

РАДКА БОЖИНОВА*, ПЕНКА ЗАПРЯНОВА

Институт по тютюна и тютюневите изделия, Пловдив

*E-mail: rbojinova@yahoo.com

**Използване на комплексообразователните агенти EDTA и DTPA
за оценка съдържанието на подвижни микроелементи в почва от
продължителен торов опит**

***An Evaluation of the Use of Chelating Agents DTPA and EDTA as
Extractants for Determination of the Available Microelement Content of
Soil in a Long-Term Fertilization Trial***

R. Bozhinova*, P. Zapryanova

Tobacco and Tobacco Products Institute, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

The available content of Fe, Mn, Zn and Cu in soil samples taken from a long-term fertilization experiment has been studied. The purpose of this work was to provide information on microelement content of soil in a long-term fertilization trial and evaluation of the use of three chelating agents (0.005 M DTPA + 0.1 M TEA pH 7.3; 0.01 M EDTA + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pH 8.6 and 0.05 M Na_2EDTA pH 6.0) as extractants for determination of the available Fe, Mn, Zn and Cu.

The long-term mineral fertilization had no recordable influence on available Fe, Mn, Zn and Cu content. It has been found that combined organic and mineral fertilizer application increased the available Fe, Mn and Zn content.

0.05 M EDTA extracted the highest quantity of Fe, Mn and Zn. The extractability of Cu was in the following order: EDTA pH 8.6 > 0.05 M EDTA > DTPA pH 7.3. Extractable Fe, Mn and Zn by different procedures were significantly correlated with each others. Therefore, all tested extractants are effective for determination of the available iron, manganese and zinc content in the experimental soil (Rendzic Leptosols).

Key words: microelements, soil, EDTA, DTPA, long-term fertilization trial

Съдържанието на микроелементи в почвата варира от дефицитни равнища до токсични концентрации в кисели почви, замърсени с тежки метали. Малка част от общите им количества е биодостъпна. Важна роля за подвижността на елементите и усвояемостта им от растенията оказват почвените характеристики – рН, съдържание на хумус, механичен състав и др. За количествена оценка на съдържанието на подвижните форми на микроелементите в почвите се прилагат раз-

лични екстрагенти. Използването на хелатообразуващите агенти в почвознанието се възприема от Norvell and Lindsay, които през 1969 г. публикуват две статии за стабилността на метал-EDTA и метал-DTPA комплекси. От тези проучвания е става ясно, че EDTA и неговите производни, както и DTPA и NTA, могат да формират стабилни комплекси с високи стабилитетни константи с някои тежки метали. Trierweiler and Lindsay (1969) предлагат използването на EDTA рН 8,6 за определяне

на подвижния цинк в почви с ниско съдържание на този елемент. Clayton (1979) адаптира EDTA метода за анализ на почви, замърсени с тежки метали. През 1978 г. Lindsay and Norvell разработват метод за извличане с DTPA на подвижните Zn, Fe, Mn и Cu от неутрални и карбонатни почви. Според Knezek and Ellis (1980), EDTA е подходящ екстрагент за определяне подвижните форми на микроелементите в различни почви, докато 0,005 M DTPA не е подходящ за по-широк диапазон на pH (Haynes and Swift, 1983). В изследване върху индустриално замърсени Алувиално-ливадни почви с pH от 7,0 до 8,1, от района на Пловдив, Angelova et al. (2003) установяват, че DTPA pH 7,3 и 0,05 M EDTA са подходящи за определяне на подвижните олово, мед, цинк и кадмий в тези почви. За характеризиране на режима на цинка при даване на препоръки за торене на българските почви е възприет методът с EDTA (pH 8,6) (Стоянов и Пенева, 1985). В представената от Захариева (1985) класификационна схема на площите, които се нуждаят от торене с желязо се наблюдава, че те се определят на база на граничните стойности на подвижно Fe в почвата (определено в извлек с EDTA pH 8,6), съдържанието на карбонати и pH.

