

Агапова Станислава Евгеньевна

студентка 3 курса факультета почвоведения кафедры химии почв
факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова,

Степанов Андрей Анатольевич

старший научный сотрудник кафедры химии почв
факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова,
кандидат биологических наук

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992,
Москва, Ленинские горы, 1-12, Россия

РАЗЛИЧИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ В ПАХОТНЫХ И СТАРОПАХОТНЫХ ЧЕРНОЗЕМАХ.

Аннотация. В работе представлены результаты лабораторного эксперимента по исследованию количественных характеристик гуминовых кислот пахотных и старопахотных выщелоченных черноземов с использованием традиционных и современных инструментальных методов.

Abstract. The paper presents the results of a laboratory experiment to study the quantitative characteristics of humic acids in arable and old arable leached chernozems using traditional and modern instrumental methods.

Ключевые слова: гуминовые кислоты

Keywords: humic acids.

Гуминовые кислоты — это часть органического вещества почвы, образующиеся в результате разложения растительных и животных остатков. Они являются частью гумусовых кислот, наряду с фульвокислотами и гумином.

ГК относятся к соединениям переменного состава, которые не имеют постоянного химического состава, что может объясняться особенностью

процесса их образования, в ходе которого происходит отбор наиболее устойчивых к биоразложению структур [1,7,12].

Предложены многочисленные схемы их строения. Однако они носят гипотетический характер и выражают статистические представления о молекуле. По одной схеме, ГК включают ароматическую центральную негидролизруемую часть и периферийную часть, состоящую из алифатических гидролизующих компонентов [11]. Центральная часть представлена высокозамещенными ароматическими фрагментами, соединенными алкильными и эфирными мостиками. Преобладающими заместителями являются кислородсодержащие функциональные группы [11,23]. Периферийная часть обогащена полисахаридными и пептидными фрагментами и с центральной частью связана ковалентно. Согласно другой схеме [31], молекула ГК включает в себя бензольные кольца с карбоксильными и фенольными группами, азотсодержащие гетероциклы, хиноидные структуры, и все они связаны между собой мостиками через азот и кислород.

Итак, однозначную формулу ГК вывести невозможно. Однако, можно привести сравнительную характеристику, выведенную экспериментально: они содержат больше ароматических и меньше алифатических компонентов.

Функциональные группы могут быть присоединены как к ароматической части, так и к алифатической составляющей ГК [32]. В составе ГК есть как положительно заряженные (пептидные, аминогруппы, амидные), так и отрицательно заряженные (спиртовые, фенольные и гидроксихинонные, альдегидные, кетонные и хинонные, карбоксильные, метоксильные) функциональные группы [16,30].

Наличие таких групп, как карбоксильная, гидроксильная и карбонильная, вместе с ароматическими структурами, позволяет ГК участвовать в ионных и донорно-акцепторных взаимодействиях, формировать водородные связи и активно вовлекаться в сорбционные процессы. Благодаря этим свойствам ГВ исполняют ряд важных функций в биосфере:

аккумулятивная, транспортная, регуляторная, протекторная и физиологическая [11]. Они улучшают структуру почвы, способствуют удержанию влаги и повышают доступность питательных веществ для растений. В целом, можно сказать, что они определяют плодородие почвы.

При длительном сельскохозяйственном освоении целинных черноземов происходит не только качественные изменения гуминовых кислот, но и их количественное уменьшение.

Объектом исследования выступают выщелоченные черноземы Липецкой области Данковского района.

Цель исследования: выявить особенности состава и строения гуминовых кислот в старопахотных и пахотных выщелоченных черноземах Липецкой области Данковского района.

Растительный покров на залежи был выражен разнотравно-злаковым сообществом, остепненным лугом с редкими кустарниками, на пашне - посадками подсолнечника.

Ход работы. Отбор проб был проведён методом конверта. Были отобраны пробы гумусового горизонта по 100 г с глубины около 20 см., что соответствует штыку лопаты. Расстояние между двумя местами отбором проб составило 1,6 км.

Далее были проведены лабораторные исследования.

Результаты и их обсуждение.

Органическое вещество в почве. Первым было определено содержание органического вещества в почве по косвенному методу И.В. Тюрина в двухкратной повторности.

Были рассчитаны средние содержания гумуса, %:

Гумус ср.знач.п., % = 5,396

Гумус ср.знач.з., % = 6,013

По классификации содержание гумуса в старопахотном и пахотном черноземах можно отнести к среднему.

Содержание NPK. В ходе работы определяли содержание общего, щелочно-гидролизуемого, нитратного и аммиачного азота; фосфора и калия.

Содержание фосфора по классификации [19] в залежи можно охарактеризовать как низкое, а в пашне – как среднее. Содержание калия по классификации [19] в залежи относится к повышенному и в пашне – как к очень высокому. В целом, содержание K_2O (1,6) и P_2O_5 (2) в залежи почти в 2 раза меньше, чем в пашне.

