

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ ФУЛЬВОКИСЛОТ
ТОРФЯНИСТО-ПОДЗОЛИСТО-ГЛЕЕВАТОЙ ПОЧВЫ

© 2001 г. Е. Д. Лодыгин, В. А. Безносиков, Е. В. Ванчикова

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

Поступила в редакцию 08.06.99 г.

Выделены препараты фульвокислот (ФК) из торфянисто-подзолисто-глееватой почвы. Определен их элементный состав, получены и проанализированы протонные спектры ФК. ФК генетических горизонтов различаются по структурно-функциональным характеристикам. На основании полученных результатов выявлены две стадии трансформации молекулярной структуры ФК.

Плодородие и устойчивость почв к антропогенному воздействию зависит не столько от количественного содержания органического вещества, сколько от его качественных характеристик, в связи с чем вопрос изучения физико-химических и структурно-функциональных параметров гумусовых веществ почв имеет большое значение [11]. Одной из наиболее важных и сложных проблем является изучение молекулярной структуры почвенных органических веществ (ПОВ). Для оценки молекулярной структуры гумусовых веществ используются различные химические и физико-химические методы: определение элементного состава, суммы кислых функциональных групп, экстинкции растворов гумусовых соединений (E_4/E_6), ИК-спектроскопия и т.д. Однако большинство этих методов дают либо косвенную, либо весьма условную информацию о структурно-функциональном составе ПОВ [10]. Все это доказывает необходимость применения такого метода, который был бы лишен указанных недостатков. Таким методом может служить спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Метод ЯМР был разработан для исследования несложных органических соединений. Достижения в технологии метода ЯМР сделали возможным его использование при изучении ПОВ. Применение сверхпроводящих магнитов с полями (до 800 МГц для ^1H) и Фурье-трансформации позволило не только провести расчет интегральной интенсивности сигналов, но и разделить сигналы при их наложении или при высоком уровне шумов [17]. Для получения хорошо разрешенных спектров сухого вещества был разработан твердофазный метод CPMAS (Cross-Polarization Magic-Angle Spinning) – техника с вращением образца под магическим углом [14, 23, 25]. Теоретическая база по его использованию применительно к ПОВ была предложена Кинчечем [16].

Прошло более 30 лет с начала применения ЯМР спектроскопии для анализа ПОВ. За это время были получены ^1H , ^{13}C , ^{31}P и ^{15}N -ЯМР спектры как

растворенных гумусовых веществ, так и твердых образцов [19–22]. Это значительно расширило представление о составе и структуре ПОВ, углубило понимание механизмов гумификации и разложения, а также позволило выявить влияние взаимодействия ксенобиотиков и металлов на качественный состав гумусовых веществ. Обзор материала по изучению ПОВ методом ядерного магнитного резонанса представлен в работах Вершава и Микиты [23], Вилсона [25], Престона и Куска [18], Фрунда [15], Степанова [8] и др. Теоретическая основа метода ЯМР при использовании его для исследования почвенных гумусовых соединений рассмотрена Аксельсоном [13] и Вилсоном [25, 26].

Все эти достижения сделали возможным применение ЯМР при анализе структуры и состава разнородных ПОВ. Метод позволяет изучать разбавленные препараты, сухое вещество, а также соединения, имеющие промежуточное состояние (типа коллоидов или гелей). Преимущество его в том, что исследуемый образец можно использовать для последующих химических анализов, например при изучении индивидуальных липидов, сахаров или аминокислот.

Цель нашей работы – сравнительный анализ химической структуры препаратов фульвокислот (ФК), извлеченных из различных генетических горизонтов торфянисто-подзолисто-глееватой почвы, на основе количественной ^1H -ЯМР спектроскопии.

Образцы из генетических горизонтов торфянисто-подзолисто-глееватой почвы, сформированной на крупнопылеватом бескарбонатном покровном суглинке, были отобраны на Максимовском стационаре Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Разрез В-12-94 заложен в 6 км к западу от г. Сыктывкара в микролощине между низкими плоскими повышениями. Березово-еловый долгомошно-сфагновый лес. Вблизи разреза сфагновый покров. Ниже приводится описание горизонтов, из кото-