Съдържанието на елементите, определено с различни екстрагенти е функция от химичния състав на използвания екстрагент и от специфичните свойства на изследваната почва. Концентрацията на даден елемент в една и съща почва, измерена с два различни екстрагента може да варира значително, но последвалата интерпретация на резултатите води до идентични заключения за съдържанието на този елемент. Въпреки големия брой изследвания върху използването на различни екстрагенти за определяне на подвижните форми на микроелементите, съпоставянето на получените резултати и дефинирането на общи зависимости е трудна задача.

Целта на изследването беше проучване на съдържанието на подвижните форми на Fe, Mn, Zn и Cu в Хумусно-карбонатна почва (Rendzic Leptosols) от продължителен торов опит и изпитване ефикасността на някои комплексобразователни агенти (DTPA pH 7,3; EDTA pH 8,6 и 0,05 M EDTA pH 6,0) за извличане на тези микроелементи.

Материал и методи

Изследването е проведено върху стационарен полски опит с продължително торене и непрекъсната монокултура тютюн. Опитът е заложен през 1966 г. в Институт по тютюна и тютюневите изделия върху Хумусно-карбонатна почва със съдържане на карбонати 7,18 – 7,26%. Изследването е върху част от вариантите и включва: $N_0P_0K_0$; $N_{2,5}$; N_5 ; N_{10} ; $N_5P_{7,5}$; $N_5K_{7,5}$; $N_5P_{7,5}K_{7,5}$; $P_{7,5}K_{7,5}$ и $N_5P_{7,5}K_{7,5} + 2$ t/da оборски тор.

Почвените проби са взети от дълбочина 0 – 25 cm и са анализирани за pH (в H_2O) – потенциометрично, хумус (по Тюрин) и за общо съдържание на Fe, Mn, Zn и Cu (след разлагане на почвата с HF, $HClO_4$ и HNO_3 и определяне на атомно-абсорбционен спектрометър).

За извличане на подвижните форми на Fe, Mn Zn и Cu от почвата са използвани следните екстрагенти:

- 1) 0,005 M DTPA + 0,1 M TEA, pH 7,3 (ISO 14870: 2001);
- 2) 0,01 M EDTA + 1M $(NH_4)_2CO_3$, pH 8,6 (Trierweiler and Lindsay, 1969);
- 3) 0,05 M Na_2EDTA , pH 6,0 (Clayton and Tiller, 1979).

Съотношението почва: разтвор за 0,05 M Na_2EDTA е 1: 10, а при останалите два екстрагента – 1: 2. Почвените проби са поставяни на шутел апарат за 2 часа при 20 °C (екстрагент 1) и съответно за 30 или 60 минути при екстрагенти 2 и 3, след което са центрофугирани и филтрувани. За определяне съдържанието на микроелементите в почвените проби е използван атомно-абсорбционен спектрометър “SpektrAA 220” на фирма Varian, Австралия при следните работни дължини на вълните: Fe – 248,3 nm, Mn – 279,5 nm, Cu – 324,8 nm и Zn – 213,9 nm.

Резултати и обсъждане

Почвата от различните варианти на торене не се различава съществено по отношение на pH (табл. 1). Наличието на достатъчно обменни бази в Хумусно-карбонатната почва и използването на физиологично неутрален азотен тор (карбамид) са вероятна причина за липсата на значителни разлики между торената контрола и останалите варианти. Варирането на общия хумус при вариантите от минералната система на торене е сравни-

Таблица 1. Характеристика на почвата

Table 1. Selected properties of the soil

Равнище на торене	pH (H ₂ O)	Хумус, %	Общо Fe, mg/kg	Общ Mn, mg/kg	Общ Zn, mg/kg	Обща Cu, mg/kg
N ₀ P ₀ K ₀	8,25	2,42	25 300	609	144	87
N _{2,5}	8,31	2,50	24 600	603	148	89
N ₅	8,27	2,49	25 900	615	156	90
N ₁₀	8,15	2,72	29 700	649	161	87
N ₅ P _{7,5}	8,22	2,58	29 800	655	168	89
N ₅ K _{7,5}	8,20	2,46	30 000	633	143	89
N ₅ P _{7,5} K _{7,5}	8,26	2,65	29 100	664	166	89
P _{7,5} K _{7,5}	8,23	2,55	29 700	652	164	90
N ₅ P _{7,5} K _{7,5} + оборски тор	8,13	4,01	27 300	676	162	88
Средна стойност	8,22	2,71	27 933	640	157	89

