

# Aminosyrer og monosaccharider i humus fra dybe grundvandsmagasiner i Danmark

MARIANNE KROG



Marianne Krog: Aminosyrer og monosaccharider i humus fra dybe grundvandsmagasiner i Danmark. *Geologisk Tidsskrift*, hæfte 1, pp. 25–29. København 1996–03–01.

The occurrence of hydrolyzable amino acids and monosaccharides in humic substances from deep groundwaters was investigated.

Humic and fulvic acids were isolated from humic groundwaters and surface waters by adsorption chromatography. After hydrolysis amino acid analysis was carried out by cation exchange chromatography with OPA-derivatization and fluorescence detection and monosaccharide analysis was carried out by anion exchange chromatography with pulsed electrochemical detection.

The total concentrations and compositions of amino acids and monosaccharides varied widely amongst different samples of humic substances. These variations reflected differences in age and degree of decomposition of the humic substances.

*Marianne Krog, Geologisk Institut, Aarhus Universitet og Institutet for Geologi og Geoteknik, Danmarks Tekniske Universitet. Nuværende adresse: Storstrøms Amt, Teknik- og miljøforvaltningen, Grundvandskontoret, Parkvej 37, 4800 Nykøbing F.*

## Baggrund for projektet

I Danmark er der i flere tilfælde påtruffet grundvand med højt indhold af opløst organisk stof, såkaldt "brunt vand" (Bruun-Petersen (1990), Christensen (1990a og 1990b) og Grøn (1991)). Det opløste organiske stof består hovedsageligt af humus og har naturlig oprindelse i lag med tørv, ler eller brunkul. Humus stoffer kan deles i fulvussyrer og humussyrer. Humus har stor betydning i grundvandskemiske processer som sulfatreduktion og kompleksbinding af metaller. Opløst humus i grundvand udgør imidlertid også et problem i forbindelse med vandindvinding, idet det brune grundvand

ikke umiddelbart opfylder kvalitetskravene til drikkevand, og fjernelse af det organiske stof er vanskelig og kostbar. Det ville derfor være nyttigt at kunne identificere de geologiske lag, som i et grundvandsmagasin forårsager højt humusindhold. Indhold af aminosyrer og monosaccharider i humus har i dette projekt været afprøvet som indikatorer for oprindelse af humus opløst i grundvand.

Tidligere undersøgelser af humus fra jord og overfladevand (f.eks.: Malcolm, 1990) har vist, at humus og fulvussyrer indeholder hydrolyserbare aminosyrer og monosaccharider. Aminosyrer og monosaccharider hører til de mest reaktive bestanddele i humus og ind-

Prøve	FA fra jord	HA fra jord	FA fra flodvand	HA fra flodvand	FA fra havvand
Total aa-konc	520	844	64	308	64

Tabel 1. Total koncentration af aminosyrer (aa) (nmol/mg) efter hydrolyse af udvalgte humusprøver fra jord, flodvand og havvand (efter Malcolm, 1990). FA: Fulvussyre, HA: Humussyre.

*Table 1. Total concentration of amino acids (aa) (nmol/mg) after hydrolysis of selected humic substances from soil, fluvial and marine environments (after Malcolm, 1990).*

