

Talajhuminsavak kinyerése és frakcionálása elektroelúciós eljárással

¹MÁDY GYÖRGY, ²BUZÁS ISTVÁN, ¹HAVAS FERENC, ¹SÁNDOR ZOLTÁN és
¹LAKATOS BÉLA

¹MTA Központi Kémiai Kutató Intézete és
²MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

Előző dolgozatunkban /BUZÁS et al., 1989/ termőtalajok és tözgek huminsav-agyagásvány komplexjeinek, illetve humuszanyagainak tetra-metil-ammonium-hidroxid vizes oldatával történő kíméletes kinyerését írtuk le. Jelen munkánkban az organominerális komplexek és natív huminsavak kivonásának szintén nem degradatív, membrán szeparációs elektrodialízissel kombinált elektroelúciós módszerét tárgyaljuk.

Az elektroelúció két elválasztási módszer, az elektroforézises és az egyszerű kimosásos eljárás, vagyis az elúció kombinációja /MORRIS és MORRIS, 1963/. Elektroforézisről /ionforézisről/ beszélünk, ha elektromos töltéssel rendelkező makromolekulák, kolloid, vagy durva szuszpenziós részecskék nagy dielektromos állandójú folyadékban, az egyenáram által létesített homogén elektromos tér hatására az elektródok felé vándorolnak /anaforézis illetve kataforézis/. Az elektroforézises elválasztást általában neutrális, enyhén savas vagy bázisos, vizes pufferoldatban szobahőmérsékleten kis ionerősség mellett, hűtés közben végzik. Az oldatokban végzett ilyen, ún. szabad elektroforézis mellett az elektrodialízis és a gravitációs konvekciók elkerülésére a hordozós elektroforézis is használatos. Az elektrodialízisnél félig átteresztő hárttyával választják el az anód- és katódteret. A hordozós elektroforézisnél a hordozóanyag lehet: papír, azbeszt, pamut-cellulóz, cellulóz-acetát, üvegpors, üvegyöngy, agergél, keményítő, műgyanta, polikrilamid, selyem, stb.

Az elektroforézissel elkülönített anyagokat a hordozóról egyszerűen a vizes pufferoldatba mossák, eluálják.

Az elektroelúciót 1950 óta /GORDON et al., 1950/ széles körben alkalmazzák biopolimerek, mint fehérjék, fehérje-fémkomplexek, savas poliszacharidák, nukleinsavak és degradációs termékeik analitikai és preparatív célú elválasztására /SMITH, 1980; LEE és SINSHEIMER, 1974; ALLINGTON et al., 1978/. Ezen eljárásoknál az elektroforézist követően az egyes frakciók az elválasztó gélnel más-más részére kerülnek. A megfelelő géldarabokból gyakran elektrodialízissel nyerik ki a makromolekulákat /RAYMOND, 1964; ZASSENHAUS et al., 1982; JACOBS és CLAD, 1986; AN DER IAN et al., 1983; HASHIZUME et al., 1984/.

Leírtak olyan preparatív gélelektroforézises módszert is, amelynél az elválasztó gélen átjutó makromolekulák folyadékaramba jutnak, amely azokat

a készülékből folyamatosan eltávolítja. Ezáltal lehetővé válik az egyes molekulafrakciók szeparációja és analízise /MANN és HUANG, 1969/. A különböző molekulafrakciók szétválasztása az elektroelúciót követő elektrodialízissel is megoldható /MORRIS és MORRIS, 1963/, különböző porusméretű félígáteresztő hátrtyák alkalmazásával.

Már a század elején ismertté vált, hogy a talajokból extrahált huminsavak és a humátionok az elektromos térben az anódhoz vándorolnak /ODÉN, 1912/. Később megállapították, hogy az alkálifém- és alkáliföldfém-humátok kivételével a fém-humátok is az anódhoz vándorolnak. Ennek az a magyarázata, hogy míg az alkálifém- és az alkáliföldfém-ionok ionkötéssel, addig a többi fémion erős komplex kötéssel kapcsolódnak a humátanionokhoz /KLEIST, 1963/. Az észlelt elektroforetikus jelenségre alapozva különböző humuszszeparációs módszereket dolgoztak ki: papírelektroforézis /FLAIG et al., 1975/, poliakrilamid gélelektroforézis /GONZALEZ és HUBERT, 1972; KLÖCKING, 1973; CASTAGNOLA et al., 1978, 1979; MORA DE GONZALEZ, 1981/, elektrofókusztáló módszer /CACCO et al., 1974; GJESSING és GJERDAHL, 1972/, izotakoforézis /CURVETTO et al., 1974; CURVETTO és ORIOLI, 1982; ORIOLI és CURVETTO, 1980/, elektrodialízis /DESAI, 1980; DORMAAR, 1967; LÖDDESÖL, 1932/. Ezek segítségével különböző elektroforetikus mozgékonyaságú: fulvosav, himátomelánsav, barna és szürke huminsavfrakciókat sikerült elkülöníteni, de a humuszanyagok igen heterogén volta nagyon megnehezítette az elektroszeparációs módszerek humuszanyagok elkülönítésére történő alkalmazását. Így pl. THORNTON /1975/ megkérdőjelezte az izoelektromos fókusztálás és az izotakoforézis használhatóságát. A humuszanyagok nagy érzékenysége és heterogenitása miatt az újabb módszerek, mint az affinitás-elektroforézis /ANDREWS, 1988/, vagy az elektroultrafiltráció /NÉMETH, 1976/ sem alkalmasak a talaj humuszvegyületeinek natív formában történő kinyerésére és elválasztására.

A talajhuminsavak natív formában történő kinyerésére és szeparálására az elektroelúció és az elektrodialízis kombinálásával új módszert dolgoztunk ki.

Vizsgálati anyag és módszer

Vizsgálatainkat az alábbi mintákkal végeztük:

- a/ Savanyú homoktalaj, Nyírlugos;
- b/ Barna erdőtalaj, Keszthely;
- c/ Barna erdőtalaj, Putnok;
- d/ Csernozjom, Kompolt;
- e/ Csernozjom, Mezőhegyes;
- f/ Csernozjom, Nagyhörccsök;
- g/ Réti csernozjom, Mosonmagyaróvár;
- h/ Réti talaj, Hosszúhát;
- i/ Réti talaj, Iregszemcse;
- j/ Meszes homoktalaj, Kecskemét;
- k/ Síkláptőzeg, Keszthely;
- l/ BIO-VEGETAL "humusztrágya", Tersanpuiglia Olaszország
/85 % olivamag pogácsa, szőlőtörköly, szalma, cukorrépa-hulladék,
növényi levelek, 15 % oltóanyag/;
- m/ COFUNA "humusztrágya", Badacsonyi Á. G. Aszófő /70 % szőlőtörköly,
20 % baromfitrágya, 10 % oltóanyag/;
- n/ Meszes homoktalaj, Űrbottyán.

A talajminták és talajextraktumok szervesanyag-tartalmát kronátos módszerrel határoztuk meg. Ennél az eljárásnál a talajmintában lévő szerves anyagot ismert mennyiségű fölös $K_2Cr_2O_7$ -tal oxidáltuk, majd a fölös $K_2Cr_2O_7$ -ot krom-III-titrimetrián, illetve a keletkezett krom-III-ionokat

kolorimetriásan meghatároztuk. A módszert glükózzal kalibráltuk. Az eljárással a talajban található valamennyi oxidálható anyag együttes mennyiségét kapjuk meg.

