

© В.М. ШКИНЕВ, В.Г. ЛИННИК, М.И. ДИНУ, Т.В. ДАНИЛОВА,
Н.В. ИВАНИЦКАЯ

vshkinev@mail.ru, linnik_53@mail.ru, fulva@rambler.ru, danilova_tatiana@mail.ru,
ivnavla@yandex.ru

УДК 631.47 УДК: 631.445.2: 631.414: 543.3:535.8

**МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ МЕЖДУ ПОЧВЕННЫМИ
МИКРО- И НАНОЧАСТИЦАМИ***

АННОТАЦИЯ. Рассмотрены методические аспекты выделения, фракционирования и определения химического состава почвенных микро- и наночастиц. Приведены примеры использования электронной микроскопии для изучения почвенных коллоидов, микро- и наночастиц. Даны результаты определения содержания химических элементов масс-спектральным методом с индуктивно-связанной плазмой и органических компонентов в водных почвенных вытяжках, полученных после мембранной фильтрации с размером пор 8, 1,2 мкм и 100 кД для иллювиально-железистых подзолистых почв. Методами вольтамперометрии определены ионы меди, свинца, кадмия, цинка в вытяжках после мембранной фильтрации и сопоставлены с содержанием органического вещества с высокой и низкой молекулярной массой. Проанализированы структурные особенности гумусовых веществ в образцах по фотографиям, полученным с помощью электронного микроскопа. Рассмотрено изменение количественных и качественных особенностей гумусовых соединений в слоях почв и различия в формах нахождения металлов в пробах.

SUMMARY. Considered methodological aspects separation, fractionation and chemical analysis of soil micro- and nanoparticles. Presented the examples of use of electron microscopy to study the soil colloids, micro- and nanoparticles. Shows the results of determination of chemical elements mass spectral analysis with inductively coupled plasma and organic compounds in aqueous soil extracts obtained after membrane filtration with a pore size of 8, 1.2 microns and 100 kD for illuvial-ferruginous podzolic soils. Voltammetric methods identified ions of copper, lead, cadmium and zinc in the extracts after membrane filtration and compared with the content of organic matter with a high and low molecular weight. Analyzed the structural characteristics of humic substances in the samples from the photographs obtained with an electron microscope. The change in the quantitative and qualitative features of humic compounds in soil layers and finding the differences in the forms of metals in the samples.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Микро- и наночастицы, электронный микроскоп, гуминовые вещества.

KEY WORDS. Micro- and nano particles, SEM, humus substances.

* Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект №11-05-01156-а).

Введение. Для понимания фундаментальных законов и закономерностей распределения химических элементов в биосферных объектах необходимо их исследование на молекулярном и атомарном уровне. История развития методов химического анализа, приоритеты в выборе объектов химических исследований подробно рассмотрены в работе [1]. Микро- и наночастицы играют важную роль в миграции техногенных загрязнителей в почве [2-5]. В последние годы для изучения структурной организации почвенного покрова, как важнейшего компонента биосферы, стали разрабатываться методы, позволяющие изучать свойства почвы на микро- и наноуровне [5-7]. Однако многие методологические аспекты изучения распределения химических и радиоактивных элементов в виде микро- и наночастиц в настоящее время далеки от полного решения.

Каждое исследование распределения химических элементов в природных объектах в зависимости от решаемой задачи начинается с пробоотбора и пробоподготовки. Для получения корректных результатов, в максимальной степени приближающихся к природным условиям распределения микро- и наночастиц в почве, требуется разработка и апробация методов пробоотбора, хранения и транспортировки проб, пробоподготовки и анализа образцов, обработки аналитического сигнала и интерпретация полученных данных с целью объяснения результатов. Методики физического и химического анализа образцов почвы следует выбирать таким образом, чтобы в процессе исследования не происходили существенные изменения физико-химических равновесий, характерных для ландшафтно-геохимических условий развития анализируемых почв.

Методика пробоотбора во многом определяется целью исследования и теоретическими представлениями о миграции химических элементов в природных ландшафтах в зависимости от следующих факторов: 1) биоклиматических условий, определяющих интенсивность биогеохимического круговорота; 2) физико-химических условий миграции; 3) интенсивности механической миграции под действием гравитационных сил (эрозионные процессы) [8-9].

