

УДК 543.429.23:631.417.2

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ПОЧВ ТЕРМОКАРСТОВЫХ ПОНИЖЕНИЙ И БУГРОВ ПУЧЕНИЯ¹

© 2021 г. Е. Ю. Мильхеев^{1,*}, Ю. Б. Цыбенков¹

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
670047 Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, Россия

*E-mail: evg-milh@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.09.2020 г.

После доработки 19.11.2020 г.

Принята к публикации 11.01.2021 г.

Биоклиматические условия почвообразования в зоне криоаридного климата Забайкалья определяют специфический состав гуминовых веществ (ГВ), однако гетерогенность этих соединений, а также широко используемые классические методы анализа органического вещества не позволяют с достаточной степенью уверенности судить о структуре высокомолекулярных органических соединений в почвах криолитозоны. Спектроскопия ¹³С-ЯМР препаратов гуминовых кислот (ГК) исследованных почв (криоморфозов) позволила выделить диапазоны химических сдвигов, принадлежащих атомам углерода различных функциональных групп и молекулярных фрагментов. Сравнительный анализ молекулярного состава ГК исследованных почв показал, что при переходе от бугров пучений к термокарстовым понижениям происходит трансформация структурно-функциональных параметров гуминовых кислот, которая выражается в уменьшении доли ароматических фрагментов и увеличении лабильных углеводных, аминокислотных и метоксильных остатков. Возрастание доли алифатических структур и снижение доли ароматических фрагментов в составе препаратов ГК позволяют говорить об упрощении строения молекулы гуминовой кислоты, что может быть обусловлено снижением микробиологической активности в термокарстовом понижении в условиях их постоянного переувлажнения.

Ключевые слова: гуминовые вещества, гуминовые кислоты, ЯМР-спектроскопия, бугры пучения, термокарстовые понижения.

DOI: 10.31857/S0002188121040098

ВВЕДЕНИЕ

Судьба природного органического вещества и особенно гуминовых веществ (ГВ) в последние десятилетия привлекает все больший интерес ученых, представляющих различные дисциплины. ГВ, являясь важнейшим компонентом почвенного гумуса, характеризуется нестехиометричностью состава, нерегулярностью строения, полидисперсностью и гетерогенностью структурных элементов. Гетерогенная химическая природа ГВ играет многофункциональную роль в окружающей среде, контролируя биогеохимический цикл углерода, обеспечивая растения питательными веществами и биостимуляторами роста и взаимодействуя с неорганическими и органическими загрязнителями.

Компонентный состав органического вещества почв – динамический показатель, отражаю-

щий влияние экологических условий на геохимический цикл углерода экосистемы. Основными механизмами стабилизации биомолекул органических остатков в аэробных условиях являются гумификация и органо-минеральные взаимодействия [1]. В силу исторически сложившихся традиций в основу классификации ГВ положено их различие, связанное с извлечением этих специфических соединений из природных объектов теми или иными растворителями. По общепринятой классификации гуминовые вещества делят на гуминовые кислоты (ГК) (растворимы в щелочных растворах), фульвокислоты (ФК) (растворимы во всем диапазоне pH) и гумины (нерастворимы во всем диапазоне pH).

Гуминовые кислоты – природные высокомолекулярные системы нерегулярного строения, являются одним из главных компонентов органического вещества почв, торфов, природных вод, морских и озерных донных отложений. Они накапливают элементы минерального питания,

¹ Работа выполнена в рамках проекта НИР 0271-2021-0004 (FWSM-2021-0004).

обеспечивая их постепенное поступление в живые организмы, отвечают за структурообразование почв и их благоприятные водно-физические свойства, снижают негативное действие токсичных веществ [1]. Существовая в почвах тысячи лет, ГК придают им стабильность, своеобразную буферность, определенный биохимический фон [2].

