

УДК 631.41

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ И ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ФИЗИЧЕСКИХ ФРАКЦИЙ ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО¹

© 2022 г. Н. Н. Данченко^а, *, З. С. Артемьева^а, Ю. Г. Колягин^б, Б. М. Когут^а^аПочвенный институт им. В.В. Докучаева, Пыжевский пер., 7, стр. 2, Москва, 119017 Россия^бХимический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: nataly_danch@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 04.05.2022 г.

Принята к публикации 06.05.2022 г.

Цель работы – оценить взаимосвязь распределения органического вещества почв между химическими фракциями, выделенными традиционной щелочной экстракцией, с его распределением по физическим фракциям. Подход заключался в сравнении структурных особенностей (на основе данных твердофазной ¹³C ЯМР-спектроскопии) и вклада в общий органический углерод почвы обоих видов фракций. Объект исследования – типичный чернозем контрастного землепользования: целина и длительный чистый пар. Изучаемые химические фракции включали: гуминовые кислоты, гумин, а также составную фракцию, объединившую фульвокислоты, органическое вещество декальцината и фракцию коллоидов, осаждаемых из щелочного экстракта. Физические фракции получали гранулоденсиметрическим методом, они включали легкую фракцию, окклюдированную внутри агрегатов, илистую фракцию и остаток после отделения легких фракций и ила. Результаты для целинной почвы показали близость структуры органического вещества и вкладов в органический углерод почвы в следующих парах фракций: гуминовые кислоты – легкая окклюдированная фракция; гумин – остаток после физического фракционирования; составная фракция – ил. Для почвы под паром структура органического вещества практически идентична для указанных пар фракций, но их вклады в общий углерод почвы заметно отличаются. Показано, что в необрабатываемом черноземе химические фракции приурочены к определенным физическим фракциям, тогда как в деградированной почве это распределение нарушено. Сравнение массы углерода во фракциях двух вариантов чернозема показало, что все фракции теряют углерод при деградации почвы, но наибольшие потери среди химических фракций наблюдаются для гумина (61%), среди физических – для окклюдированной легкой фракции (66%).

Ключевые слова: гуминовые кислоты, гумин, гранулоденсиметрические фракции, ¹³C ЯМР-спектроскопия, контрастные виды землепользования

DOI: 10.31857/S0032180X22100033

ВВЕДЕНИЕ

За более чем 200-летнюю историю изучения почвенного органического вещества (ПОВ) разработано множество подходов к его исследованию и характеристике: различные варианты физического и химического фракционирования [1, 7, 26–28, 47, 52], применяемые уже давно, их сочетания со спектроскопическими методами, и наконец, современные методы высокого разрешения, позволяющие идентифицировать классы органических соединений и их распределение на минеральной матрице [2, 21, 35, 36, 38, 48]. Сего-

дня упор делается на то, что для получения достоверной информации о структуре и механизмах стабилизации органического вещества (ОВ) в почве необходимо исследовать нативное ПОВ, не отделяя его от минеральной матрицы [37, 40, 50]. Однако позволяющие этого достигнуть масс-спектрометрия вторичных ионов (Nano-SIMS) методы прикраевой структуры и тонкой прикраевой структуры спектров рентгеновского поглощения (XANES и NEXAFS), электронно-зондовый микроанализ (EPMA) не являются ни широко доступными, ни экспрессными, а обработка и трактовка их результатов возможна только с применением факторного анализа и других сложных статистических методов [35, 36, 48], способных выделить в огромном массиве данных сигналы

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S0032180X22100033.

отдельных компонентов ОВ. Поэтому различные варианты фракционирования и их комбинации, позволяющие выделить более гомогенные фракции ПОВ, по-прежнему остаются ключевым подходом при исследовании его структуры и свойств [19]. Например, комплексное сравнительное исследование разных методов фракционирования [47] показало, что сочетание физического и химического фракционирования дает возможность выделить пулы ОВ, максимально различающиеся по времени оборота и наиболее соответствующие теоретическим пулам.

Много исследований распределения органического углерода почвы между денсиметрическими и гранулоденсиметрическими фракциями и особенности структуры ОВ таких фракций для различных почв: солодей, буроземов, красно-бурых, черноземов и др. [3, 4, 9, 18, 22, 23, 26, 34]. Большое число работ посвящено и фракционированию ПОВ химическими методами с использованием различных экстрагентов и их последовательного применения [7, 29, 30, 54]. И химическое, и физическое фракционирование имеют достоинства и недостатки и связаны с потерями некоторой доли ОВ, а значит, и части информации [22, 37, 46]. Примеров параллельного применения физического и химического фракционирования к одним и тем же объектам мало [8, 27, 39, 47].

Выделение гуминовых веществ позволяет получить более однородные фракции на основе их растворимости в кислотах и щелочах. Гранулоденсиметрическое фракционирование – по плотности и размеру частиц, то есть большей либо меньшей ассоциированности с минеральной частью почв. Однако, как показывают ранее проведенные исследования [1, 27], это во многом взаимозависимые свойства.

Цель работы – исследовать взаимосвязь между распределениями компонентов ОВ по химическим и физическим фракциям, а именно, наличие/отсутствие приуроченности выделенных химических фракций к тем или иным физическим, на основе сопоставления структурных особенностей и вкладов в $C_{орг}$ почвы гуминовых кислот (ГК) и гумина, полученных с помощью щелочной экстракции, со структурой и вкладами ОВ гранулоденсиметрических фракций. Настоящее исследование является продолжением работы [23], в которой строение ОВ тех же образцов почв изучалось после гранулоденсиметрического фракционирования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объекты. Для исследования выбрали почвы двух контрастных видов землепользования: целина (Центрально-Черноземный государственный биосферный заповедник “Стрелецкая степь” Кур-

ская область, 51°34'24" N, 36°06'00" E) и длительный бессменный чистый пар (52 года) на бывшей старопахотной почве многолетнего полевого опыта Курского федерального аграрного научного центра, 51°37'6" N, 36°15'44" E. Первый вариант характеризуется максимальным, достигшим стационарного уровня содержанием ОВ ($C_{орг}$ 5.1%), который обусловлен отсутствием антропогенной нагрузки и установившимся в этих условиях равновесием между процессами поступления и разложения ОВ. Второй – минимальным содержанием ОВ ($C_{орг}$ 2.8%), являющимся результатом постоянной обработки при отсутствии поступления свежей растительной массы. Режим длительного бессменного чистого пара значительно ускоряет деградацию ОВ почвы по сравнению с традиционным сельскохозяйственным использованием. Благодаря этому почва под паром обогащена стабильным ОВ [17], и, соответственно, ее изучение позволяет наблюдать направление и результат трансформации зрелого ПОВ (деградационных процессов), отделив их от процессов разложения и стабилизации свежего и/или промежуточного ОВ. Почва – чернозем типичный, среднесуглинистый на лёссовых отложениях, *Na_{plc} Chernozem*, согласно международной классификации [60]. Территория опытных площадей типична для Центрального Черноземья России. Климат – умеренный со среднегодовой температурой +5.3°C и количеством осадков 550 мм. Территориальная близость участков и высокая пространственная однородность черноземных почв этого района позволяют рассматривать целину как исходное (нативное) состояние почвы для варианта пар.

Образцы отбирали из верхних горизонтов (5–25 см) в трехкратной повторности для каждого варианта опыта. После удаления подстилки с поверхности почвы, вырезали ненарушенные монолиты (25 × 25 × 15 см). Все почвенные образцы высушивали на воздухе при комнатной температуре, избегая попадания прямых солнечных лучей, затем пропускали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Остатки (размером > 1 мм) острожно измельчали пестиком с резиновым наконечником и снова пропускали через сито 1 мм. Все просеянные части каждого образца объединяли.

Методы. Физическое фракционирование. Физические фракции выделяли модифицированным вариантом [16] оригинального метода гранулоденсиметрического фракционирования [1]. Схема позволяет выделить четыре фракции: свободную (неокклюдированную) легкую ($ЛФ_{св}$), легкую фракцию окклюдированную внутри агрегатов ($ЛФ_{агр}$), илстую фракцию (Ил) и фракцию остатка (Остаток). $ЛФ_{агр}$ и Ил – компоненты крупных (50–250 мкм) микроагрегатов, неустойчивых при

обработке ультразвуком. Фракция Остаток состоит из тонких частиц первичных минералов и мелких (1–50 мкм) микроагрегатов (глинистых частиц с адсорбированным ОВ), устойчивых при обработке ультразвуком [16].