Таблица 2. Съдържание на микроелементи в почвата

Table 2. Available microelement content in the soil

Елемент	Екстрагент	Минимално съдържание, mg/kg	Максимално съдържание, mg/kg	Средно съдържание, mg/kg	CV, %
Fe	EDTA pH 8,6	2,6	6,8	3,4	38,3
	0,05 M EDTA	11,9	28,1	15,6	31,7
	DTPA pH 7,3	5,1	9,6	6,5	21,1
Mn	EDTA pH 8,6	19,8	64,3	32,2	40,7
	0,05 M EDTA	53,9	98,5	71,8	19,7
	DTPA pH 7,3	15,8	36,5	22,4	27,7
Zn	EDTA pH 8,6	13,7	22,9	16,7	15,9
	0,05 M EDTA	20,3	35,8	23,9	20,1
	DTPA pH 7,3	6,5	12,1	7,7	21,8
Cu	EDTA pH 8,6	28,9	40,9	33,2	11,4
	0,05 M EDTA	21,2	25,0	23,3	4,7
	DTPA pH 7,3	9,4	12,1	10,7	9,1

телно малко. Органоминерално торене е повишило значително съдържание му – с 66% спрямо неторената контрола. Съдържанието на общ манган е по-високо при органоминералната система на торене, което може да се свърже главно с внесените с оборския тор големи количества (табл. 1).

В табл. 2 са представени извлечените количества желязо с различните екстрагенти. В изследването не се установиха големи разлики между вариантите от минералната система на торене. Значително е повишаването на подвижното Fe от органоминералното торене и екстрахираното с EDTA и DTPA желязо от

този вариант е най-високо. Високият вариационен коефициент, посочен в табл. 2 е поради големите разлики в стойностите на елемента между вариантите, торени с минерални торове и този с органоминерално торене. По данни на O'Hallorans et al. (2004) железен дефицит при карбонатните почви може да настъпи, ако съдържанието на подвижно желязо (извлек с ДТРА) е по-малко от 4,5 mg/kg. Екстрахируемите количества ДТРА-Fe при повечето от вариантите на опита са около тази стойност.

Количеството на извлеченото с различни екстрагенти желязо варира от 2,6 до 28,1 mg/kg и зависи главно от свойствата на комплексобразователния агент, рН на разтвора, продължителността на периода за екстракция и др. Най-големи количества от елемента са извлечени с 0,05 М разтвор на EDTA. Средното количество Fe, извлечено с този екстрагент, е няколко пъти по-високо от извлечените количества с EDTA, рН 8,6 и ДТРА, рН 7,3. Екстрагентът (0,05 М EDTA) е с най-висока концентрация на EDTA и с най-ниско рН. Следователно най-вероятно се засягат в известна степен киселиннозависими форми на желязото, т. е. железни оксиди или карбонати. Екстрахируемите количества с EDTA рН 8,6; ДТРА рН 7,3 и 0,05 М EDTA представляват съответно 0,01%, 0,02% и 0,06% от общото съдържание на елемента. Съгласно ISO 14870: 2001 за определяне съдържанието на подвижните микроелементи в почви с рН > 6 се използва ДТРА с рН 7,3. Средното съдържание на желязо в почвата, отчетено с EDTA рН 8,6, е близо 2 пъти по-ниско от извлеченото с разтвора на ДТРА. Средното количество от елемента, екстрахирано с 0,05 М EDTA е около 2,5 пъти по-високо от ДТРА-Fe. Установи се висока корелация между съдържанието на желязо в почвата, отчетено с ДТРА рН 7,3 и EDTA рН 8,6:

$Fe_{EDTA\ 8,6} = -1,89 + 0,83 Fe_{DTPA}$ ($r = 0,853^{**}$),
както и между екстрахираните количества с ДТРА рН 7,3 и 0,05 М EDTA:

$$Fe_{0,05\ EDTA} = -3,41 + 2,94 Fe_{DTPA}$$
 ($r = 0,813^{**}$).