В настоящее время специалистов в области химии природного органического сырья привлекают уникальные возможности спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^{13}C для количественного анализа и изучения строения многокомпонентных систем, в том числе и гуминовых кислот [3]. Применимость данного метода исследования в изучении функционального состава ГК подтверждена неоднократно [3–5]. Использование сверхпроводящих магнитов и преобразования Фурье позволило не только разделять сигналы при высоком уровне шумов или при их наложении, но и выполнять расчет интегральной интенсивности сигналов [6, 7].

Комплексное изучение высокомолекулярных органических соединений криогенных форм рельефа (бугров пучений и термокарстовых понижений), сформированных в условиях ультраконтинентального климата Бурятии и относительно близко залегающих многолетнемерзлых пород, с использованием высокочувствительных спектроскопических методов будет способствовать пониманию фундаментальных процессов гумусообразования и созданию новых представлений о сложных по составу и структуре природных высокомолекулярных соединений почв в зоне криогенеза.

Цель работы — изучение химического строения гуминовых кислот почв термокарстовых понижений и бугров с использованием ^{13}C ядерного магнитного резонанса. Выявление структурных особенностей ГК криоморфозов по ^{13}C -ЯМР-спектрам позволяет установить закономерности изменения структурного состава гуминовых кислот почв различного криогенеза.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Район исследования расположен в Еравнинской котловине юга Витимского плоскогорья, где многолетняя мерзлота достигает максимальной мощности 120–130 м, в среднем составляя 80–85 м [8, 9]. Верхняя границы мерзлоты залегает на глубине 1.5–3.0 м от дневной поверхности, местами — на глубине <1 м.

Объектами исследования послужили образцы ГК, полученные из верхних генетических горизонтов почв бугров пучения и термокарстовых

понижений. Гуминовые кислоты были выделены по стандартной методике [10] экстракцией 0.1 н. NaOH, препараты ГК очищали путем переосаждения 20%-ным раствором HCl до величины pH 1.5–2.0 и многократного центрифугирования. Осадок промывали 0.1 н. HCl, затем дистиллированной водой, высушивали и растирали до состояния пудры. Спектры ядерно-магнитного резонанса ^{13}C -ЯМР были сняты на спектрометре Avance 300 MHz “Bruker” (Германия) с рабочей частотой 100.53 МГц с использованием твердофазной методики CP-MAS. Частота вращения образца 6 kHz, время контакта 5 мс, время релаксации 5 с, количество накоплений 3500–13000 сканов. Химические сдвиги представлены относительно тетраметилсилана со сдвигом 0 ppm, в качестве стандарта использовали пик адамантана (в слабом поле) при 38.48 ppm. Для количественной обработки применяли численное интегрирование по областям, соответствующим расположению функциональных групп и молекулярных фрагментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения особенностей структурно-функциональных параметров органического вещества почв бугров и понижений были сняты ^{13}C -ЯМР-спектры (техника CP-MAS) препаратов гуминовых кислот. Все полученные спектры ГК характеризовались широкими полосами поглощения, обусловленными перекрыванием нескольких сигналов (рис. 1).

Ввиду сильного перекрывания пиков, отнесение сигналов в твердофазных ^{13}C -ЯМР-спектрах возможно только по диапазонам химического сдвига, согласно положению резонансов атомов со сходным химическим окружением (табл. 1).

По характеру спектров ЯМР ^{13}C видно, что в химическом строении углеродного скелета ГК бугров и понижений в сопоставимых количествах содержатся как ароматические, так и алифатические компоненты. Относительно острый пик, сосредоточенный в области 30 м.д., может быть отнесен к метиленовым атомам углерода в положениях α , β , δ и ϵ от концевых метильных групп (15 м.д.) в алкильных цепочках [11]. Эти метиленовые атомы углерода, как предполагается некоторыми исследователями, могут являться результатом накопления воско смол, липидов и субербиновых структур из растений [12–15].