Потенциальные запасы доступного для растений азота, которые определяются по щелочно-гидролизуемому азоту, в залежи характеризуются как среднее, а в пашне – низкое [19].

Выделение и очистка ГК. Для выделения ГК из воздушно-сухих проб методом квартования создавалась интегральная проба. Выделение ГК для последующего их анализа производилось методом щелочной экстракции по Орлову [12].

Было получено два препарата гуминовых кислот из исследуемых почв - $GK_{залежь}$ и $GK_{пашня}$. Вес препаратов равен, соответственно – 2,2 г и 2,0 г. Препараты имели зольность, соответственно - 1,2 % и 1,3%.

Элементный состав ГК на С, Н, N. Результаты элементного состава ГК приведены в Таблица 1.

Обр.	Элементный состав, масс. % на беззольную навеску				Атомное отношение			E_4/E_6^1	E_{465}^2	ω^3	α^4
	С	Н	N	О	Н/С	С/N	О/С				
ГК _{залежь}	54,5	3,7	4,9	36,9	0,80	12,9	0,51	4,2	0,10	+ 0,19	29,2
ГК _{пашня}	56,6	4,4	4,0	35,0	0,93	16,3	0,47	4,4	0,13	+ 0,03	36,6

Таблица 1. Элементный состав ГК, коэффициенты цветности, атомное отношение в ГК, степень окисленности и степень бензоидности ГК.

Содержание С и Н в исследуемых ГК следует охарактеризовать как среднее. Атомное отношение Н/С молекулы ГК в пашне указывает на большую замещенность ароматических колец в “ядре”, по сравнению с ГК залежи. Коэффициент экстинкции для ГК пашни выше, чем залежи, что говорит о большей доле С бензоидных фрагментов в молекуле ГК пашни и ее более высокую устойчивость. Содержание N соответствует высоким значениям для ГК пашни (соотношение С/N > 13), и средним значениям для залежи. В молекулах ГК положительная степень окисленности, что соответствует избытку кислорода, поэтому соединения имеют окислительный характер. Также, более высокое значение у ГК залежи указывает на рост содержания кислородсодержащих групп (карбоксильных, карбонильных и фенольных), а также на уменьшение количества полисахаридных фрагментов.

Определение содержания в ГК углеводов и аминокислот. Прямым подтверждением присутствия активных кислых групп (гидроксильных, карбоксильных) являются результаты определения суммы кислых

¹ E_4/E_6 - коэффициенты цветности;

² $E_{465,1 \text{ см}}^{0,001\% \text{ ГК}}$ - коэффициенты экстинкции;

³ ω - степень окисленности;

⁴ α - степень бензоидности.

функциональных групп, содержание карбоксильных групп и фенольных гидроксидов, приведенные в Таблица 2. ГК, выделенные из залежи, более окислены по сравнению с ГК из пашни. Содержание углеводов и аминокислот также больше в ГК залежи в 1,9 и 1,6 раз соответственно, чем в пашне.

Обр.	Активные кислые группы, мг*экв/г			Гидролиза т ⁵ , %	Углеводы , %	Аминокислоты, %
	-COOH	ОН _{фенольные}	Σ			
ГК _{залежь}	5,93±0,14	1,66±0,18	7,59±0,16	40,3	Всего - 19,5; пентозы – 4,2; метилпент. т. - 8,4 гексозы – 6,9	15,4
ГК _{пашня}	4,28±0,14	1,32±0,18	5,60±0,16	32,7	Всего - 10,3; пентозы – 2,5; метилпент. т.- 4,5; гексозы – 3,3	9,6

Таблица 2. Функциональный состав, содержание углеводов, аминокислот.

В гидролизате ГК исследуемых идентифицировано 18 аминокислот: нейтральные (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин); дикарбоновые

⁵ Гидролизат - гидролизуемая часть ГК, % по углероду

(аспарагиновая, глутаминовая, орнитин); оксикислоты (треонин, серин); циклические (пролин, фенилаланиновая, тирозин), основные (аргинин, лизин, гистидин); серосодержащие (цистин, метионин), аминокислота орнитин не была обнаружена (Таблица 3).

Аминокислота	Образец	
	ГК _{залежь}	ГК _{пашня}
Глицин	10,08	9,84
Аланин	9,09	9,34
Валин	8,70	8,9
Лейцин	7,13	5,87
Изолейцин	5,13	4,96
Пролин	4,30	4,06
Фенилаланиновая	4,69	4,24
Метионин	0,32	0,30
Серин	2,61	3,18
Треонин	5,37	5,45
Лизин	0,94	0,88
Аргинин	4,34	4,96
Гистидин	2,64	2,58
Аспаргиновая	20,91	20,80
Глутаминовая	11,10	11,70
Цистин	2,07	1,89
Тирозин	0,60	1,05
Орнитин	-	-
Сумма аминокислот, % от беззольного препарата	15,4	9,6

Таблица 3. Аминокислотный состав ГК (% содержания от суммы).