Методы пробоотбора, пробоподготовки и анализа микро- и наночастиц. Сложный состав почвы определяет необходимость рационального сочетания различных методов пробоподготовки. На первом этапе требуется провести выделение размерных фракций, а затем, при работе с сухими пробами, анализ твердых фаз, включая их минералогический анализ. В случае фракционирования жидких проб требуется также анализ суспензий частиц.

Для получения наиболее полной информации о распределении частиц, металлов или органических загрязнителей в природных объектах необходимо, чтобы первый метод обработки пробы был основан на свойстве частиц, которое равномерно изменяется на всем диапазоне размеров частиц, присутствующих в пробе. Единственное свойство частиц в пробе, которое отвечает этому требованию — размер частиц. Поэтому начальный метод, используемый практически во всех методиках, заключается в сухом разделении частиц пробы почвы на ситах, с последующим выделением наночастиц на мембранах.

В работах [10-11] показано, что для эффективного разделения частиц в пробе последующие методы должны быть основаны на других физических или химических свойствах компонентов пробы: например, таких как различие по плотности — для этого используются методы центрифугирования; наличия зарядов на частицах — применяют капиллярный электрофорез, различия

в гидрофобно-гидрофильных свойствах поверхности частиц — используют жидкостную экстракцию. При этом важно, чтобы эффективность разделения последующего метода была выше предыдущего. Данный принцип выдерживается при последовательном использовании мембранных методов, жидкостной экстракции, капиллярного электрофореза и других известных методов.

Размерный ряд разделяемых компонентов, которые могут присутствовать в жидком почвенном растворе, и варианты мембранных методов для их выделения приведены на рис. 1.



Рис. 1. Размерный ряд разделяемых компонентов и варианты мембранных методов их выделения

Основной задачей исследователя является правильная постановка задачи и последующее объяснение результатов.

Пробоотбор. Почва, как природное тело, по своему строению неоднородна и имеет иерархическую организацию. Ее элементами служат отдельные почвенные агрегаты, которые в свою очередь состоят из микроагрегатов, последние образуются из элементарных почвенных частиц. При гранулометрическом анализе имеют дело с элементарными почвенными частицами (ЭПЧ) — которые представлены обломками горных пород и минералов, а также аморфных соединений, включая органические соединения, гидроксиды Fe, Al [9]. Все эти элементы находятся в химической взаимосвязи и не поддаются разрушению общепринятыми методами пептизации. Таким образом, разделение ЭПЧ можно осуществить с помощью пептизации, т.е. разрушения почвенных агрегатов, сформировавшихся в результате «слипания» отдельных дисперсных частиц.

Пробоподготовка. Гранулометрический анализ включает два этапа: (1) диспергация почвенной массы и (2) анализ содержания частиц различного размера [9]. Основной задачей первого этапа гранулометрического анализа является отделение ЭПЧ друг от друга. Для этого прибегают к различным химическим и физическим методам разделения, чтобы разрушить природный «клей», который соединяет эти частицы. Однако при химическом воздействии на почву в ней могут происходить необратимые изменения за счет перераспределения лабильных форм и биохимических процессов. Известно, что при этом может изменяться также распределение исходного материала по гранулометрическим фракциям, особенно в микро- и нанодиапазоне размеров [9].

Фракционирование почвенных микро- и наночастиц

Предложенные методы исследования демонстрируются на примере двух-трех образцов, взятых из двух разрезов иллювиально-железистой почвы, отобранных на Кольском п-ве в 2010 году. Образец Т2 (5-8) характеризует верхнюю часть элювиального горизонта A_2 , сложенную песчаными отложениями, тогда как образец Т11 (7-10) представлен бурым рыхлым песком иллювиального горизонта B_1 . Подробное описание ландшафтных условий формирования этих почв представлено в работе [5].

На первой стадии выделения микрочастиц использовался метод сухого ситования [5]. Основной особенностью сухого фракционирования на ситах является то, что значительных изменений в содержании лабильных форм и компонентов практически не происходит, хотя возможно изменение газового баланса среды (особенно углекислоты и паров воды).

