were extracted with a mixture of the aqueous solution of 0.1 M Na-pyrophosphate and NaOH from three soil samples of different type (calcareous meadow chernozem, leached chernozem and podzolic brown forest soil). The extracts were separated by gel-filtration on a column of Sephadex G-100 (45 cm long and 2.5 cm in diameter), eluted with distilled water and tris-(hydroxymethyl-methylamine-hydrochloric acid) buffer of pH 8.5. The humic acid components of the soil were separated into 5 fractions. Fractionation proved to be reproducible and — under identical conditions — it seems to be suitable for estimating the qualitative differences between the different soil types. The diagrams obtained by the tris-buffer elution of humic acids were employed for approximative determination of the molecular weight of humic acid components. For this purpose the column was calibrated with secondary standards (proteins of known molecular weight), then the molecular weights of the fractions were determined from the calibration curve prepared under the same experimental conditions as for the gel-filtration of humic acids. According to our experimental results, components of similar molecular weights may be found in the soluble humic acid fractions of soils but in a different ratio depending on the soil type.

*Table 1.* Physical constants of the Sephadex G-100 gel column used for the investigation. (1) Naming of the characteristic feature: volume of the column:  $v_t$ , ml; specific weight of swelled gel:  $d$ , g/ml; column-packing:  $a$ , g; quantity of liquid fixed reversibly by 1 g of xerogel:  $S_r$ , g/g; specific weight of the tris-buffer solution at 25 °C:  $\rho$ , g/ml;  $v_0$ : outer volume of the gel bed, ml;  $v_i$ : inner volume of the gel bed, ml. (2) Value.

*Table 2.* Some characteristic data of the studied soils. (1) Soil type, place of origin. a) calcareous meadow chernozem, b) leached chernozem, c) slightly podzolic brown forest soil. (2) Sampling depth, cm. (3) Physical clay. (4) Physical sand. (5) Total C. (6) Humic acid C. (7) Fulvic acid C. (8) Total soluble C, g/100 g soil. (9) Humic acid + fulvic acid in the percentage of total C. (10) Humic acid/fulvic acid ratio.

*Table 3.* Molecular weight of humic acid components. (1) Sign of fraction. (2) Range of m.w. (3) M.w. value at the peaks.

*Figure 1.* Light absorption curves of humic acid components. I. Calcareous meadow chernozem (fivefold dilution). II. Leached chernozem (tenfold dilution). III. Podzolic brown forest soil (original extract).

*Figure 2.* Fractionation of the humic acid stock solution of a calcareous meadow chernozem by using different eluents. A. 0.05 M basic Na-pyrophosphate (pH 11.5). B. Ion-free water. C. Tris-buffer (pH 8.5.).

*Figure 3.* Distribution of the soil's humic acid fraction in the gel-column after the elution of the 1st fraction (in the case of chernozem). Number of fractions: 2: russety, 3: chestnut-brown and dark-brown, 4: light brown, 5: brown and russety.

Figure 4. Elution diagrams of humic acid extracts in the case of elution with distilled water. I. Calcareous meadow chernozem. II. Leached chernozem. III. Podzolic brown forest soil. 1-5 number of fractions, measured at 254, 465 and 665 nm.

Figure 5. Relative C-content of the fractions (elution with distilled water). I-III.: See Figure 4. Vertical axis: eluted quantity, %. 1-5: sequence of fractions.

Figure 6. Elution with tris-buffer of the humic acids of the studied soils, measured at 254 and 465 nm. I-III.: See Figure 4.

Figure 7. Calibration curve for the determination of the molecular weight of the humic acid components. T - trypsin, P - pepsin, HG - Humane haemoglobin, FT - alkaline phosphatase, GG - humane serum  $\gamma$ -globulin. (Sephadex G-100; elution with tris-buffer.)

## Fraktionierung der löslichen Huminsäurekomponenten einiger ungarischer Böden mit Hilfe einer Sephadexsäule

GY. FILEP und L. TATÁR

Landesinstitut für Landwirtschaftliche Qualitätsprüfung, Debrecen, und Agrotechnisches Forschungsinstitut, Nyíregyháza (Ungarn)

### Zusammenfassung

0,1 M Na-pyrophosphat + NaOH-Huminsäureextrakte von drei Bodentypen (karbonathaltiger Wiesenboden, ausgelaugter Tschernosjomboden, podsolierter brauner Waldboden) wurden mit Hilfe einer Sephadex-G-100 Säule (2,5 × 45 cm) fraktioniert. Als Eluanten dienten destilliertes Wasser und eine Salzsäure - Tris (=Trihydroxi-aminometan)-Pufferlösung (pH = 8,5). Der Huminsäurekomponent der Böden konnte durch Eluierung mit destilliertem Wasser in 5 Fraktionen getrennt werden. Die Fraktionierung erwies sich als reproduzierbar. Wenn die Untersuchungsbedingungen konstant gehalten werden, kann dieses Verfahren zur Bestimmung der qualitativen Unterschiede in der Huminsäurezusammensetzung der verschiedenen Bodentypen verwendet werden. Die mit Hilfe des Tris-Puffer-Eluanten erhaltene Diagramme wurden zur Bestimmung des approximativen Molekulargewichtes der einzelnen Huminsäurekomponenten angewendet. Zwecks der Molekulargewichtbestimmung wurde die Sephadex-Säule mit sekundären Standardverbindungen (Eiweißstoffe bekannten Molekulargewichtes) kalibriert und mit Hilfe dieser Kalibrationskurve das approximative Molekulargewicht der einzelnen, unter den gleichen Umständen gewonnenen Fraktionen bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, daß die löslichen Huminsäurekomponenten der verschiedenen Bodentypen aus Fraktionen naheliegenden Molekulargewichtes bestanden, ihr Verhältnis war aber je Bodentyp verschieden.