Распределение и элементный состав ФК торфянисто-подзолисто-глеевой почвы

Горизонт, глубина, см	Масса ФК в образце, г/кг	Зола, %	Содержание, %				Атомные отношения			Степень окисленности (w)
			С	Н	О	N	H/C	O/C	C/N	
O, 0–12	18.3 ± 0.9	3.8	$\frac{41.8}{32.3}$	$\frac{3.9}{36.1}$	$\frac{52.1}{30.2}$	$\frac{2.2}{1.4}$	1.1	0.9	23.1	+0.75
A2hg' 12–15	10.5 ± 0.5	2.0	$\frac{35.0}{28.9}$	$\frac{3.3}{32.7}$	$\frac{60.1}{37.3}$	$\frac{1.6}{1.1}$	1.1	1.3	26.3	+1.45
A2hg' 15–20	7.3 ± 0.4	1.4	$\frac{33.6}{26.6}$	$\frac{3.8}{36.1}$	$\frac{61.3}{36.4}$	$\frac{1.3}{0.9}$	1.4	1.4	29.6	+1.38
A2lg 20–25	5.30 ± 0.27	1.9	$\frac{42.6}{30.4}$	$\frac{4.8}{41.2}$	$\frac{50.5}{27.1}$	$\frac{2.1}{1.3}$	1.4	0.9	23.4	+0.43

Примечание. Над чертой – массовая доля, под чертой – атомная доля.

рых были отобраны образцы для выделения препаратов ФК.

O, 0–12 см. Имеет двуслойное строение. Верхняя часть (0–8 см) представлена светло-коричневым сфагновым слаборазложившимся торфом с включением веток, коры, хвои, листьев, много корней, свежий. Нижняя часть (8–12 см) – коричневый, среднеразложившийся торф, переплетен корнями, в основании углестые остатки, влажный, переход резкий.

A2hg', 12–20 см. Бледно-коричневый с сизым оттенком, слоеватый, тиксотропный, легкоуглинистый крупнопылеватый, слабо уплотнен, влажный, оршштейны диаметром 1–3 мм, есть вертикальные трещины с коричневой гумусовой пленкой и пропиткой стенок. Корни диаметром до 0.5 см.

A2lg, 20–28(30) см. Мозаичный: на сизо-сером фоне ржавые и ржаво-охристые пятна, занимающие до 30% горизонта, бесструктурный, среднесуглинистый, крупнопылеватый, плотный, влажный, тиксотропный, пронизан вертикальными трещинами с коричневой гумусовой пропиткой стенок, обычные конкреции диаметром до 3 мм, их содержание больше на участках ржавого цвета. Есть тонкие древесные корни. Переход постепенный по изменению окраски.

Торфянисто-подзолисто-глееватые почвы отличаются от подзолистых большей мощностью и двуслойным строением торфянистой подстилки, существенным усилением оглеения, возрастанием мощности потечно-гумусового горизонта, высокой плотностью и вертикальной трещиноватостью с гумусовой пропиткой стенок подзолистого горизонта. Эти специфические особенности почвы связаны с усилением увлажнения за счет латерального, поверхностного и внутрипочвенного притока влаги с микроповышений, занятых подзолистыми почвами, а также с застаиванием атмосферной влаги вследствие малого уклона дна ложины и наличия в ней заторфованных западин.

В таких условиях складывается застойно-промывной водный режим с высоким увлажнением всего профиля. Во влажные годы верховодка исчезает лишь на короткий срок (в июле или августе), а влажность нижних горизонтов постоянно находится в интервале НВ–ПВ [7]. Все эти факторы заметно влияют как на химический состав, так и на структуру гумусовых веществ. Ранее было изучено профильное распределение гумуса, его групповой и фракционный состав. Отмечено, что тип гумуса в органогенных горизонтах – фульватно-гуматный (Сгк : Сфк = 1.0–1.2), в минеральных – фульватный (Сгк : Сфк = 0.3–0.4) [2]. Это связано с тем, что переувлажнение этих почв ведет к сужению видового разнообразия микробных ценозов и преимущественному развитию в их составе анаэробной микрофлоры, что сопровождается снижением интенсивности процессов гумификации [9].

Использование протонного магнитного резонанса для изучения состава и структуры ФК, выделенных из торфянисто-подзолисто-глеевой почвы средне-таежной подзоны Европейского северо-востока России, проводится впервые. Препараты ФК были выделены по методике Кононовой и Бельчиковой [3]. Выделение ФК проводили из воздушно-сухих образцов почв путем 2-кратной экстракции смесью 0.1 н NaOH и 0.1 М Na₄P₂O₇. Далее к щелочному экстракту добавляли насыщенный раствор Na₂SO₄ (20% от объема экстракта) для коагуляции коллоидных частиц. Центрифугирование проводили в течении двух часов при 5000 об/мин. Затем серной кислотой осаждали гуминовые кислоты (ГК), а ФК очищали на активированном угле (марка АГ-3) по Форситу [6] и обессоливали пропусканием через катионит КУ-2 в Н⁺-форме. Зольность препаратов определяли их прокаливанием при 600°C. Элементный состав ФК определяли на CHNS-O-элементном анализаторе EA 1110 (Италия). Данные элементного состава приведены в таблице. Зольность всех препаратов не превышает 4% (таблица).