Для изучения распределения химических элементов воздушно сухой образец почвы разделялся на фракции с использованием Вибропривода ВП-30 (ООО ВИБРОТЕХНИК, Санкт-Петербург) и набора сит лабораторных С20/50 (диаметр просеивающей поверхности 200 мм и высота обечайки 50 мм) производства той же фирмы, с размерами ячеек 0,14-0,071, 0,071-0,04 и <0,04 мм. Разделение выполнялось до постоянного веса фракций в течение 8-12 часов. После ситования были получены гранулометрические фракции размером: более 140 мкм; 140-71; 71-40 и менее 40 мкм. Поскольку сухое фракционирование менее 40 мкм практически невозможно, для выделения более тонких фракций далее проводилось фракционирование в жидкой среде на мембранах.

Методика фракционирования проб для выделения микро- и наночастиц. Навеску пробы весом 5 г (< 40 мкм) и 100 см³ дистиллированной воды перемешивали в течение 3 дней, затем декантировали раствор с осадка и пропускали через мембрану 8 мкм. В оставшуюся пробу добавляли 100 см³ дистиллированной воды, количественно переносили на фильтр и пропускали через ту же мембрану. Полученный фильтрат последовательно пропускали через мембраны 1,2 мкм и 100 кД (рис. 2). Для определения содержания химических элементов в фильтратах использовали масс-спектральный метод с индуктивно-связанной плазмой, метод инверсионной вольтамперометрии; для визуализации частиц, присутствующих в фильтрате, использовали электронную микроскопию. Для определения растворенных форм нахождения металлов — акваионных, связанных в низкомолекулярные и высокомолекулярные комплексы, применяли электрохимические, титрометрические методы анализа и экстракционное разделение.

В табл. 1 представлены результаты мембранного фракционирования почвы. Для всех образцов почвы наблюдается снижение массы осадка на мембранах. На мембране размером 8 мкм для образца почвы Т11 (7-10 см) осадок составил 94%, тогда как для образца Т2 (5-8 см) — 81%. При переходе от фильтра 8 мкм к фильтру 1,2 мкм (зона микрочастиц) масса осадка снижается на три порядка (для пробы Т2 (5-8 см) — на четыре порядка). При переходе от микро- к наночастицам масса осадка для образца Т11 (7-10) снижается на порядок, тогда как для образца Т2 (5-8 см) это снижение составляет 4 раза. Таким образом, основная часть почвы при мембранной фильтрации с использованием дистиллированной воды осаждается на фильтрах, и существенно меньшая ее часть проходит через фильтры в виде раствора и наночастиц.

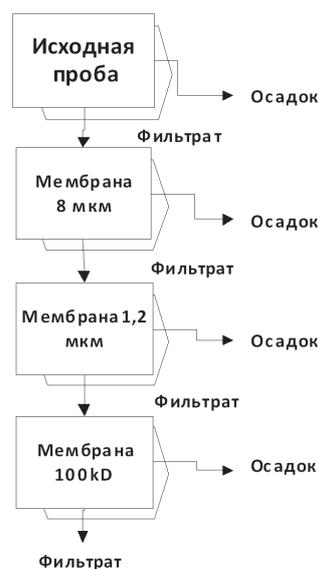


Рис. 2. Схема фракционирования почвенных микро- и наночастиц

Таблица 1

Весовое (% к исходной пробе) распределение компонентов пробы почвы после мембранного фракционирования (О — осадок на мембране, Ф — фильтрат)

Проба	более 8 мкм		8-1,2 мкм		1,2 мкм-100 kDa		менее 100 kDa	
	О	Ф	О	Ф	О	Ф	О	Ф
Т 11(7-10) <40 мкм	94,33	5,67	0,1	5,57	0,01	5,56	0	5,56
Т 2(5-8) <40 мкм	81,00	19,00	0,04	18,96	0,01	18,95	0	18,95

В природных условиях за счет действия органических кислот и при кислой реакции почвенного раствора реальное выщелачивание будет выше полученных значений. Поэтому полученные нами значения можно рассматривать как оценку минимальных уровней выщелачивания при химическом выветривании почвенных минералов.