Химическое фракционирование ПОВ. Исходные образцы двух вариантов почв обрабатывали в соответствии с методом выделения гуминовых веществ, рекомендованным Международным обществом по изучению гуминовых веществ (IHSS) [56]. Для количественной оценки распределения углерода между фракциями на каждом этапе процедуры отбирали аликвоту экстракта ОВ и анализировали на содержание С и N. Таким образом, концентрации С и N были получены для следующих растворов: кислый экстракт (декальцинат); щелочной экстракт; кислый раствор фульвокислот (ФК) (после осаждения ГК); щелочной раствор повторно растворенных ГК после коагуляции минеральных коллоидов с помощью KCl; и раствор этих коллоидов (далее Коллоиды). Содержание углерода и азота в негидролизуемом остатке (НГО) после отделения щелочного экстракта определяли в его суспензии в деионизированной воде. Для ЯМР-исследования готовили очищенные и лиофилизированные препараты фракций ГК, ФК, гумина. Для минимизации потерь на последней стадии выделения ГК не подвергали ни обработке смесью (HF + HCl), ни диализу, в связи с чем они имели значительную зольность (около 18%). Суспензию НГО нейтрализовали HCl и промывали дистиллированной водой, после чего сушили на водяной бане при 60°C. Выход ФК для почвы под паром, а также HCl-растворимой и фракции Коллоиды для обеих почв был недостаточным для ЯМР-анализа.

Элементный анализ. Общее содержание органического углерода (TOC) и общего азота (TN) во всех исследуемых растворах определяли методом каталитического окисления сжиганием с помощью анализатора углерода TOC-L CSN (Shimadzu, Япония). Все измерения проводили в трех повторностях. Содержание углерода в исходных образцах почвы анализировали методом сухого сжигания на анализаторе Vario Macro Cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия).

Деминерализация. Для концентрирования ОВ и удаления Fe(III), снижающего качество спектров ЯМР, образцы почвы в целом обрабатывали плавиковой кислотой (HF) в соответствии с [24, 51]. К навеске почвы (0.1–0.3 г) добавляли 4 мл 10%-ного раствора HF, перемешивали в течение 20 мин на шейкере, оставляли на 12 ч и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость декантировали и отбрасывали. Обработку повторяли 4 раза. Образцы отмывали от HF дистиллированной водой, встряхивая на шейкере а затем центрифугируя. Отмывку по-

вторяли до достижения pH 6 супернатанта по универсальной индикаторной бумаге (~5 раз), затем сушили при 60°C. Из-за низкого содержания С в образцах НГО, их подвергали аналогичной обработке. Выходы по углероду и азоту после обработки HF оценивали по формуле:

$$\text{Выход C(N) (\%)} = \frac{m_{\text{обр}} C(N)_{\text{обр}}}{m_{\text{необр}} C(N)_{\text{необр}}} \times 100\%,$$

где $m_{\text{необр}}$ и $m_{\text{обр}}$ – масса необработанного и обработанного образцов, г; $C(N)_{\text{необр}}$ и $C(N)_{\text{обр}}$ – концентрация С (или N) в необработанном и обработанном образцах, г/г почвы или НГО.

Результаты представлены как среднее значение трех определений. Для ЯМР-анализа три порции обработанного HF материала объединяли.

ГК и ФК изучали методом ЯМР-спектроскопии без HF-обработки, так как содержание С в них было достаточным для получения качественных спектров, а Fe из них уже было удалено на начальном этапе процедуры экстракции (при декальцировании обработкой HCl).

¹³C ЯМР-спектроскопия в твердом теле. Для анализа химического строения ОВ фракций использовали твердофазную ¹³C ЯМР-спектроскопию, являющуюся мощным инструментом структурного анализа ПОВ [15]. ¹³C ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance-Ii NMR 400 WB, работающем на частоте 400.1 (¹H) и 100.4 (¹³C) МГц с 4 мм зондом H/X MAS WVT. Для получения ¹³C CP/MAS спектров использовали 4-импульсную последовательность гаmr-CP/TOSS(B) с линейным снижением мощности ¹H-канала от 100 до 70% и временем контакта 2 мс и высокоэффективной ¹H развязкой. Время задержки между импульсами 1.5 с. Количественные данные получали из спектров ¹³C CP/MAS по специально разработанной методике масштабирования, описанной ранее [23]. Для расчета интегральной интенсивности использовали следующие интервалы в соответствии с положением минимумов интегральной кривой: 0–47 (Alk); 47–113 (O/N-Alk); 113–141 (Ar); 141–160 (O–Ar); 160–188 (COO); 188–214 ppm (CO). Расчетная стандартная ошибка значения интегральной интенсивности для всех конкретных интервалов не превышала 2% от общей интегральной интенсивности спектров, включая ошибку спектрального измерения, математической обработки и воспроизводимости спектрального измерения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение ОВ черноземов между химическими фракциями и характеристика элементного состава фракций. Вклады химических фракций в общее содержание углерода почв, рассчитанные

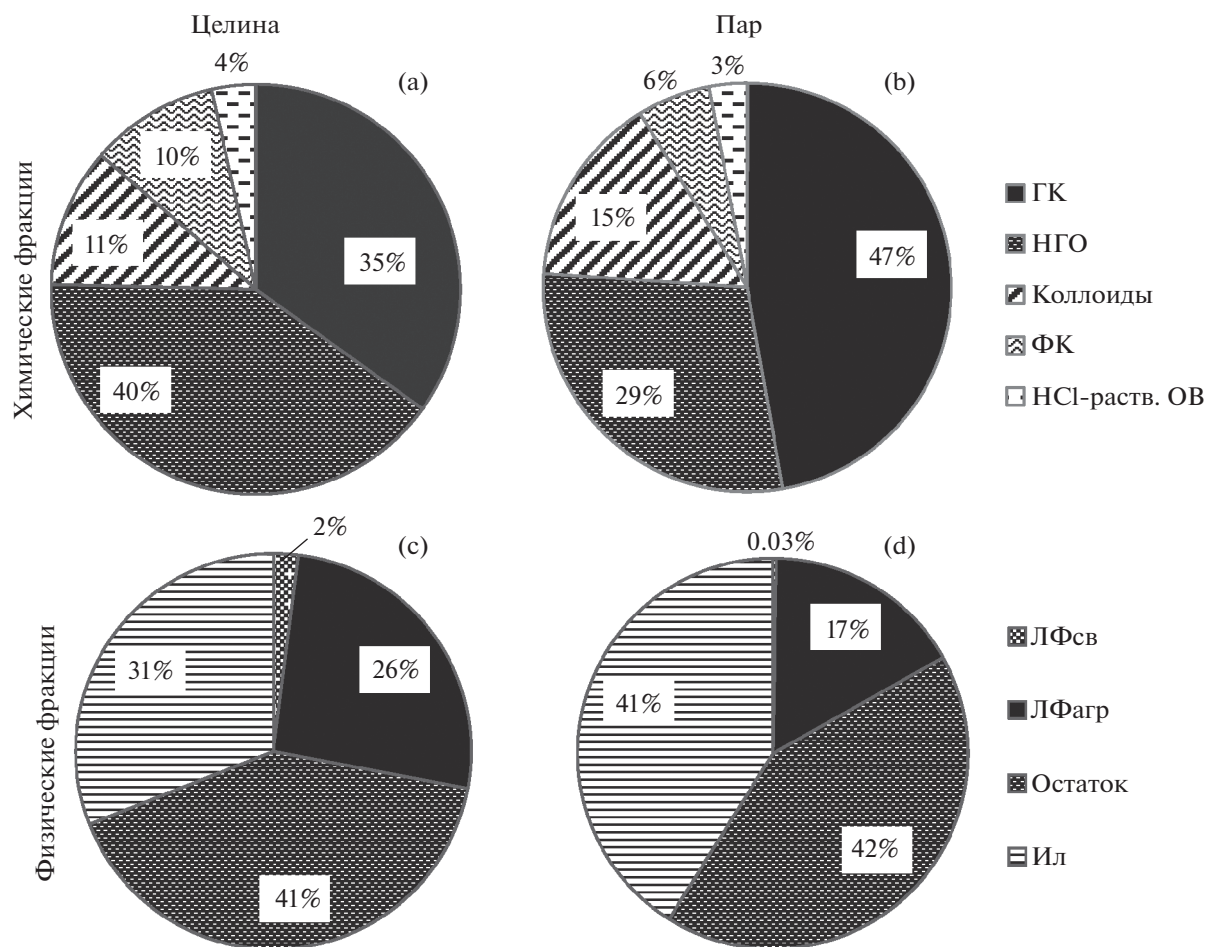


Рис. 1. Сравнение вкладов химических и гранулоденсиметрических фракций в $C_{орг}$ чернозема типичного контрастных видов землепользования: целина (а, б) и пар (с, д). Обозначения: ГК – гуминовые кислоты; НГО – негидролизующий остаток; Коллоиды – органо-минеральная фракция, осаждаемая из щелочного раствора ГК; ФК – фульвокислоты; ЛФ_{св} – свободная легкая фракция; ЛФ_{агр} – окклюдируемая легкая фракция, Ил – ОВ, связанное с глинистыми частицами (<1 мкм), Остаток – ОВ тяжелой фракции, остающейся после отделения легких фракций и Ила. Стандартное отклонение вкладов фракций по трем повторностям (%): НСI-гидролизующее ОВ 0.6 и 0.7, ФК 0.6 и 0.5, НГО 2 и 3, коллоиды 0.5 и 1, ГК 1 и 1 (целина и пар соответственно).

по результатам анализа экстрактов, Коллоидов и НГО по ходу выделения согласно методике ИНСС [56], представлены на рис. 1. Там же, приведены вклады гранулоденсиметрических фракций, рассчитанные на основе их масс и данных элементного анализа, взятых из работы [9] (рис. 1с, 1д). Их использовали при сравнении ОВ фракций.

