

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 631.421:631.417.2

DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-209-221

Поступила в редакцию 09.10.2017

Received 09.10.2017

Е. В. Скрыльник¹, Н. В. Шевченко², М. А. Попирный¹, О. Т. Николов³

¹Национальный научный центр «Институт почвоведения и агрохимии имени А. Н. Соколовского», Харьков, Украина

²Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Харьков, Украина

³Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ СУПРАСТРУКТУРЫ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ

Аннотация. С помощью физико-химических методов изучено влияние способов обработки чернозема типичного на состояние воды и перестройку межмолекулярных связей, т. е. на супраструктуру гуминовых кислот (ГК). Установлено, что ГК, экстрагированные из почвы залежи, ввиду наличия участков с гидрофобными и гидрофильными доменами гетерогенны по составу, что обусловлено сбалансированным функционированием сопряженных процессов накопления и распада органического вещества почвы (ОВП). В то же время обработка чернозема вызывает потери ОВП. Обнаружено, что после вспашки из-за увеличения биодеградации ОВП содержание фульвокислот и количество свободной воды, а также число гидроксильных и карбоксильных групп ГК повышаются, способствуя увеличению лабильности ОВП и высвобождению питательных веществ. Установлено, что после вспашки чернозема типичного отмечается конформационная перестройка межмолекулярных взаимодействий в супраструктуре ГК, вызванная гидрофильной гидратацией. Координируемые свободными диполями воды полярные структурные элементы с доступными карбоксильными группами стабилизируют новую конформацию ГК преимущественно за счет водородных связей. Показано, что при 9-летнем использовании No till из-за большего содержания неполярных ароматических структур и меньшего – доступных полярных гидрофильных структур количество свободной воды уменьшается. Это обуславливает стабилизацию конформации супраструктуры ГК за счет гидрофобных сил, что определяет накопление труднодеградируемого консервативного ОВП. С помощью трансмиссионного электронного микроскопа установлено наличие в ГК, экстрагируемых из почвы после вспашки, частиц меньшего размера, чем в ГК, экстрагируемых из почвы после No till, что связано с отличием в молекулярной организации их гуминовой супраструктуры.

Ключевые слова: обработка почвы, супраструктура ГК, свободная вода, гидрофобно-гидрофильные структуры, перестройка межмолекулярных взаимодействий, конформационная перестройка, гидроксильные и карбоксильные группы

Для цитирования: Конформационные перестройки супраструктуры гуминовых кислот чернозема типичного в зависимости от способов обработки почвы / Е. В. Скрыльник [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 2. – С. 209–221. DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-209-221

E. V. Skrylnik¹, N. V. Shevchenko², M. A. Popirny¹, O. T. Nikolov³

¹National Scientific Center “O. N. Sokolovsky Institute for Soil Science and Agrochemistry Research”, Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv National Agrarian University named after V. V. Dokuchayev, Kharkiv, Ukraine

³V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

CONFORMATIONAL RESTRUCTURES OF SUPERSTRUCTURE OF HUMIC ACIDS OF CHERNOZEM TYPICAL IN DEPENDENCE BY SOIL TILLAGE

Abstract. The physicochemical methods have been used to study the effect of soil tillage of typical black soil for the state of water and the restructuring of intermolecular bonds that determine the of the superstructure of humic acids (HA). It has been established that the HA of the virgin soil is more heterogeneous in composition, due to the presence of hydrophobic and hydrophilic domains, that is due to the equilibrium of the conjugated processes of accumulation and decomposition of soil organic matter (SOM), while tillage of typical black soil caused losses of SOM. It was found that plowing increases the content of fulvic acids and the amount of free water and hydroxyl and carboxyl groups of HA, due to the increase the biodegradation of SOM, which promotes the labile SOM and release of more nutrients. It has been established that plowing of typical black soil leads to conformational rearrangement of intermolecular interactions in the superstructure of HA by hydrophilic hydration. Polar structural elements coordinated by free water dipoles with accessible carboxyl groups. They stabilized the new conformation of HA mainly by hydrogen bonds. It has been shown that the 9-year use of No till leads to a decrease in free

water, due to the greater availability of non-polar aromatic structures, and to the reduction of unavailable hydrophilic components, which causes the conformation of the superstructure of HA to stabilize mainly by hydrophobic forces, which causes the accumulation of a hard-to-degradable conservative SOM. Transmission electron microscopy (TEM) have been revealed the presence of smaller particles in the HA samples, in contrast to the sample of HA by No till, which is due to the difference in the molecular organization of their humic superstructures.