Методы анализа фаз

Для анализа проб почвы известно большое число методов. Твердые пробы почв с низким содержанием металлов наиболее часто анализируют рентгенофлуоресцентным методом. Для анализа растворов, после разложения проб, используют масс-спектральный метод с индуктивно-связанной плазмой [1], для определения отдельных элементов возможно использовать атомно-абсорбционный метод или различные электрохимические методы, например, инверсионную вольт-амперометрию.

Основной проблемой при изучении распределения металлов между микро- и наночастицами является отсутствие близких по составу стандартных образцов или образцов сравнения. Возможно проводить анализ образцов различными

методами. Данный подход особенно важен при анализе образцов с высоким содержанием органических веществ.

Предварительный анализ исходной пробы используется для контроля баланса металлов после разделения компонентов пробы.

Электронно-микроскопический метод исследования

Для полной характеристики исследуемых почвенных образцов недостаточно только химического и гранулометрического анализа. Для качественного и количественного описания микро- и наночастиц требуются методы визуализации присутствующих в образце компонентов на микро- и наноуровне с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ). Применение РЭМ позволяет исследовать общий характер структуры всей поверхности объекта при малых увеличениях, а также детально изучить любой интересующий исследователя участок при больших увеличениях (рис. 3-5).

На рис. 3 представлен график распределения частиц по размерам после математической обработки изображения, полученного в результате сканирования электронным микроскопом. Исходное изображение (А) переводится в бинарную форму (Б), где черным распознаны частицы различного размера. Затем производится подсчет частиц различного размера, на рисунке 2В показаны результаты подсчета количества частиц в диапазоне 1,5-6,1 мкм. Общее количество выделенных частиц этого размера по результатам обработки данного фрагмента составило 559.

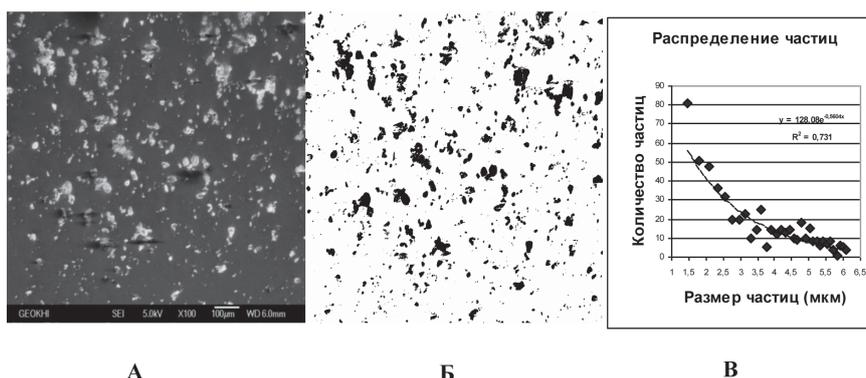


Рис. 3. Обработка результатов сканирования электронным микроскопом.
А — изображение микрочастиц почвы в водной вытяжке, полученное с помощью микроскопа; **Б** — бинарное изображение частиц в результате обработки снимка; **В** — распределение частиц по размерам

Электронно-микроскопические исследования позволяют также разносторонне изучить гумусовые вещества — начиная от размеров гумусовых компонентов, их структурных особенностей, наличия минеральных или биологических (микроорганизмы, бактерии) компонентов и заканчивая возможностью проследить процесс распада органического вещества в природе [6]. Согласно полученным данным (рис. 4А, Б), на снимке образца Т11 (7-10 см) (фильтрат пропущен через мембрану размером 1,2 мкм) отчетливо проявляется структурированный пористый каркас гумусовых фрагментов с вкраплениями минеральных и, судя по цепочной структуре, силикатных, возможно, алюмосиликатных, группировок.