Разница в содержании отдельных аминокислот достигает двух порядков и колеблется от сотых долей до целых процентов от массы сухого беззольного образца. В исследуемых ГК преобладают нейтральные и дикарбоновые аминокислоты. В наименьшем количестве присутствуют серосодержащие аминокислоты. Существенные различия проявляются в суммарном содержании аминокислот. В ГК_{залежь} содержится до 15,4% аминокислот от массы беззольного препарата, в ГК_{пашня} – 9,6 %.

Определение и расчёт молекулярно-массового распределения ГВ.

Проводилось методом гель-фильтрации на сефадексе G-75, который основан на принципе молекулярного сита. Условия проведения анализа: колонка — 1.84 × 76 см (LKB); буфер — 0.05 М Tris-HCl pH 8.2 с 0,1% SDS-Na; чувствительность — 0,2% T; скорость элюирования — 10 мл/ч; детектирование велось при 206 нм.

На Рисунок 1 и

Рисунок 2 представлены графики молекулярно-массового распределения ГВ. Хроматограммы для залежи и пашни различны. Первая содержит пять максимумов, вторая – три, соответствующие молекулярным фракциям ГВ. Пики 2 и 3 пашни выражены нечетко. Основное различие между ними состоит в наличии меньшего числа фракций в пашни, что говорит о деградации почвы от антропогенного воздействия.

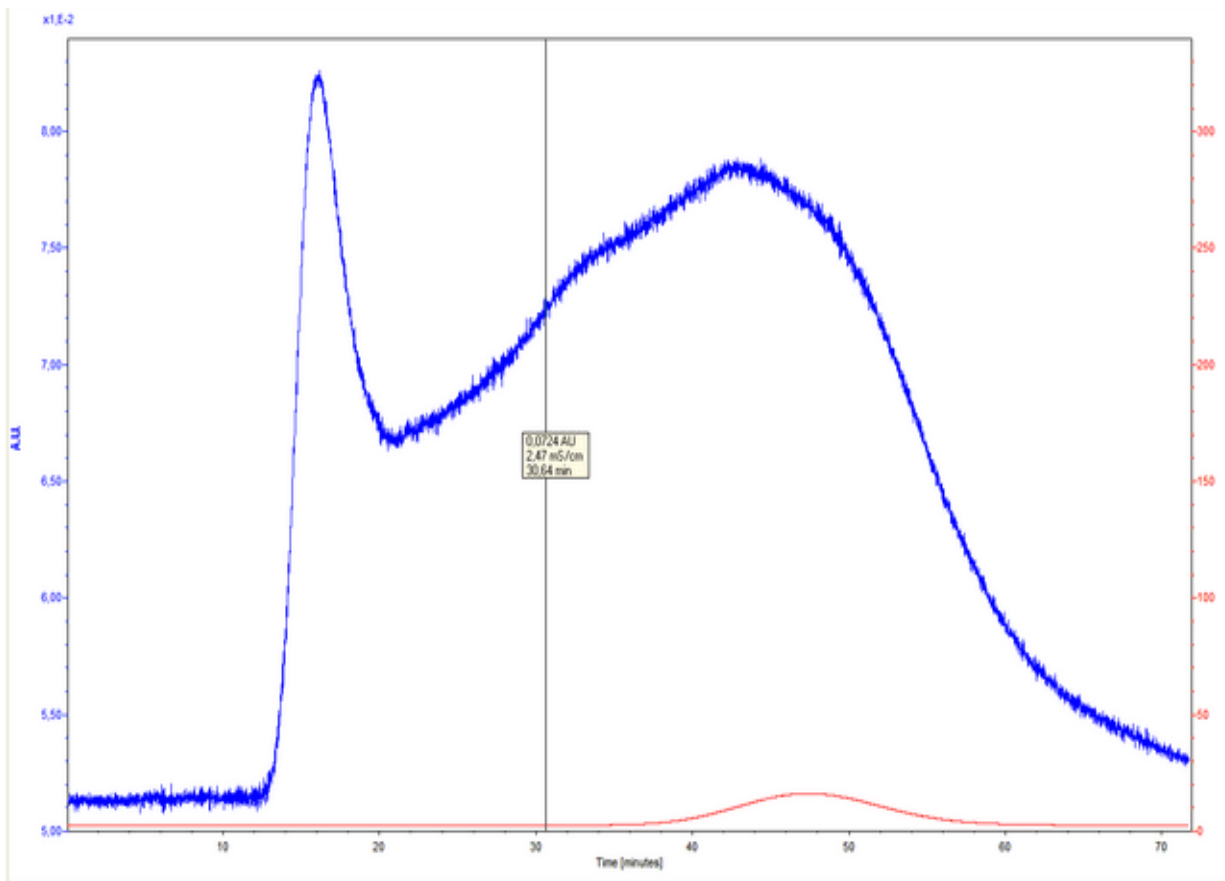


Рисунок 1. График ММР залежи.