Спектры ^1H -ЯМР ФК в D_2O регистрировали на спектрометре AVANCE 300 фирмы "Bruker" с рабочей частотой 300.13 МГц. Ширина спектров составляла 5400 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры всех исследованных препаратов ФК имеют схожий набор характеристических полос, отличающихся лишь по интенсивности и ширине (рис. 1). На основании литературных данных [1, 8, 12, 24] были выделены следующие диапазоны химических сдвигов (ХС), принадлежащих протонам различных молекулярных фрагментов ФК:

- сигналы при 0.3–1.2 ppm относятся к CH_3 -группам алифатических цепочек;
- серия интенсивных сигналов при 1.2–2.0 ppm отнесена к протонам вторичных и третичных атомов углерода алифатических цепей;
- сигналы в диапазоне 2.0–3.0 ppm обусловлены протонами алифатических групп, непосредственно связанных с карбонильными ($\text{C}=\text{O}$) и сложноэфирными (COOR)-группами, а также с ароматическими фрагментами (Ar);
- широкий сигнал при 3.0–4.5 ppm объединяет сигналы протонов, характерных для большого класса органических соединений, в которых алкильный атом углерода связан одинарной связью с атомом кислорода (например, в эфирах или в углеводах);
- в области 4.5–6.3 ppm наблюдается сигнал, соответствующий протонам олефиновых фрагментов ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$);
- широкое галло при 6.3–9.0 ppm отнесено к протонам ароматических структур.

Следует выделить два достаточно интенсивных сигнала в области ароматических протонов, соответствующих, по-видимому, протонам изолированных бензольных ядер, имеющих заместители в пара-положении ($\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{R}$, $\sigma = 6.70$ ppm и $\text{R}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{R}$, $\sigma = 6.95$ ppm).

Оценка относительного содержания протонов основных молекулярных фрагментов ФК проведена интегрированием соответствующих диапазонов ХС. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Установлено, что в ФК органогенного горизонта суммарное содержание протонов алифатических групп составило около 73.1%, из них 6.6% приходится на протоны CH_3 -, CH_2 - и CH -групп алифатических цепочек, 20% – на протоны CH_3 , CH_2 и CH -групп, непосредственно связанных с $\text{C}=\text{O}$, COOR -фрагментами и с ароматическими кольцами, и 33.5% – на протоны $\text{R}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{O}$ -групп в простых и сложных эфирах, а также в углеводах. Доля "олефиновых" протонов составила 16%, про-

тонов ароматических фрагментов – 11% от общего количества протонов в ФК.

При переходе к горизонту A2hg' происходит постепенная трансформация органических веществ подстилки, сопровождающаяся накоплением в молекулах ФК карбоксилсодержащих групп ($\text{C}=\text{O}$, COOR) и снижением доли протонов $\text{R}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{O}$ -групп. Подобная тенденция, наряду с уменьшением суммарного количества углерода, отмечалась Шнитцером и Десьярдинсом [4]. Содержание "олефиновых" протонов уменьшается до 6.5%, а доля "ароматических" – колеблется от 10 до 13% от общего числа.

В минеральном гор. A2lg в условиях переувлажнения и анаэробнозиса происходит следующая стадия трансформации молекул ФК. При этом доля всех классов алифатических протонов резко падает до 67.7%, а доля протонов олефиновых фрагментов, наоборот, сильно увеличивается до 24.9%, "ароматические" протоны при этом составляют 7.4% от общего числа.

Следует отметить, что коэффициент корреляции между степенью окисленности ФК и содержанием в них протонов алифатических фрагментов, непосредственно связанных с $\text{C}=\text{O}$ и с COOR -группами, равен 0.88 ($n = 4$). Это позволяет выдвинуть предположение, что изменение степени окисленности ФК при их трансформации обусловлено главным образом карбоксилсодержащими группами, а не углеводными фрагментами.