Диаграммы распределения С по химическим фракциям показывают, что ГК и НГО являются, как и ожидалось, доминирующими химическими фракциями в обоих изученных вариантах. При этом вклад ГК в $C_{орг}$ почвы в варианте пар на 12% больше, чем в варианте целина, а НГО практически на столько же процентов меньше. Доля $C_{орг}$ в составе ФК в пару в 1.7 раза меньше. Вклад Коллоидов, которые обычно не рассматриваются как фракция ОВ, оказался сравнимым с вкладом ФК в почве целины и в 2.5 раза больше такового в

почве под паром. Их доля в $C_{орг}$ почвы в пару по сравнению с целиной возрастает в 1.5 раза. Вклад НСI-растворимого ОВ мало зависит от варианта землепользования. Полученные данные о вкладах в $C_{орг}$ почвы для ГК и ФК лежат несколько ниже, а для гумина – существенно выше значений, приводимых для фракционно-группового состава пахотного слоя чернозема типичного: ГК ~ 40%, ФК ~ 20%, гумин 22–27% [13]. В первую очередь это связано с использованием разных методик выделения: три разных обработки щелочью в методике по Тюрину в модификации Пономаревой–Плотниковой и всего одна в методике ИНСС.

Исследователи, работающие с гуминовыми веществами, как правило, ставят целью выделение наиболее “чистых” препаратов для дальнейшего их изучения и не всегда приводят данные о количественном выходе фракций. Лишь в неко-

Таблица 1. Соотношение C/N в образцах почвы в целом и химических фракциях чернозема типичного контрастных видов землепользования

Образец	C/N*	
	целина	пар
Почва в целом	10.7 (0.2)	12.5 (0.2)
Негидролизующий остаток	9.9 (0.2)	13.3 (0.7)
ГК	12.4 (0.3)	15.8 (0.2)
Коллоиды	11.8 (0.3)	13.8 (0.9)
ФК	9.3 (0.1)	7.2 (0.2)
HCl-гидролизующее ОВ	7.1 (0.4)	7.8 (0.9)

*Среднее из трех аналитических повторностей (стандартное отклонение).

торых публикациях представлены значения выхода ГК, ФК и гумина в виде процентов от $C_{орг}$ почвы. Ранее для черноземов Курской области суммарная доля ГК + ФК при исчерпывающей ступенчатой экстракции 0.1 М пиррофосфатом Na при pH 7, 10.6 и 12.6 составила 45–54% от $C_{орг}$ почвы [6]. В работе [29] для ОВ почвы Clayic Eutric Stagnosols ($C_{орг} = 4.6\%$) аналогичным методом для суммы ГК + ФК получена цифра 26% от $C_{орг}$ почвы. Важно отметить, что препаративный выход ГК и ФК по углероду всегда будет несколько меньше, чем измеренный в ходе фракционирования, так как при обессоливании гуминовых кислот и очистке ФК на смолах [56], некоторая доля ОВ отбрасывается. Пол [45] на основе компиляции материалов нескольких исследований приводит следующие данные по вкладам химических фракций в $C_{орг}$ близкой к чернозему почвы Mollisol ($C_{орг} = 5.6\%$) под северным культивируемым лугом: кислотный экстракт – 14%; ФК – 15%; ГК – 40%; гумин – 31% от $C_{орг}$. Несколько больший выход ГК и ФК, и меньший гумина в указанной работе по сравнению с нашими данными может быть связан как с особенностями почвы, так и с использованием более высокой концентрации щелочи 0.5 М [20]. Строго говоря, эти результаты нельзя сравнивать, так как использование разных экстрагентов и их концентраций влияют на степень извлечения ОВ из почвы [13], однако нам не удалось найти полных данных, полученных по методике IHSS.

Соотношения C/N для почв в целом и всех изучаемых фракций приведены в табл. 1. Видно что, значения C/N для почвы в целом и НГО близки, а для ГК – заметно шире, чем для остальных компонентов щелочного экстракта: ФК и коллоидов. Разница между значениями C/N для ГК и коллоидов свидетельствует о различии химического состава этих фракций. Обогащенность азотом ФК и HCl-гидролизующего ОВ указывает на большую гидролизующесть (растворимость) N-содержащего ОВ [25] и соответствует версии

происхождения фракции ФК, как продуктов отщепления аминокислотных и углеводных фрагментов в ходе гидролиза ГК, гумина и не до конца разложившихся растительных остатков [13]. НГО целины также обогащен N, что согласуется с данными о преимущественной стабилизации веществ белкового происхождения в тяжелых фракциях [27, 44, 53].

Почва в целом и химические фракции (за исключением ФК) почвы под паром характеризуются более широким C/N, чем таковые целины. Аналогичная закономерность наблюдалась для гранулоденсиметрических фракций изучаемых вариантов почвы [23]. С точки зрения химических фракций это можно связать с большим вкладом ГК, для которых характерна большая величина C/N [14], и существенно меньшим вкладом гумина в ОВ почвы под паром.

ОВ, стабильное в условиях деградации почвы. Для оценки устойчивости фракций в условиях деградации почвы рассчитана масса С во всех фракциях (рис. 2) и оценены его потери в пару по сравнению с целиной. Полученные данные показывают, что в режиме бесшумного чистого пара углерод теряется из обеих стабилизированных фракций: ГК и НГО, однако ГК являются более устойчивой (менее расходуемой) фракцией в условиях деградации почвы. При общих потерях углерода в почве пара по сравнению с целиной – 46%, фракция ГК теряет только 27%. Неожиданным оказался результат по НГО: в длительном пару общие потери С этой фракции по сравнению с целиной максимальны и составляют около 61%. Очевидно, ОВ этой органо-минеральной фракции в пару не только интенсивно расходуется (минерализуется), но и трансформируется, становясь более гидролизующим при последовательной обработке кислотой и щелочью, то есть частично пополняет собой химические фракции, убыль С в которых меньше, чем в почве в целом: ГК и коллоиды (8%-ные потери С). Фракции ФК и HCl-растворимого ОВ, как и НГО, теряют более 60% С. Интересно, что суммарные потери состав-

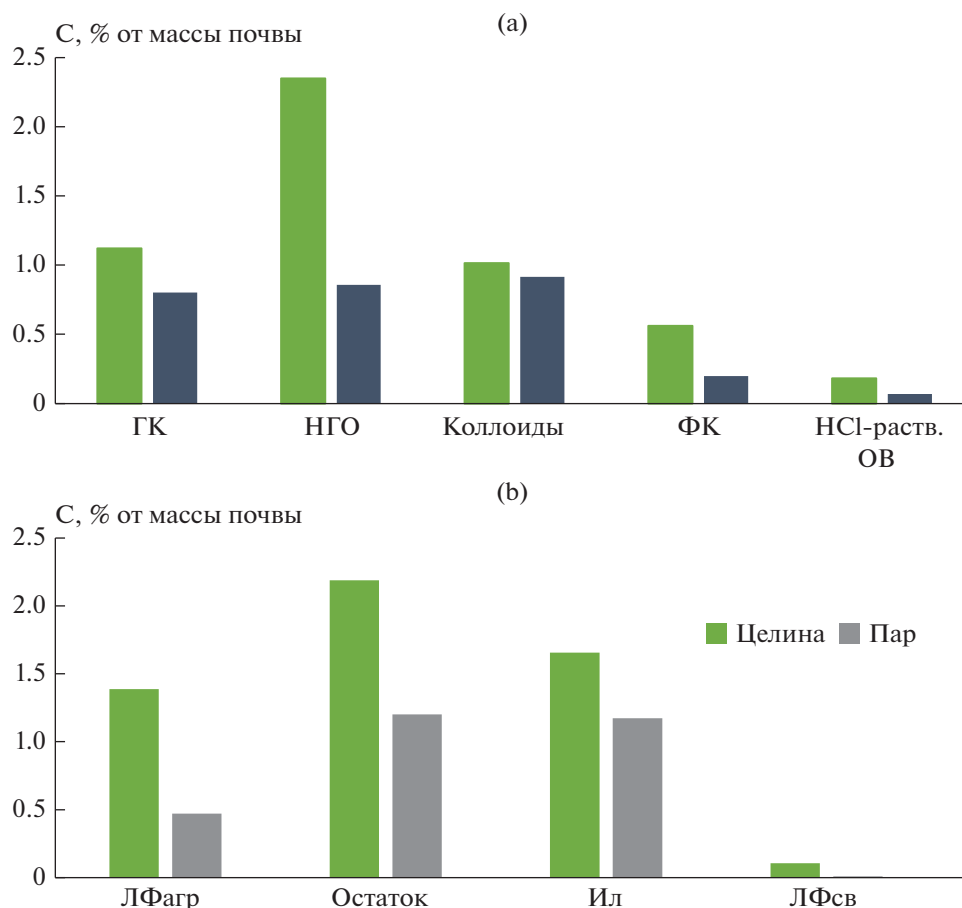


Рис. 2. Сравнение массы углерода химических (а) и физических (б) фракций в почвах целины и пара.