Также все спектры имели сигнал в диапазоне 47–60 м.д., который некоторые авторы связывают с метоксильными группами, обусловленными

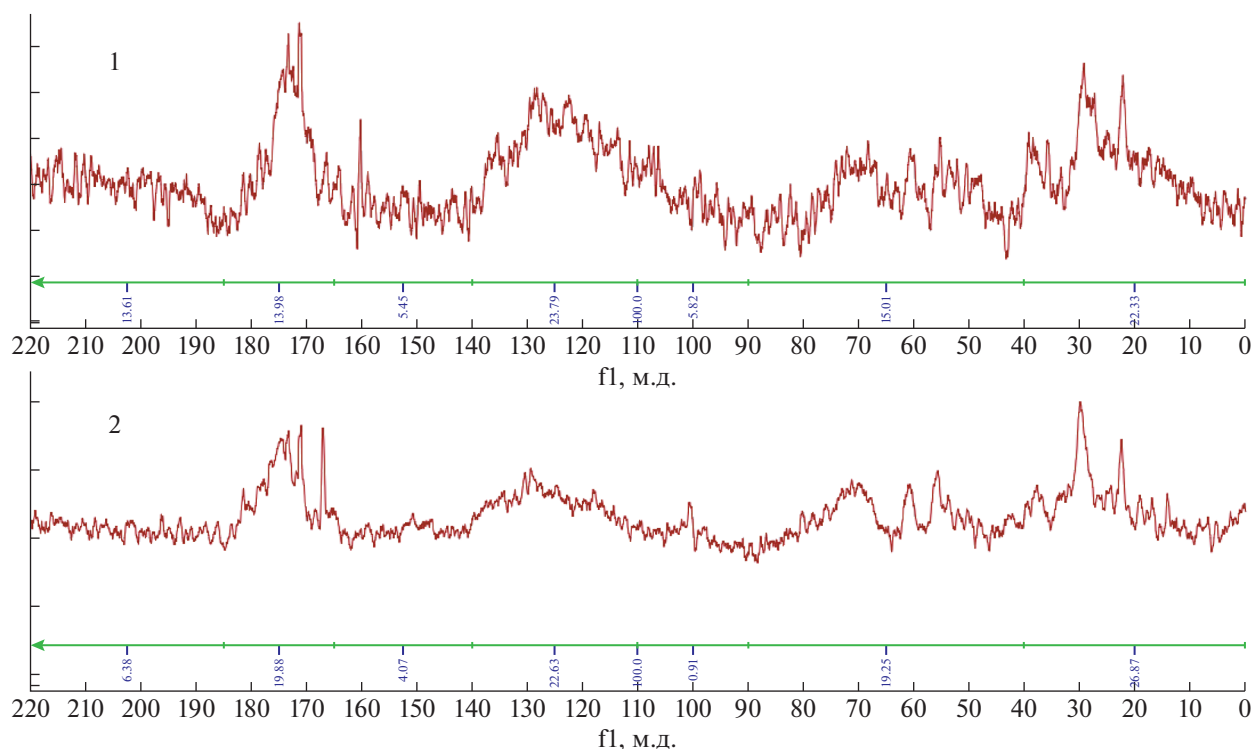


Рис. 1. Спектры ^{13}C -ЯМР гуминовых кислот: 1 – бугор пучения, 2 – термокарстовое понижение.

присутствием лигниновых фрагментов – синрингил- и гваяцилпропановых единиц [16, 17]. Однако в этой области химических сдвигов можно также наблюдать и сигналы от атомов углерода в α положении в полипептидах ($-\text{C}(\text{O})-\text{C}^*(\text{R})\text{N}-\text{NH}-$)_n [14, 18]. Высокий коэффициент корреляции между интенсивностью сигнала в диапазоне 47–60 м.д. и массовой долей азота в составе исследованных гуминовых веществ косвенно подтверждал последнее предположение. Количественная оценка их ядерных сигналов показала, что содержание $\text{C}_{\text{лигн}}$ в препаратах, выделенных из бугра, больше, чем в понижении. На состав ГК,

возможно, повлияла высокая лигнинофицированность первичных источников гумуса, различия в видовом составе травянистой растительности.