На наш взгляд, отмеченная трансформация молекул ФК может быть вызвана рядом причин. Во-первых, в кислой среде (рН 4–5), в условиях избыточного увлажнения, идет отщепление периферической части молекул ФК, состоящей преимущественно из углеводных и аминокислотных остатков. В результате накапливаются более устойчивые олефиновые фрагменты, сосредоточенные в "ядрах" молекул ФК. Небольшое уменьшение доли "ароматических" протонов может быть связано либо с отщеплением периферических бензольных колец, либо с увеличением степени их замещенности, что также приводит к уменьшению доли "ароматических" протонов. Кроме того, может происходить микробиологическая деструкция ароматических фрагментов, сопровождающаяся раскрытием бензольных колец и увеличением количества олефиновых протонов. Во-вторых, процессы трансформации молекулярной структуры ФК могут быть обусловлены включением продуктов разложения свежих органических остатков, обогащенных олефиновыми фрагментами, в периферическую часть молекул ФК. В результате происходит "фрагментарное обновление" молекул ФК [5]. По нашему мнению, подобные реакции присоединения могут протекать в почвах, поскольку непредельные соединения, в частности олефиновые, довольно легко вступают в реакции конден-

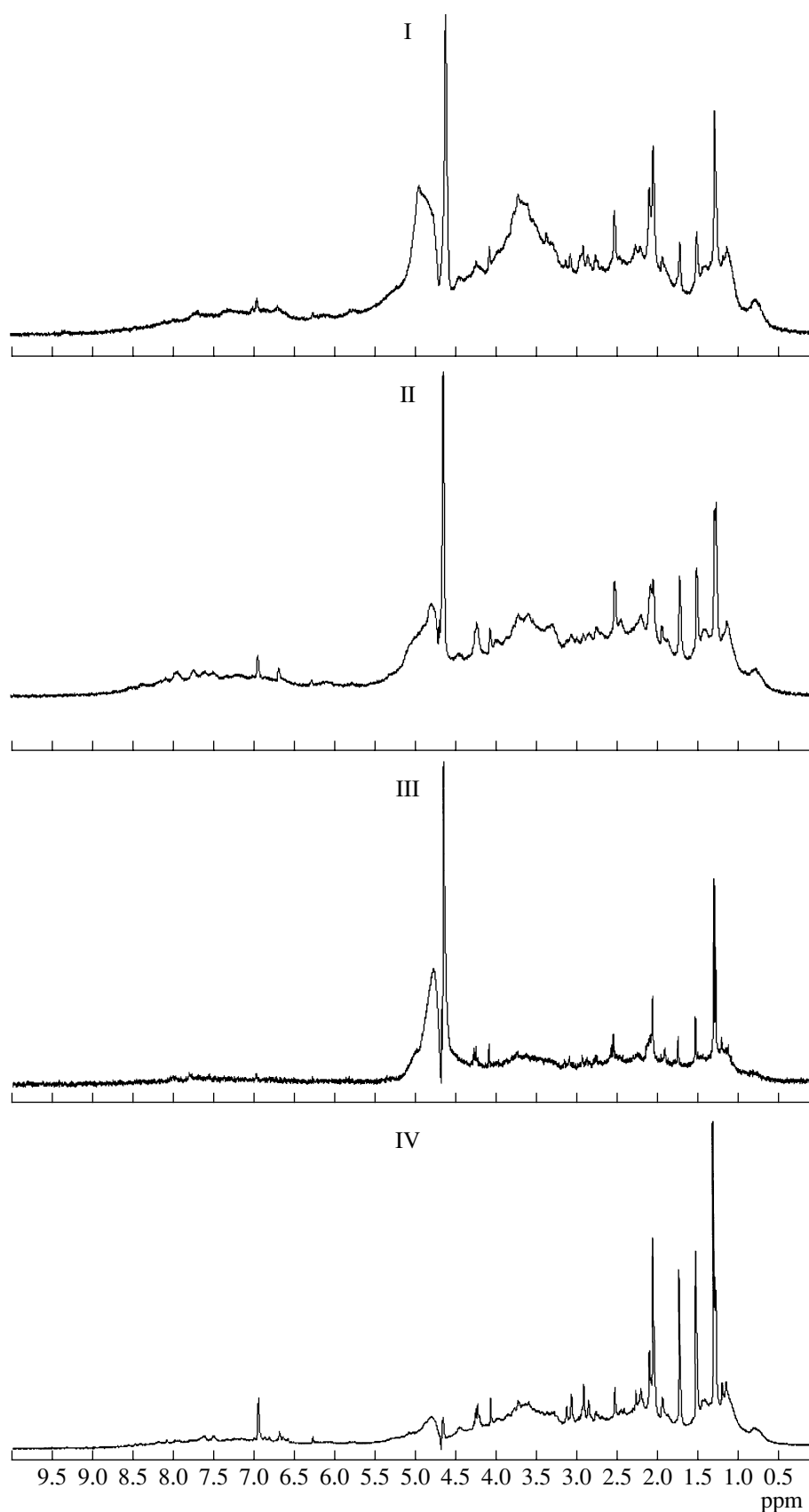


Рис. 1. ^1H -ЯМР спектры ФК выделенных из торфянисто-подзолисто-глееватой почвы: I – гор. O, 0–12 см; II – гор. A2hg', 12–15 см; III – гор. A2hg', 15–20 см; IV – гор. A2lg, 20–25 см.

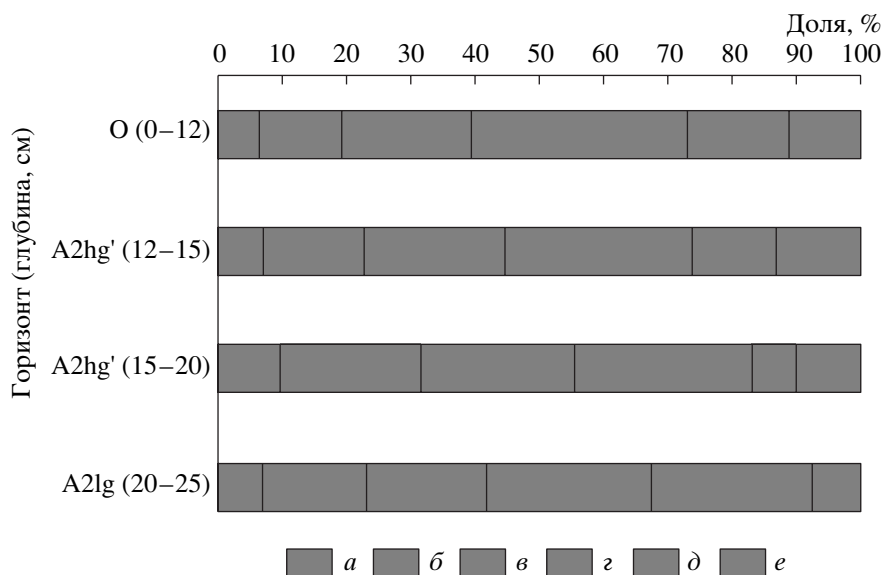


Рис. 2. Распределение протонов функциональных групп и молекулярных фрагментов в ФК по горизонтам торфянисто-подзолисто-глееватой почвы. а — CH_3 -группы алифатических цепочек; б — CH_2 - и CH -группы алифатических цепочек; в — CH_3 -, CH_2 - и CH -группы, связанные с $\text{C}=\text{O}$ и с COOR -группами; г — $\text{R}(\text{H})\text{-CH}_2\text{-O}$ -группы; д — протоны олефиновых фрагментов; е — протоны ароматических ядер.

сации (как по свободнорадикальному, так и по ионному механизму).

