

Научная статья
УДК 631.417.7
DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-59-67

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГИДРОФОБНЫХ И ГИДРОФИЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ПОЧВ ДЕЛЬТЫ Р. СЕЛЕНГИ

Е. Ю. Мильхеев, Ю. Б. Цыбенков

© **Мильхеев Евгений Юрьевич**

кандидат биологических наук, научный сотрудник,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
evg-milh@rambler.ru

© **Цыбенков Юрий Бадмажапович**

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
jurcybenov@gmail.com

Аннотация. В статье рассматриваются почвенные гуминовые вещества как многокомпонентная система амфифильных (проявляющих как гидрофобные, так и гидрофильные свойства) веществ. Фракционирование гуминовых веществ из почв (луговые и лугово-болотные) различного генезиса проводили методом хроматографии гидрофобного взаимодействия на октил-сефарозе CL-4B. Данный метод фракционирует гуминовые и фульвокислоты на отдельные компоненты, различающиеся по своей способности вступать в гидрофобные взаимодействия с гелевой матрицей. Результаты показывают, что в гуминовых веществах луговых почв обнаружено более высокое процентное содержание гидрофобных макромолекул, чем в других образцах (гуминовые кислоты лугово-болотных почв и фульвокислоты). Образец фульвокислот показал более слабые гидрофобные взаимодействия, чем гуминовые кислоты.

Ключевые слова: амфифильные компоненты, гуминовые вещества, луговые почвы, лугово-болотные почвы, дельта р. Селенги.

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121030100228-4.

Для цитирования

Мильхеев Е. Ю., Цыбенков Ю. Б. Дифференциация гидрофобных и гидрофильных компонентов гуминовых веществ почв дельты р. Селенги // Природа Внутренней Азии. Nature of Inner Asia. 2022. № 4(22). С. 59–67. DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-59-67

Введение

Гуминовые вещества (ГВ) являются доминирующими компонентами органического вещества (ОВ) почвы и играют ключевую роль в экологической устойчивости благодаря их вкладу в биологические, химические и физические свойства почвы. ГВ образуются в результате разложения и последующей полимеризации органических остатков растительного и животного происхождения, что приводит

к образованию гетерогенных супрамолекулярных частиц с большой молекулярной массой [Martin et al., 2014], содержащих различные функциональные группы, состав и свойства которых различаются в зависимости от источника ОВ и экологических условий [Fernandes et al., 2010]. Происхождение, состав и структурные особенности ГВ до сих пор являются предметом интенсивных дискуссий [Nebbioso, Piccolo, 2013; Hayes, Swift, 2018; Nobili et al., 2020]. С химической точки зрения ГВ представляют собой молекулярные агрегаты, состоящие из сахаров, жирных кислот, полипептидов, алифатических цепей и ароматических колец, что придает им амфифильные свойства [Милановский, 2000].

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 рН) и гумины (нерастворимы во всем диапазоне рН). Эти фракции значительно различаются по размеру молекулы и содержанию функциональных групп (карбоксильные и фенольные, а также небольшое количество группы аминокислот) [Rigobello et al., 2011].

Различный вклад данных компонентов в составе ГВ обуславливает зависимость свойств выделяемого вещества от источника его происхождения. По данным Орлова и др. (1996); Kulikova et al. (2005), показано, что наиболее гидрофобная (ароматическая) часть вносит существенный вклад в детоксицирующую способность и биологическую активность ГВ, в то время как гидрофильные фракции не обладают таким свойством. В природных условиях именно гидрофобные и/или гидрофильные свойства продуктов гумификации обуславливают их способность находиться в растворе, мигрировать в водных потоках или оставаться на месте своего образования, формируя характерную для конкретных экологических условий дифференциацию гумусового профиля.

Перспективным для разделения смеси биологических макромолекул на компоненты, различающиеся степенью выраженности амфифильных свойств, является метод жидкостной хроматографии гидрофобного взаимодействия (ЖХГВ). Разделение смеси анализируемых веществ на компоненты происходит за счет различий их взаимодействий с гидрофобными группами сорбента. Наиболее гидрофильные компоненты анализируемой пробы не сорбируются на гидрофобной матрице и вымываются с потоком стартового буфера в свободном объеме колонки. Элюирование сорбированных молекул осуществляется путем постепенного ослабления гидрофобных контактов.