Съдържанието на подвижен манган в основни линии следва хода на общото количество на елемента. Количеството му се повишава от органоминералното торене в резултат главно на оборския тор, който, както отбелязват Палавеев и сътр. (1976), е „силен манганов тор”.

Хелатообразуващите агенти имат различна способност да извличат и подвижните форми на Mn (табл. 2). Най-големи количества от елемента се екстрахират с 0,05 М EDTA, а най-малки количества Mn се извличат от ДТРА рН 7,3. Потенциално достъпният Mn в Хумусно-карбонатната почва от стационарния опит – ДТРА-Mn, EDTA рН 8,6-Mn и 0,05 М EDTA-Mn представлява съответно 3,5%, 5,0 или 11,2% от общия Mn (640 mg/kg). Според Атанасова (2012) екстрахируемите количества Mn с EDTA рН 8,6 представляват 1,7% от общите концентрации в Черноземите и 7% в Сивите горски почви. Mitsios et al. (2005) установяват, че с ДТРА се извлича само 1,9% от общото количество Mn. Същите автори съобщават за доказана отрицателна корелация между рН на почвата и екстрахирувания с ДТРА Mn. В нашето изследване също се установи отрицателна корелация между рН и извлечения с различните екстрагенти манган. Корелационният коефициент ($r = -0,87$) е статистически значим ($p = 0,01$) единствено при отразяване на зависимостта между рН и 0,05 М EDTA-Mn. Причината за отрицателната корелация е, че манганът е под форми, които не се атакуват от комплексобразователни агенти, т. е. не съществува под формата на органични комплекси, а е утаен като оксид или карбонат, или оклюдиран в други почвени оксиди, карбонати в тези почви. Подобни твърдения са установени също за почви от Северна България с различно рН – от 5 до 8 (Atanassova, 2003; Atanassova and Damyanova, 2003a; Atanassova and Damyanova, 2003b).

Средното количество Mn, извлечено с EDTA рН 8,6 и 0,05 М EDTA е съответно 1,4 и 3,2 пъти по-високо от съдържанието, определено с разтвора на ДТРА. Корелацията между количество Mn, извлечено с ДТРА и EDTA рН 8,6 е силна:

$Mn_{EDTA\ 8,6} = -10,84 + 1,92 Mn_{DTPA}$
($r = 0,908^{**}$), а между извлечения Mn с ДТРА и 0,05 М EDTA има положителна, средна по сила корелация:

$$Mn_{0,05\ EDTA} = 46,00 + 1,15 Mn_{DTPA}$$
 ($r = 0,506$).

Между вариантите с минерално торене се установиха малки разлики по отношение количеството на подвижния цинк. Единствено при органоминералната система съдържанието му е по-високо от останалите варианти.

Този ефект се дължи на оборския тор и потвърждава резултатите от други изследвания (Szalai et al., 2002; Fischer et al., 2005).

Подобно на мангана, екстрахираното количество цинк следва реда:

0,05 M EDTA > EDTA pH 8,6 > DTPA pH 7,3.

На базата на средната стойност на общата концентрация (157 mg/kg) екстрахируемите количества представляват 4,9%, 10,6% и 15,2% съответно за DTPA-Zn, EDTA pH 8,6-Zn и 0,05 M EDTA-Zn. Mitsios et al. (2005) съобщават за много по-ниска екстрахируемост на цинка с DTPA pH 7,3 – 1,6% от общото му съдържание в почви, използвани за отглеждане на тютюн. В изследването установихме отрицателна корелация между екстрахирания цинк и pH на почвата, но получените корелационни коефициенти не са статистически значими. Атанасова (2012) изследва зависимостта Zn EDTA/pH и съобщава за намаляване на EDTA-Zn с нарастване на почвеното pH поради нарастване на специфичната сорбция от неорганичните почвени компоненти. Средното съдържание на цинка в почвата, отчетено с EDTA pH 8,6 и 0,05 M EDTA е съответно 2,2 и 3,1 пъти по-високо от количеството, извлечено с DTPA. Силна е връзката между DTPA-Zn и цинка, отчетен с EDTA pH 8,6 и 0,05 M EDTA:

$Zn_{EDTA\ 8,6} = 7,15 + 1,24 Zn_{DTPA}$ ($r = 0,783^*$),

$Zn_{0,05\ EDTA} = 4,39 + 2,52 Zn_{DTPA}$ ($r = 0,883^{**}$).

Не се установиха значителни разлики между вариантите по съдържанието на подвижна мед. Слабото изменение на този параметър от торенето се потвърждава от по-ниските стойности на вариационните коефициенти (табл. 2).

Екстрахираното количество Cu следва следния ред:

EDTA pH 8,6 > 0,05 M EDTA > DTPA pH 7,3.

Аналогични са резултатите, получени от Maftoun et al. (2003). Sedberry et al. (1988) намират, че EDTA-(NH₄)₂CO₃ извлича по-голямо количество Cu в сравнение с DTPA-CaCl₂. Изглежда, че наличието на NH₄⁺ йон в реагента е причина за екстрахиране на разтворимата и обменната Cu, защото според Hickey et al. (1984) хелатообразуващите агенти EDTA и DTPA извличат главно органично свързаната Cu. По-високото pH на EDTA-(NH₄)₂CO₃ мобилизира по-голямо количество разтворим органичен въглерод, а медта е свързана основно в органични комплекси.

Средното количество Cu, извлечено с EDTA pH 8,6 е почти 3 пъти по-голямо от екстрахираното с разтвора на DTPA. Други източници също съобщават за относително силно вариране съдържанието на подвижна мед, отчетено с различни екстрагенти (Maftoun et al., 2003). Получените резултати показват, че в разтвора на EDTA pH 8,6 преминават 37% от общото количество Cu, докато с разтворите на 0,05 M EDTA и DTPA pH 7,3 се извличат съответно 26% и 12% от общата Cu. В изследването не се установи силна корелация между pH на почвата и екстрахираните количества мед. Атанасова (2012) обяснява липсата на статистически достоверна корелация между CuEDTA и pH с факта, че медта образува стабилни органични комплекси и частта на киселинно зависимите й форми и разтворими органични комплекси с тип връзки Cu-EDTA от общата екстрахирана мед е малка. Също така медта е фиксирана от почвените колоиди – глинестите минерали и оксидите на Fe, Al и Mn (специфично адсорбирана pH > 6,0), чийто форми не се атакуват от екстрагента.

Изводи

Системното торене с минерални торове не изменя съществено съдържанието на подвижните форми на Fe, Mn, Zn и Cu в Хумусно-карбонатната почва, докато продължителното органо-минерално торене значително повишава съдържанието на подвижното желязо, манган и цинк.

Най-големи количества от Fe, Mn и Zn се екстрахират с 0,05 M разтвор на EDTA. Екстрахираното количество Cu следва следния ред: EDTA pH 8,6 > 0,05 M EDTA > DTPA pH 7,3. Установена е силна корелация между съдържанието на Fe, Mn и Zn, определено с различните методи. Следователно за оценка на подвижните форми на тези елементи в Хумусно-карбонатната почва успешно могат да се използват и трите комплексобразователни агенти – 0,05 M EDTA, EDTA pH 8,6 и DTPA pH 7,3.

При условията на Хумусно-карбонатната почва екстрахираните количества желязо, цинк и манган с 0,05 М разтвор на EDTA са съответно 2,5, 3,1 и 3,2 пъти по-високи от извлечените с DTPA pH 7,3 елементи. Средното количество Cu, извлечено с EDTA pH 8,6 е почти 3 пъти по-високо от съдържанието, определеното с разтвора на DTPA.