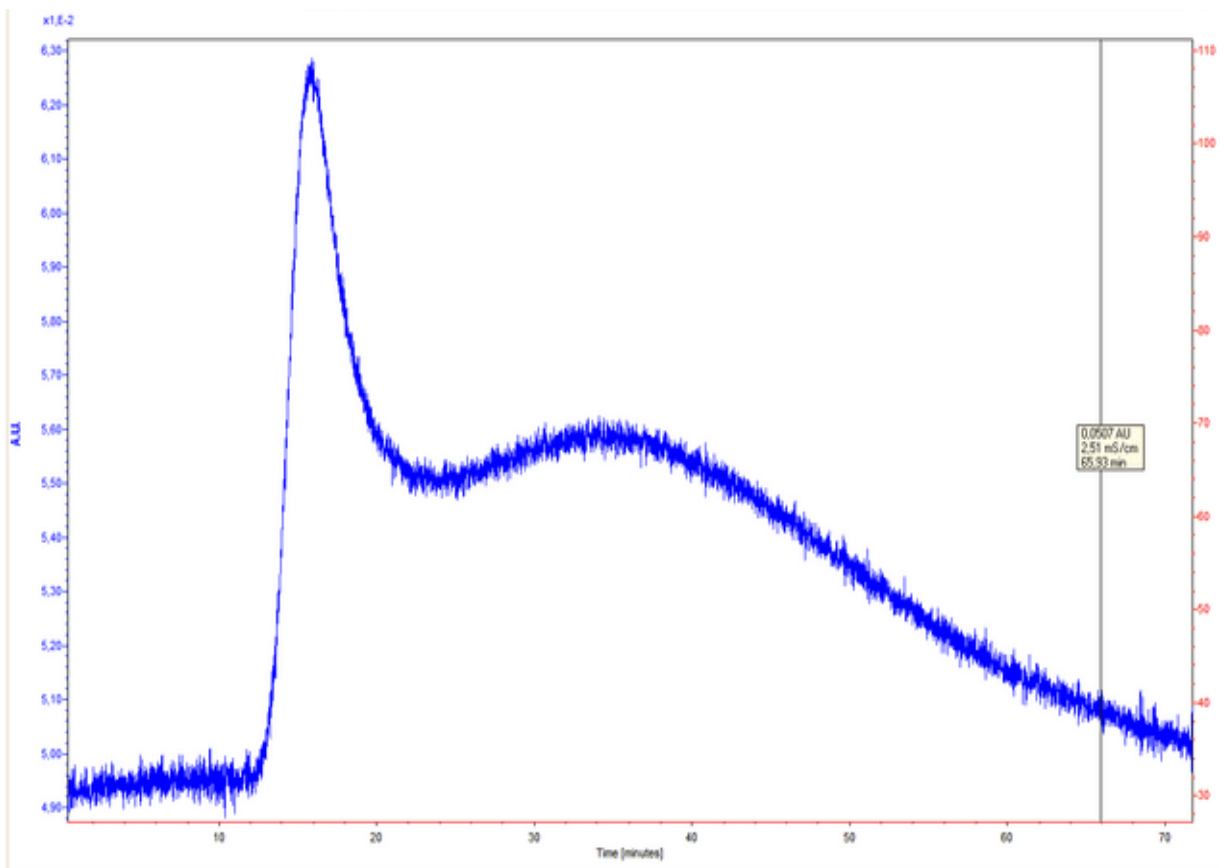


Рисунок 2. График ММР пашни.

В Таблица 4 представлены молекулярные массы образцов. Высокомолекулярным фракциям (время выхода с колонки 18 мин) принадлежат ГК с ММ ≥ 75000 Да представлена предположительно ГК. В залежи это первый пик с относительным содержанием фракций 25,6% от общей площади. В пашне – это первый пик с относительным содержанием 30,3%.

Среднемолекулярные фракции со средними значениями ММ, предположительно — ГК, образуют на хроматограмме залежи второй пик с максимумами 39100 Да. На его долю приходится 19,2%.

Низкомолекулярные компоненты, предположительно ФК, были обнаружены на хроматограмме ГК залежи, соответствующие третьему и четвертому и пикам (12500, 4100 Да), составляют в сумме 28,2%. В пашне они представлены вторым и третьим пиками 23100 Да и 10500 Да. Пятый пик в залежи с ММ 1800 Да соответствует неспецифическим веществам, их доля составила 26,9%.

Образец	Фракция	ММ, Да	S/Sобщ, %
ГК залежь	1	74500	25,6%
	2	39100	19,2%
	3	12500	15,4%
	4	4100	12,8%
	5	1800	26,9%
ГК пашня	1	74500	30,3%
	2	23100	12,1%
	3	10500	57,6%

Таблица 4. ММ фракций и их доля в составе ГВ.