A talajkivonatokban oldott humuszanyagok humifikációjának mértékéül a színkvocienst, a

$$Q = \frac{E_{465}}{E_{665}}$$

extinkció-hányadost használtuk /WELTE, 1955/. Ez az érték a humifikáció,

1.

/1/ Vizsgált talaj- minta	A különböző eljárásokkal kivont szerves						
	/2/ Összes szerves- anyag- tartalom mg C/g	/3/ A különböző oldószerekkel kivonható szerves anyag mennyisége mg C/g talaj ill. az összes %-ában					
		I 0.1 M NaOH /pH = 13/ 24 óra		II 0.1 M Na ₄ P ₂ O ₇ /pH = 10/ 24 óra		III 0.1 M Na ₄ P ₂ O ₇ 0.07 M H ₃ PO ₄ /pH = 7.0/ 3.5 óra	
	100 %	mg C/g	%	mg C/g	%	mg C/g	%
a/ Savanyú homoktalaj Nyírlugos	3.90	0.3	7.3	0.6	14.6	0.7	17.5
b/ Barna erdőtalaj Keszthely	10.63	0.8	7.7	1.9	17.6	1.0	9.5
c/ Barna erdőtalaj Putnok	13.65	1.9	13.7	3.3	23.9	2.0	14.5
d/ Csernozjom Kompolt	19.41	2.8	14.5	5.1	26.4	2.8	14.4
e/ Csernozjom Mezőhegyes	27.46	1.1	4.1	5.0	18.3	3.0	11.2
f/ Csernozjom Nagyhörcsök	21.80	1.0	4.7	3.5	16.0	2.3	10.4
g/ Réti csernozjom Mosonmagyaróvár	10.91	0.7	6.7	1.3	12.2	0.9	8.2
h/ Réti talaj Hosszúhát	23.40	1.9	8.2	5.0	21.4	2.5	10.6
i/ Réti talaj Iregszemcse	17.73	0.9	4.9	2.3	13.3	1.5	8.6
j/ Meszes homoktalaj Kecskemét	2.49	0.5	21.0	0.3	12.1	0.4	15.9
k/ Síkláptőzeg Keszthely	304.9	142.0	46,6	110.7	36.3	69.0	22.6
l/ BIO-VEGETAL	240.2	23.5	9.8	26.2	10.9	16.4	6.9
m/ COFUNA	336.5	69.5	19.0	40.4	11.0	22.6	6.2

azaz a kondenzáció foka, illetve a molekulatömeg növekedésével csökken /SCHNITZER és KHAN, 1972; STEVENSON, 1982; AIKEN et al., 1985/. A Q-értéke fulvosavaknál 6,0-8,5; barna huminsavaknál 5,0-5,5; míg szürke huminsavaknál 2,2-2,8. Podzolos talajoknál 5,0; csernozjomoknál 3,0-3,5; szürke erdőtalajoknál alig 3,5. Méréseinket 0,1 mol/dm³ nátrium-pirofoszfát és 0,07 mol/dm³ foszforsav pH = 7,0 értékű pufferoldatban végeztük. A kapott értékek nagyobbak, mintha a méréseket CHEN és munkatársai /1977/ szerint 10 cm³ 0,05 mol/dm³ nátrium-hidrokarbonát vizes oldatában végeztük volna /lásd 1. táblázat/.

táblázat
anyagok mennyiségének összehasonlítása

/4/							
Az elektroelúcióval kivonható szerves anyag szinkvociense /Q/ és mennyisége, mg C/g talaj ill. %-ban /0.1 M Na ₄ P ₂ O ₇ + 0.07 M H ₃ PO ₄ pH = 7.0 puffer; 80 V; 3.5 óra							
/5/ Whatman GF/B szűrő huminsav + fulvosav				/6/ Kalle celofán szűrő fulvosav			/7/ huminsav/ fulvosav arány
Q = E ₄₆₅ E ₆₆₅	mg C/g	%	a III. módszerrel kivont %-ában	Q = E ₄₆₅ E ₆₆₅	mg C/g	%	
5.9	0.6	16.6	94.6	10.4	0.5	13.3	0.24
5.6	1.8	17.3	182.3	11.8	0.9	9.0	0.89
6.1	2.8	20.3	139.8	17.4	1.5	10.9	0.86
5.5	4.0	20.5	142.0	10.7	1.4	7.2	1.83
5.5	3.8	14.1	125.7	14.5	1.7	6.2	1.26
5.6	3.5	16.1	154.3	13.8	1.6	7.3	1.21
4.7	1.3	12.4	151.3	10.7	0.8	7.8	0.58
5.1	3.3	14.1	133.5	12.5	1.2	5.2	1.71
5.9	2.3	13.2	154.0	14.2	1.2	6.9	0.90
5.6	0.3	12.1	76.1	-	0.3	12.3	-
7.5	59.9	19.6	86.8	9.7	28.6	9.4	1.09
7.7	15.1	6.3	90.9	10.3	7.9	3.3	0.92
9.0	23.5	6.4	104.2	12.0	9.8	2.7	1.41

Az általunk kidolgozott elektroelúciós /EE/ módszerrel való összehasonlítás érdekében a minták humuszanyagainak extrahálására három különböző kivonószert alkalmaztunk: $0,1 \text{ mol/dm}^3$ nátrium-hidroxidot /pH=13; I-módszer/, $0,1 \text{ mol/dm}^3$ nátrium-pirofoszfátot /pH=10; II-módszer/, valamint $0,1 \text{ mol/dm}^3$ nátrium-pirofoszfát és $0,07 \text{ mol/dm}^3$ foszforsav puffert /pH=7,0; III-módszer/. Az elektroelúciós kivonást is a fenti pH=7-es nátrium-pirofoszfát-foszforsav pufferben végeztük /l. táblázat/.

A kutatási célra kifejlesztett elektroelúciós készülék leírása

Talajok, tőzegek, mesterséges növényi tápközégek szerves anyagának nem degradatív extrahálására, a szerves anyag összetételének tudományos igényű meghatározására szolgáló elektroelúciós-elektrodialízises készülék /MÁDY et al., 1984/ három fő részből áll /l. ábra/: az anódtér, a katódtér, valamint a közöttük elhelyezkedő minta- és elúciós terek.

A speciális membrán szűrőréteg biztosítja a huminsavak szeparálását a nagyobb méretű szerves és szervesetlen kolloidoktól. A vizsgálni kívánt huminsavfrakciót az elúciós kamrákból az elektroforézis irányára merőleges irányú puffer-folyadékárammal kimossuk és analízis céljából összegyűjtjük.