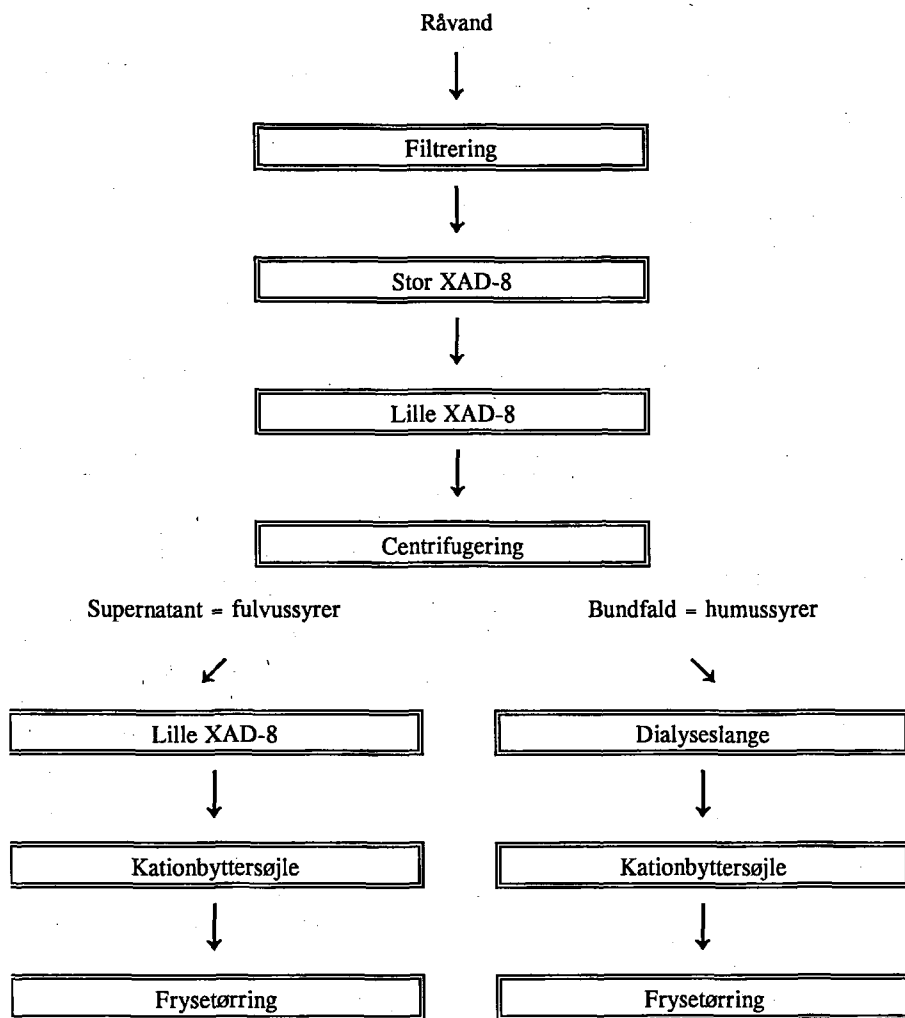


Fig. 1. Flowdiagram for den valgte procedure til isolering af humus fra vand.  
 Fig. 1. Flow diagram of the applied procedure for isolation of humic substances from water.

holdet af disse biomolekyler i humus fra grundvand har hidtil ikke været undersøgt. Sammensætningen og koncentrationen af disse biomolekyler varierer og synes at være karakteristisk for bestemte fraktioner af humus og for forskellige miljøer. Der er påvist højere total koncentration af aminosyrer og monosaccharider i humussyrer end i fulvussyrer, samt højere koncentration i humus fra jord og marine sedimenter end i humus fra overfladevand (Müller, 1975; Thurman, 1985; Malcolm, 1990). Eksempler på aminosyreindhold i humus fra forskellige miljøer fremgår af Tabel 1.

Sammensætningen af monosaccharider i geologiske prøver synes at være betinget af dannelsesmiljøet, idet analyser af forskelligt terrigent og marint organisk materiale, som typisk er udgangsmateriale for humus, har vist at andelen af xylose er relativt stor i træ og græs,

mens andelen af fucose og ribose er relativt stor i plankton og bakterier (Cowie & Hedges, 1984a). Desuden er det ved flere undersøgelser påvist, at monosaccharider findes i højere koncentrationer i terrigent materiale end i marint, mens aminosyrer findes i højere koncentrationer i marint materiale end i terrigent (Müller, 1975).