Таким образом, проблема исследования состава и структурных особенностей ГВ, выделенных из пойменных почв дельты р. Селенги, которые являются самыми молодыми и самыми уязвимыми участками суши, весьма актуальна и практически не отражена в публикациях. Принадлежность озера и прилегающих к нему территорий к объектам Всемирного природного наследия, а также стратегическое значение запасов его ультрапресных вод диктуют необходимость проведения детального изучения почвенного покрова дельты, так как он выполняет роль геохимического барьера, функционирование которого зависит от ГВ и его специфических кислот, от природы которых зависит устойчивое функционирование почвы в целом.

Комплексный подход, заключающийся в изучении состава и свойств ГВ с использованием ЖХГВ, позволяет получить ценную информацию о структурных и функциональных параметрах ГК и ФК различного генезиса. В связи с этим целью настоящего исследования является изучение гетерогенности амфифильных (гидрофобно-гидрофильных) компонентов гуминовых веществ луговых и лугово-болотных почв пойменной части дельты р. Селенги.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили в дельте р. Селенги (самой крупной в мире пресноводной дельты), расположенной в центральной зоне юго-восточного побережья оз. Байкал. Она представляет собой предгорную тектоническую впадину площадью 1 120 км², заполненную дельтовыми, аллювиальными и делювиальными отложениями. Ее территория находится в пределах Кабанского района Республики Бурятия и характеризуется значительным разнообразием экологических условий, обусловленных сложностью геоморфологического строения и разной степенью гидроморфности. Карта-схема района исследования приведена на рисунке 1.

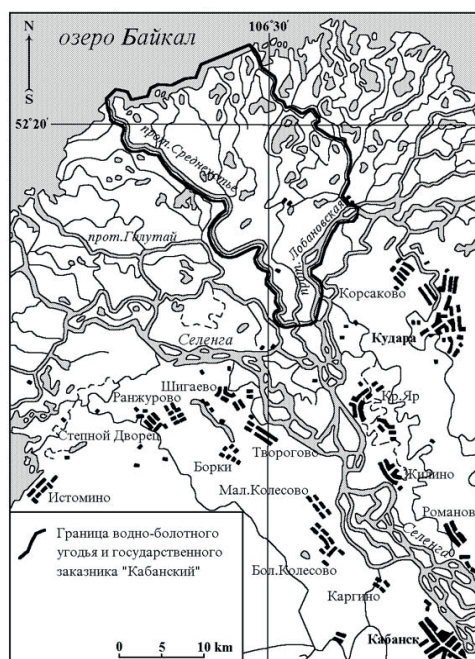


Рис. 1. Карта-схема района исследования — дельты р. Селенги

Климат района резко континентальный, несколько смягченный влиянием озера Байкал. Годовая сумма осадков 400 мм, основная их часть выпадает во второй половине лета. Среднегодовая температура — -1 °С, средняя температура января — -25 °С, июля — 21 °С. Коэффициент континентальности в межгорных впадинах Забайкалья достигает 85–90, а на побережье Байкала снижается до 67–73 [Жуков, 1960]. Относительная мягкость климата благоприятно сказывается на

продуктивности фитоценозов и процессах гумусообразования. На почвы островов оказывают влияние низкие температуры вод Байкала. На островах периферической части дельты в конце первой декады июля почва была еще мерзлой на глубине 25–30 см. В этот же период на крупных островах лопастной части дельты заболоченные почвы были мерзлыми на глубине 60 см. Полное оттаивание почв островов дельты происходит в августе — сентябре, что затормаживает процессы гумификации [Гынинова и др., 2012]. Грунтовые воды в дельте залегают на глубинах 0,5–3 м в поймах и до 8–15 м на надпойменных террасах. Дренажность территории дельты р. Селенги и промывка подтопляемых зон байкальскими водами ограничивает возможность засоления почв.

В качестве объектов исследований служили аллювиальные (лугово-болотные, луговые) почвы дельты р. Селенги, по классификации WRB — Fluvisols¹, а также препараты ГК и ФК, выделенные по стандартной методике [Орлов, Гришина, 1981].

В Центральной пойме под злаково-разнотравно-осоковым сообществом формируются аллювиальные луговые почвы по «Классификации и диагностике почв России» [Классификация... 2004] — аллювиальные темногумусовые гидрометаморфизованные. В настоящее время эти почвы не затопляются паводковыми водами, а увлажняются атмосферными осадками. Изучаемая почва расположена в 1 км от ст. Тимлюй Кабанского района на слабо наклонной равнине. Почва среднесуглинистая, слабощелочной реакции, с высоким содержанием гумуса, мелкозернистой структуры.