Определение степени амфифильности ГВ. В качестве рабочей матрицы применяли вариант модифицированной “сшитой” агарозы фирмы “Pharmacia

- Octil-Sepharose CL 4B". Результаты фракционирования представлены на хроматограммах (Рисунок 3 и Рисунок 4).

На хроматограмме ГВ из залежи Рисунок 3 присутствуют два мощных гидрофильных максимума в левой части хроматограммы (ФК и гидрофильные ГК, способные к миграции в почвенном профиле). Важно отметить, что наиболее гидрофильные компоненты, составляющие крайний левый пик на хроматограмме сходят с колонки с задержкой в 2 минуты.

Наиболее гидрофобные компоненты в составе ГК из залежной почвы формируют гидрофобный максимум в правой части хроматограммы (ГК, обуславливающие водопрочные свойства почвенных агрегатов). Крайне важно отметить и возрастание сродства к гидрофобной матрице третьего максимума, сформированного наиболее гидрофобными компонентами гумуса в залежи по сравнению с хроматограммой из пашни.

Для количественной оценки наблюдаемых изменений удобно использовать показатель степени гидрофобности ГВ (h_{rh}). При этом делается допущение о близости коэффициентов экстинкции индивидуальных фракций и, следовательно, прямой зависимости площади пика от количества вещества. Степень гидрофобности ГВ из залежной почвы больше единицы ($h_{rh}=1,7$), что свидетельствует о некотором преобладании гидрофильного гумуса над гидрофобным в составе органического вещества.

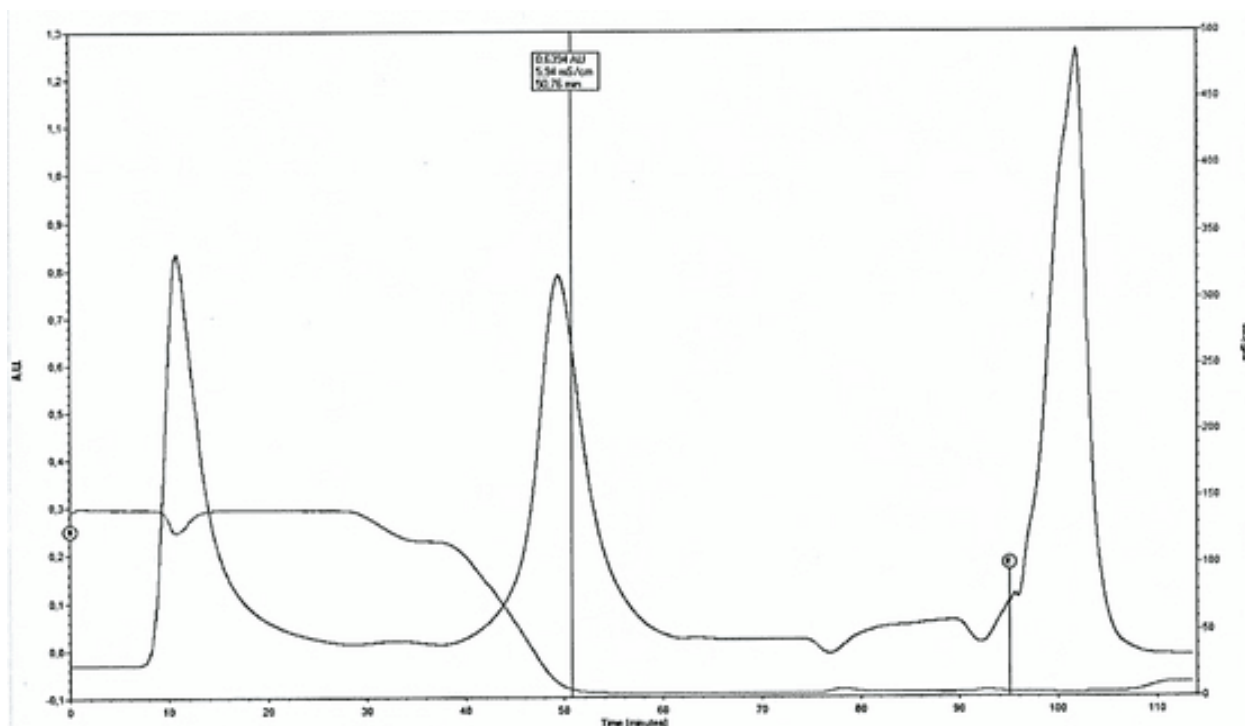


Рисунок 3. Амфифильные фракции в составе ГВ из залежи.

Картина распределения амфифильных фракций ГВ в составе пахотной почвы имеет ряд существенных особенностей. На хроматограмме пашни Рисунок 4 также присутствуют три максимума, как и для ГВ в залежи, но доля гидрофильного гумуса уменьшается. Так, например, интенсивность первого гидрофильного пика снижается, а второй гидрофильный пик (время выхода – 49,6 минут) заметно подрастает по сравнению с аналогичным максимумом на хроматограмме ГВ из залежной почвы.