For aminosyrer og monosaccharider bundet i tørv og marine sedimenter er der i flere tilfælde påvist aftagende total koncentration nedadtil i profilet/borekernen (f.eks.: Müller, 1975; Cowie og Hedges, 1984a). Denne aftagende tendens er tolket som foretrukket nedbrydning af aminosyrer og monosaccharider, der normalt er letomsættelige. Desuden synes sammensætningen af aminosyrer og monosaccharider at ændre sig som følge af foretrukket nedbrydning af visse aminosyrer/monosaccharider. For aminosyrer er det karakteristisk, at

andelen af sure aminosyrer (især asparaginsyre) falder, mens andelen af glycin, som er den mest simple aminosyre, stiger ved tiltagende dybde/alder (Cowie, Hedges og Calvert, 1992). For monosaccharider er det karakteristisk at forholdet mellem (galactose+mannose) og (arabinose+xylose), som benævnes hexose/pentoseforholdet, stiger som følge af foretrukken nedbrydning af pentoser og tilførsel af hexoser fra mikroorganismer (Cheshire, Christensen og Sørensen, 1990).

Formålet med dette projekt har, som nævnt, været at analysere humus fra forskellige typer brunt grundvand for hydrolyserbare aminosyrer og monosaccharider og dermed påvise en eventuel sammenhæng mellem forekomsten af humusbundne aminosyrer og monosaccharider og oprindelse/alder af det organiske stof.

Bestemmelse af humusbundne aminosyrer og monosaccharider forudsætter hydrolyse (spaltning fra de store humusmolekyler). Metoder til isolering af humus fra grundvand og til hydrolyse af aminosyrer og monosaccharider eksisterer, men er kun til en vis grad standardiserede. En væsentlig del af projektet har derfor bestået i indkøring og optimering af metoder til det aktuelle formål.

## Undersøgte lokaliteter

Med henblik på at sammenligne humus fra forskellige typer brunt grundvand er der taget prøver af grundvand fra udvalgte borer, således at forskellige geologiske miljøer er repræsenteret. Der er for alle de undersøgte grundvandsmagasiner tale om vand med højt indhold af opløst organisk stof: „brunt grundvand“. De undersøgte lokaliteter er kort beskrevet i Tabel 2.

## Metoder

Humus- og fulvussyrer (HA henholdsvis FA) er isoleret fra vandprøverne ved brug af adsorptionschromatografi på XAD-8-materiale. Isolering af humus med XAD-8 omfatter tilbageholdelse af humus i en søjle, fjernelse af lavmolekylære, polære organiske stoffer og salte, samt videre oprensning ved dialyse og ionbytning. Den valgte procedure er skitseret på Fig. 1. Som grundlag for metodeudviklingen er benyttet en metode beskrevet af Thurman og Malcolm (1981), der vel er det nærmeste man kan komme en standardmetode. En væsentlig modifikation i forhold til Thurman og Malcolm's metode er, at der er benyttet salpetersyre i stedet for saltsyre for at undgå indkorporering af chlorid i de færdige humuspræparater (Grøn og Raben-Lange, 1992). Brug af salpetersyre resulterede derudover ikke i ændrede kemiske egenskaber af humusprøverne (Krog og Grøn, under trykning).

Tabel 2. Oversigt over de undersøgte lokaliteter med brunt grundvand og overfladevand.

Table 2. List of sampling sites of humic groundwaters and surface waters.

Lokalitetsnavn/ evt. DGU-nr	Alder af filtersat lag
Løgumkloster/ 158.698	Miocæn
Skærbæk/ 149.467	Miocæn
Fjand/ 72.622	Miocæn
Bramming/ 131.826	Holstein
Hviding/ 140.283	Holstein
Tuse Næs/ 198.514	Kvartær
Skagen Vandværk/ 1.193	Postglacial
Rømø	Postglacial
Skidendam Højmosé	Recent overfladevand
North Saskatchewan River	Recent overfladevand
Driedmeat lake	Recent overfladevand

Afprøvning af en standardmetode til hydrolyse af aminosyrer (Malcolm, 1990), som bl.a. består i kogning i 6M HCl i 24 timer, viste, at aminosyrer frigives langsommere fra humus end fra protein, og at standardmetoden derfor ikke er optimal til humusprøver. For at kunne sammenligne med resultater fra tidligere undersøgelser, er standardmetoden alligevel benyttet i dette projekt. Det kan anslås, at ca. 70-80% af aminosyrerne er frigivet ved den anvendte metode.