В понижениях и по террасам рек на участках с близким залеганием грунтовых вод под осоково-разнотравными сообществами в условиях длительного поверхностного и грунтового увлажнения с практически постоянной капиллярной каймой на поверхности и периодическим затоплением формируются аллювиальные лугово-болотные почвы. Профиль их состоит из задернованного аккумулятивного горизонта и выраженным оглеением минеральных горизонтов. Как самостоятельный тип лугово-болотные почвы выделены в «Классификации и диагностике почв СССР» [Классификация...1977], а по Классификации (2004) они — аллювиальные темногумусовые. Разрез заложен около с. Закалтус, среднесуглинистого гранулометрического состава, комковатой структуры, содержание гумуса — среднее.

Хроматографическое фракционирование проводили на колонке 1 × 10 см с гидрофобизированным гелем агарозы (Octyl Sepharosa CL4B, Pharmacia) на жидкостном хроматографе низкого давления BioLogic LP (BioRad, USA). К 5–11 мг препарата (ГК, ФК) в пробирке Эппендорф на 1.5 мл добавляли 1 мл 0.05 М ТРИСНСl буфера pH 8.0. От минеральных примесей растворенный препарат очищали центрифугированием (30 мин, 11 000 об/мин). Колонку с хроматографической матрицей 40–50 мин уравнивали в потоке (1.5 мл/мин) стартового буфера 0.05 М ТРИСНСl + 2 М (NH₄)₂SO₄, pH 8.0 (буфер А). Оптическую плотность элюата измеряли при 280 нм. Объем пробы — 100 мкл, скорость потока элюента — 1.5 мл/мин. Гидрофильные компоненты гумусовых кислот, не сорбирующиеся на хроматографической матрице геля, элюировали из колонки в потоке стартового буфера

¹ IUSS Working Group WRB World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps. *World Soil Resources Reports No. 106*. Rome: FAO, 2015. 192 p.

(фракция 1). Элюирование компонентов ГК и ФК, сорбировавшихся на матрице геля, производили путем постепенного ослабления их гидрофобных контактов с матрицей геля: сначала раствором 0.05 М ТРИСНСI (буфер В, рН 8.0) при негативном градиенте буфера А (фракция 2), далее — 100%-ный буфер В (фракция 3). Компоненты ГК и ФК в составе хроматографической фракции 4 элюировали раствором 0.05 М ТРИСНСI + 0.25% додецилсульфата натрия (буфер С, рН 8.0). Последнюю фракцию вымывали раствором 0.2 н. NaOH + 5 мМ ЭТДА (буфер D).

Содержание ГВ в составе хроматографических фракций оценивали по оптической плотности в точке их максимума, пропорциональной концентрации ГВ. Площадь хроматографической фракции, выраженная в % от общей площади хроматограммы, дает представление об относительном содержании ГВ. Гумусовые вещества, элюирующиеся из колонки в присутствии сульфата аммония и входящие в состав первых 2 хроматографических фракций, авторы относят к гидрофильным, последующие — к гидрофобным. На качественном уровне гидрофильные компоненты ГВ частично, а гидрофобные — полностью осаждаются кислотой.

Результаты и обсуждение

Жидкостная хроматография гидрофобного взаимодействия (ЖХГВ) физически разделяет гумусовые вещества, гуминовые и фульвокислоты на следующие компоненты, различающиеся по своей способности вступать в гидрофобные взаимодействия с матрицей геля. В составе как ГК, так и ФК присутствуют фракции, элюирующиеся в потоке стартового буфера, обладающие наиболее сильно выраженными гидрофильными свойствами.

Образец ФК показал более слабые гидрофобные взаимодействия, чем образец ГК: количество неадсорбированных соединений составляло 78 и 88% для лугово-болотной и ФК луговых почв соответственно, тогда как для соответствующих ГК — 26–39% и 38–43% от общей площади хроматограмм (табл. 1).

Таблица 1

Относительное содержание хроматографических фракций в ГВ лугово-болотной и луговой почвы

Почва, тип ГВ	Глубина, см	Фракции, % гидрофобность				
		1	2	3	4	5
Лугово-болотная, ГК	0-20	16,1	22,9	32,6	26,5	1,9
	20-30	10,2	15,8	38,7	33,9	1,4
Луговая, ГК	0-20	20,5	22,4	33,8	22,1	1,2
	20-30	16,1	21,9	44,3	17,1	0,6
Лугово-болотная, ФК	0-20	75,3	2,7	8,4	9,9	3,7
	20-30	68,8	9,5	10,2	10,1	1,4
Луговая, ФК	0-20	80,1	7,9	7,3	2,8	1,9
	20-30	81,6	5,9	6,9	4,6	1,0

Кроме того, гуминовые вещества луговой почвы (ГК+ФК) более гидрофобны, чем соответствующая лугово-болотная почва. Высокая растворимость компонентов этих фракций в сочетании с их способностью вступать в сильные гидрофобные взаимодействия предполагает дифильную структуру по типу поверхностно-активного вещества. В адсорбционном слое на границе раздела дифильные молекулы ориентированы наиболее выгодно с энергетической точки зрения: гидрофильные группы направлены к полярной (водной) фазе, агидрофобные группы — к неполярной фазе (октильная группа хроматографической матрицы). Элюирование последних из гидрофобных фракций достигается только с помощью ЭДТА, поэтому его гидрофобные свойства могут зависеть от ионов металлов.