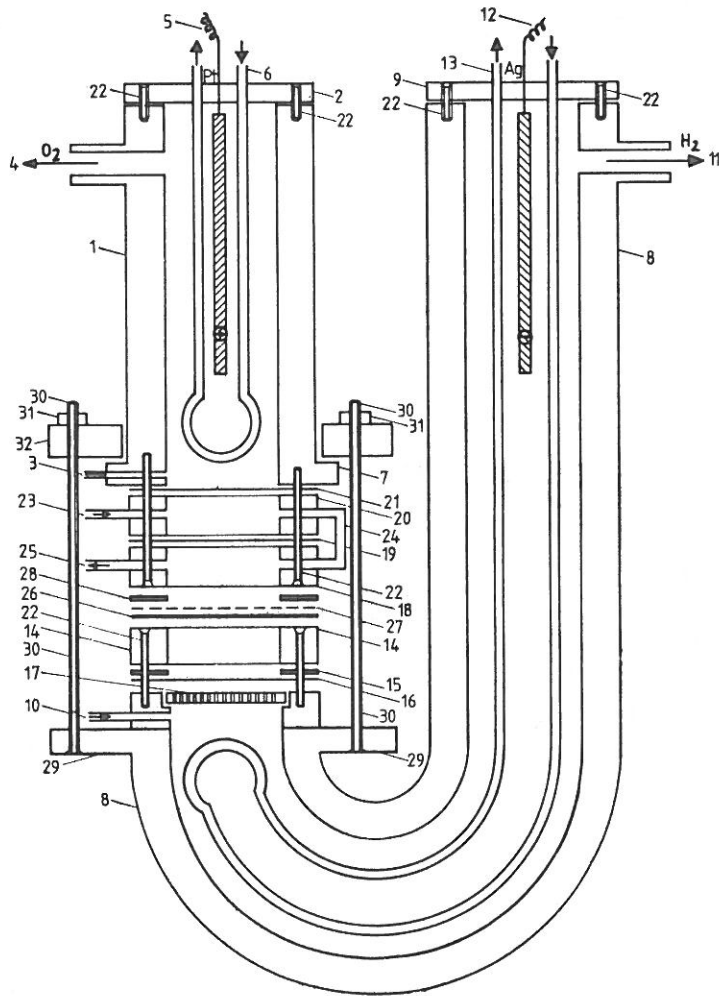
A munka során a 2. ábrán látható mérőrendszert használtuk, amely a következő egységeket tartalmazza: elektroelúciós készülék /I/, reagensoldattartály /II/, többcsatornás kromatográfiás szivattyú /III/, frakciókolektor /IV/, elektronos tápegység /V/, ultratemosztát /VI/.

Az 1. ábrán feltüntetett elektroelúciós készülék anódtérét /I/ és katódtérét /8/ összeszereljük. 1 g talajmintát $0,1 \text{ cm}^3$ pufferoldattal megnedvesítünk, majd 30 perc állást követően kvantitatíve a mintatartó kamrába /14/ visszük. A kamrába kevés pufferoldatot teszünk és azon buborékmentesen elhelyezzük a speciális szűrőréteget /26/. Ezt követően felhelyezzük az anódtérrel /1/, melyet anyák /31/ segítségével rögzítünk. A pufferoldatokat szállító csöveket csatlakoztatjuk, majd az egyenáramot bekapcsolva a vizsgálatot megkezdjük. A készülékből eltávozó pufferoldatot, amely a talajextraktumot tartalmazza, frakciókolektorban /IV/ gyűjtjük, annak szervesanyag-tartalmát az előzőekben leírtak szerint analizáljuk.

A rutinvizsgálatokhoz kifejlesztett elektroelúciós készülék ismertetése

A szabad és gyengén kötött /könnyen mobilizálható/ humuszanyag-frakció gyors meghatározására egyszerre több talajmintát vizsgáló /rutin/ készüléket /MÁDY et al., 1987/ dolgoztunk ki.

A rutin elektroelúciós készülékben /3. ábra/ vertikális elrendezésben elválasztó csövek /1/ helyezkednek el /max. 10 db / a katód /K/ és az anód /A/ terek között. Mindkét elektród tere azonos pufferoldatot /pH = 7-10/ tartalmaz. Az elválasztó csövek anódtérbe merülő alsó részét a folyadék átfolyásának megakadályozása végett porózus szűrőlap /2/ és az arra helyezett celofánréteg /3/ zárja le, melyet gumigyűrű /4/ rögzít. Az elválasztó csöveket az elektród tereket kitöltő pufferoldatban szuszpendált huminanyagokat nem adszorbeáló inert hordozó /5/ pl. kvarc, üveg, műanyag vagy keményítő por tölti meg. Az elválasztócső felső végét /6/ egy műanyag fejben csavar /7/ és szigetelő gyűrű /8/ segítségével rögzítjük. Az elválasztócső felső végét a műanyag fejben porózus lemez /9/ fedi le, ennek felső felére került a kontrollált pórusméretű membrán szűrőréteg /10/, amelyet műanyag gyűrű /11/ rögzít. A műanyag gyűrű üregébe történik a pufferoldatban szuszpendált $0,1-0,2$

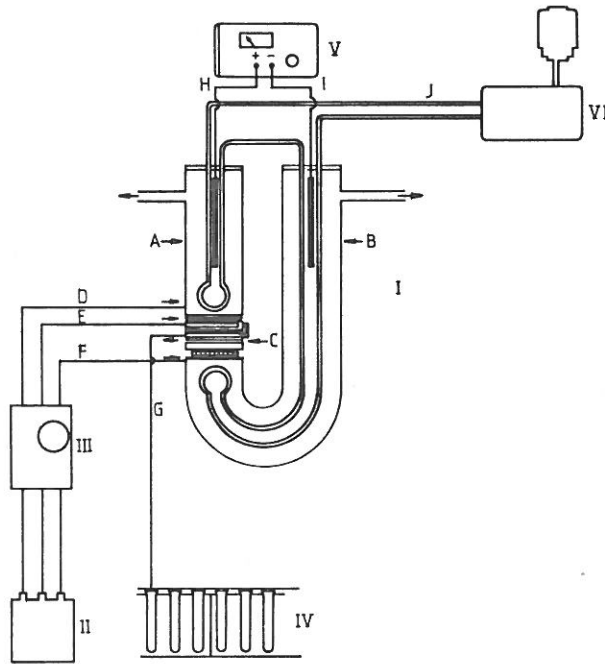


1. ábra

Kutatási elektroelúciós készülék. 1. Anódtér. 2. Fedőlap. 3. Alsó bevezető csomk. 4. Felső elvezető csomk. 5. Pt-elektrod. 6. Üveg hűtőcső. 7. Perem. 8. Katódtér. 9. Fedőlap. 10. Alsó bevezető csomk. 11. Felső elvezető csomk. 12. Ag-elektrod. 13. Vékonyfalú műanyag hűtőcső. 14. Mintatartó kamra. 15. Tömítő lemez. 16. Cellofán réteg. 17. Pórusos szűrőréteg. 18. Alsó elúciós kamra. 19. Cellofán réteg. 20. Felső elúciós kamra. 21. Cellofán réteg. 22. Műanyag csavarok. 23. Bevezető csomk. 24. Átömlő csatorna. 25. Kivezető csomk. 26. Speciális szűrőréteg. 27. Műanyag szitaszövet. 28. Tömítő lemez. 29. Perem. 30. Átmenő csavar. 31. Anya csavar. 32. Műanyag szorító lemez

g talajminta /S/ elhelyezése. A szuszpendált talajmintát a /12/ porózus réteg fedi le. A mintát tartalmazó elválasztó csöveket a katódtér alsó részén kiképzett lyukakba /13/ helyezük, amelyekben a rögzítést és a folyadék szigetelését gumigyűrűk /14/ látják el.