Keywords: soil tillage, superstructure of HA, free water, hydrophobic-hydrophilic structures, restructuring of intermolecular interactions, conformational rebulding, hydroxyl, carboxyl groups

For citation: Skrylnik E. V., Shevchenko M. V., Popirny M. A., Nikolov O. T. Conformational restructures of superstructure of humic acids of chernozem typical in dependence by soil tillage. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 209–221 (in Russian). DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-209-221

Введение. Способы обработки почвы как антропогенный фактор влияния на трансформационные процессы органического вещества в почве (ОВП) определяют накопление и активность гумусовых веществ (ГВ) [1, 2]. Известно, что из-за естественной саморегуляции открытой термодинамической гумусовой системы процессы синтеза и распада ОВП в природных ценозах более сбалансированы, чем в агроценозах [3]. Саморегуляция системы ГВ почвы определяется самоорганизацией гетерогенной смеси природных биоорганических молекул (биомолекул) в водных средах [4–6]. Самоорганизация ГВ в водной среде осуществляется посредством слабых мультидисперсионных гидрофобных межмолекулярных взаимодействий (Ван дер Ваальсовы, π - π и С- π силы) и водородных связей (Н-связей), которые формируют большого размера супрамолекулярные ансамбли (надмолекулярные комплексы) ГВ из относительно меньших по размеру и гетерогенных биомолекул различного происхождения, образующиеся в результате биодеградации ОВП [5, 6]. Поведение ГВ в почве обусловлено их амфифильными свойствами, которые определяют их биосферные функции [3].

Функционирование ГВ как гидрофильно-гидрофобных веществ в почве происходит в водной среде, и взаимодействие составляющих структур с водой во многом определяет пространственную конфигурацию надмолекулярных комплексов целом (макроструктуру). В нативном (природном) состоянии (как и все биополимеры клетки) ГВ находятся в гидратированном виде, поэтому структура водного окружения обуславливает их подвижность в почве [4–8].

Супрамолекулярные ансамбли ГВ, которые агрегируются в гумусовые супрамолекулярные ассоциаты, где маленькие гидрофильные молекулы имеют достаточно кислотных функциональных групп ($-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{COOH}$) и удерживают свои кластеры при любых рН, относят к фульвокислотам (ФК). Ассоциаты, которые сформированы преимущественно неполярными гидрофобными структурами и которые стабилизируются при нейтральном рН дисперсионными гидрофобными силами, относят к гуминовым кислотам (ГК). Постепенное увеличение в размерах гуминовой супраструктуры при понижении рН обусловлено стабилизацией конформации преимущественно Н-связями [5, 6]. Наибольшее количество органического углерода содержится в гидрофобных доменах гуминовой супраструктуры, которые представлены низкомолекулярными сопряженными ароматическими структурами ($\text{C}=\text{C}$), что определяет высокое содержание углерода в черноземах типичных благодаря высокой биологической активности почвы, которая вызывает глубокий распад устойчивых фенольных лигниновых структур клеточных стенок растений [5–7]. Гидрофильные и гидрофобные домены гумусовых молекул прилегают друг к другу или содержат друг друга вместе с гидратированной водой, формируют большие по размеру молекулярные ассоциаты ГВ, что определяет их амфифильные свойства, активность и полифункциональность [6, 8]. В гуминовой супрамолекулярной организации межмолекулярные взаимодействия определяют конформационную стабильность, а сложность распределения слабых мультидисперсионных сил регулирует экологическую реакционную способность ГВ [3, 5, 6, 9, 10].

В результате интенсивной обработки почвы происходит смещение трансформационных процессов вследствие возрастания биодеградационных процессов неустойчивого пула ОВП [1–3]. Это может приводить не только к потере гумуса, но и к разрушению функциональной устойчивой супраструктуры вследствие необратимой перестройки устойчивой гуминовой конформации [6, 11–13], а также к дегумификационным процессам, что определяет агрогенную трансформацию ОВП и формирование экологически не устойчивых участков [11, 12]. Отсутствие постоянной

компенсации растительными остатками или органическими удобрениями текущих расходов органического вещества обусловлено главным образом биологической минерализацией (биодegradацией) слабо стабилизированных новообразованных органических веществ [1, 2, 11]. Изменение соотношения между минерализацией свежего органического вещества, образованием и стабилизацией новых органических веществ – основные факторы, влияющие на уменьшение содержания гумуса и ухудшение его качественных характеристик, присущих антропогенным неустойчивым участкам [1]. Влияние обработки почвы на устойчивость супрамолекулярной организации ГК определяется изменением условий гумификации, что обуславливает образование нестабильной водной структуры и отсутствие неполярного (гидрофобного) микроокружения лабильного гидрофильного домена [14]. Поэтому при конформационных перестройках супраструктуры ГК необходимо учитывать стабилизирующее действие водного окружения (включение водных кластеров извне) и гидрофобного окружения, предохраняющего от микробиологической минерализации новообразованные ГВ [14, 15].