Степень гидрофобности ГВ из пахотной почвы меньше единицы ($h_{ph}=0,8$), что свидетельствует об относительном возрастании доли гидрофобного гумуса в составе органического вещества. Вероятно, при интенсивном использовании исследуемой почвы как сельхозугодья происходит вынос или разрушение наиболее подвижных фракций гумуса.

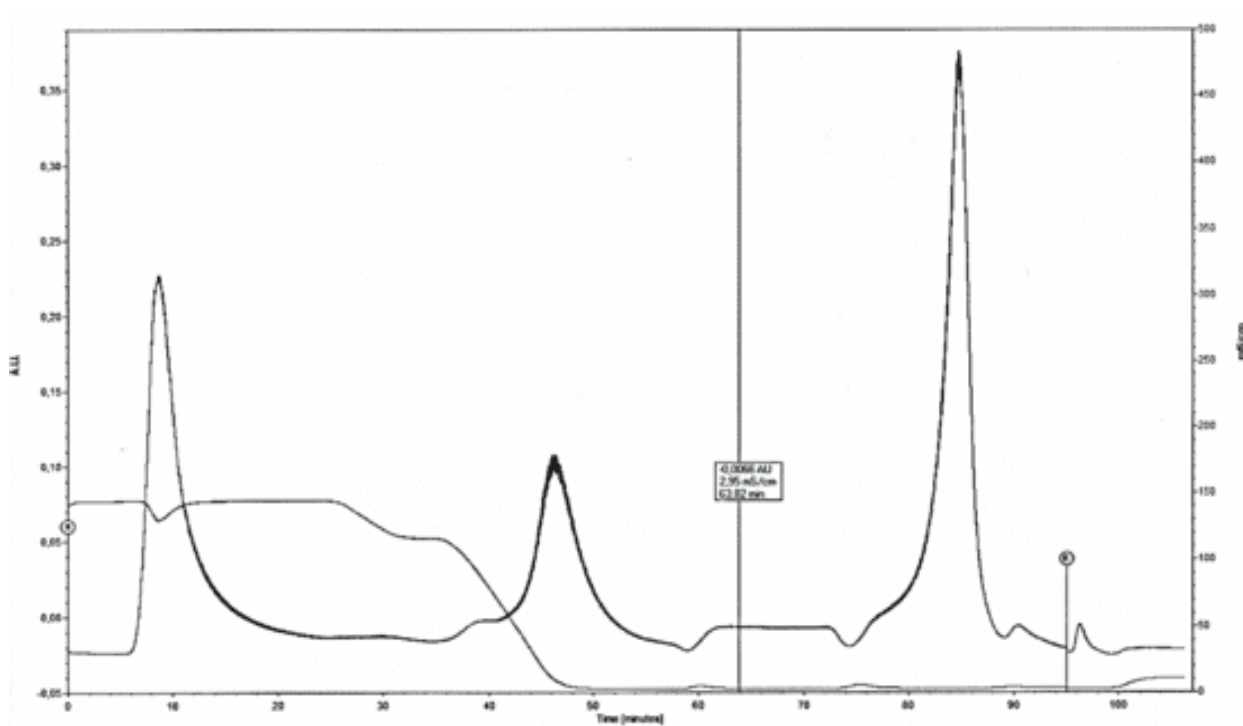


Рисунок 4. Амфифильные фракции в составе ГВ из пашни.

ИК-спектры ГВ. ИК-спектры ГВ состоят из набора специфических полос поглощения. На качественном уровне полученные спектры являются идентичными, но присутствуют различия в интенсивности линий поглощения. Далее проводили расшифровку спектра с использованием справочных данных.

Результаты расшифровки ИК-спектров представлены в Таблица 5 и Таблица 6.

Линия поглощения	Функциональная группа
Залежь	
454, 578	Полисахариды
614, 661	SO ₄ ²⁻
850, 884	Пентазамещённое бензольное кольцо
1069	-R-OH
1175	-C-OH
1289	-C-O фталатов и бензоатов
1322	-SO ₂ O-
1628	Амид-I
1718	-COO-
2368, 2489	димеры карбоновых кислот
2605	-OH карбоксилов
2966, 3060	-CH ₂ - алканов
3379	-OH, связанные водородными связями

Таблица 5. Результаты расшифровки ИК-спектров залежи.

Линия поглощения	Функциональная группа
Пашня	
453, 583	Полисахариды
612	SO ₄ ²⁻
851, 887	Пентазамещённое бензольное кольцо
887	Пентазамещённое бензольное кольцо
1008, 1068	-R-OH
1171, 1290	-C-O фталатов и бензоатов
1205	-C(=O)-O-
1631	Амид-I
1715	-COO-
2493	димеры карбоновых кислот
2606	-OH карбоксилов
2856	-CH ₃
2926	-CH ₂ - алканов
3396	-OH, связанные водородными связями

Таблица 6. Результаты расшифровки ИК-спектров пашни.