Az elektromos áram /40-100 V/ bekapcsolása után a talajminta anionos komponensei az anód irányába elmozdulnak. A szűrőn /10/ áthaladva az elvá-



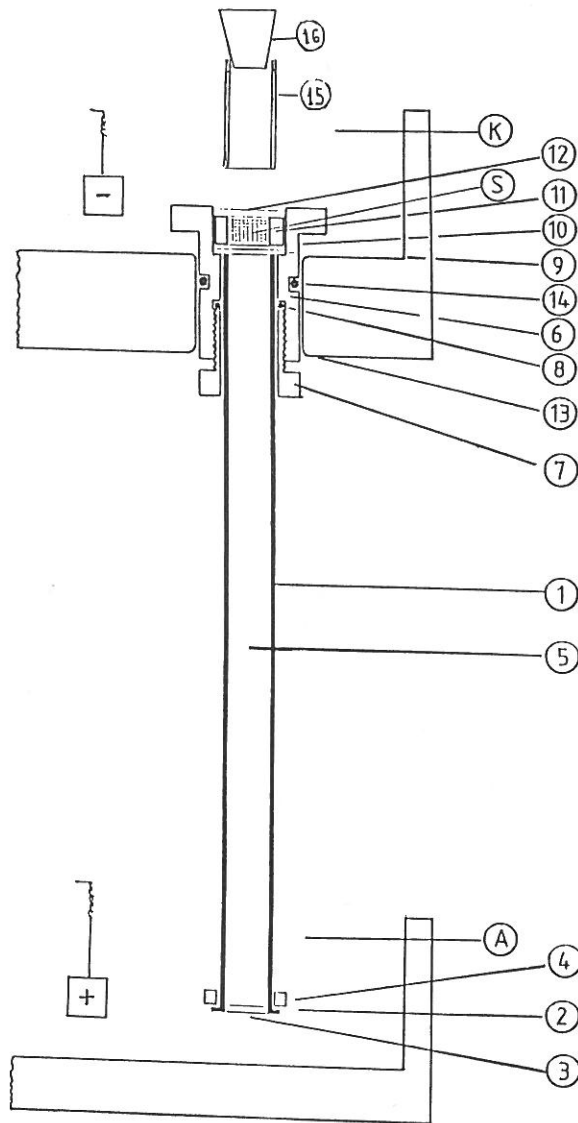
2. ábra

Mérőrendszer az elektroelúciós készülékhez. I. Elektroelúciós készülék. II. Reagensoldat-tartály. III. Többcsatornás kromatográfiás szivattyú. IV. Frakciókollektor. V. Elektromos tápegység. VI. Ultratermosztát. A. Anódtér. B. Katódtér. C. Speciális szűrőréteg. D,E,F. Csatlakozó szilikongumi csövek. H,I. Csatlakozó elektromos vezetékek. J. Ultratermosztáthoz csatlakozó hűtőcső

lasztó csövet kitöltő inert hordozó közötti pufferoldatba vándorolnak. A huminanyagok elválasztása 3-4 órát vesz igénybe. Egyszerre 10 db csővel lehet dolgozni.

A feszültség kikapcsolása után az elválasztó csöveket a készülékből kiemeljük, majd a talajmintát, a szűrőréteget /10/ és a folyadékáramlást megakadályozó celofánréteget /3/ eltávolítva, pufferoldat áramoltatásával a leválasztott anyagok a csőben lévő inert hordozóból kimoshatók.

Az elválasztócsőből eltávozó oldatot mérőlombikba gyűjtjük és törzsoldatot készítünk, melynek szervesanyag-tartalmát az előzőekben leírtak szerint határoztuk meg.



3. ábra

Rutin elektroelúciós készülék. A. Anódtér. B. Katódtér. S. Talajminta. 1. Elválasztócső. 2. Porózus szűrő. 3. Cellofán réteg. 4. Gumigyűrű. 5. Inert hordozó. 6. Műanyag fej. 7. Csavar. 8. Szigetelő gyűrű. 9. Porózus szűrőágy. 10. Kontrollált membrán. 11. Műanyag gyűrű. 12. Porózus réteg. 13. Lyuk az elválasztócső számára. 14. Gumi szigetelő gyűrű. 15. Töltő üvegcső. 16. Gumi dugó

Az eredmények értékelése

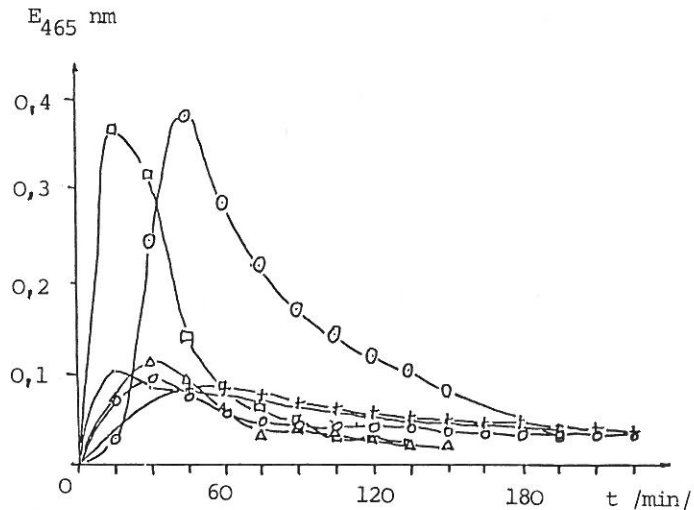
A membrán szeparációs technikával kombinált elektroelúciós készülékekkel történő vizsgálatot alapvetően három paraméter befolyásolja: az alkalmazott elektromos áram /intenzitása, feszültsége és az áram hatásának ideje/, az alkalmazott membrán-szűrő átteresztőképessége és a vizsgálatnál használt puffer összetétele. Az alább ismertetett méréseknél a kutatási célokra kifejlesztett elektroelúciós készüléket használtuk.

A 4. ábrán egy méréstechnikailag nehezen kezelhető talaj, a hosszúhátú réti talaj vizsgálati eredményeit ismertetjük. A talajminta szervesanyag-tartalma 3,4 %, agyagtartalma 44,5 % volt. A nagy agyagtartalom kedvezőtlen, mivel a mérés során a membrán eltömődhet. A hosszúhátú réti talajra vonatkozó mérési eredmények bemutatásával egyúttal szeretnénk azt is bizonyítani, hogy az eljárás még az ilyen nagy agyagtartalmú talajoknál is alkalmazható.

Elsőnek az alkalmazandó elektromos feszültséget határoztuk meg. Ehhez 7,4 pH-jú citrát-puffert használtunk /0,1 M citromsavat 400 cm³ vízben feloldottunk, karbonátmentes 1 M nátrium-hidroxiddal beállítottuk a pH-t 7 értékre. A desztillált vízzel 1000 cm³-re feltöltött oldat pH-ja 7,4 lett./.

Membránként a nagy, 50000 D molekulatömeg átteresztőképességű Pierce dializáló hárttyát használtuk. Az elektromos feszültség és a leválasztott szervesanyag-mennyiség összefüggést 20, 40, 60, 80, 100 és 120 V-os feszültségek alkalmazásával vizsgáltuk /4. ábra/. Megállapítható volt, hogy a leválasztott szerves anyag mennyisége csak 100, 120 V feszültségek hatására lesz jelentékeny. Alkalmazandó feszültségként a 100 V-ot választottuk, mivel 120 V-nál már a hűtés nem tudta a melegedést kompenzálni. A 4. ábrán látható, hogy 3-3,5 órás elektroelúció elég a humuszanyagok kinyeréséhez.