Выявленные различия в соотношении гидрофильных и гидрофобных компонентов в гумусовых кислотах из разных почв позволяют объяснить их химические и физико-химические свойства. Относительное содержание гидрофобной ГК увеличивается в последовательности ФК (лугово-болотная почва) <ФК (луговая почва) <ГК (лугово-болотная почва) <ГК (луговая). Аналогичные изменения наблюдаются в отношении способности ГК к коагуляции с солями кальция, содержания в них углерода, степени ароматичности и другие физико-химические свойства.

Хроматографический анализ ГВ с разных глубин позволяет выявить основные закономерности дифференциации амфифильных компонентов ГК и ФК. В лугово-болотных и луговых почвах многокомпонентный состав ГК сохраняется по всему профилю. В составе ГК в верхних горизонтах профиля (0–20 см) при незначительном преобладании гидрофобных компонентов присутствует весь спектр амфифильных фракций. С глубиной (20–30 см) явно выражено доминирование гидрофобных фракций. В составе ФК независимо от глубины абсолютно доминируют гидрофильные соединения.

Несколько иная закономерность отмечена в гидрофильной группе ГВ, где с глубиной отмечается уменьшение содержания фракций, но сохраняется весь компонентный набор амфифильных фракций гуминовых веществ, присутствующих выше. По всей видимости, чем сильнее у ГВ будут выражены гидрофильные свойства, тем подвижнее они будут в профиле почвы, выступая агентами кислотного гидролиза минералов и элюируются. Гидрофобные ГВ будут, напротив, закрепляться на месте образования, формируя аккумулятивные характеристики профиля. По-видимому, в этом состоит значение и роль свойств амфифильности в формировании гумусового профиля почв.

Сопоставление характера распределения амфифильных фракций в лугово-болотной и луговой почве позволяет предположить существование различных механизмов формирования гумусового профиля этих почв. По всей видимости, в условиях активной минерализации ОВ при избытке кислорода образуется окисленное органическое вещество, обладающее в первую очередь гидрофильными свойствами. Эти условия обычно выполняются в верхнем горизонте почвы. Очевидно, что при минерализации нижних горизонтов гумусообразование идет по иному пути, результатом чего является относительное накопление гидрофобных органических молекул. Эта тенденция отражается и на результатах хроматографического фракционирования ГВ.

Этот результат еще раз подтверждает, что процесс гумификации имеет одно направление и заключается в отборе и накоплении термодинамически стабильных продуктов трансформации органического материала независимо от факторов почвообразования и типа почвы [Орлов и др., 1996]. Полученные данные по хроматографическому фракционированию ГВ показывают, что в рамках традиционной классификации гумусовых кислот гидрофильные компоненты ГВ близки к фульвокислотам, а гидрофобные — к гуминовым кислотам.

Заключение

Различный состав амфифильных компонентов в составе ГВ лугово-болотных и луговых почв дельты р. Селенги обуславливает характер поступления предшественников гумификации в почву и локальные условия в зоне гумификации. Процессы химической и микробиологической минерализации преобладают в окислительных условиях, в анаэробных напротив, замедленная минерализация ОВ наряду с его консервацией.

Таким образом, множество функциональных свойств, пространственная организация и растворимость ГВ обуславливают соотношение гидрофильных (полярных) и гидрофобных (неполярных) связей в молекуле. Вследствие преобладания в ГК лугово-болотной почвы боковых радикалов им присуща более высокая гидрофильность, чем у ГК из луговых почв, где преобладают ароматические углеродные связи. ГК лугово-болотной почвы подвержены пептизации, с чем связана их высокая подвижность в почвенном профиле по сравнению с ГК луговой почвы.