Интенсивный пик при 71 м.д. в ^{13}C -ЯМР-спектрах характерен для $\text{CH}(\text{O})$ -групп кольцевых атомов углерода в углеводах [11]. Сигнал в этой области спектра распространяется от 64 до 90 м.д., который, вероятно, происходит от различных $\text{HC}-\text{OH}$ -групп целлюлозных или других углеводных фрагментов [14]. Слабый сигнал ≈ 62 м.д. типичен для CH_2O -групп гексоз из полисахаридных фрагментов [19]. Наличие слабо интенсивного сигнала при 101 м.д., который является

Таблица 1. Содержание молекулярных фрагментов гуминовых кислот

Химический сдвиг, м.д.	Тип молекулярных фрагментов*	Интегральная интенсивность, %	
		бугор пучения	термокарстовое понижение
0–40	$\text{C}_{\text{алк}}$	22.3	26.9
40–90	$\text{C}_{\text{алк}}-\text{O}$	15.0	19.3
90–110	$\text{C}_{\text{ар}}$	5.8	0.9
110–140	$\text{C}_{\text{ар}}-\text{CH}$	23.8	22.6
140–165	$\text{C}_{\text{ар}}-\text{O}$	5.5	4.1
165–185	$\text{C}_{\text{COOH}} + \text{C}_{\text{COOR}}$	14.0	19.9
185–220	$\text{C}_{\text{C=O}}$	13.6	6.4

*Ковалевский Д.В. Исследование структуры гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C : Дис. ... канд. хим. наук. М., 1998. 140 с.

представительным для аномерных (полуацетальных) атомов углерода, также подтверждал присутствие углеводных фрагментов в структуре ГК.

В области ароматических фрагментов сигнал в пределах 90–165 м.д. могут давать незамещенные и/или алкил-замещенные ароматические атомы углерода. Пик при 147–149 м.д. типичен в спектрах структурных блоков лигнина, и его приписывают к кислородзамещенным атомам углерода ароматических колец – сингил- и гваяцилпропановых единиц [14, 20]. ЯМР-спектры ГК бугра пучения имели более интенсивные сигналы в этой области по сравнению с термокарстовым понижением.

Многие свойства ГК определяются типом и количеством функциональных групп в их составе. В области карбоксильной группы (165–185 м.д.) наблюдали максимум при 171–173 м.д., в значительной степени относимый к углероду карбоксильных групп [21], но также он может принадлежать и карбонильной группе амидов и полипептидов [14]. Преобладание карбоксильных групп ($-\text{CO}-\text{OH}$) служит основанием для причисления гуминовых веществ к кислотам, в частности к высокомолекулярным ароматическим оксикарбоновым кислотам. Атомы углерода хинонных фрагментов и карбонильных групп альдегидов и кетонов вносили свой вклад в слабые сигналы в области 185–220 м.д., и невысокое их содержание (6.4–13.6), вероятно, связано с понижением биохимической активности почв понижений.

Кроме рассмотренных соотношений важным свойством ГК является соотношение в их составе гидрофильных и гидрофобных компонентов. К гидрофильным компонентам относим активные функциональные кислородсодержащие группы ($\text{C}=\text{O}$, COOH , $\text{C}_{\text{алк}}-\text{O}$ -фрагменты), а гидрофобную часть представляют С- и Н-замещенные ароматические и алкильные фрагменты ($\text{C}_{\text{ар}}\text{CH}$ и $\text{C}_{\text{алк}}$) гуминовых кислот. Доля гидрофильных фрагментов в исследованных препаратах, которая отвечает за реакционную способность ГК, составляла 42.6–45.6%.