Az elektromos feszültség és az elektroelúció idejének meghatározása után a membrán-szűrő kiválasztása következik. A membrán-szűrő feladata az elekt-

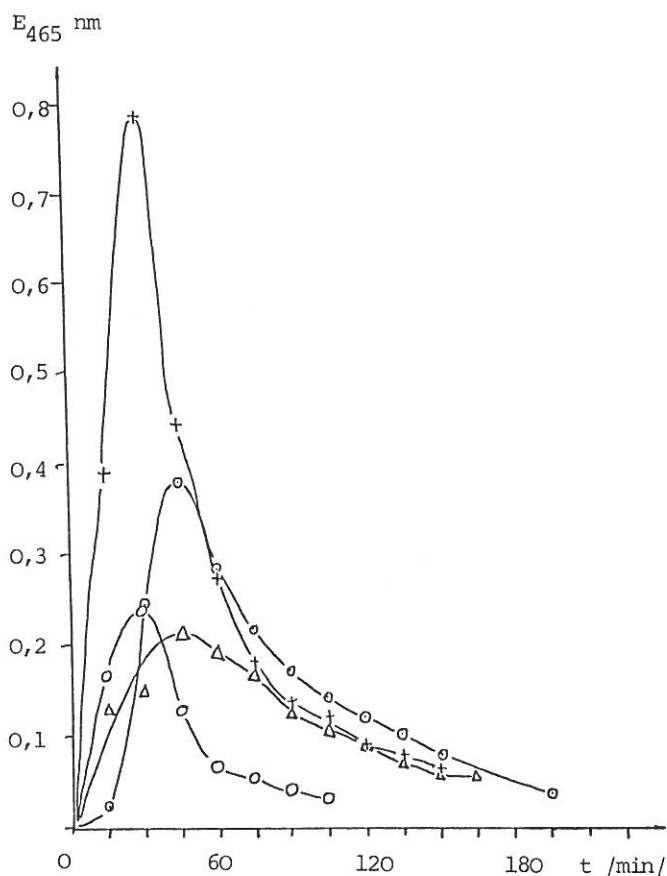


4. ábra

Hosszúhátú réti talajból elektroelúcióval kioldott humuszanyag mennyisége az alkalmazott feszültség és az elektroelúció idejének függvényében Pierce cellofán szűrővel és citrát pufferben /pH = 7,4/. (+) 20 V; (o) 40 V; (*) 60 V; (x) 80 V; (o) 100 V; (□) 120 V

romos áram hatására elmozduló durva talajrészecskék visszatartása és a humuszanyagok frakcionálása. A mérés során a következő membrán-szűrőket próbáltuk ki: a már említett Pierce 5000-D cellofán szűrőt, a Kalle gyártmányú, kb. 5000 D móltömég áteresztőképességű dializáló hárttyát, a Vogel gyártmányu, kb. 20000 D móltömég áteresztőképességű univerzális EUF szűrőt és a Whatman gyártmányú GF/C ill. GF/B jelzésű és igen nagy áteresztőképességű 1μ pórusméretű üveg "szűrőpapírt" /5. ábra/. A kivont szerves anyagok mennyiségét a 465 nm hullámhossznál mért extinkció mutatja /LAKATOS et al., 1974; SIPOS et al., 1974/. A kalibrációs görbe a 6. ábrán látható.

A Whatman szűrő a mechanikai igénybevételt nehezen viselte el, ezért kettős rétegben kellett alkalmaznunk. A Whatman üveg szűrőpapír csak az agyagszemcséket tartotta vissza. A Kalle membrán-szűrő viszont csak a kis molekulatömegű /5000 D-nál kisebb/ fulvósavakat engedi át, a többi szerves alkotót /himatomelánsav, barna és szürke huminsavak/ visszatartja. A kétfé-



5. ábra

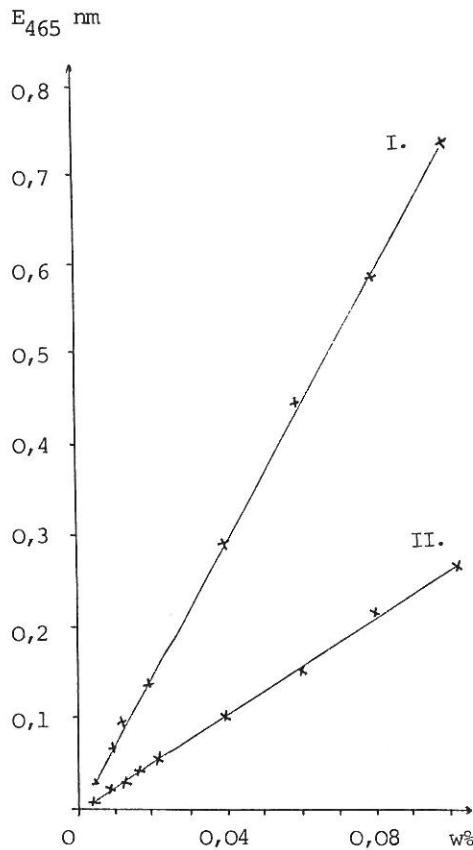
Hosszúhátú réti talajból elektroelúcióval kioldott humuszanyag mennyisége az elektroelúció idejének függvényében különböző membránszűrők alkalmazásával /pH = 7,4/. (○) Pierce cellofán. (△) Kalle szűrő. (◊) Vogel EUF szűrő.

(+) Kettős Whatman szűrő

le /Kalle, Whatman/ szűrő alkalmazásával tehát mód van a talaj fulvósav- és huminsavtartalmának egyszerű, nem degradatív, gyors kinyerésére és elválasztására.

Az alkalmazott puffer feladata, hogy a mérés alatt biztosítsa a talaj eredeti állapotának megfelelő pH-t, tehát kompenzálja az elektroforézis során fellépő pH-változást. A vizsgálatoknál megállapítottuk, hogy az alkalmazott citrát-puffer nem képes kompenzálni az elektroelúció során fellépő pH-változást $\Delta\text{pH}=1$. Ezért a nagyobb pufferkapacitású citrát- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ puffert alkalmaztuk $0,05\text{ M Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -ot és $0,05\text{ M}$ citromsavat oldottunk 400 cm^3 vízben, 1 M nátrium-hidroxiddal 7-re állítottuk a pH-ját és 1000 cm^3 -re hígítottuk. Az oldatban $\text{pH}=7,5$ értéket mértünk. Ilyen puffer alkalmazása mellett nem tapasztaltunk mérhető pH-változást.

A humuszanyagok jobb kivonhatósága érdekében karbamidot adtunk a citrát- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ pufferhez, ugyanis a karbamid erősen dezaggregáló hatású $0,05\text{ M}$ citromsavat, $0,05\text{ M Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -ot és 300 g karbamidot feloldottunk 400 cm^3 desztillált vízben, 1 M nátrium-hidroxiddal $\text{pH} = 7$ -re állítottuk az oldatot

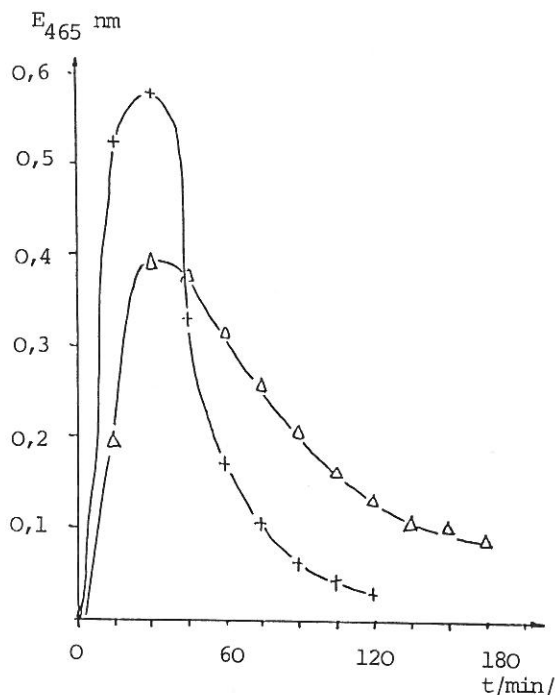


6. ábra

A humuszanyag-koncentráció és $E_{456\text{ nm}}$, a 465 nm hullámhossznál mért fényelnyelés összefüggése. I. Huminsav és II fulvosav standard /LAKATOS et al., 1974/. (w%) a vizes oldat súlyszázaléka

és desztillált vízzel 1000 cm³-re töltöttük fel, így a pH = 7,2 lett/. A 7. ábra szemlélteti a citrát-nátrium-pirofoszfát-karbamid puffer mellett a hosszúhíati réti talajból kivont fulvósav ill. huminsav mennyiségét.