Литература

1. Почвы дельты реки Селенги (генезис, география, геохимия) / А. Б. Гынинова, С. А. Шоба, Л. Д. Балсанова, Б. Д. Гынинова. Улан-Удэ : Изд-во БНЦ СО РАН, 2012. 344 с. Текст : непосредственный.
2. Жуков В. М. Климат Бурятской АССР. Улан-Удэ : Бурят. кн. изд-во, 1960. 188 с. Текст : непосредственный.
3. Классификация и диагностика почв России / Л. Л. Шишов, В. Д. Тонконогов, И. И. Лебедева, М. И. Герасимова. Смоленск : Ойкумена, 2004. 324 с. Текст : непосредственный.
4. Классификация и диагностика почв СССР / В. В. Егоров, В. М. Фридланд, Е. Н. Иванова, Н. Н. Розов, В. А. Носин, Т. А. Фриев. Москва : Колос, 1977. 223 с. Текст : непосредственный.
5. Милановский Е. Ю. Амфифильные компоненты гумусовых веществ почв // Почвоведение. 2000. № 6. С. 706–715. Текст : непосредственный.
6. Орлов Д. С., Бирюкова О. Н., Суханова Н. И. Органическое вещество почв Российской Федерации. Москва : Наука, 1996. 258 с. Текст : непосредственный.
7. Орлов Д. С., Гришина Л. А. Практикум по химии гумуса. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1981. 273 с. Текст : непосредственный.
8. Fernandes A. N., Giovanela M., Esteves V. I. Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances. *J. Mol. Str.* 2010; 971: 33–38. doi: 10.1016/j.molstruc.2010.02.069
9. Hayes M. H. B., Swift R. S. An appreciation of the contribution of Frank Stevenson to the advancement of studies of soil organic matter and humic substances. *J Soils Sediments*. 2018; 18: 1212–1231. doi: 10.1007/s11368-016-16366

10. Kulikova N. A., Stepanova E. V., Koroleva O. V. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota. *Use humic Subst. to remediat. polluted environ.: from theory to pract.* Springer, 2005, pp. 285–309.

11. Martin M. V., Gebuhr C., Daniel O., Wiltshire K. H. Characterization of a humic acid extracted from marine sediment and its influence on the growth of marine diatoms. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2014; 94(5): 895–906. doi: 10.1017/S0025315414000368

12. Nebbioso A., Piccolo A. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405: 109–124.

13. Nobili M., Bravo C., Chen Y. The spontaneous secondary synthesis of soil organic matter components: a critical examination of the soil continuum model theory. *Appl. Soil Ecol.* 2020; 154: 103655. doi: 10.1016/j.apsoil.2020.103655

14. Rigobello E. S., Dantas A. D. B., Di Bernardo L, Vieira E. M. Influence of the apparent molecular size of aquatic humic substances on colour removal by coagulation and filtration. *Environmental Technology*. 2011; 32: 1767–1777. doi: 10.1080/09593330.2011.555423

Статья поступила в редакцию 07.11.2022; одобрена после рецензирования 14.11.2022; принята к публикации 25.11.2022.

DIFFERENTIATION OF HYDROPHOBIC AND HYDROPHILIC COMPONENTS OF HUMIC SUBSTANCES IN THE SELENGA RIVER DELTA SOILS

E. Yu. Milkheev, Yu. B. Tsybenov

Evgeniy Yu. Milkheev

Cand. Sci. (Biol.), Researcher,
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St, Ulan-Ude 670047, Russia
evg-milh@rambler.ru

Yury B. Tsybenov

Cand. Sci. (Biol), Head of the Laboratory,
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St, Ulan-Ude 670047, Russia
jurcybenov@gmail.com

Abstract. The article considers soil humic substances as a multicomponent system of amphiphilic (showing both hydrophobic and hydrophilic properties) substances. We have carried out fractionation of humic substances from soils of various genesis (meadow and meadow-boggy) by hydrophobic interaction chromatography on octyl sepharose CL-4B. This method fractionates humic and fulvic acids into separate components that differ in their ability to enter into hydrophobic interactions with the gel matrix. The results show that a higher percentage of hydrophobic macromolecules has been found in the humic substances of meadow soils than in other samples (humic acids of meadow-boggy soils and fulvic acids). The fulvic acid sample has shown weaker hydrophobic interactions than the humic acids.

Keywords: amphiphilic components, humic substances, meadow soils, meadow-boggy soils, Selenga River delta.

Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the state assignment No. 121030100228–4.

For citation

Milkheev E. Yu., Tsybenov Yu. B. Differentiation of Hydrophobic and Hydrophilic Components of Humic Substances in the Selenga River Delta Soils. *Nature of Inner Asia*. 2022; 4(22): 59–67. DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-59-67

The article was submitted 07.11.2022; approved after reviewing 14.11.2022; accepted for publication 25.11.2022.