Получените резултати могат да послужат за разработване на модели за оценка на режима на микроелементи в карбонатни почви, където подвижните форми са именно подобни хелатни комплекси.

Литература

Атанасова, И. 2012. Лабилни форми на тежки метали и органични съединения в почвения адсорбент. Автореферат. София.

Захаријева, Т. 1985. Торене с желязо. *Почвозна-ние агрохимия и растителна защита*, № 1, 67-73

Палавеев, Т., Д. Стоянов, Н. Патарински, Св. Мирчев, Т. Тотев. 1976. Агрохимия на микроелементите. –В: Торенето при интензивното земеделие. *Земиздат*, София.

Стоянов, Д., Н. Пенева. 1985. Торене с цинк. *Почвознание агрохимия и растителна защита*, № 1, 74-81

Angelova, V., K. Ivanov, P. Zaprjanova. 2003. AAS Defining of the Mobile Forms of Pb, Cu, Zn and Cd in Soils From Industrially Polluted Regions. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 4, № 3, 600-612

Atanassova, I. 2003. Bioavailability of Trace Elements in Soils from North Bulgaria. I. Mn and Cr. *Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 38, (2), 23-27

Atanassova, I., I. Damyanova. 2003a. Bioavailability of Trace Elements in Soils from North Bulgaria. II. Cu and Pb. *Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 38 (2), 28-32

Atanassova, I., I. Damyanova. 2003b. Bioavailability of Zn in Soils from North Bulgaria. *Ecology and Future*, 2, (3-4), 119-121

Clayton, P. M., K. G. Tiller. 1979. A chemical method for the determination of the heavy metal content of soils in environmental studies. *CSIRO Aust. Tech.*, 41: 1-17

Fischer, M., J. Raupp, P. Mäder, D. Dubois, V. Römheld. 2005. Micronutrient status in two long-term trials with fertilisation treatments and different cropping systems. ISOFAR: Proceedings of the Conference „Researching Sustainable Systems“ Adelaide, 522-525

Haynes, R. J., R. S. Swift. 1983. An evaluation of the use of DTPA and EDTA as extractants for micronutrients in moderately acid soils. *Plant and Soil*, 74, 111-122

Hickey, M. G., J. A. Kittrick. 1984. Chemical partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in soils and sediments containing high levels of heavy metals. *J. Environ. Qual.*, 13, 372-376

ISO 14870. 2001. Soil Quality. Extraction of trace elements by buffered DTPA solution.

Knezek, D. D., B. G. Ellis. 1980. Essential micronutrients IV. Copper, iron, manganese and zinc. In Applied soil trace elements. Davies, B. E. (Ed), p. 259-268, *John Wiley*, Chichester.

Lindsay, W., W. Norvell. 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42: 421-428

Maftoun, M., V. Mohasseli, N. Karimian, A. M. Ronaghi. 2003. Laboratory and Greenhouse Evaluation of Five Chemical Extractants for Estimating Available Copper in Selected Calcareous Soils of Iran. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, Vol. 34, 9&10, p. 1451-1463

Mitsios, K. I., E. E. Golia, D. C. Tsadilas. 2005. Heavy Metal Concentration in Soils and Irrigation Waters in Thessaly Region, Central Greece. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 36, 487-501

Norvell, W. A., W. L. Lindsay. 1969. Reactions of EDTA complexes of Fe, Zn, Mn, and Cu, with soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 33: 86-91

O'Hallorans, J. M., W. C. Lindemann, R. Steiner. 2004. Iron Characterization in Manure Amended Soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 35, (15&16), 2345-2356

Sedberry, J. E., Jr. D. P. Bligh, M. Y. Eun. 1988. An evaluation of chemical methods for extracting copper from rice soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 19, 1841-1857

Szalai, T., É. Lehoczky, F. Nyárai, S. Holló, P. Csathó. 2002. The Available Microelement Content of Soil in a Long-Term Nutrient Supply Experiment. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 33, 3251-3260

Trierweiler, J. F., W. L. Lindsay. 1969. EDTA-Ammonium Carbonate Soil Test for Zinc. *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 33, № 1, 49-54