ной фракции Δ ОВ близки таковым почвы в целом и составляют около 48% от исходного количества С. Для сравнения потери углерода основных гранулоденсиметрических фракций в пару по сравнению с таковыми целины, рассчитанные из данных предыдущей работы [23], составили ЛФ_{agr} – 66%; Остаток – 46%; Ил – 30% (рис. 2б).

Деминерализация нефракционированной почвы и НГО. Обработка 10%-ной HF, наиболее часто используется для пробоподготовки образцов почвы и органо-минеральных фракций к анализу методом твердотельного ЯМР [24, 49, 51]. Ранее показано, что существенного изменения состава ОВ в результате обработки HF для почв верхних горизонтов не наблюдается [25]. Выходы ОВ после обработки 10%-ной HF для образцов почвы в целом и НГО приведены в табл. 2, для сравнения данные результаты для фракции Остаток, полученной гранулоденсиметрическим методом [23]. Выход ОВ после деминерализации по массе больше на целине, как для почвы в целом, так и для НГО, что связано с большим содержанием С в этой почве. Выход по С или доля ОВ, нерастворимого в разбавленной HF, наоборот, больше в пару (и

для почвы, и для НГО), что согласуется с меньшей долей в почве пара фракций HCl-гидролизуюемого ОВ и ФК. Это свидетельствует о качественном отличии ОВ почвы под длительным паром от такового почвы с регулярным поступлением свежих растительных остатков: в пару оно не просто зрелое, а деградированное, обогащенное стабильными компонентами [17]. Выход по С после обработки HF для ОВ фракции Остаток в пару был больше по сравнению с целиной аналогично образцам почвы в целом и НГО, тогда как выход по N для этой фракции, наоборот, меньше в пару (табл. 2).

В варианте целина наблюдаются более низкие выходы ОВ, С и N для образцов почвы в целом по сравнению с образцами НГО. Вероятно, это связано с тем, что HCl-растворимое ОВ, удаленное из НГО еще на стадии декальцирования исходной почвы, из образцов нефракционированной и необработанной почвы вымывается в ходе обработки HF. Для варианта пар отличаются только выходы по массе, а по С и N одинаковы для образцов нефракционированной почвы и НГО, что можно

Таблица 2. Выход органического вещества после обработки 10%-ной HF почвы и фракций НГО и остаток, среднее (стандартное отклонение)

Образец	Вариант землепользования	Выход по, %		
		массе*	С**	N***
Почва в целом	Целина	16 (1)	68 (2)	70 (5)
	Пар	10 (3)	86 (6)	78 (6)
НГО/гумин	Целина	21 (1)	78 (3)	73 (4)
	Пар	14 (2)	86 (5)	81 (5)
Остаток	Целина	14 (2)	80 (3)	63 (4)
	Пар	15 (3)	85 (4)	55 (10)

*Масса ОВ в % от массы почвы/фракции.

**% С от $C_{\text{орг}}$ почвы/фракции.

***% N от общего N почвы/фракции.

связать с меньшим вкладом в $C_{\text{орг}}$ почвы под паром HCl-растворимого ОВ.

Для почвы в целом варианта целина выход по N после обработки HF практически равен выходу по С, тогда как для нефракционированной почвы пара и фракций НГО и Остаток обоих вариантов землепользования он существенно ниже выхода С. Это говорит о большей гидролизуемости азотсодержащего ОВ в деградированной почве. Так как 10%-ная HF (≈ 5 М) по гидролизующей способности близка к 6 М HCl, используемой в аминокислотном анализе для разрушения пептидных связей, и, соответственно, обработка ею приводит к гидролизу заметного количества таких связей [49, 51].

Отношение к разбавленным кислотам может служить показателем прочности закрепления ОВ. Считается, что растворимое в 10%-ной HF ОВ органо-минеральных фракций представляет пул, стабилизированный за счет адсорбции на поверхности минеральных частиц [24, 25]. Нерастворимое в HF защищено физически благодаря инкапсулированию внутри микроагрегатов, либо представляет собой конгломераты ОВ микрометрового размера, приклеенные к минеральным частицам [21, 40, 42]. Учитывая тот факт, что для образцов почвы под паром (исходная почва и НГО) при обработке HF наблюдаются меньшие потери С, можно предположить, что в режиме чистого парования, адсорбированное на поверхности минеральных частиц (незащищенное физически) ОВ в значительной степени ассимилировано и минерализовано. По этой причине в органо-минеральных фракциях этой почвы увеличена доля ОВ, “законсервированного” внутри микроагрегатов. Кроме того, ОВ пара обогащено гидрофобными фрагментами (табл. S1), а достаточно гидрофобное ОВ даже после удаления минерального компонента нерастворимо в кислых водных растворах [25]. Только щелочная среда за счет диссоциации и гидратации карбоксильных и

некоторых фенольных групп повышает гидрофильность таких соединений, что способствует их растворению.

Таким образом, традиционная щелочная экстракция и деминерализация 10%-ной HF показали, что в почве под длительным чистым паром не только уменьшается количество ОВ, но и значительно изменяется его качество. Оно становится существенно менее водорастворимым, то есть более гидрофобным, что подтверждают данные ЯМР-спектроскопии.

^{13}C ЯМР-спектры образцов. Полученные ^{13}C CP/MAS-спектры препаратов ОВ чернозема приведены на рис. 3. На всех спектрах выделяются характерные для ПОВ сигналы [54]: в диапазоне 0–45 м. д. – 2–3 максимума, характерных для алкильных фрагментов; 45–60 м. д. – метоксильных групп и α -С аминокислот; 60–94 м. д. – O/N-алкильных фрагментов; 94–113 м. д. – аномерных атомов углеводов и орто-С по отношению к O-заместителям в ароматических кольцах 2,4-O-замещенных лигнанов; 113–141 м. д. – незамещенного и С-замещенного ароматического углерода; 141–160 м. д. – O/N-замещенного ароматического углерода; 160–188 м. д. – карбоксильного углерода кислотных, сложноэфирных и амидных групп; 188–214 м. д. – карбонильного углерода альдегидных, кетонных и хинонных групп. Однако соотношение интенсивностей различается для разных фракций.

Известно, что твердотельные спектры ЯМР, полученные методом с переносом поляризации (CP/MAS) являются полуколичественными и дают заниженное содержание ароматического и четвертичного углерода, а также лабильных алкильных фрагментов [41]. По этой причине для рассмотрения конкретных трендов в изменении распределения углерода по структурным фрагментам проводили корректировку интегральных интенсивностях выделенных областей в соответ-

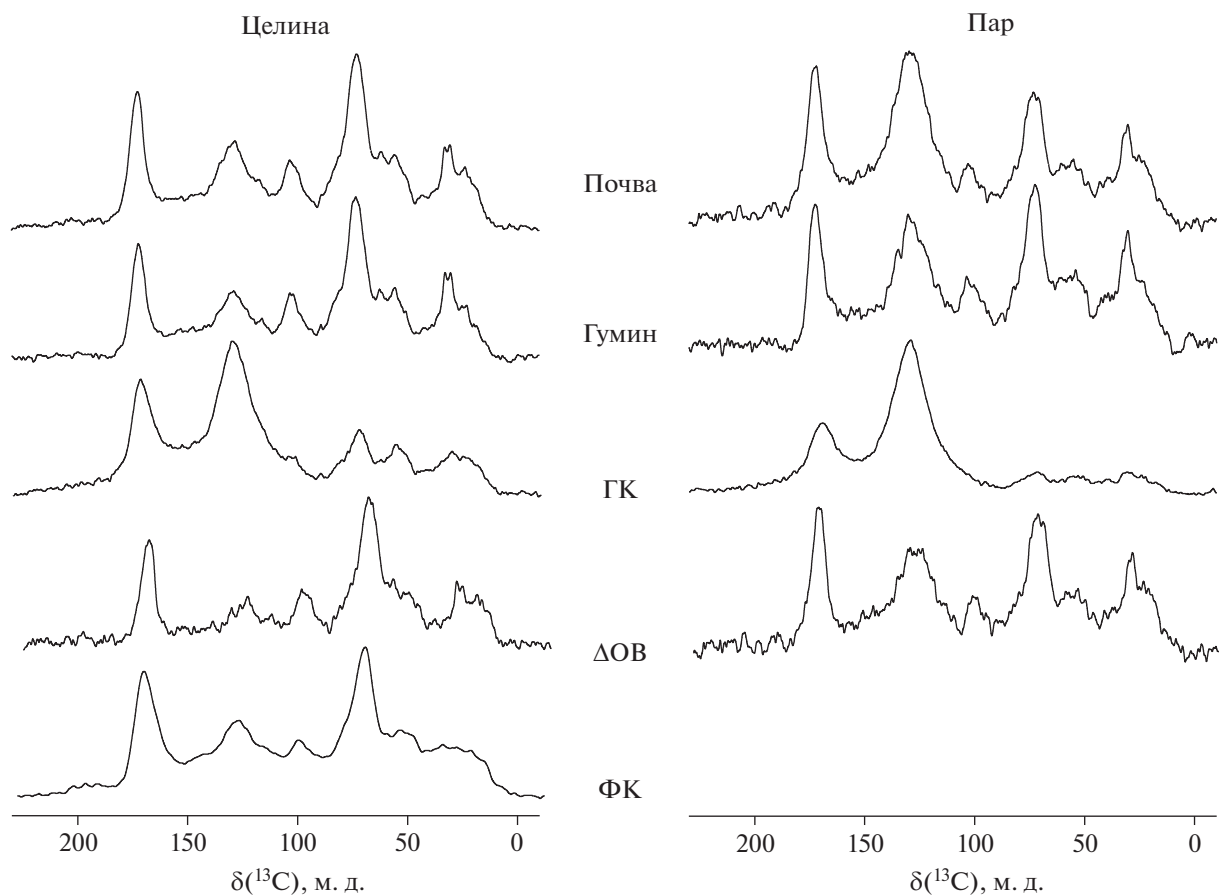


Рис. 3. ^{13}C ЯМР-спектры образцов почвы и химических фракций чернозема типичного контрастных видов земледользования: целина и пар.