В земледелии одним из способов возвращения утраченного органического углерода, глобальной стабилизации CO_2 и агрономических качеств почв является минимизация обработки почвы, а именно популярная система нулевой обработки (No till) и покровной культуры, которые успешно используются в Северной Америке и различных европейских странах с соответствующими климатическими условиями [16]. Неудачные последствия, по мнению сторонников таких технологий, объясняются недостаточным периодом применения, который должен составлять не менее 6–8 лет для полного восстановления естественного состояния почв, и создания необходимых условий [17]. Поэтому изучение влияния интенсивных технологий обработки и No till с длительным применением на молекулярные процессы реагирования гумусовых молекул и их ассоциатов особенно актуальны как для современной фундаментальной науки, так и в агроэкологическом аспекте.

Цель работы – изучение конформационной перестройки супраструктуры гуминовых кислот чернозема типичного в зависимости от способов обработки почвы.

Материалы и методы исследования. Отбор почвенных образцов проводили на стационарном опытном поле кафедры земледелия Харьковского национального аграрного университета имени В. В. Докучаева. Опыт был заложен в 2006 г. для определения эффективности технологий обработки чернозема типичного. Схема полевого опыта: 1) 40-летняя залежь (контроль); 2) интенсивная обработки (вспашка на глубину 20–22 см), 3) нулевая обработка (No till), прямой посев в необработанную почву. Образцы чернозема типичного отбирали на глубине 0–20 см по стандартной методике [18].

Содержание общего углерода ($C_{\text{общ}}$) в почве определяли методом Тюрина [19], общего азота ($N_{\text{общ}}$) – методом Кьельдаля [20], лабильного углерода ($C_{\text{лаб}}$) – методом Егорова [21], гумусовых веществ – методом Кононовой-Бельчиковой [22], подвижных соединений калия и фосфора – методом Чирикова [23].

Получение щелочных вытяжек ГК проводили по методу Орлова [24], после чего вытяжки центрифугировали, фильтровали, концентрировали в вакуумном испарителе и подвергали диализу. Для изменения pH щелочной среды вытяжек ГК (pH 11) до pH 2,0 последние обрабатывали лимонной кислотой по методике уменьшения гетерогенности ГВ, при которой происходит перереорганизация супраструктуры ГВ [5, 6, 9]. Для проведения инфракрасной (ИК) спектроскопии пропускания с преобразованием Фурье (FTIR) использовали спектрофотометр SPECTRUM ONE PerkinElmer со стандартной областью измерения $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Образцы ГК в жидкой фазе подсушивали на пленке и прессовали в таблетки с КВг. Состояние воды в жидких образцах ГК определяли методом СВЧ-спектроскопии, используя цилиндрический H_{01n} -резонатор с рабочей частотой 9,2 ГГц. Данная методика позволяет зафиксировать изменение частоты релаксации дипольных моментов воды, которое обусловлено подвижностью свободных диполей в поле СВЧ [25]. В качестве эталона для вычисления сдвига частот (f_0 , кГц) и СВЧ мощности (u_0 , ма) по абсолютной величине использовали пустой резонатор (без образца).

Эксклюзионную (проникающую) гель-хроматографию по размерам молекул ГК проводили на хроматографической колонке с рабочим объемом 70 мл, используя гель-сефадекс G-200, иден-

тификацию фракций – по поглощению света при 465 нм, элюцию – 0.1 н гидроксидом натрия и 0.1 н лимонной кислотой по стандартной методике [26], электрофорез – по стандартной методике [26].

Для просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии образцов ГК использовали электронный микроскоп Selmi EM 125.

Результаты и их обсуждение. Снижение содержания общего углерода за время 9-летнего сельскохозяйственного использования вспашки и No till по сравнению с таковым в залежи (табл. 1) связано с увеличением биологической минерализации, особенно при вспашке, после интенсивного механического перемешивания слоя чернозема на глубине 0–20 см. При этом накопление лабильного углерода, азота, а также питательных веществ при вспашке обусловлено поступлением в почву свежих растительных остатков и их активной деградацией. Кроме того, наличие лучших водно-воздушных условий привело к более активной биодеградации ОВП микробным сообществом и к изменению направленности ферментативной активности почвы.