Ved hydrolyse af monosaccharider er der tradition for, at hydrolysemetoden tilpasses den aktuelle prøve-type (Biermann, 1988). To forskellige metoder har været afprøvet til hydrolyse af monosaccharider i humus fra grundvand. Den ene metode (Cowie og Hedges, 1984b) indbefatter forbehandling af prøven med 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og fældning af SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> med Ba(OH)<sub>2</sub>. Den anden metode (Fox, Morgan, Hudson, Zhu og Lau, 1983) er mildere, idet forbehandling med stærk syre og fældning med Ba(OH)<sub>2</sub> udelades, og prøven kun opvarmes med 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, som fjernes ved ionbytning. Dog indebærer den milde metode, at monosaccharider bundet i eventuelle vanskeligt hydrolyserbare celluloseforbindelser ikke frigives komplet (Cowie og Hedges, 1984b). I det aktuelle tilfælde er den milde metode fundet bedst egnet, da fældning med Ba(OH)<sub>2</sub> indebærer store tab af monosaccharider, som kun findes i meget lave koncentrationer i humus fra grundvand.

Aminosyrer og monosaccharider er bestemt henholdsvis med kationbytningschromatografi (Barkholt og Jensen, 1989) og med anionbytningschromatografi (Enevoldsen, upubl.). Disse metoder er valgt, fordi de lave detektionsgrænser muliggør bestemmelse af små koncentrationer af aminosyrer og monosaccharider i humus, selvom der kun er små mængder humuspræparat (ned til 10 mg) til rådighed.

Tabel 3. Total koncentration af hydrolyserbare aminosyrer og monosaccharider i de undersøgte prøver.

Table 3. Total concentration of hydrolysable amino acids and monosaccharides in the investigated samples.

Prøvenavn	Aminosyrer [nmol/mg]	Monosaccharider [ng/mg]
Skærbæk HA	27	430
Løgumkloster HA	19	450
Fjand HA	7	140
Bramming HA	36	1902
Bramming FA	24	—
Hviding HA HNO <sub>3</sub>	15	534
Hviding HA HCl	13	—
Tuse Næs FA	27	331
Skagen FA	129	554
Rømø HA	171	4581
Rømø FA	64	3041
Skidendam HA	984	61972
Skidendam FA	72	19791
N. Sask. River FA	41	805
Driedmeat Lake FA	81	1336

## Resultater

Ved analyser af humus fra grundvand er der påvist 10-200 nmol aminosyrer pr. mg humus og 100-5000 ng/mg (0.01-0.5% w/w) monosaccharider. Til sammenligning fandt vi i humus fra mosevand op til ca. 1000 nmol aminosyrer pr. mg humus og ca. 60000 ng/mg (6% w/w) monosaccharider. Total koncentration af aminosyrer og monosaccharider i de undersøgte prøver fremgår af Tabel 3.

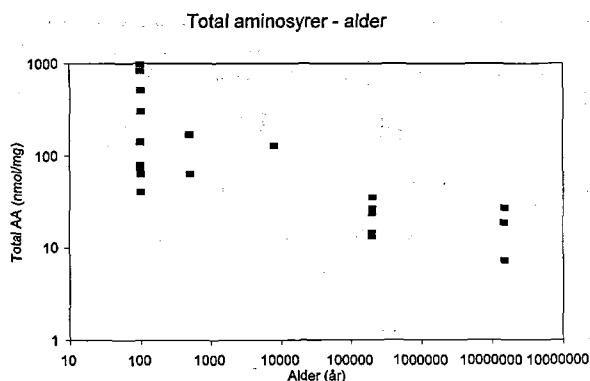


Fig. 2. Sammenhæng mellem total koncentration af aminosyrer i humusprøverne og formodet alder af udgangsmaterialet.

Fig. 2. Graph showing the relation between total concentration of amino acids in humic substances and assumed age of the organic matter (years).