ствии с количественными спектрами, снятыми в режиме прямой поляризации (DP/MAS), по ранее разработанной методике [23]. Полученные значения представлены в виде диаграмм, отражающих вклады отдельных фрагментов в структуру ОВ исследованных почв в целом и их химических фракций (рис. 4). Помимо ГК и НГО приведены схематичные спектры суммы фракций: HCl-растворимое ОВ + ФК + Коллоиды; полученные вычитанием спектров ГК и НГО из спектров почвы в целом (с учетом долей углерода в ГК и НГО). Для удобства эту составную фракцию обозначили символом $\Delta\text{ОВ}$. Отдельный спектр-диаграмму для фракции ФК не приводим, так как она составляет меньше половины (по С) от фракции $\Delta\text{ОВ}$. В численном виде все скорректированные данные вместе с вычисленными на их основе интегральными структурными показателями, DI – степень разложения, ARI – ароматичность и HI – степень гидрофобности приведены в Приложении 1.

Перед рассмотрением особенностей распределений углерода по структурным фрагментам для разных фракций следует отметить общие тренды

для почвы в целом и рассматриваемых химических фракций в почвах обоих вариантов земледользования. Первый – практически равные доли С в COO-фрагментах: ~19% в почве в целом, ~20–21% в ГК, 22% в ФК, 16–18% в гумине, 19–20% в $\Delta\text{ОВ}$ (табл. S1). Это дает основание полагать, что в процессе щелочной экстракции ОВ из исследуемых черноземов практически не увеличивается содержание COOH-групп, то есть не происходит значимого окисления ОВ. Данное наблюдение согласуется с выводами Заварзиной с соавт. [5] о том, что благодаря высокой природной окисленности ОВ черноземов, щелочная экстракция не приводит к его дополнительному окислению даже при контакте с кислородом воздуха. Кроме того, близкое содержание С в COO-фрагментах для почвы в целом и химических фракций показывает, что растворимость компонентов ОВ в кислотах и щелочах напрямую не связана с обогащенностью ОВ фракции карбоксильными (включая амидные и эфирные) группами, и, соответственно, с общей окисленностью. Определяющим фактором, очевидно, является то, в какого типа связи вовлечены COO-группы.

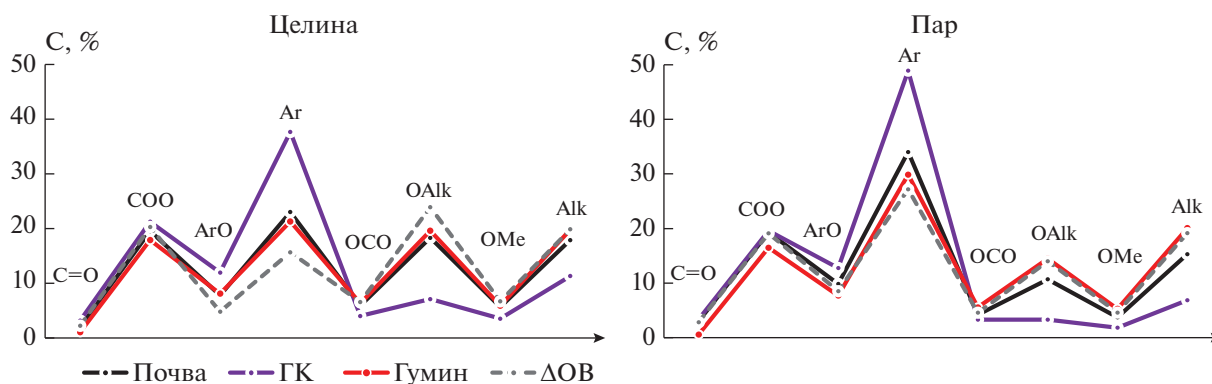


Рис. 4. Распределение углерода между функциональными группами в ОВ чернозема контрастных видов земледельческого использования (на основе интенсивностей в ^{13}C CP/MAS ЯМР спектрах, скорректированных в соответствии с количественными ^{13}C DP/MAS спектрами). Обозначения функциональных групп: C=O – карбонилы; COO – карбоксилы; ArO – O/N-замещенная ароматика Ar – H/C-замещенное ароматическое вещество; OCO – аномерные атомы сахаров и ароматический C в орто-положении к ArO; OAlk – O/N-замещенный алифатический C, OMe – метоксилы и α -C аминокислот; Alk – незамещенный алифатический C. ΔOV – разность между интенсивностью в спектре почвы в целом и суммой интенсивностей в спектрах (ГК + гумин), с учетом доли C в них от $C_{\text{орг}}$ почвы. Стандартная ошибка определения долей углерода в составе функциональных групп $\leq 2\%$ (подробнее см. Объекты и методы).

Второй тренд – резкое отличие спектров ГК от всех других близких между собой спектров: почвы в целом, НГО, ФК и разностного спектра ΔOV , что указывает на специфичность ОВ фракции ГК, в структуре которых доминируют ароматические фрагменты, а вклад N/O-алкильных – низок [54]. Спектр ФК не рассматривали отдельно, так как это минорная фракция, и ее спектр за исключением Alk-региона близок спектру НГО, тогда как расчетный спектр ΔOV отличается существенно большим вкладом O/N-алкильных фрагментов.

Как видно из рис. 4, в варианте целина распределение C по структурным фрагментам для ОВ почвы в целом очень близко таковому НГО, что определяется количественным преобладанием этой фракции в почве [4, 9]. Для составной фракции ΔOV наблюдается меньший (в 2.5 раза), а для ГК, наоборот, больший вклад ароматических фрагментов по сравнению с гумином и почвой в целом (в 1.6 и 1.7 раза соответственно). Вклад N/O-алкильных фрагментов в ГК в 2.6 раза меньше, чем в почве в целом, и приблизительно в 2.8 раза меньше, чем в гумине/НГО. Для фракции ΔOV вклад N/O-алкильных фрагментов несколько больше, чем для гумина и почвы в целом (37 против 30 и 32%).

Таким образом, по ароматичности ОВ химических фракций изученных образцов образует следующий возрастающий ряд: фракция ΔOV < гумин < почва в целом \ll ГК; а по содержанию N/O-алкильных фрагментов – обратный.

Сравнивая ОВ двух контрастных вариантов земледельческого использования, следует отметить существенно меньший вклад N/O-алкильных фрагментов в структуру ОВ как почвы в целом, так и всех фракций (включая ΔOV) варианта пар по сравнению с

вариантом целина, и существенно больший – ароматических фрагментов. Аналогичные тенденции описаны ранее для образцов почв под паром [32] без их фракционирования и для гранулоденсиметрических фракций исследуемых почв [23]. Соотношение Ar/OAr также значительно больше в пару, чем в целине, то есть ОВ варианта пар обогащено компонентами с более гидрофобным конденсированным ароматическим скелетом. Примечательно, что углистые вещества вносят незначительный вклад в общее содержание ароматических соединений в наших образцах, поскольку ранее показано [58], что их содержание в 0–30 см слое почвы с тех же участков, что и в нашей работе, составляет 3–4% от $C_{\text{орг}}$ в целине и 5–7% от $C_{\text{орг}}$ в пару. Тогда как доля ароматического углерода в почве в целом наших образцов составила около 30 и >40% от $C_{\text{орг}}$ (для целины и пара соответственно). Вклады алкильных фрагментов близки для всех фракций почв целины и пара, за исключением ГК, где в пару их почти в 2 раза меньше, чем в целине.

Сопоставление данных ^{13}C NMR-спектроскопии для химических и физических фракций. Ранее показана близость спектров фракций ЛФ_{арр} и ГК в исследуемом черноземе [23], согласующаяся с выводами [27] об определяющем вкладе ЛФ_{арр} в ГК почв. Сопоставление распределения интенсивностей сигналов в спектрах и, соответственно, C между структурными фрагментами изученных химических фракций с таковым для физических фракций приведено на рис. 5.