Таблица 1. Содержание органических и питательных веществ в 5–20-сантиметровом слое чернозема типичного при разных способах обработки почвы, %

Table 1. Organic and nutrient content in a 5–20-centimeter layer of chernozem typical for different methods of soil treatment, %

Показатель	Залежь	Вспашка	No till
Общий углерод	2,91	2,56	2,52
Лабильный углерод	0,11	0,13	0,10
Общий азот	0,25	0,27	0,23
Соотношение C:N	11,64	9,48	10,96
Подвижные соединения фосфора, мг/кг	73,27	85,47	75,95
Подвижные соединения калия, мг/кг	129,61	131,34	93,89
Гуминовые кислоты	0,96	0,88	0,86
Фульвокислоты	0,31	0,32	0,27

Со снижением поступления растительных остатков в 5–20-сантиметровом слое чернозема типичного при использовании No till отмечалось уменьшение содержания органических и питательных веществ. При вспашке чернозема типичного (табл. 1) благодаря увеличению минерализации ОВП содержание ГК снизилось, а ФК – увеличилось по сравнению с таковыми в залежи, а при No till отмечалось уменьшение содержания как ГК, так и ФК. Это вызвано перераспределением группового состава ГВ, обусловленным изменением условий (доступом кислорода и влаги, оксидредуктазной активностью и рН) и, как следствие, изменением направленности и интенсивности трансформации ГВ [27].

С помощью FTIR было показано, что ГК исследованных вытяжек имеют типичный спектр (рис. 1, 2), в котором проявляются характерные для ГВ полосы поглощения. В полученных спектрах FTIR полосы поглощения 3200–3400 и 3400–3500 см⁻¹ обуславливают колебание гидроксильных и фенолгидроксильных групп (–ОН), образование межмолекулярных Н-связей, для которых характерно насыщение и которые связаны с координацией кластеров ГК диполями свободной воды [28, 29]. Дуплеты 2900–2800 см⁻¹ обусловлены валентными колебаниями алифатических периферийных групп –СН₂, –СН₃, деформационными колебаниями С–Н метоксильных групп (–ОСН₃) и кислородзамещенными полярными ионизированными группами (1440 и 1375–1230 см⁻¹) циклических ароматических структур. Сопряженные циклические ароматические структуры проявляются в диапазоне 1500–1525 см⁻¹, что связано с присутствием молекул воды в вытяжках, которые сдвигают традиционную полосу 1600–1625 см⁻¹ в коротковолновую область. Для кетонных и карбоксильных групп (С=О и –СООН) характерен диапазон 1710–1725 см⁻¹. Наличие данных полос поглощения указывает на общность в построении макроструктуры ГК и на различия в относительной интенсивности и в сдвигах полос поглощения [3]. Сдвиг полос поглощения вызван различной ионизацией кислородсодержащих боковых функциональных групп ароматических структур, что обусловлено таутомерными (кетонольные формы) переходами и соответ-

ственным расположением (ориентацией) дипольных моментов, их активностью и способностью к межмолекулярным и донорно-акцепторным взаимодействиям, которые определяют стабилизацию гуминовой конформации [3, 28–32].

По данным FTIR щелочных вытяжек (см. рис. 1), макроструктура ГК залежи при pH 11,0 имеет интенсивные полосы поглощения при 1440 и 1710 см^{-1} , что указывает на присутствие разнообразных по амфифильным свойствам компонентов и обуславливает гетерогенный состав ГК залежи.

Отсутствие интенсивного поглощения при 1440 см^{-1} в ГК, экстрагированных из почвы после вспашки, и присутствие разных, но слабых по интенсивности полос поглощения (1440, 1375 и 1235 см^{-1}), а также интенсивной полосы (1710 см^{-1}) указывает на формирование ГК с большим содержанием кислородсодержащих ионизированных групп. Поглощение ГК, экстрагированных