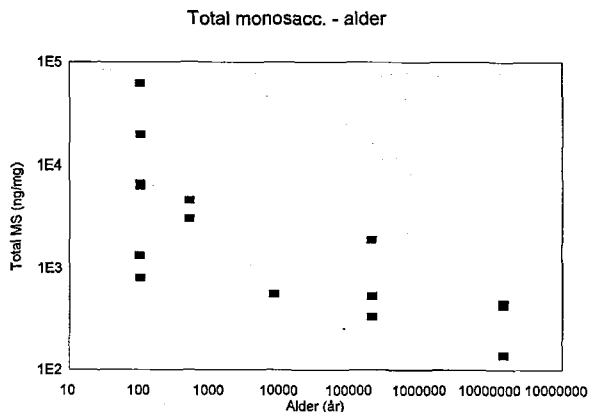


Fig. 3. Sammenhæng mellem total koncentration af monosaccharider i humusprøverne og formodet alder af udgangsmaterialet.

Fig. 3. Graph showing the relation between total concentration of monosaccharides in humic substances and assumed age of the organic matter (years).

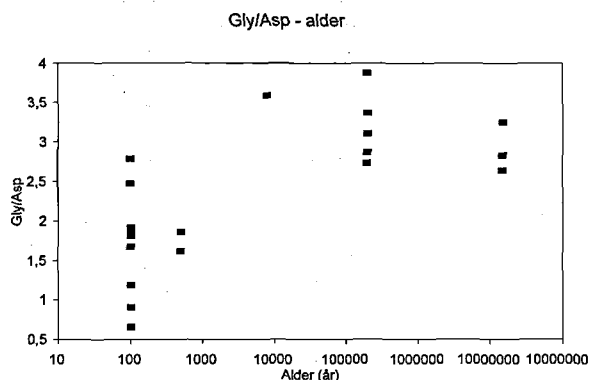


Fig. 4. Sammenhæng mellem forholdet glycin/asparaginsyre for humusprøverne og formodet alder af udgangsmaterialet.

Fig. 4. Graph showing the relation between the glycine/asparagine ratio of the humic substances and assumed age of the organic matter (years).

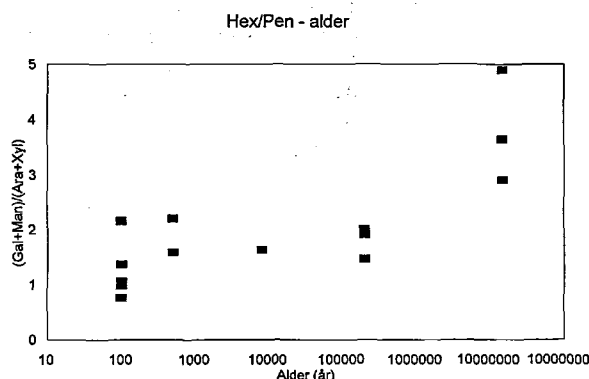


Fig. 5. Sammenhæng mellem hexose/pentose-forholdet for humusprøverne og formodet alder af udgangsmaterialet.

Fig. 5. Graph showing the relation between the hexose/pentose ratio of humic substances and assumed age of the organic matter (years).

## Diskussion

For at belyse en evt. sammenhæng mellem koncentration og sammensætning af humusbundne aminosyrer og monosaccharider og udgangsmaterialets alder, er total koncentration, hexose/pentose-forhold og forholdet glycin/asparaginsyre sammenstillet med formodet alder (Fig. 2–5). Resultaterne viser, at den totale koncentration af både aminosyrer og monosaccharider (Fig. 2–3) falder med tiltagende alder, mens såvel hexose/pentose-forholdet, som gly/asp-forholdet (Fig. 4–5) stiger med tiltagende alder. Årsagen til denne sammenhæng er sandsynligvis, at der sker en hurtigere nedbrydning af aminosyrer og monosaccharider, sammenlignet med de øvrige bestanddele i det organiske stof.

Resultaterne viser derimod ikke nogen udtalt sammenhæng mellem sammensætningen af aminosyrer og monosaccharider og formodet dannelsesmiljø (marin/terrigent). Årsagen hertil kan være, at en sådan sammenhæng er sløret som følge af foretrukket nedbrydning af visse aminosyrer og monosaccharider.

Ved vurdering af analyseresultaterne skal der tages forbehold for hydrolysetab og ufuldstændig hydrolyse. Ved sammenligning af resultater fra forskellige prøver, skal der desuden tages forbehold for, at de undersøgte prøver repræsenterer humus, somer opløst i grundvandet, og ikke nødvendigvis er identisk med humus i sedimentet.