Сравнительный анализ молекулярного состава ГК исследованных почв показал, что при переходе от бугров пучений к термокарстовым понижениям происходила трансформация структурно-функциональных параметров гумусовых кислот, которая выражалась в уменьшении доли ароматических фрагментов и увеличении лабильных углеводных, аминокислотных и метоксильных остатков. Основными факторами, влияющими на строение и свойства высокомолекулярных органических соединений почв, являются климатические условия (температурный и водный режимы) обуславливающие специфику растительности и микробиоло-

гической активности исследованных криогенных экосистем.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что избыточное увлажнение заметно влияет не только на количество накапливаемых гумусовых соединений, но и оказывает воздействие на их молекулярную структуру, а именно, обуславливает накопление в полугидроморфных почвах гумусовых веществ, обогащенных алифатическими цепочками. Переувлажнение, в совокупности с анаэробными условиями и низкой микробиологической активностью заметно снижает скорость трансформации почвенного органического вещества и приводит к увеличению доли не окисленных алифатических фрагментов в структуре гуминовых кислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в спектрах ^{13}C -ЯМР гуминовых кислот (ГК) бугров пучений доминирует сигнал углерода ароматического ряда, в ГК термокарстовых понижений – алифатического. Эти данные полностью совпадают с результатами элементного состава, величинами отношения $\text{H} : \text{C}$. Выявленные различия в содержании атомов углерода, входящих в состав структурных фрагментов в составе макромолекул ГК, свидетельствуют о разных условиях почвообразования и гумификации. Возрастание доли алифатических структур и снижение доли ароматических фрагментов в составе препаратов ГК позволяют говорить об упрощении строения молекулы гуминовой кислоты, что может быть обусловлено снижением микробиологической активности в термокарстовом понижении в условиях их постоянного переувлажнения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. 324 с.
2. Дергачева М.И. Методы почвоведения в археологических исследованиях. Новосибирск: Новосибирск. гос. ун-т, 2007. 96 с.
3. Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 407 с.
4. Федорова Т.Е. Количественная спектроскопия ЯМР ^{13}C , ^{17}O и физиологическая активность гуминовых кислот: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Иркутск, 2000. 24 с.
5. Ковалевский Д.В. Исследование структуры гуминовых кислот методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C . Дис. ... канд. хим. наук. М., 1998. 140 с.
6. Simpson A.J., Burdon J., Graham C.L. Interpretation of heteronuclear and multidimensional NMR spectroscopy