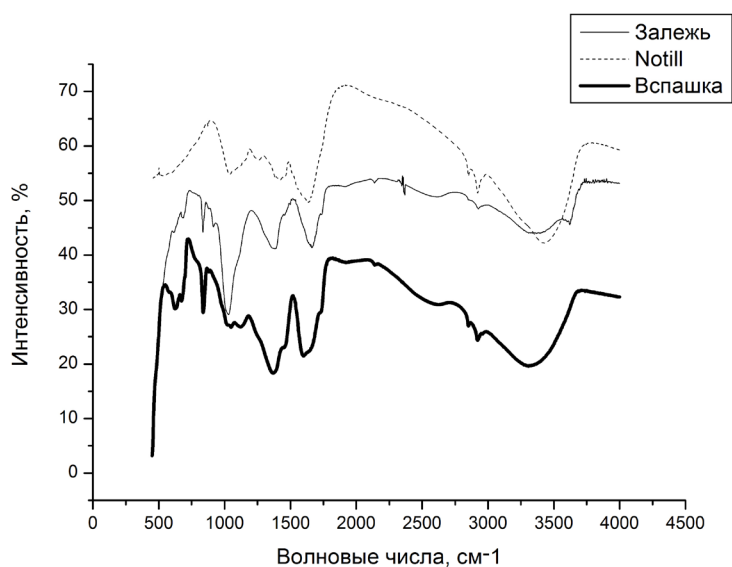


Рис. 1. FTIR-спектры щелочных вытяжек ГК, экстрагированных из чернозема типичного после разных способов обработки почвы

Fig. 1. FTIR spectra of alkaline extracts of humic acids extracted from chernozem typical after different methods of soil cultivation

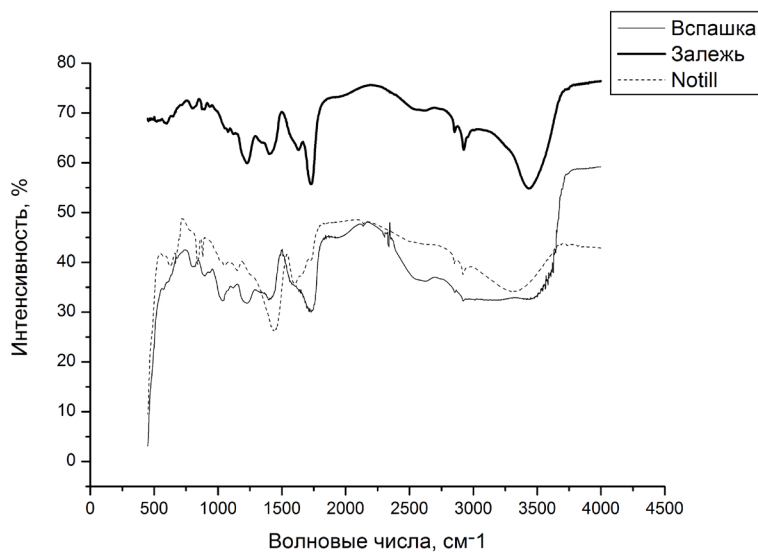


Рис. 2. FTIR-спектры вытяжек ГК с pH 2,0, экстрагированных из чернозема типичного после разных способов обработки почвы

Fig. 2. FTIR spectra of humic acid extracts with pH 2.0, extracted from chernozem typical after different soil treatments

из почвы после No till, при 1500 см^{-1} обусловлено присутствием неполярных сопряженных ароматических структур.

При изменении pH до 2,0 на спектрах FTIR (рис. 2) отмечаются усиление и сдвиг частот поглощения карбоксильными и –ОН группами (что также свидетельствует о присутствии свободной воды) при залежи и вспашке, а также дополнительные полосы ионизированных и замещенных групп. При вспашке происходит уширение диапазона поглощения при 3400 см^{-1} , связанное с образованием дополнительных Н-мостиков между –ОН и свободными диполями кластеров воды, что указывает на присутствие в ГК полярных структур ароматической природы, которые координируются молекулами воды (дополнительные акцепторы-доноры Н-связей). Незначительные изменения в ГК, экстрагированных из почвы после No till, связаны с появлением небольших полос ионизированных групп и ароматических сопряженных структур при 1625 см^{-1} . При этом в супраструктуре ГК (No till) при изменении pH наблюдается интенсивное поглощение при 1500 см^{-1} с незначительным сдвигом в коротковолновую область ИК-поглощения, что указывает на присутствие в ГК большего количества неполярных ароматических структур.