На ИК-спектрах ГК залежи и пашни (Рисунок 5, Рисунок 6) представлены интенсивные полосы в области 3300–3600 см⁻¹, что свидетельствует о наличии гидроксильных групп -OH. К особенностям спектров также относится полоса средней интенсивности в области 2800-2900 см⁻¹, обусловленная валентными колебаниями алкильных групп: -CH₃ и -CH₂-цепочки. Полоса средней интенсивности в области 1628 и 1631 см⁻¹

характерна для амидной группы. Несколько полос слабой интенсивности могут быть приписаны кислородсодержащим функциональным группам. Это карбоксильные группы (1718 и 1715 см⁻¹), а также гидроксильные группы, связанные с первичным (1000-1070 см⁻¹) и третичным (1170 см⁻¹) атомами углерода. О высокой степени замещения бензольных колец говорит отсутствие выраженной полосы в области 3030 см⁻¹.

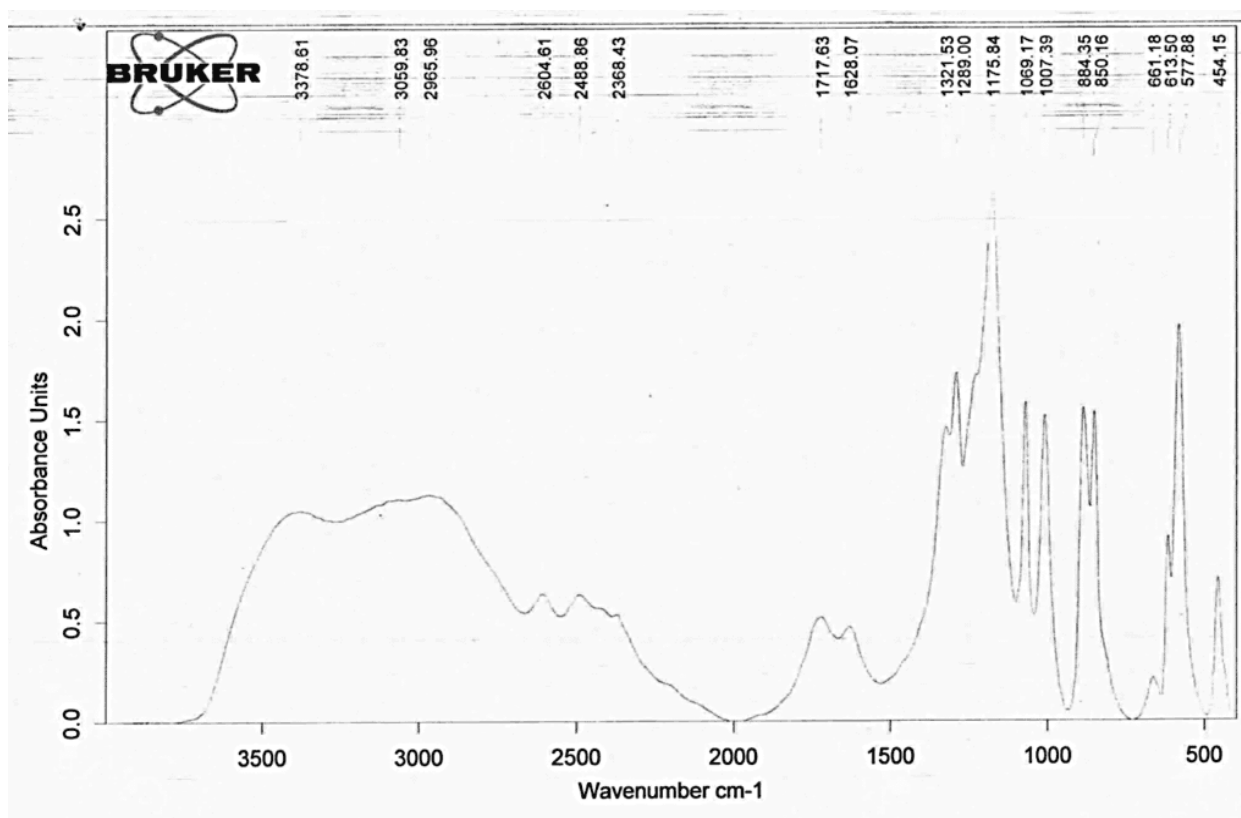


Рисунок 5. ИК-спектр ГК залежи.