Рис. 5 демонстрирует близость структурного состава ОВ фракций ГК с ЛФ_{арр}; НГО с остатком и составной фракции ΔOV с илом. Коэффициен-

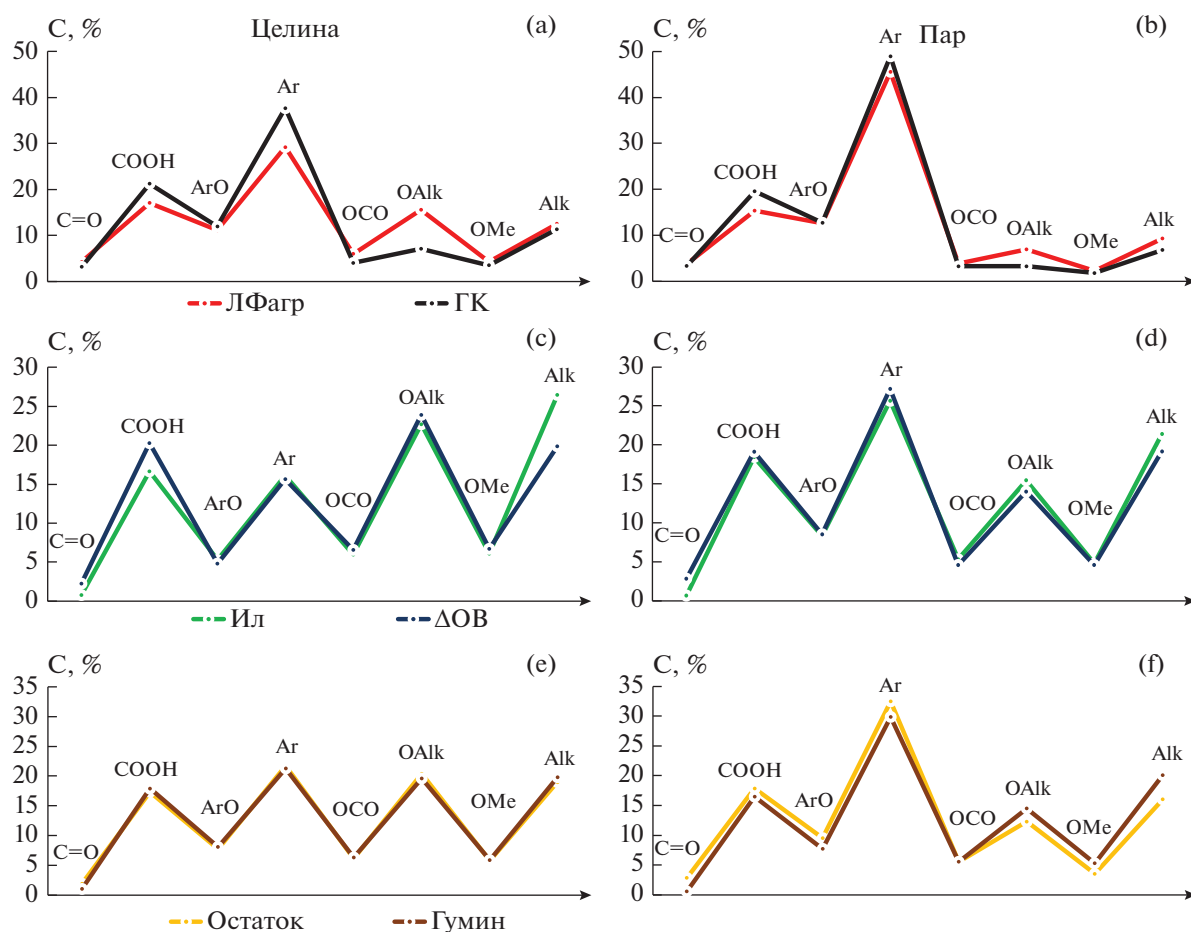


Рис. 5. Сопоставление распределений С по структурным фрагментам в парах физических и химических фракций: ГК – ЛФ_{арр}, ил – фракция ΔОВ; остаток – гумин в почве целины (a, b, c) и пара (d, e, f). Коэффициенты корреляции r^2 : 0.94 (a), 0.95 (b), 0.99 (c), 0.98 (d), 0.99 (e), 0.97 (f).

ты корреляции между распределениями углерода по структурным фрагментам для указанных пар фракций составили 0.93–0.99. Это не означает, что ОВ фракции ЛФ_{арр} состоит только из ГК, ОВ фракции Ил только из компонентов фракции ΔОВ, а ОВ фракции Остаток абсолютно идентично НГО, поскольку разностные спектры ΔОВ близки спектрам НГО, а сопоставляемые пары спектров имеют некоторые различия. Но на основании этих данных можно говорить о выраженной приуроченности рассматриваемых химических и физических фракций. Сопоставление вкладов в $S_{орг}$ почвы (рис. 1) также дает аргументы в пользу того, что, по крайней мере, в ненарушенной почве прослеживается приуроченность химических фракций к определенным физическим. Рассмотрим подробнее каждую из пар фракций.

Структура (спектр) ОВ фракции ЛФ_{арр} отличается от ГК несколько большим вкладом углеводных фрагментов и меньшими – ароматических и карбоксильных. Это согласуется с данными работы [27], где для австралийских черноземных почв

показано, что более 2/3 фракции ЛФ_{арр} растворяется в щелочи, а ее негидролизующий остаток состоит в основном из минеральных частиц и не до конца разложенного дискретного ОВ. Вклад ГК в $S_{орг}$ почвы в целине выше вклада ЛФ_{арр} в 1.3 раза. Учитывая эти факты, можно утверждать, что в исследуемом черноземе значительная часть ГК и их прекурсоров локализованы в ЛФ_{арр}, являются ее основным органическим компонентом. В образцах пара вклад ГК в $S_{орг}$ в 2.8 раза больше, чем вклад ЛФ_{арр}, при том, что их спектры еще более близки. То есть в пару ГК по-прежнему составляют основу ЛФ_{арр}, но значительной становится и их доля во фракциях Ил и Остаток, как следует и из увеличенного вклада ароматических фрагментов в их спектрах.

Различия в спектрах ОВ фракции Ил по сравнению с фракцией ΔОВ, а именно, большее содержание Alk и меньшее СОО-фрагментов – скорее всего, связаны с вымыванием из фракции Ил более гидрофильных компонентов при обработке

10%-ной НФ, вследствие чего оставшееся ОВ обогащено Alk- и обеднено СОО-фрагментами. Это подтверждается и минимизацией этих различий в пару, ОВ которого в целом более гидрофобно. Вклады в $S_{орг}$ почвы фракций ΔОВ и Ил близки для варианта целина (25 и 31% соответственно) и различаются в 1.7 раза для пара (24 и 41% соответственно). Доля составной фракции ΔОВ в $S_{орг}$ почвы не зависит от типа землепользования, хотя соотношение Коллоиды : ФК в пару существенно больше.

Спектры гумина и ОВ Остатка для почвы целины идентичны, и вклады этих фракций в $S_{орг}$ почвы равны. Доли НФ-устойчивого ОВ, строение которого и отражают спектры, во фракции Остаток и в НГО близки между собой как в целине (80 и 77%), так и в пару (85 и 89% соответственно). Таким образом, ОВ “остатков” физического и химического фракционирования в необрабатываемой почве (целина) имеет одинаковую структуру, и есть основания полагать, что ОВ фракции остаток, то есть устойчивых в УЗ-поле микроагрегатов [1, 4] и составляет химическую фракцию гумина. В пару вклад НГО в 1.4 раза меньше, чем вклад Остатка, следовательно, гумин составляет лишь часть ОВ этой фракции. Кроме гумина во фракции присутствуют нерастворимые в НФ, но гидролизующиеся щелочью соединения, то есть, в основном, ГК, что подтверждается большим вкладом ароматического вещества и карбоксилатов и меньшим – О-Alk и Alk в спектрах фракции остаток почвы пара по сравнению с целиной. Возросшая доля ГК объясняет и значительно меньшие потери углерода (в пару по сравнению с целиной) во фракции Остаток (46%), чем во фракции НГО (64%). Ранее высказывалась точка зрения, что ГК и ФК образуются в результате окислительной деградации компонентов гумина [34] и стабилизируются связями с минеральными компонентами. Возможны и другие объяснения – рост относительной доли ГК в ОВ фракции Остаток за счет потерь более легко усвояемых компонентов, а также транслокация ГК наряду с другими продуктами трансформации ЛФ_{агр} в процессе эволюции/разрушения почвенных агрегатов [57].

Резистентность НГО по отношению к гидролизующим агентам (НСl, затем NaOH) может быть связана как с химической устойчивостью отдельных компонентов этого ОВ, таких как целлюлоза, кутины и суберины [30, 43]; так и с физической защищенностью слоев минеральных частиц, прочно удерживаемой благодаря “клеящим” агентам, в роли которых могут выступать как микробные продукты, так и корневые экссудаты [40, 57]. Таких агентов в пару катастрофически не хватает из-за резкого снижения микробной активности при отсутствии поступления свежих растительных остатков [17], и равновесие

между разрушением микроагрегатов и формированием новых в пару сдвинуто в сторону их разрушения, соответственно фракция Остаток становится менее устойчивой, и ее количество не равным НГО.

В целом, полученные результаты говорят о том, что фракция НГО весьма чувствительна к смене варианта землепользования. Следовательно, доля углерода в НГО наряду с углеродом легких фракций может служить показателем деградированности почвы. Учитывая меньшую трудоемкость и доступность реагентов для выделения НГО по сравнению с физическим фракционированием, показатель может быть перспективным.