Щелочные вытяжки, по данным СВЧ-спектроскопии (табл. 2), содержат меньше свободной воды, на что указывает частота колебаний свободных диполей воды в поле СВЧ (Δf) по сравнению с таковой при измененной до pH 2,0. Повышение уровня свободной воды при изменении pH после обработки лимонной кислотой, вероятно, связано с перестройкой гидрофобно-гидрофильных взаимодействий и конформационной переорганизацией всей супрамакроструктуры ГК. Как известно, добавление лимонной кислоты и других органических кислот не вызывает разрыва ковалентных связей (двойной связи C=C) и гидролиза структурных компонентов ГВ (в отличие от минеральных кислот), а благодаря наличию полярных и неполярных элементов влияет на ориентацию дипольных моментов кислородсодержащих групп, приводя к распаду гидрофобных межмолекулярных взаимодействий (а соответственно, и к распаду большей по размеру супраструктуры) и образованию новых, преимущественно с участием более сильных Н-связей, которые стабилизируют супраструктуру ГК [5, 6, 9, 10]. В результате гидрофильной конформационной переорганизации участие воды является доминирующим, так как определяет энтропию образования новых связей между вновь ассоциируемыми молекулярными агрегатами. Однако в щелочных вытяжках наблюдаются увеличение частоты (Δf) и потеря мощности СВЧ-излучения в образцах ГК, выделенных из вспаханной почвы, по сравнению с образцами, выделенными из залежи и после применения No till. Это указывает на большее содержание свободной воды в ГК при вспашке чернозема типичного.

Обработка лимонной кислотой вытяжек ГК вызвала увеличение содержания свободной воды, особенно в образцах ГК, выделенных при вспашивании чернозема типичного, что связано с наличием большего количества полярных структур, представленных кислородсодержащими группами, которые способны к межмолекулярным взаимодействиям координируемыми Н-связями кластеров воды.

Т а б л и ц а 2. СВЧ-спектроскопия вытяжек ГК, экстрагированных из чернозема типичного после разных способов обработки почвы

Table 2. Microwave spectroscopy of extracts of uumic acid, extracted from chernozem typical after different methods of soil cultivation

Обработка почвы	u_0 (μa)	f_0 , кГц	u	f	Δu	Δf
Щелочные вытяжки ГК (pH 11,0)						
Залежь	195,8	2943,2	88,6	2165,9	114,4	685,9
Вспашка	197,8	2903,4	88,4	2124,4	109,4	779,0
No till	190,2	3037,8	75,9	2351,9	114,3	685,9
Вытяжки ГК с pH 2,0 (после обработки лимонной кислотой)						
Залежь	277,4	2867,5	100,3	2034,6	177,1	832,9
Вспашка	247,2	2807,2	79,7	1799,7	167,5	1007,4
No till	204,3	2875,3	98,0	2112,9	106,4	762,3

Наименьшее содержание свободной воды отмечалось в ГК, выделенных из почвы после No till, что связано с наличием большого количества неполярных структур, которые слабо поддаются конформационным перестройкам. Наличие в ГК, выделенных из почвы залежи, промежуточного значения свободной воды свидетельствует о присутствии как полярных, так и неполярных структур, и указывает на возможность гидратации их супраструктуры по гидрофильному и гидрофобному типу. Таким образом, формируется структура, при которой лабильные участки (гидрофильные) расположены в окружении гидрофобных неполярных структур, в которых происходит упрочнение Н-связей гидрофобным эффектом. Это оберегает лабильные участки от дестабилизирующего действия возмущающих внешних факторов среды [14].

Молекулярное распределение щелочных вытяжек ГК обусловлено бимодальным распределением, которое выражено двумя характерными для ГВ максимумами (рис. 3). Первый максимум соответствует выходу больших по размеру гуминовых молекул и их ассоциатов, которые представлены разветвленными алифатическими и ароматическими структурами с функциональными полярными группами, а также свободной водой. Второй максимум соответствует меньшим по размеру молекулам и низкомолекулярным структурам ароматических сопряженных колец. Разветвленные алифатические структуры взаимодействуют с ароматическими сопряженными структурами благодаря СН-π связям, между собой ароматические сопряженные структуры связываются через стекнинг π-π-связи, при этом в сопряженных циклических структурах, как известно, активно осуществляются электронные переходы, влияющие на характер донорно-акцепторные взаимодействия через перераспределение электронной плотности [5, 6, 30].

Профиль молекулярного распределения щелочной вытяжки ГК залежи указывает на выход большего количества, но меньших по размеру молекулярных фракций, представленных низкомолекулярными сопряженными ароматическими структурами (рис. 3). Однако при изменении рН щелочной вытяжки ГК до 11,0 после добавления лимонной кислоты и до рН 2,0 наблюдается обратный эффект – увеличение первого максимума, обусловленное наличием свободной воды и гидрофильных компонентов с полярными группами, относительно второго (рис. 4).