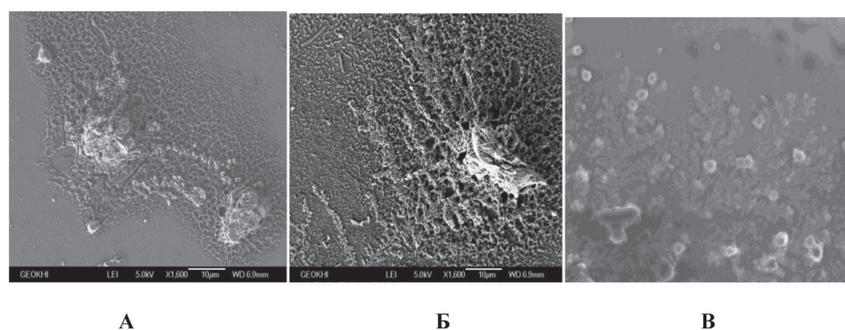


Рис. 4. Результаты сканирования электронным микроскопом пробы из разреза Т11 (7-10 см). А, Б — использован фильтр с размером пор 1,2 мкм; В — 100 кД

Полученные данные согласуются с результатами работ [6], [13], в которых также рассматривается роль минеральной составляющей в распределении гумусовых компонентов по размерам — от коллоидов до наноструктур. Результаты РЭМ для проб, полученных после фильтрации с размером пор 100 кД, показывают наличие в системе хорошо структурированных, симметричных наноструктур (рис 3В), содержащих компоненты более светлого оттенка, предположительно биологической природы.

Анализ распределения тяжелых металлов в составе гумусовых веществ

Экспериментальные результаты [13-15] показывают, что валовое содержание гумусовых веществ в образцах Т2 и Т11 характеризуется соотношением 5:1 (суммы фульвокислот, гуминовых кислот и гематомелановых кислот) соответственно, на что также указывают различия в концентрациях таких ионов металлов как Zn(II), Pb(II), Cu(II) в вытяжке почв после каждого процесса фильтрации (табл. 2). Согласно полученным данным, выявлено более резкое снижение количества органических соединений при переходе от фракций <8 мкм для образцов разреза Т2 к фракциям <1,2 мкм <100 кД, в отличие от проб разреза Т11, что влияет на присутствие в системах комплексов металлов с органическими веществами и общие различия в молекулярных массах комплексов.

Таблица 2

Концентрации ионов металлов в образцах Т2 и Т11, мг/л ($\Delta \pm 0,03$), полученные методом инверсионной вольтамперометрии

Разрез, слой	Металл	Размер фильтра (фракции)			Содержание органических компонентов [14], [15], lgC		
		<8 мкм	<1,2 мкм	<100 кД	<8 мкм	<1,2 мкм	<100 кД
Т2 (5-8)	Zn	0,363	0,012	0,004			
	Pb	0,008	0,008	0,01			
	Cu	0,044	0,016	0,009			
Т11 (7-10)	Zn	0,023	0,009	0,003			
	Pb	0,004	0,003	0,002			
	Cu	0,022	0,015	0,008			

Гумусовые компоненты подзолов Кольского региона характеризуются фульвокислотным составом, содержащим в больших количествах окисленные (кислородные) фрагменты [13-14], поэтому сродство ионов цинка, в меньшей степени ионов меди и свинца к кислородсодержащим периферийным группам гумусовых веществ обуславливают различия в формах миграции металлов. Слабое изменение содержания ионов свинца в образцах Т2 и Т11 объясняется общим невысоким сродством металла к кислородным группировкам фульвокислотных соединений, в отличие, например, от ионов цинка.

Вытяжка после пропускания через фильтр с размером пор 8 мкм содержит соединения металлов с гумусовыми составляющими с молекулярными массами около 400-700 г/моль (рис. 5a,b). Согласно результатам лабораторных экспериментов и как видно на снимках, образец Т2 (рис. 5a) содержит больше органического вещества с высокой молекулярной массой, которое покрывает минеральные фрагменты тонкой пленкой. Образец Т11 (рис. 5b) (после фильтрации через поры 8 мкм), содержащий меньше гумусового компонента и, следовательно, комплексов с ионами металлов, а в большей степени — акваионные формы металлов, представлен на снимках минеральными и, возможно, биологическими образованиями [16-17].