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующее заключение. Исследованные препараты ФК претерпевают две стадии трансформации в торфянисто-подзолисто-глееватой почве: при переходе от органогенного горизонта к минеральному A2hg' наблюдается относительное накопление как общего количества алифатических цепей, так и их фрагментов, непосредственно связанных с карбоксилсодержащими группами; при переходе от гор. A2hg' к гор. A2lg происходит относительный рост числа протонов олефиновых фрагментов и уменьшение всех групп алифатической природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каницкая Л.В., Рохин А.В., Гоготов А.Ф., Кушнерева Д.Ф., Калабин Г.А. Количественная спектроскопия ЯМР ^1H и ^{13}C препаратов лигнина, полученных щелочными способами делигнификации древесины сосны // *Химия в интересах устойчивого развития*. 1996. № 4. С. 281–288.
2. Козачок Ж.Н. Особенности гумусовых веществ подзолистых и болотно-подзолистых почв // *Экология таежных почв Севера*. Тр. Коми научного центра УрО Российской АН. Сыктывкар, 1997. № 155. С. 53–63.
3. Кононова М.М., Бельчикова Н.П. Ускоренные методы определения состава гумуса // *Почвоведение*. 1961. № 10. С. 75–87.
4. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1974. С. 265–286.
5. Почвоведение / Под ред. И.С. Кауричева, Н.П. Панова, Н.Н. Розова и др. М.: Агропромиздат, 1989. 719 с.
6. Практикум по почвоведению / Под ред. И.С. Кауричева. М.: Агропромиздат, 1986. 336 с.
7. Путеводитель научной почвенной экскурсии. Лесная зона (сезонно-промерзающие почвы). Сыктывкар, 1997. 72 с.
8. Степанов А.А., Жаркова Л.В., Степанова Е.А. Применение ^1H -ЯМР спектроскопии для характеристики гуминовых веществ // *Почвоведение*. 1997. № 2. С. 173–177.
9. Хабибуллина Ф.М. Микромицеты почв среднетаежной подзоны Европейского северо-востока // *Криопедология'97*. Тез. докл. междунар. конф. (Сыктывкар, Республика Коми, Россия, 5–8 августа 1997 г.). Сыктывкар, 1997. С. 198–199.
10. Чуков С.Н. Изучение гумусовых кислот антропогенно нарушенных почв методом ^{13}C -ЯМР // *Почвоведение*. 1998. № 9. С. 1085–1093.
11. Чуков С.Н. Исследование физико-химических параметров органического вещества почв (по данным ЭПР и ^{13}C -ЯМР). Автореф. дис. ... докт. с.-х. н. М., 1998. 49 с.
12. Эмсли Дж., Финей Дж., Сатклиф Л. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. М.: Мир, 1969. Т. 2. 468 с.
13. Axelson D.E. Solid State Nuclear Magnetic Resonance of Fossil Fuels: An experimental approach. Multiscience Publications Limited, Montreal, Quebec, Canada. 1985.

14. Frund R., Ludemann H.-D. The quantitative analysis of solution- and CPMAS-C-13 NMR spectra of humic material // *Sci. Total Environ.* 1989. V. 81/82. P. 157–168.
15. Frund R., Guggenberger G., Haider K., Knicker H., Kogel-Knabner I., Ludemann H.-D., Luster J., Zech W., Spiteller M. Recent advances in the spectroscopic characterization of soil humic substances and their ecological relevance // *Z. Pflanzenernahr. u. Boden.* 1994. B. 157. S. 175–186.
16. Kinchesh P., Powlson D.S., Randall E.W. ¹³C NMR studies of organic matter in whole soil: I. Quantitation possibilities // *Eur. J. Soil Sci.* 1995. V. 46. P. 125–138.
17. Lentz H., Lademann H.D., Ziechmann W. Proton resonance spectra of humic acid from the solum of a podzol // *Geoderma.* 1973. V. 18. P. 325–328.
18. Preston C.M., Rusk A.C. A bibliography of NMR applications of forestry research. Pacific Forestry Center Information Report. BC-X-322. Victoria, BC, 1990. 58 p.
19. Preston C.M., Newman R.H., Rother P. Using ¹³C CPMAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil // *Soil Sci.* 1994. V. 157. P. 26–35.
20. Preston C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects // *Soil Sci.* 1996. V. 161. P. 1–21.
21. Schnitzer M., Barton D.H. A new approach to the humic acid problem // *Nature.* 1963. V. 198. P. 217–219.
22. Thorn K.A., Arterburn J.B., Mikita M.A. ¹⁵N and ¹³C NMR investigation of hydroxylaminoderivatized humic substances // *Environ. Sci. Technol.* 1992. V. 26. P. 107–116.
23. Wershaw R.L., Mikita M.A. (eds.). NMR of humic substances and coal. Techniques, problems and solutions. Lewis Publishers, Chelsea, MI. 1987.
24. Wilson M.A., Collin P.J., Tate K.P. ¹H-Nuclear Magnetic Resonance study of soil humic acid // *Soil Sci.* 1983. V. 24. P. 297–304.
25. Wilson M.A. NMR Techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. Pergamon Press. Oxford, UK. 1987. 248 p.
26. Wilson M.A. Analysis of functional groups in soil by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In *soil analysis: Modern instrumental techniques*. 2nd ed. K.A. Smith (ed.). Marcel Dekker Inc. New York. 1991. P. 601–645.

Functional Groups of Fulvic Acids from Peaty-Podzolic Gleyic Soil

E. D. Lodygin, V. A. Beznosikov, and E. V. Vanchikova

The elemental composition and proton spectra of the preparations of fulvic acids (FA) isolated from peaty-podzolic gleyic soil have been determined. It is shown that FA from different genetic horizons have their own structural and functional characteristics. Two stages of the transformation of molecular structure of FA can be distinguished.