Эффект обусловлен перестройкой межмолекулярных связей между структурными элементами и связанной водой в супраструктуре ГК, а также снижением оптической плотности (гипохромный эффект), что подтверждается рядом работ [4–7, 9, 10]. Обработка лимонной кислотой вызывает изменение конформации супраструктуры ГК за счет перестройки гидрофобных взаи-

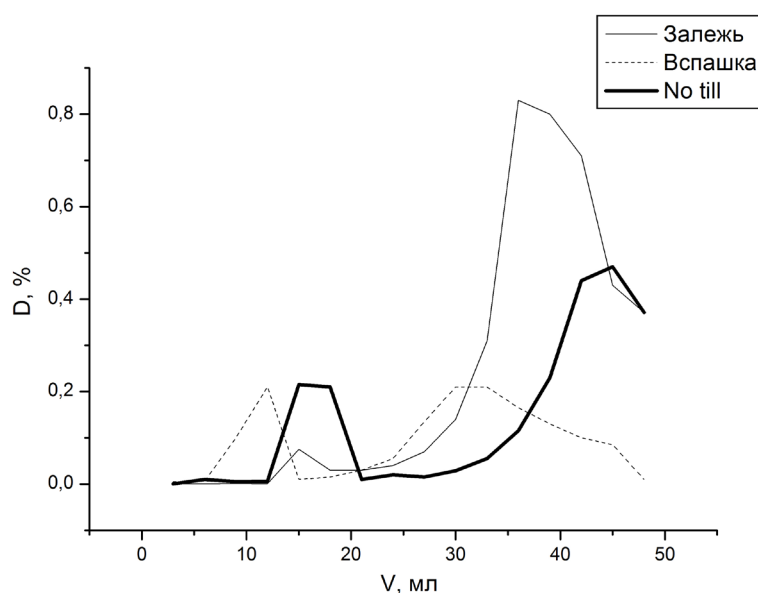


Рис. 3. Профиль бимодального молекулярного распределения щелочных вытяжек ГК при разном способе обработки чернозема

Fig. 3. Profile of the bimodal molecular distribution of alkaline extracts of humic acid with a different method of treating chernozem

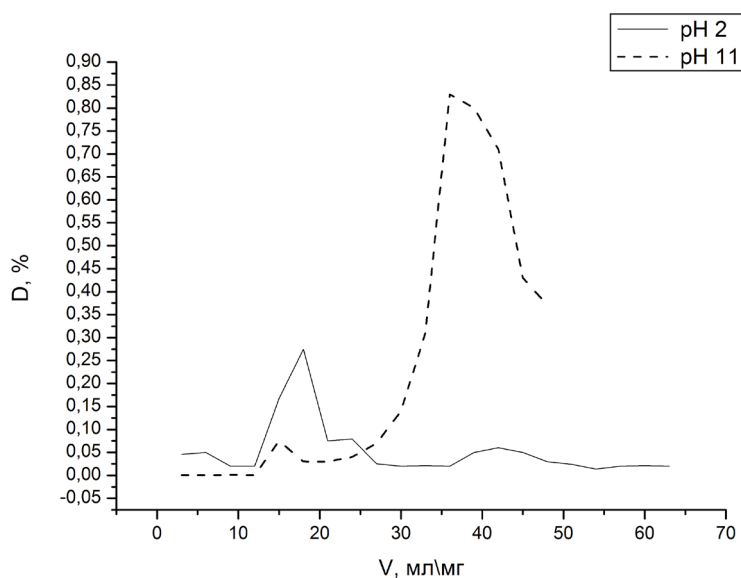


Рис. 4. Профиль молекулярного распределения ГК залежи при pH 11,0 и pH 2,0

Fig. 4. The profile of the molecular distribution of the alkaline extract of humic acid deposits at pH 11.0 and pH 2.0

модействий между неполярными молекулами, при которой происходит перестройка конформации ГК в супраструктуру, которая стабилизирована преимущественно более сильными Н-связями между полярными структурами и меньшими по размеру молекулярными ассоциатами [5, 6]. При этом результаты эксклюзионной гель-хроматографии свидетельствуют о наличии в ГК залежи как гидрофобных, так и гидрофильных структур. Последние проявляются при изменении pH органическими кислотами амфифильной природы через деблокирование кислородсодержащих функциональных групп.