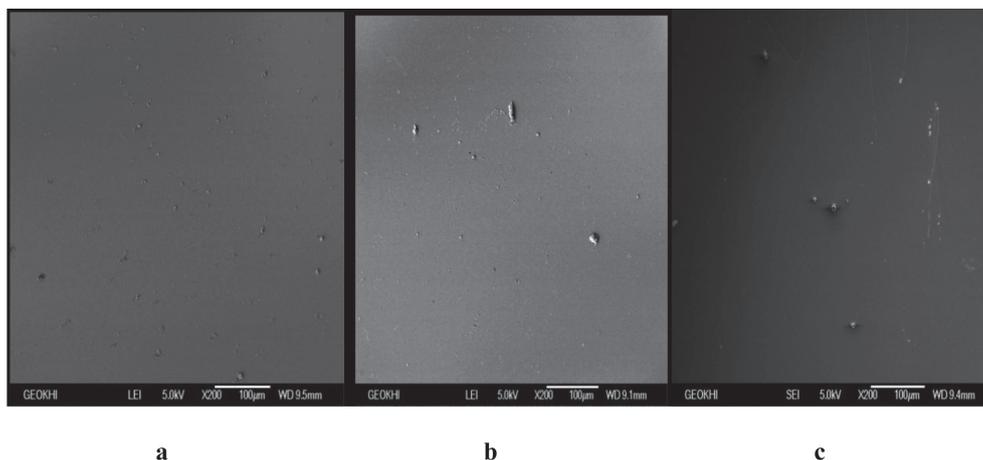


Рис. 5. Сравнение снимков электронного микроскопа фильтрата (размер фильтра 8 мкм) образцов Т2 (а) и Т11 (b). Снимок фильтрата (размер фильтра 1,2 мкм) образца Т11 (с)

Фильтрат (размер фильтра 8 мкм) образцов Т2 и Т11 содержит как гидролизованые ионные формы металлов, так и связанные с гумусовыми веществами более низкомолекулярные компоненты. Появление на снимках фильтрата образца Т11 (рис. 5с) более однородной пленки указывает на доминирование фракций гумусовых веществ со средней молекулярной массой ниже 300 г/моль в смеси.

Снижение количества ионов металлов и гумусовых соединений после фильтрации через поры 100 кД указывают на преобладание гидратированных форм нахождения металлов и не такое высокое влияние гумусовых соединений на качества снимков [16-18].

Определение химических элементов методом индуктивно-связанной плазмы

Для анализа растворов, после разложения проб и фильтратов используют масс-спектральный метод с индуктивно-связанной плазмой. Данный метод полезен при низком содержании компонентов в пробе. На рис. 6 приведены значения логарифмов концентраций (мкг/л) элементов в различных размерных фракциях (фильтратах после мембранной фильтрации через поры размером 8, 1,2 мкм и 100 кД (10 нм) для образцов Т2 и Т11).

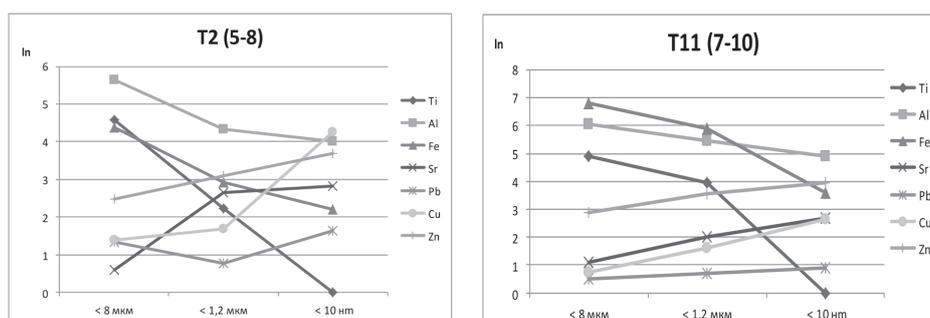


Рис. 6. Распределение химических элементов в водных растворах

Из полученных данных видно, что с уменьшением размера пор содержание элементов, присутствующих в виде твердых частиц, уменьшается (Ti, Fe, Al), а содержание элементов, существующих в виде растворимых соединений или комплексов (Cu, Zn, Pb, Sr), увеличивается. Это дает возможность выделить группы элементов, которые вероятнее всего присутствуют в почвах в виде микро- и наночастиц.