På trods af de nævnte forbehold rummer resultaterne interessante perspektiver med hensyn til at bestemme oprindelsen af organisk stof i grundvand i situationer, hvor der er flere mulige kilder. Specielt vil der være gode muligheder for at skelne mellem humus fra recente lag og humus fra interglaciale eller ældre lag.

## Efterskrift

Aminosyreanalyserne er udført af Vibeke Barkholt og Anne Blicher fra Afdelingen for Biokemi og Ernæring på Danmarks Tekniske Universitet. Monosaccharidanalyserne er udført af Karen Enevoldsen fra Danisco Biotechnology. Projektet er finansieret af SNF-bevillingen "Dybe Grundvandsmagasiner".

## Referenceliste

- Barkholt, V., Jensen, A. L. 1989: Amino Acid Analysis: Determination of Cysteine plus Half-Cystine in Proteins after Hydrochloric Acid Hydrolysis with a Disulfide Compound as Additive. *Analytical Biochemistry* 177, 318–322.
- Biermann, C. J. 1988: Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 46, 251–271.
- Bruun-Petersen, J. 1990: Det brune grundvand i Ribe amt. *Dansk Geologisk Forening, Årsskrift for 1987–1989*, 103–107.

- Cheshire, M. V., Christensen, B. T., Sørensen, L. H. 1990: Labelled and native sugars in particle-size fractions from soils incubated with  $^{14}\text{C}$  straw for 6 to 18 years. *Journal of Soil Science* 41, 29–39.
- Christensen, T. 1990a: Brunt vand i Vestjylland. *Vandteknik* 58 (1), 79–83.
- Christensen, T. 1990b: Brunt vand i Vestjylland, del II. *Vandteknik* 58 (2), 129–134.
- Cowie, G. L., Hedges, J. I. 1984a: Carbohydrate Sources in a coastal marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 2075–2087.
- Cowie, G. L., Hedges, J. I. 1984b: Determination of Neutral Sugars in Plankton, Sediments, and Wood by Capillary Gas Chromatography of Equilibrated Isomeric Mixtures. *Analytical Chemistry* 56, 497–504.
- Cowie, G. L., Hedges, J. I., Calvert, S. E. 1992: Sources and relative reactivities of amino acids, neutral sugars, and lignin in an intermittently anoxic marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 1963–1978.
- Fox, A., Morgan, S. L., Hudson, J. R., Zhu, Z. T., Lau, P. Y. 1983: Capillary gas chromatographic analysis of alditol acetates of neutral and amino sugars in bacterial cell walls. *Journal of Chromatography* 256, 429–438.
- Grøn, C. 1991: Bruntvandsproblemer i Danmark. Kursus i vandforsyningsteknik 40, 71–86. *Dansk Vandteknisk Forening*.
- Grøn, C., Raben-Lange, B. 1992: Isolation and Characterization of a Haloorganic Soil Humic Acid. *The Science of the Total Environment* 113, 281–286.
- Krog, M., Grøn, C. Under trykning: Isolation and Characterization of Haloorganic Groundwater Humic Substances. *The Science of the Total Environment*.
- Malcolm, R. L. 1990: The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Analytica Chimica Acta* 232, 19–30.
- Müller, P. J. 1975: Diagenese stickstoffhaltiger organischer Substanzen in oxischen und anoxischen marinen Sedimenten. *Meteor Forsch.-Ergebnisse C* 22, 1–60.
- Thurman, E. M. 1985: *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Nijhoff/Junk, Dordrecht.
- Thurman, E. M., Malcolm, R. L. 1981: Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* 15 (4), 463–466.

## Geologiens dag 1996

Lørdag d. 4 maj

og

søndag d. 5 maj

Planlægning/koordination:  
Skov- og Naturstyrelsen

90 arrangementer spredt over hele  
Danmark.

Få en folder på Biblioteket eller hos  
Skov- og Naturstyrelsen  
tlf: 39 47 20 00