Большая устойчивость к НФ-гидролизу ОВ деградированной почвы пара связана с преобладанием в нем достаточно гидрофобной фракции ГК, распределенной в почвенной массе в виде дискретных частиц [27]. Вероятно, наблюдаемые в илистой фракции с помощью трансмиссионной электронной микроскопии агломераты, устойчивые к обработке разбавленной НФ [21], могут представлять собой фракцию ГК, а не только илистые вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что в необрабатываемом черноземе химические фракции приурочены к определенным гранулоденсимметрическим. Основным местом формирования фракции ГК и их преимущественной локализации в почвенной структуре является легкая фракция, окклюдируемая внутри почвенных агрегатов. Нерастворимая ни в кислотах, ни в щелочах, и непептизируемая фракция – гумин связана с входящими в состав фракции Остаток мелкими, устойчивыми в УЗ-поле микроагрегатами. ОВ легкопептизируемых Коллоидов, ФК, и НСl-растворимое ОВ ассоциированы по большей части с илистыми частицами диаметром <1 мкм (Ил), основная масса которых (легкодиспергируемый ил) входит в состав крупных микроагрегатов, неустойчивых в УЗ-поле. Эти илистые частицы, наряду с легкими фракциями, являются основными депо лабильного ОВ. В деградированной почве под длительным бесменным чистым паром это распределение нарушается. ГК уже не только являются основным компонентом ОВ окклюдируемой легкой фракции, но и составляют значительную долю ОВ фракций Ила и Остатка.

При деградации почвы теряется ОВ всех химических фракций, однако размер потерь не одинаков для разных фракций. Наибольшие потери С наблюдаются для фракции НГО (61%), близкие к ним – для минорных фракций кислоторастворимого ОВ и ФК, фракция ГК теряет вдвое меньше С (~30%), а фракция Коллоиды несет минималь-

ные потери (8%). Суммарные потери химических фракций, ассоциированных с Илом, приблизительно равны таковым исходной почвы – 48%. Все химические и физические фракции почвы под паром обогащены ароматическими фрагментами и обеднены углеводными, что указывает на большую устойчивость ароматических компонентов почвенного ОВ по сравнению с алифатическими в условиях деградации чернозема.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Табл. S1. Процентное содержание структурных фрагментов в ОВ почв и фракций на основе интегральных интенсивностей в ¹³C ЯМР-спектрах, а также интегральные структурные показатели, рассчитанные на их основе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Артемьева З.С.* Органическое вещество и гранулометрическая система почвы. М.: ГЕОС, 2010. 240 с.
2. *Артемьева З.С., Федотов Г.Н.* Состав функциональных пулов легкоразлагаемого органического вещества автоморфных зонального ряда почв Центра Русской равнины // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2013. № 4. С. 3–10.
3. *Артемьева З.С., Кириллова Н.П.* Роль продуктов органо-минерального взаимодействия в структурообразовании и гумусообразовании основных типов почв Центра Русской равнины // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2017. № 90. С. 73–95.
4. *Артемьева З.С., Данченко Н.Н., Завовская Э.П., Колягин Ю.Г., Кириллова Н.П., Когут Б.М.* Изотопный состав углерода и химическая структура органического вещества типичного чернозема в условиях контрастного землепользования // Почвоведение. 2021. № 6. С. 686–700.
5. *Заварзина А.Г., Кравченко Е.Г., Константинов А.И., Перминова И.В., Чуков С.Н., Демин В.В.* Сравнение свойств препаратов гуминовых кислот, выделенных из почв щелочной экстракцией в отсутствие и присутствии кислорода // Почвоведение. 2019. № 8. С. 910–922. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19080161>
6. *Когут Б.М.* Изменение содержания, состава и природы гумусовых веществ при сельскохозяйственном использовании типичного мощного чернозема. Автореф. дис. ... канд. с.-х. н. М.: Почв. ин-т им. В.В. Докучаева, 1982. 24 с.
7. *Когут Б.М.* Принципы и методы оценки содержания трансформируемого органического вещества в пахотных почвах // Почвоведение. 2003. № 3. С. 308–316.
8. *Когут Б.М., Сысуев С.А., Холодов В.А.* Водопрочность и лабильные гумусовые вещества типичного чернозема при разном землепользовании // Почвоведение. 2012. № 5. С. 555–561.
9. *Когут Б.М., Артемьева З.С., Кириллова Н.П., Яшин М.А., Сошникова Е.И.* Компонентный состав органического вещества воздушно-сухих и водоустойчивых макроагрегатов 2–1 мм типичного чернозема в условиях контрастного землепользования // Почвоведение. 2019. № 2. С. 161–170. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19020084>
10. *Кононова М.М.* Органическое вещество почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 315 с.
11. *Орлов Д.С.* Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 325 с.
12. *Орлов Д.С.* Химия почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992. 401 с.
13. *Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И.* Органическое вещество почв Российской Федерации. М.: Наука, 1996. 256 с.
14. *Холодов В.А., Константинов А.И., Беляева Е.Ю., Куликова Н.А., Кирюшин А.В., Перминова И.В.* Строение гуминовых кислот, извлекаемых в ходе последовательной щелочной экстракции из типичного чернозема // Почвоведение. 2009. № 10. С. 1177–1183.
15. *Чуков С.Н., Лодыгин Е.Д., Абакумов Е.В.* Использование ¹³C ЯМР-спектроскопии в исследовании органического вещества почв (обзор) // Почвоведение. 2018. № 8. С. 952–964. <https://doi.org/10.1134/S0032180X18080026>
16. *Artemyeva Z.S., Kogut B.M.* The effect of tillage on organic carbon stabilization in microaggregates in different climatic zones of European Russia // Agriculture. 2016. V. 6. 63. <https://doi.org/10.3390/agriculture6040063>
17. *Barré P., Eglin T., Christensen B.T., Ciais P., Houot S., Kätterer T., van Oort F. et al.* Quantifying and isolating stable soil organic carbon using long-term bare fallow experiments // Biogeosciences. 2010. V. 7. P. 3839–3850. <https://doi.org/10.5194/bg-7-3839-2010>
18. *Boeni M., Bayer C., Dieckow J., Conceição P.C., Dick D.P., Knicker H., Macedo M.C.M.* Organic matter composition in density fractions of Cerrado Ferrasols as revealed by CPMAS ¹³C NMR: influence of pastureland, cropland and integrated crop-livestock // Agric. Ecosyst. Environ. 2014. V. 190. P. 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.024>
19. *Breulman M., Masyutenko N.P., Kogut B.M., Schroll R., Dorfler U., Buscot F., Schulz E.* Short-term bioavailability of carbon in soil organic matter fractions of different particle sizes and densities in grassland ecosystems // Sci. Total Environ. 2014. V. 497–498. P. 29–37.
20. *Campbell C.A., Pau E.A., Rennie D.A., McCallum R.J.* Applicability of the carbon dating method of analysis to soil humus studies // Soil Sci. 1967. V. 104. P. 217–224.
21. *Chenu C., Plante A.F.* Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the “organo-mineral complex” // Eur. J. Soil Sci. 2006. V. 57. P. 596–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00834.x>
22. *Crow S.E., Swanston C.W., Lajtha K., Brooks J.R., Keirstead H.* Density fractionation of forest soils: method-