Заключение

Предложенная схема фракционирования почвы для выделения микро- и наночастиц основана на последовательном использовании методов сухого ситования мембранного фракционирования. Использование фильтра с размером пор 8 и 1,2 мкм позволяет выделить почвенные микрочастицы. Фильтры с размером пор 100 кД использовались для выделения коллоидной фракции, содержащей наночастицы. Математическая обработка результатов РЭМ позволила оценить количество микрочастиц в диапазоне 1,5-6,1 мкм. Химический анализ фильтратов позволяет выделить группы металлов, присутствующих в почвах в виде микро- и наночастиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотов Ю.А., Вершинин В.И. История и методология аналитической химии: Учебное пособие. М.: ИЦ Академия 2007. С. 384.
2. Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B.C., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M., Lowry, G.V., Unrine, J.M. Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms // Soil. Sci. Soc. Am. J. 2011. V. 75. P. 365-377.
3. Bystrzejewska-Piotrowska, G., Asztemborska, M., Giska, I., Mikoszewski, A. Influence of Earthworms on Extractability of Metals from Soils Contaminated with Al_2O_3 , TiO_2 , Zn, and ZnO Nanoparticles and Microparticles of Al_2O_3 // Pol. J. Environ. Stud. 2012. Vol. 21. № 2. 313-319

4. Nowack, B., Bucheli, Th.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment // *Environmental Pollution*. 2007. 150. 5-22.
5. Линник В.Г., Шкинев В.М., Рощина И.А., Борисов А.П., Данилова Т.В. Распределение химических элементов в почвенных микрочастицах северной тайги в зоне влияния Кольской АЭС // *Вестник Тюменского государственного университета*. 2011. № 12. Экология. С. 47-55.
6. Федотов Г.Н., Иткис Д.М. и др. Исследование почвенных гелей методом атомно-силовой микроскопии // *ДАН*. 2008. Т. 421. № 2. С. 202-205
7. Федотов Г.Н., Быстрова О.Н., Мартынкина Е.А. О наноструктурной организации почв // *Доклады РАН*. 2009. Т. 245. № 4. С. 492-496.
8. Перельман А.И., Касимов Н.С. *Геохимия ландшафта*. М.: Астрей-2000, 1999. 763 с.
9. Шейн Е.В. *Курс физики почв: Учебник*. М.: Изд-во МГУ, 2005. 432 с.
10. Fedotov, P.S., Vanifatova, N.G., Shkinev, V.M., Spivakov, B.Ya. Fractionation and characterization of nano- and microparticles in liquid media // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. № 6. P. 1787-1804.
11. Spivakov, B., Shkinev, V.. *Membrane Techniques*. In: *Encyclopedia for Analytical Science*, 2005, Elsevier Ltd, Editors-in-Chief: Paul Worsfold, Alan Townshend, and Colin Poole P. 524-530.
12. Федотов Г.Н., Добровольский Г.В. и др. Микрофазное расслоение в гумусовых системах // *ДАН*. 2005. Т. 403. № 2. С. 205-207.
13. Дину М.И. Влияние функциональных особенностей гумусовых веществ на процессы комплексообразования с ионами металлов. Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. М., 2012. 22 с.
14. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И. *Органическое вещество почв РФ*. М.: Наука, 1996. 256 с.
15. Орлов Д.С., Гришина Л.А. *Практикум по химии гумуса*. М.: МГУ, 1981. 115 с.
16. Salbu, B., Krekling, T., Oughton, D.H. Characterisation of radioactive particles in the environment // *Analyst*. 123. 1998. P. 843-849
17. Majzik, A., Tomba'cz, E. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions I. Interfacial and aqueous phase equilibria: Adsorption and complexation // *Organic Geochemistry*. 2007. 38. P. 1319-1329.
18. DeNovio, N.M., Saiers, J.E., Ryan, J.N. Colloid movement in unsaturated porous media: Recent advances and future directions // *Vadoze Zone J.* 2004. V. 3. P. 338-351.