A nagyhörcsöki mészlepedékes csernozjom talaj agyagtartalma 23,1 %, kromátos módszerrel meghatározott szervesanyag-tartalma 2,18 %-nak adódott.



7. ábra

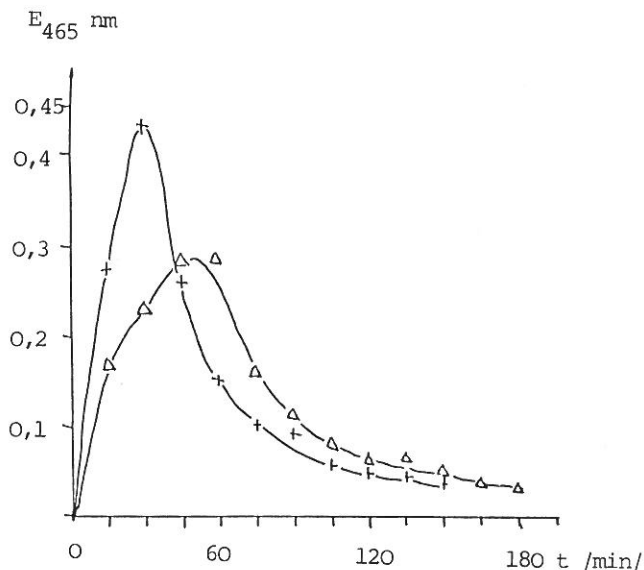
Hosszúhíati réti talajból elektroelúcióval kioldott fulvósav /Kalle szűrő/ és huminsav + fulvosav /Whatman szűrő/ mennyisége az elektroelúció idejének függvényében citrát-nátrium-pirofoszfát-karbamid pufferban /pH = 7,2/ 100 V feszültség mellett. (+) Kettős Whatman szűrő. (Δ) Kalle szűrő

Az elektroelúciós eljárással 100 V-on citrát-nátriumpirofoszfát pufferban Whatman szűrővel 16,1 % szerves anyagot tudunk 160 perc alatt kivonni belőle /8. ábra/. Ugyanolyan feszültség és puffer alkalmazása mellett az örbottyáni homoktalajból /szervesanyag-tartalma 0,91 %/ 75 perc alatt közel a teljes szervesanyag-mennyiség kivonható volt elektroelúcióval /9. ábra/. Az örbottyáni homoktalaj tehát kevés humuszanyagot tartalmaz, ugyanakkor ez a csekély szervesanyag-tartalom rendkívül könnyen mobilizálódik.

Az ismertetett eljárással a termőtalajokból nem degradált fulvósav-ill. huminsavfrakciókat lehet kivonni. Ezek kémiai analitikai, móltömeg eloszlási, valamint szerkezeti /infravörös abszorpciós spektrometriás, elektronspin rezonanciás, mágneses rezonanciás, tömegspektrometriás/ vizsgálatával lehetőség van arra, hogy valóságghú képet kapjunk a talajban lévő szerves anyagokról. Az elektroelúciós görbe alakja az agyagásvány-szerves anyag kötések erősségéről, illetve ezen organominerális kötések erősség szerinti megoszlásáról ad felvilágosítást.

A rutin elektroelúciós készülékkel 13 különféle mintát, köztük két "humusztrágya" vizsgálatát végeztük el /1. táblázat/.

Az 1. táblázatból megállapítható, hogy az elektroelúciós eljárással pH=7 mellett közel azonos szervesanyag-mennyiséget lehet kivonni, mint a közismerten jó hatásfokú, azonban kissé degradáló nátrium-pirofoszfátos



8. ábra

Nagyhörcsöki mészlepedékes csernozjom talajból elektroelúcióval kioldott fulvosav /Kalle szűrő/ és huminsav + fulvosav /kettős Whatman szűrő/ mennyisége az elektroelúció idejének függvényében citrát-nátrium-pirofoszfát puffer /pH = 7,2/ 100 V feszültség mellett. (+) Kettős Whatman szűrő. (Δ) Kalle szűrő

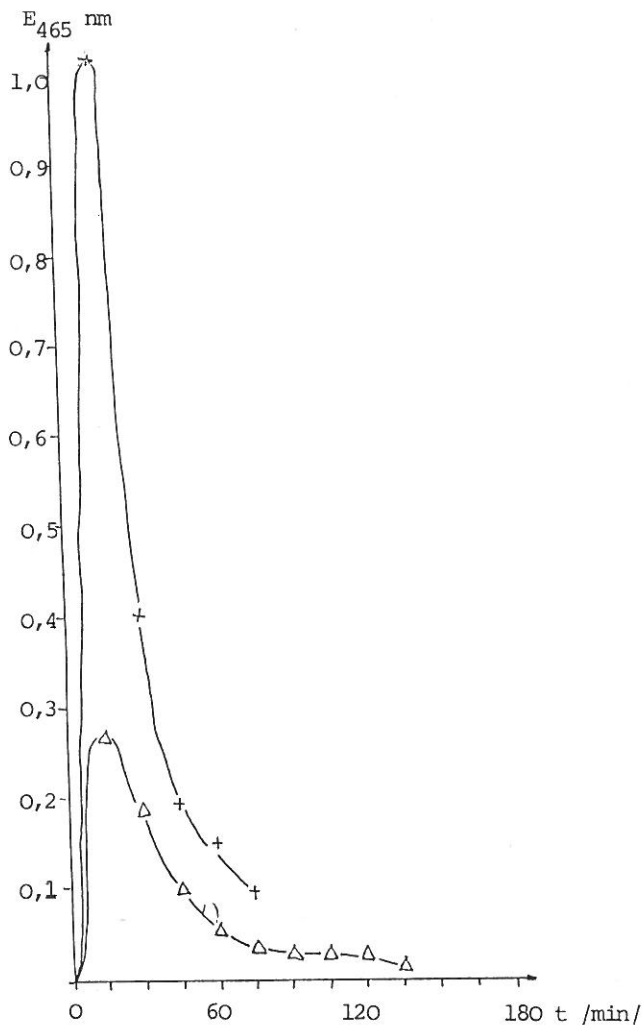
/II-módszer/ extrakcióval pH=10-nél. A 7-es pH-jú nátrium-pirofoszfát-foszforsav pufferrel /III-módszer/ extrahálható szervesanyag-mennyiség a minták nagyobb részénél lényegesen megnő az elektromos áram hatására, de a többi esetben is közel azonos. Ez jól látszik, ha a táblázat 5. oszlopának adatait összehasonlítjuk a 7. illetve a 8. oszlop adataival.

A Q színkvocienseket összehasonlítva megállapítható, hogy a fulvosavakat ténylegesen sikerült elválasztani, mivel a Kalle-szűrő alkalmazásakor valóban a fulvosavakra jellemző 10-nél nagyobb Q-értékeket kaptunk.

Egyszerűsége mellett az elektroelúciós módszer nagy előnye az extrakciós eljárásokkal szemben, hogy nem lépnek fel az esetenként alig megoldható szűrési problémák. Az extraktumokból emiatt gyakran nem különíthetők el teljesen a finom agyagrészecskék. Az elektroelúciós eljárásnál már a mikro-szűrőkön átjutó tiszta frakciókat kapjuk. Ilyen finom szűrők alkalmazása elektromos áram nélkül gyakorlatilag lehetetlen lenne.