- py of humic substances // *Eur. J. Soil Sci.* 2001. V. 52. P. 495–509.
7. Schilling M., Cooper W.T. Effects of chemical treatments on the quality and quantitative reliability of solid-state ^{13}C NMR spectroscopy of mineral soils // *Analyt. Chim. Acta.* 2004. V. 508. P. 207–216.
 8. Мельничук Н.Л. Геоэкологические условия южной части Витимского плоскогорья // Геоэкологические условия Забайкалья и Прибайкалья. М.: Наука, 1967. С. 71–79.
 9. Цыбенков Ю.Б., Чимитдоржиева Г.Д., Чимитдоржиева Э.О., Егорова Р.А., Мильхеев Е.Ю., Давыдова Т.В., Корсунова Ц.Д.-Ц. Морфологические и физические свойства почвенной массы из криогенных трещин мерзлотных лугово-черноземных почв Забайкалья // *Почвоведение.* 2016. № 8. С. 975–981.
<https://doi.org/10.7868/S0032180X16080153>
 10. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1981. 271 с.
 11. Simpson A.J., Simpson M.J. Nuclear magnetic resonance analysis of natural organic matter // *Biophysicochemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems* / Eds. Senesi N., Xing B., Huang P.M. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2009. P. 589–650.
 12. Lodygin E.D., Beznosikov V.A. Influence of soil moisture on concentrations and ^{13}C NMR profiles of lipids in three Albeluvisols // *Geoderma.* 2005. V. 127. № 3–4. P. 253–262.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.12.004>
 13. Winkler A., Haumaier L., Zech W. Insoluble alkyl carbon components in soils derive mainly from cutin and suberin // *Org. Geochem.* 2005. V. 36. P. 519–529.
 14. Keeler C., Kelly E.F., Maciel G.E. Chemical-structural information from solid-state ^{13}C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil, Colorado, USA // *Geoderma.* 2006. V. 130. P. 124–140.
 15. Alarcón-Gutiérrez E., Floch C., Augur C., Petit J.L., Ziarelli F., Criquet S. Spatial variations of chemical composition, microbial functional diversity, and enzyme activities in a Mediterranean litter (*Quercus ilex* L.) profile // *Pedobiologia.* 2009. V. 52. P. 387–399.
 16. Tadini A.M., Pantano G., Toffoli A.L., Fontaine B., Spaccini R., Piccolo A., Moreira A.B., Bisinoti M.C. Off-line TMAH-GC/MS and NMR characterization of humic substances extracted from river sediments of northwestern São Paulo under different soil uses. Original research article // *Sci. Total Environ.* 2015. V. 506–507. P. 234–240.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.012>
 17. Ковалева Н.О., Ковалев И.В. Лигниновые фенолы в почвах как биомаркеры палеорастворимости // *Почвоведение.* 2015. № 9. С. 1073–1086.
<https://doi.org/10.7868/S0032180X15090063>
 18. Knicker H., Hilscher A., González-Vila F.J., Almendros G. A new conceptual model for the structural properties of char produced during vegetation fires // *Org. Geochem.* 2008. V. 39. P. 935–939.
 19. Duarte R.M.B.O., Silva A.M.S., Duarte A.C. Two-dimensional NMR studies of water-soluble organic matter in atmospheric aerosols // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 8224–8230.
 20. Ковалева Н.О., Ковалев И.В. Биотрансформация лигнина в лесных почвах // *Лесоведение.* 2006. № 3. С. 57–63.
 21. Лодыгин Е.Д., Безносиков В.А. Изучение молекулярной структуры гумусовых кислот подзолистых и болотно-подзолистых почв методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии // *Почвоведение.* 2003. № 9. С. 1085–1094.

NMR-Spectroscopy of Humic Acids in Soils of Thermokarst Depressions and Numerous Heaving Mounds

E. Y. Milkheev^{a,*} and Y. B. Tsybenov^a

^a*Institute of General and Experimental Biology SB RAS
ul. Sakhyanovoy 6, Ulan-Ude 670047, Russia*

^{*}*E-mail: evg-milh@rambler.ru*

Bioclimatic conditions of soil formation in the cryoarid climate zone of Transbaikalia determine the specific composition of humic substances. However, the heterogeneity of these compounds, as well as the widely used classical methods for the analysis of organic matter, do not make it possible to judge with a sufficient degree of confidence the structure of high-molecular organic compounds in the soils of the permafrost zone. ^{13}C -NMR spectroscopy of the preparations of humic acids (HA) of the studied soils (cryomorphoses) made it possible to identify the ranges of chemical shifts belonging to carbon atoms of various functional groups and molecular fragments. A comparative analysis of the molecular composition of the HAs of the studied soils showed that the transition from numerous heaving mounds to thermokarst depressions transforms the structural and functional parameters of humic acids. This is reflected in a decrease in the proportion of aromatic fragments and an increase in labile carbohydrate, amino acid and methoxyl residues. An increase in the proportion of aliphatic structures and a decrease in the proportion of aromatic fragments in the composition of HA preparations suggest a simplification of the structure of the humic acid molecule, which may be due to a decrease in microbiological activity in thermokarst depression under conditions of their constant waterlogging.

Key words: humic substances, humic acids, NMR spectroscopy, heave mounds, thermokarst depressions.