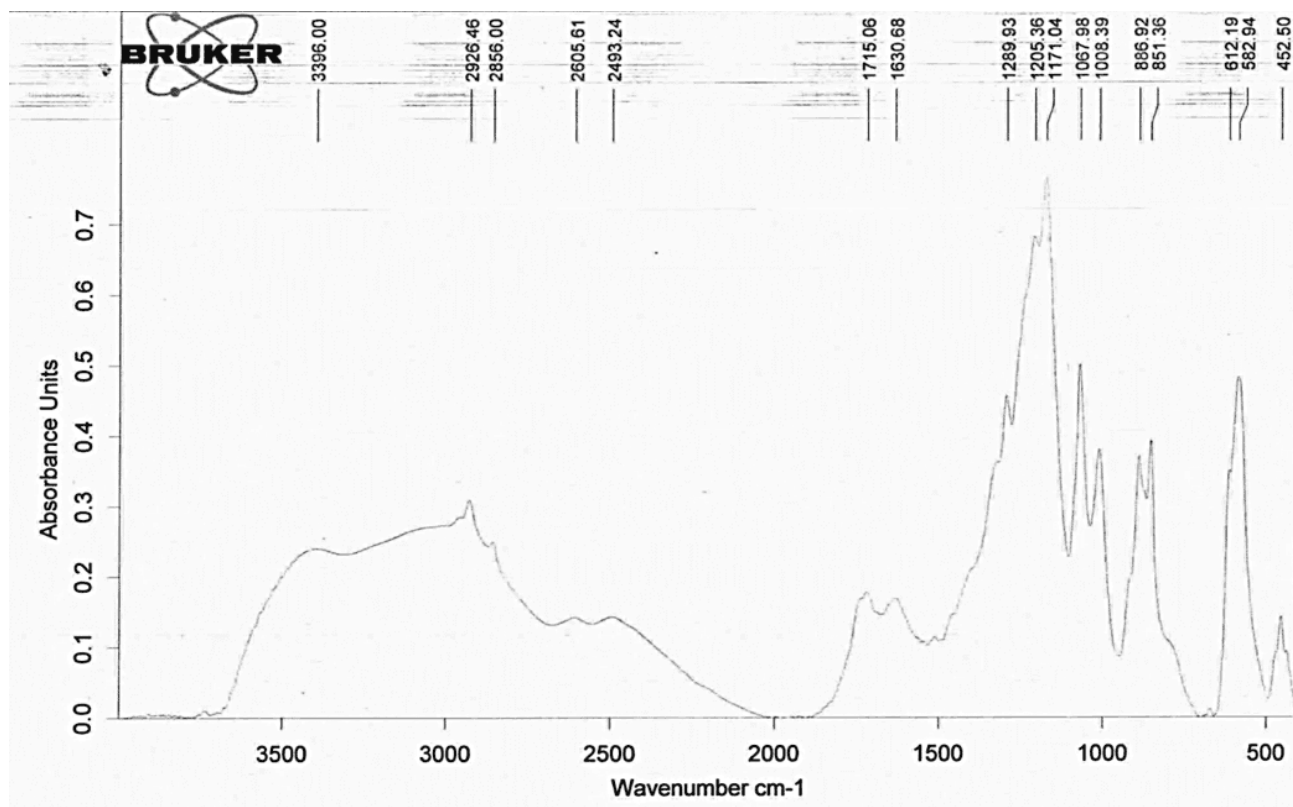


Рисунок 6. ИК-спектр ГК пашни.

Выводы. В молекуле ГК пахотной почвы меньше активных кислых функциональных групп, в них преобладают ароматические углеродные связи, они более устойчивые. Им также характерна большая замещенность и низкая степень гидрофобности по сравнению с старопахотной почвой, что делает их более миграционно устойчивыми и уменьшает водопроницаемость почвы, что свидетельствует о деградации пахотной территории под воздействием сельскохозяйственной техники за счет ухудшения ее физических и химических свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Александрова Л.Н., 1980. Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. Наука. Л-д. 287 с.
2. Кононова М.М., 1951. Проблема почвенного гумуса и современные задачи его изучения. М. 391 с.
3. Орлов Д.С., 1990. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ. 332 с.
4. Орлов Д.С., 1992. Химия почв. М.: Изд-во МГУ. 399 с.

5. Попов А.И., 2004. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование: монография / А.И. Попов под ред. Е. И. Ермакова. СПб.: Изд-во С. Петерб. ун-та. 248 с.
6. Сычев В.Г., Аристархов А.Н. и др. 2003. Методические указания по проведению комплексного мониторинга плодородия почв земель сельскохозяйственного назначения/ Л. М. Державин, Д.С. Булгаков. М.: ФГНУ «Росинформагротех». 240 с.
7. Bollag J.-M., Mayers K., 1992. *Sci. Total Environ.*, v. 117/118. 357-366 p.
8. Schnitzer M., Khan S. U., 1972. *Humic Substances in the Environment*. New York, M. Dekker. 327 p.
9. Stevenson F.J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 496 p.
10. Swift R., 1996. *Organic matter characterization. Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Soil Science Society of America. 1018-1020 p.