Az extrakciós módszereknél a fulvosav elválasztása a huminsavaktól savanyítással történik. Megállapodás szerint fulvosavaknak nevezzük azt a szervesanyag-frakciót, amely a savanyú /pH=1-2/ közegben is vizes oldatban marad.

Az elektroelúciós eljárásnál a szűrők segítségével valóban molekulatömeg szerint szeparálunk pH=7-nél, tehát további finomítást jelent, hogy a szerves anyagok a teljes szeparáció alatt is natív állapotban vannak. Az így kapott reálisabb huminsav-fulvosav arányokat az 1. táblázat 11. oszlopában tüntettük fel.



9. ábra

Az őrbottyáni homoktalajból elektroelúcióval kioldott fulvosav /Kalle szűrő/ és huminsav + fulvosav /kettős Whatman szűrő/ mennyisége az elektroelúció idejének függvényében citrát-nátrium-pirofoszfát pufferben /pH = 7,4/ 100 V feszültség mellett. (+) Kettős Whatman szűrő. (Δ) Kalle szűrő

Összefoglalás

A talajok, tőzegek és humusztrágyák szerves anyagának nem degradatív kinyerésére egy membrán-szeparációs elektrodiálízissel kombinált elektroelúciós készüléket állítottunk össze, melynek segítségével alkalmasan választott vizes pufferoldatokban szobahőmérsékleten, megfelelő membrán-szűrő segítségével közel kvantitatív kitermeléssel analízisre és szerkezetvizsgálatra alkalmas frakciók nyerhetők. E készülék rutin változata alkalmas nagyobb számú minta gyors, rutinanalízisére. Munkánkban bemutattuk a készülékkel történő mérést és a módszerrel nyert szervesanyag-frakciók segítségével jellemeztük a kiindulási mintákat.

Irodalom

- AIKEN, G. R. et al., 1985. Humic Substances in Soil, Sediment and Water. J. Wiley, N. Y.
- ALLINGTON, W. B. et al., 1978. Electrophoretic concentration of macromolecules. Anal. Biochem. 85. 188-196.
- AN DER LAN, B. et al., 1983. An improved and simplified apparatus for protein extraction and concentration from gel slices, using moving boundary electrophoresis. Electrophoresis. 4. 335-337.
- ANDREWS, A. T., 1988. Electrophoresis. Clarendon Press. Oxford.
- BUZÁS I. et al., 1990. Natív huminsav-agyagásvány komplexek kinyerése kémiai extrakciós módszerrel. Agrokémia és Talajtan. 39.
- CACCO, G., MAGGIONI, A. and FERRARI, G., 1974. Electrofocusing: A new method for characterization of soil humic matter. Soil Biol. Biochem. 6. 145-148.
- CURVETTO, N. R., BALMACEDA, N. A. and ORIOLI, G. A., 1974. Isotachopheresis and isoelectric focusing of soil humic substances in polyacrylamide gel. J. Chromatogr. 93. 248-250.
- CURVETTO, N. R. and ORIOLI, G. A., 1982. Elektrophoretic subfractionation of low and high molecular weight humic acids fractions. Plant and Soil. 66. 205-215.
- CASTAGNOLA, M. et al., 1978. Effect of urea on electrophoretic pattern of soil humic acids. J. Chromatogr. 147. 438-442.
- CASTAGNOLA, M. et al., 1979. Characterization of soil humic acid by polyacrylamide disc electrophoresis and chromatic reactions. J. Chromatogr. 177. 130-134.
- CHEN, Y., SENESI, N. and SCHNITZER, M., 1977. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41. 352-358.
- DESAI, M. V. M., 1980. Humic substances in the marine environment: Physicochemical characteristics and interaction properties. In: Management of Environment. 260-274. Wiley Eastern Ltd., New Delhi.
- DORMAAR, J. F., 1967. Infrared absorption spectra of mineral matter derived from electrolysed humic acids. Geoderma, 1. 131-138.
- FLAIG, W., BEUTELSPACHER, H. and RIETZ, E., 1975. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: Soil Components. Vol. 1. /Ed.: GIESEKING, I. E./ 31-34. Springer Verlag. N. Y.
- GJESSING, E. T. and GJERDAHL, T., 1972. Electromobility of aquatic humus: fractionation by the use of the isoelectric focusing technique. Proc. Int. Meet. Humic Subst. Nieuwersluis. Pudoc, Wageningen. 43-51.
- GONZALEZ, A. et HUBERT, G., 1972. Propriétés chimiques et physiques de la Matière Organique Nondialysable extraite de Quatre Podzols du Québec. Can. J. Soil Sci. 52. 1-17.

- GORDON, A. H. et al., 1950. Electrophoresis of protein in agar jelly. *Nature*. 164. 498-499. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 15. 1-16.
- HASHIZUME, S. et al., 1984. Electrophoretic extraction-concentration of proteins from polyacrylamide gels under alkaline, neutral and acidic conditions. *Electrophoresis*. 5. 30-34.
- JACOBS, E. and CIAD, A., 1986. Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels into a membrane trap. *Anal. Biochem.* 154. 583-589.
- KLEIST, H., 1963. Untersuchungen über den Ladungszustand einiger Metallionen in Gegenwart von Huminsäuren. *Acta biol. med. germ.* 11. 156-163.
- KLÖCKING, R., 1973. Ein System zur Polyacrylamid gelektrophorese von Huminsäuren. *J. Chromatogr.* 78. 409-416.
- LAKATOS B., MEISEL T-né és MÁDY Gy. 1974. Biopolimer-fém komplex rendszerek I., Kísérletek nagytisztaságú tőzeg humuszanyagok és fémkomplexeik előállítására. *Agrokémia és Talajtan.* 23. 505-522.
- LEE, A. S. and SINSHEIMER, R. L., 1974. A continuous electroelution method for the recovery of DNA restriction enzyme fragments.
- LÖDDESÖL, A., 1932. Factors affecting the amount of electro-dialyzable ions liberated from some soils. *Soil Sci.* 33. 187-209.
- MÁDY Gy. et al., 1984. Berendezés szuszpenziók, különösen a termőtalajok szervesanyag- és kolloidtartalmának meghatározására. Találmányi bejelentés: 195.338.
- MÁDY Gy. et al., 1987. Készülék szerves trágyák, tőzgek és talajok könnyen mobilizálható huminanyag-tartalmának rutinszerű meghatározására. Találmányi bejelentés: 197.632.
- MANN, M. B. and HUANG, P. C., 1969. An elution attachment for analytical polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 32. 138-144.
- MORA DE GONZALEZ, N., CASTAGNOLA, M. and ROSSETTI, D., 1981. Humic acid characterization of Colombian soil by disc electrophoresis and infrared spectroscopy following gel filtration. *J. Chromatogr.* 209. 421-431.
- MORRIS, C. J. O. R. and MORRIS, P., 1963. *Separation methods in biochemistry.* Isaac Pitman and Sons Ltd. London.
- NEMETH, K., 1976. Die effektive und potentielle Nährstoffverfügbarkeit im Boden und ihre Bestimmung mit Elektro-Ultrafiltration /EUF/. Habilitation Dissertation, Justus-Liebig University, Giessen.
- ODÉN, I., 1912. Zur Kenntnis des Humussäure des Sphagnum-Torfes. *Chem. Ber.* 45. 651-660.
- ORIOLO, G. A. and CURVETTO, N. R., 1980. Evaluation of extractants for soil humic substances I. Isotachophoretic studies. *Plant and Soil.* 55. 353-361.
- RAYMOND, S., 1964. Protein purification by elution convection electrophoresis. *Science.* 146. 406-407.
- SCHNITZER, M. and KHAN, S. U., 1972. *Humic substances in the environment.* Marcel Dekker, Inc. N. Y.
- SIPOS S. et al., 1974. Biopolimer-fém komplex rendszerek. II. Humuszanyagok és fémekkel alkotott rendszereik fizikai tulajdonságai. *Agrokémia és Talajtan.* 23. 313-334.
- SMITH, H. O., 1980. Recovery of DNA from gels. *Adv. Enzymol.* 65. 371-380.
- STEVENSON, F. I., 1982. *Humus chemistry.* Wiley Intersci. Publ., N. Y.
- THORNTON, J. I., 1975. Isotachophoresis and isoelectric focusing of soil humic substances in polyacrylamide gel. *J. Chromatogr.* 103. 402.
- WELTE, E., 1955. Neuere Ergebnisse der Humusforschung. *Angew. Chem.* 67. 153-155.
- ZASSENHAUS, H. P., BUTOW, R. A. and HANNAN, Y. P., 1982. Rapid electroelution of nucleic acids from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 125. 125-130.