## Фракционирование в гелевых колонках растворимых компонентов гуминовых кислот некоторых отечественных почв

ДБ. ФИЛЭП и Л. ТАТАР

Государственный Институт по контролю за качеством сельскохозяйственных продуктов и почв, Дебрецен и Ниршегский Агротехнический Научно-Исследовательский Институт, Ниредьхаза

### Резюме

Вытяжку гуминовой кислоты, полученную из трех типов почвы — карбонатный луговой чернозем, выщелоченный чернозем и подзолстая бурая лесная почва — смесью 0,1 M пирофосфата натрия + NaOH, фракционировали 2,5 × 45 см-ой колонке Sephadex G-100. В качестве элюирующего вещества использовали дистиллированную воду и солянокислый трис буффер с pH — 8,5. Водной элюцией удалось разделить компонент гуминовой кислоты почвы на пять фракций. Фракционирование оказалось воспроизводимым и в одинаковых условиях исследования может быть использовано для определения качественных различий в составе гуминовых кислот различных почвенных типов. Диаграммы, полученные при элюции гуминовых кислот трис буффером использовали для прибли-

тельного определения молекулярного веса компонентов гуминовых кислот. С этой целью калибровали колонку вторичными стандартами (белками с известным молекулярным весом), затем с помощью кривой, полученной в одинаковых условиях при фильтрации гуминовой кислоты через гелевую колонку, определили молекулярный вес фракций. По данным исследований можно сделать заключение, что в растворимой гуминовой кислоте почвы составляющие фракции имеют подобный молекулярный вес, но соотношение их изменяется в зависимости от типа почвы.

*Табл. 1.* Физические постоянные гелевой колонки Sephadex G-100 использованной для исследований. (1) Название характеристики: объем колонка  $V_t$ , мл; удельный вес набухшего геля  $d$ , г/мл; заряд колонки:  $a, g$ ; количество жидкости реверсильно связанной 1 г ксерогеля:  $Sg$ , г/г.; удельный вес буферного раствора трис при 25 С°:  $E$ , г/мл;  $V_0$  — внешний объем гелевого ложа, мл;  $V_i$  — внутренний объем гелевого ложа, мл. (2) Величины.

*Табл. 2.* Некоторые данные анализа изученных почв. (1) Тип почвы, место залегания. *a)* Карбонатный луговой чернозем, *b)* выщелоченный чернозем, *c)* слабо оподзоленная бурая лесная почва. (2) Глубина взятия образца. (3) Физическая глина. (4) Физический песок. (5) Всего. (6) Гуминовая кислота С. (7) Фульвокислота С. (8) Всего воднорастворимого С, г/10 г почвы. (9) Гуминовая и фульвокислота в % от общего С. (10) Соотношение гуминовой кислоты и фульвокислоты.

*Табл. 3.* Молекулярный вес компонентов гуминовой кислоты. (1) Обозначение фракции. (2) Пределы  $M_s$ . (3) Величина  $M_s$  у пиков.

*Рис. 1.* Кривые световой адсорбции для компонентов гуминовой кислоты. I. Карбонатный луговой чернозем (пятикратное разбавление). II. Выщелоченный чернозем (десятикратное разбавление). III. Подзолистая бурая лесная почва (натуральная вытяжка).

*Рис. 2.* Фракционирование основного раствора гуминовой кислоты из карбонатного лугового чернозема при использовании различных элюирующих веществ. А) 0,05 М щелочной пиррофосфат натрия (рН 11,5). В) Дистиллированная вода. С) Трис буфер (рН 8,5).

*Рис. 3.* Распределение фракций гуминовых кислот на гелевой колонке после элюции первой фракции (у чернозема). Номер фракций: 2: желтобурая, 3: каштановобурая и темно бурая, 4: светло бурая, 5: бурая и желтобурая.

*Рис. 4.* Элюционные диаграммы вытяжек гуминовых кислот при водной элюции. I. Карбонатный луговой чернозем. II. Выщелоченный чернозем. III. Подзолистая бурая лесная почва. Количество фракций 1—5, измеряя при 254, 465 и 665 нм.

*Рис. 5.* Относительное содержание углерода в фракциях (элюция дистиллированной водой). I. Карбонатный луговой чернозем. II. Выщелоченный чернозем. III. Подзолистая бурая лесная почва. По вертикальной оси: количество элюирующей жидкости, %. Порядок фракций 1-5.

*Рис. 6.* Вытяжка гуминовых кислот из изученных почв трис буфером, измерено при 254 и 465 нм. I. Карбонатный луговой чернозем. II. Выщелоченный чернозем. III. Подзолистая бурая лесная почва.

*Рис. 7.* Калибрационная кривая для определения молекулярного веса компонентов гуминовой кислоты. Т — трипсин, Р — пепсин, НГ — гуман гемоклобин, FT — щелочная фосфатаза, GG — гуман серум  $\gamma$  глобулин (Sephadex G-100, вытяжка трис буфером).