- ological questions and interpretation of incubation results and turnover time in an ecosystem context // *Bio-geochemistry*. 2007. V. 85. P. 69–90.
<https://doi.org/10.1007/s10533-007-9100-8>
23. *Danchenko N.N., Artemyeva Z.S., Kolyagin Y.G., Kogut B.M.* Features of the chemical structure of different organic matter pools in Haplic Chernozem of the Streletskaia steppe: ^{13}C MAS NMR study // *Environ. Res.* 2020. V. 191. P. 110205.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110205>
 24. *Eusterhues K., Rumpel C., Kleber M., Kögel-Knabner I.* Stabilisation of soil organic matter by interactions with minerals as revealed by mineral dissolution and oxidative degradation // *Org. Geochem.* 2003. V. 34. P. 1591–1600.
 25. *Eusterhues K., Rumpel C., Kögel-Knabner I.* Composition and radiocarbon age of HF-resistant soil organic matter in a Podzol and a Cambisol // *Org. Geochem.* 2007. V. 38. P. 1356–1372.
 26. *Golchin A., Oades J.M., Skjemstad J.O., Clarke P.* Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid state ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy and scanning electron microscopy // *Austr. J. Soil Res.* 1994. V. 32. P. 285–309.
 27. *Golchin A., Oades J.M., Skjemstad J.O., Clarke P.* Soil structure and carbon cycling // *Austr. J. Soil Res.* 1994b. V. 32. P. 1043–1068.
 28. *Hayes M.H.B.* Solvent Systems for the Isolation of Organic Components from Soils // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2006. V. 70. P. 986–994.
 29. *Hayes T.M., Hayes M.H.B., Skjemstad J.O., Swift R.S.* Compositional relationships between organic matter in a grassland soil and its drainage waters // *Eur. J. Soil Sci.* 2008. V. 59. P. 603–616.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.01007.x>
 30. *Hayes M.H.B., Mylotte R., Swift R.S.* Humin: its composition and importance in soil organic matter // *Adv. Agron.* 2017. V. 143. P. 47–138.
<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.01.001>
 31. *Hayes M.H.B., Swift R.S.* Vindication of humic substances as a key component of organic matter in soil and water // *Adv. Agronomy*. 2020. V. 163. Ch. 1.
<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.05.001>
 32. *Kiem R., Knicker H., Körschens M., Kögel-Knabner I.* Refractory organic carbon in C-depleted arable soils, as studied by ^{13}C NMR spectroscopy and carbohydrate analysis // *Org. Geochem.* 2000. V. 31. P. 655–668.
 33. *Kiem R., Kögel-Knabner I.* Refractory organic carbon in particle-size fractions of arable soils II: organic carbon in relation to mineral surface area and iron oxides in fractions <6 mm // *Org. Geochem.* 2002. V. 33. P. 1699–1713.
 34. *Kögel-Knabner I., Zech W. and Hatcher P.G.* Chemical composition of the organic matter in forest soils: The humus layer // *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 1988. V. 151. P. 331–340.
 35. *Kopittke P.M., Dalal R.C., Hoeschen C., Lia C., Menzies N.W., Mueller C.W.* Soil organic matter is stabilized by organo-mineral associations through two key processes: The role of the carbon to nitrogen ratio // *Geoderma*. 2020. V. 357. P. 113974.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113974>
 36. *Lehmann J., Solomon D., Kinyangi J., Dathe L., Wirrick S. and Jacobsen C.* Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales // *Nat. Geosci.* 2008. V. 1. P. 238–242.
<https://doi.org/10.1038/ngeo155>
 37. *Lehmann J., Kleber M.* The contentious nature of soil organic matter // *Nature*. 2015. V. 528. P. 60–68.
 38. *Lehndorff E., Rodionov A., Plümer L., Rottmann P., Spiering B., Dultz S., Amelung W.* Spatial organization of soil microaggregates // *Geoderma*. 2021. V. 386. P. 114915.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114915>
 39. *Lopez-Sangil L., Rovira P.* Sequential chemical extractions of the mineral-associated soil organic matter: An integrated approach for the fractionation of organo-mineral complexes // *Soil Biol. Biochem.* 2013. V. 62. P. 57–67.
 40. *von Lützw M., Kögel-Knabner I., Ekschmitt K., Flessa H., Guggenberger G., Matzner E., Marschner B.* Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review // *Eur. J. Soil Sci.* 2006. V. 57. P. 426–445.
 41. *Mao J-D., Cao X., Olk D.C., Chu W., Schmidt-Rohr K.* Advanced solid-state NMR spectroscopy of natural organic matter // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2017. V. 100. P. 17–51.
<https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2016.11.003>
 42. *Moni C., Rumpel C., Virto I., Chabbi A., Chenu C.* Relative importance of sorption versus aggregation for organic matter storage in subsoil horizons of two contrasting soils // *Eur. J. Soil Sci.* 2010. V. 61. P. 958–969.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01307.x>
 43. *Nebbioso A., Vinci G., Drosos M., Spaccini R., Piccolo A.* Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humins) by humeomics // *Biol. Fertil. Soils*. 2015. V. 51. P. 443–451.
<https://doi.org/10.1007/s00374-014-0991-y>
 44. *Nelson P.N., Baldock J.A., Clarke P., Oades J.M., and Churchman G.J.* Dispersed Ил and organic matter in soil: their nature and associations // *Aust. J. Soil Res.* 1999. V. 37. P. 289–315.
<https://doi.org/10.1071/S98076>
 45. *Paul E.A.* The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization // *Soil Biol. Biochem.* 2016. V. 98. P. 109–126.
 46. *Plaza C., Giannetta B., Benavente I., Vischetti C., Zaccaro C.* Density-based fractionation of soil organic matter: effects of heavy liquid and heavy fraction washing // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 10146.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46577-y>
 47. *Poeplau C., Dona A., Six J., Kaiser M., Benbie D., Chenu C., Cotrufo M.F. et al.* Isolating organic carbon fractions with varying turnover rates in temperate agricultural soils – A comprehensive method comparison // *Soil Biol. Biochem.* 2018. V. 125. P. 10–26.
 48. *Prietzl J., Müller S., Kögel-Knabner I., Thieme J., Jaye C., Fischer D.* Comparison of soil organic carbon speciation using C NEXAFS and CPMAS ^{13}C NMR spectroscopy // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 628–629. P. 906–918.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.121>

49. *Rumpel C., Chaplot V., Chabbi A., Largeau C., Valentin C.* Stabilisation of HF soluble and HCl resistant organic matter in sloping tropical soils under slash and burn agriculture // *Geoderma*. 2008. V. 145. P. 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.04.001>
50. *Schmidt M.W.I., Torn M.S., Abiven S., Dittmar T., Guggenberger G., Janssens I.A., Kleber M., Kögel-Knabner I., Lehmann J., Manning D.A.C., Nannipieri P., Rasse D.P., Weiner S., and Trumbore S.E.* Persistence of soil organic matter as an ecosystem property // *Nature*. 2011. V. 478. P. 49–56. <https://doi.org/10.1038/nature10386>
51. *Schöning I., Knicker H., Kögel-Knabner I.* Intimate association between O/N-alkyl carbon and iron oxides in clay fractions of forest soils // *Org. Geochem.* 2005. V. 36. P. 1378–1390.
52. *Shaymukhametov M.S., Titova N.A., Travnikova L.S., Labenets Y.M.* Use of physical fractionation methods to characterize soil organic matter // *Sov. Soil Sci.* 1984. V. 16. P. 117–128.
53. *Sollins P., Swanson C., Kleber M., Filley T., Kramer M., Crow S., Caldwell B.A., Lajtha K., Bowden R.* Organic C and N stabilization in a forest soil: evidence from sequential density fractionation // *Soil Biol. Biochem.* 2006. V. 38. P. 3313–3324. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.014>
54. *Song G., Hayes M.H.B., Novotny E.H., Simpson A.J.* Isolation and fractionation of soil humin using alkaline urea and dimethylsulphoxide plus sulphuric acid // *Naturwissenschaften*. 2011. V. 98. P. 7–13. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0733-4>
55. *Stevenson F.J.* Humus chemistry; Genesis, composition, reactions. N.Y.: Wiley & Sons, 1994. 512 p.
56. *Swift R.* Organic matter characterization. In: *Methods of soil analysis*. (Sparks D.L. et al., editors). Part 3. Chemical methods. SSSA Book Series 5. SSSA, Madison, WI. 1996. P. 1011–1069. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c35>
57. *Totsche K.U., Amelung W., Gerzabek M.H., Guggenberger G., Klumpp E., Knief C., Lehdorff E. et al.* Microaggregates in soils // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2018. V. 181. P. 104–136. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600451>
58. *Vasilyeva N.A., Abiven S., Milanovskiy E.Y., Hilf M., Rizhkov O.V., Schmidt M.W.I.* Pyrogenic carbon quantity and quality unchanged after 55 years of organic matter depletion in a Chernozem // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43. P. 1985–1988. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.015>
59. World reference base for soil resources 2014. A framework for international classification, correlation and communication, World Soil Resource Report 106. FAO. Rome, 2014. 181 p.
60. *Yang Z.H., Singh B.R., Sitaula B.K.* Soil organic carbon fractions under different land uses in Mardi watershed of Nepal // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2004. V. 35. P. 615–629. <https://doi.org/10.1081/CSS-120030347>

Comparative Study of Humic Substances and Organic Matter of Physical Fractions of Haplic Chernozem under Contrasting Land Uses

N. N. Danchenko¹ *, Z. S. Artemyeva¹, Y. G. Kolyagin², and B. M. Kogut¹

¹*Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, 119017 Russia*

²*Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: nataly_danch@mail.ru

The aim of the work was to find out whether the chemical fractions isolated by traditional alkaline extraction are associated with any specific physical fractions. The approach was to compare the structural features (based on solid-phase ¹³C-NMR spectroscopy data) and contributions to soil organic carbon for both types of fractions. The object of the study was Haplic Chernozem of two contrasting land use: steppe and long-term bare fallow. The chemical fractions were humic acids, humin, and the composite fraction combining fulvic acids and organic matter of hydrochloric acid-extract and of colloids precipitated from an alkaline extract. The physical ones – fractions obtained by the size-density method: light fraction occluded inside the aggregates, clay-sized fraction and residue after separation of light fractions and clay. The results for the virgin soil revealed a close resemblance of the organic matter structure and the contribution to the soil carbon in the following fraction pairs: humic acids – occluded light fraction; composite fraction – clay; humin – residue after physical fractionation. For fallow soil, the organic matter structural composition of the above fraction pairs is also similar, but their contributions to soil carbon are markedly different. Thus, in the uncultivated Chernozem, chemical fractions are confined to specific physical fractions, whereas in degraded bare fallow soil this distribution breaks down. A comparison of the carbon mass in all fractions of two soils studied has shown that all fractions lose carbon during soil degradation, but the highest loss among chemical fractions is unexpectedly observed for humin (61%), while among physical fractions, occluded light fraction is the most wasted (66%).

Keywords: humic acids, humin, size-density fractionation, ¹³C NMR spectroscopy