Extraction and Fractioning of Soil Humus Acids by Electroelution

GY. MÁDY¹, I. BUZÁS², F. HAVAS¹, Z. SÁNDOR¹ and B. LAKATOS¹

¹Central Research Institute for Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences and ²Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

For the separation and examination of soil humic acids in native state a new method, the electroelution has been worked out by the combination of elution and electrodialysis. Two types of apparatus have been constructed: a research and a routine one. In the apparatus developed for research purposes /Fig. 1/ the humic substances in native state can be separated from the soil particles by electric current and can be moved towards the anode and then recovered from the apparatus by elution with the application of suitable buffer solution.

The solution speed of humic substances depends on the applied voltage /Fig. 4/. By choosing the porosity of the filter layer placed in the direction of the anode the humic substance fractions of different molecular mass can be separated - e.g. fulvic acids /Fig. 3/. In the native state, humic acid - fulvic acid ratio can also be determined. The solution speed and content of humic substances are also influenced by the composition of the buffer solutions applied /Fig. 7/.

In case of different soil samples under the same conditions /buffer solution, filter layer, voltage/ the extraction of the organic matter as a function of time can be the measure of the strength of organomineral bonds /Figs. 8 and 9/.

The apparatus developed for routine purposes /Fig. 3/ is suitable for the examination of organic matter content of several soil samples simultaneously. By choosing the proper filter layer porosity the separation of the different humic acid fractions /e.g. fulvic acids/ in native state can be performed and their quantity can be determined. The data of Table 1 shows the determination of the actual humic acid - fulvic acid ratio. These data have great importance from the point of view of soil fertility investigations.

Both methods are suitable for the preparation of native state humic acid fractions needed for further instrumental structural investigations /IR, NMR, absorption spectroscopy/.

Table 1. Comparison of the quantities of organic matter extracted by various methods. /1/ Soil type and place of sampling. a/ Acid sandy soil, Nyírlugos; b/ Brown forest soil, Keszthely; c/ Brown forest soil, Putnok; d/ Chernozem soil, Kompolt; e/ Chernozem soil, Mezőhegyes; f/ Chernozem, Nagyhörccsök; g/ Meadow chernozem, Mosonmagyaróvár; h/ Meadow soil, Hosszúhát; j/ Calcareous sandy soil, Kecskemét; k/ Marshy peat, Keszthely; l/ BIO-VEGETAL; m/ COFUNA. /2/ Total organic matter content, mg C/g. /3/ Quantity of organic matter extractable by various solvents, mg C g⁻¹ soil; % of total. /4/ Colour quotient /Q/, quantity /mg C g⁻³/ and % of organic matter extractable by electroelution /0.1M Na₄P₂O₇ + 0.07 M H₃PO₄; pH = 7.0 buffer; 80 V; 3.5 hours/ /5/ Whatman GF/B filter; humic acid + fulvic acid. /6/ Kalle cellophane filter; fulvic acid. /7/ Humic acid/fulvic acid ratio.

Fig. 1. Electroelution apparatus for research purposes. 1. Anode chamber. 2. Cover plate. 3. Lower entrance branch. 4. Upper outlet branch. 5. t-

electrode. 6. Glass cooling pipe. 7. Rim. 8. Cathode chamber. 9. Cover plate. 10. Lower entrance branch. 11. Upper outlet branch. 12. Ag-electrode. 13. Thin-walled plastic cooling pipe. 14. Sample chamber. 15. Packing plate. 16. Cellophane layer. 17. Porous filter layer. 18. Lower elution chamber. 19. Cellophane layer. 20. Upper elution chamber. 21. Cellophane layer. 22. Plastic screws. 23. Entrance branch. 24. Transfer pipe. 25. Outlet branch. 26. Special filter layer. 27. Synthetic screening cloth. 28. Packing plate. 29. Rim. 30. Through-bolt. 31. Nut. 32. Plastic clamping plate.

Fig. 2. Measuring system for the electroelution apparatus. I. Electroelution apparatus. II. Reagent solution container. III. Multichannel chromatography pump. IV. Fraction collector. V. Electric supply unit. VI. Ultrathermostat. A. Anode chamber. B. Cathode chamber. C. Special filter layer. D, E, F. Connecting silicone rubber pipes. H, I. Connecting electric lines. J. Cooling pipe joining the ultrathermostat.

Fig. 3. Routine electroelution apparatus. A. Anode chamber. K. Cathode chamber. S. Soil sample. l. Separating tube, 2" porous filter. 3. Cellophane layer. 4. Rubber ring. 5. Inert carrier. 6. Plastic head. 7. Screw. 8. Insulating ring. 9. Porous filter bed. 10. Controlled membrane. 11. Plastic ring. 12. Porous layer. 13. Hole for the separating tube. 14. Rubber insulating ring. 15. Glass feeding pipe. 16. Rubber plug.

Fig. 4. Quantity of humic substances extracted by electroelution from the meadow soil of Hosszúhát, as the function of the voltage applied and electroelution time, with Pierce cellophane filter and in citrate buffer.

Fig. 5. Quantity of humic substances extracted by electroelution from the meadow soil of Hosszúhát as a function of elution time, with various membrane filters. /@/ Pierce cellophane. /Δ/ Kalle filter. /o/ Vogel EUF filter. /+/ double Whatman filter. pH = 7.4.

Fig. 6. Correlation between the concentration of humic substances and $E_{456 \text{ nm}}$, the extinction measured at 456 nm wave-length. I. Humic acid and II. Fulvic acid standard /LAKATOS et al., 1974/. /W%/ weight percentage of the aqueous solution.

Fig. 7. Quantities of fulvic acid /Kalle filter: Δ/ and humic acid + fulvic acid /Whatman filter: +/ extracted by electroelution from meadow soil of Hosszúhát as the function of electroelution time, in citrate-sodium-pyrophosphate-carbamide buffer /pH = 7.2/ at 100 V voltage.

Fig. 8. Quantities of fulvic acid /Kalle filter: Δ/ and humic acid + fulvic acid /double Whatman filter: +/ extracted by electroelution from calcareous chernozem soil of Nagyhöröcsök as the function of electroelution time, in citrate-sodium-pyrophosphate buffer /pH = 7.2/ at 100 V voltage.

Fig. 9. Quantities of fulvic acid /Kalle filter: Δ/ and humic + fulvic acid /double Whatman filter: +/ extracted by electroelution from the sandy soil of Örbottyán as the function of electroelution time in citrate-sodium-pyrophosphate buffer /pH = 7.4/ at 100 V voltage.