Вспашка привела к уменьшению второго максимума и увеличению первого, а также сместила время и объем элюции в сторону нулевого объема, соответствующего только свободной воде (см. рис. 3). Соотношение этих максимумов обусловлено большим содержанием гидрофильных структур, которые координируются присутствием кластеров свободной воды. Таким образом, обработка почвы способствовала формированию гидрофильной конформации ГК чернозема типичного. Использование No till привело к увеличению второго максимума и некоторому смещению первого в сторону большего времени элюции, что указывает на увеличение содержания неполярных структур (рис. 3).

Обработка лимонной кислотой образцов ГК вспашки и No till указывает на распад первичной конформации и на дальнейшую перестройку супраструктуры ГК. Наблюдаемый гипохромный эффект по сравнению с таковым при залежи обусловлен меньшим содержанием ароматических структур. Однако полное исчезновение первого максимума при вспашке и увеличение второго указывает на полную перестройку гидрофильной конформации с высвобождением свободной воды и стабилизацией имеющихся неполярных структур гидрофобными силами (рис. 5). В образце ГК No till при pH 2,0 перестройка межмолекулярных связей менее выражена из-за присутствия первых максимумов и полимодального второго максимума, что обусловлено большим содержанием неполярных структур в составе ГК (рис. 5).

Результаты гель-электрофореза подтверждают общность состава образцов ГК – наличие окрашенных фракций свидетельствует о присутствии сопряженных ароматических структур. Отличие фракций заключается в разной интенсивности окраски полос, что вызвано различным конформационным состоянием супраструктуры образцов ГК и изменением pH щелочных вытяжек.

На рис. 6 показана электронно-микроскопическая фотография образца ГК, выделенного из вспаханного чернозема, где наблюдается агрегация частиц меньшего размера. При наблюдении за поведением частиц размером около 10–100 нм в диаметре отмечается их способность агрегироваться в водной среде в более крупные молекулярные агрегаты, что согласуется с данными

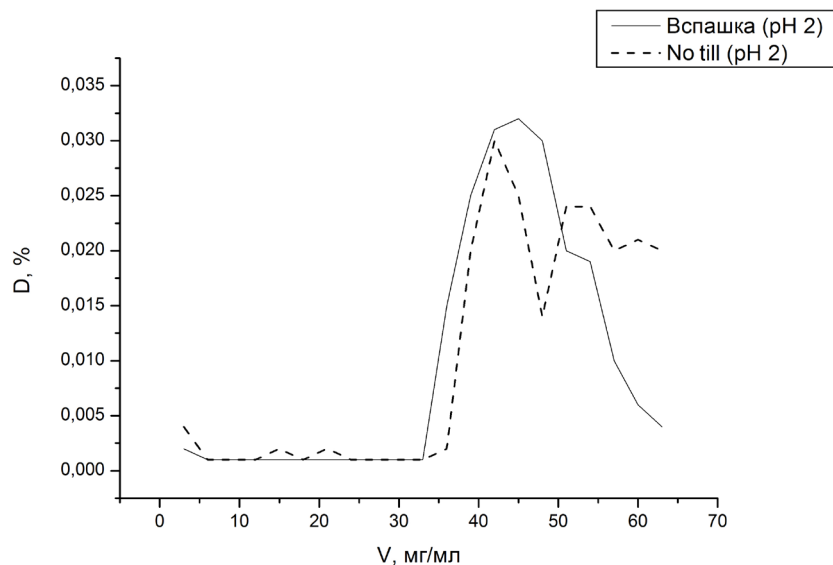


Рис. 5. Профиль молекулярного распределения вытяжек ГК при pH 2,0

Fig. 5. Profile of the molecular distribution of humic acid extracts at pH 2.0

других работ [3, 33]. При этом наблюдается их сильное наслаивание и плохое просвечивание, вызванное агрегацией гидрофобных неполярных органических частиц, особенно образцов ГК из чернозема при No till.

При этом увеличение наслаивания (от 500 до 1000 нм) вызвано большим содержанием трудно разлагаемого органического вещества (рис. 7). Результаты анализа образца ГК, экстрагированного из почвы под залежью, указывают на присутствие гетерогенных по размеру частиц и их молекулярных агрегатов, что указывает на различия в конформационной организации гуминовой супраструктуры (рис. 8).

Таким образом, наблюдаемое под трансмиссионным электронным микроскопом наличие в ГК, экстрагированных из чернозема типичного после вспашки, частиц меньшего размера, чем в ГК, экстрагированных из почвы после технологии No till, обусловлено различиями в макроскопической организации супраструктуры их ГК.

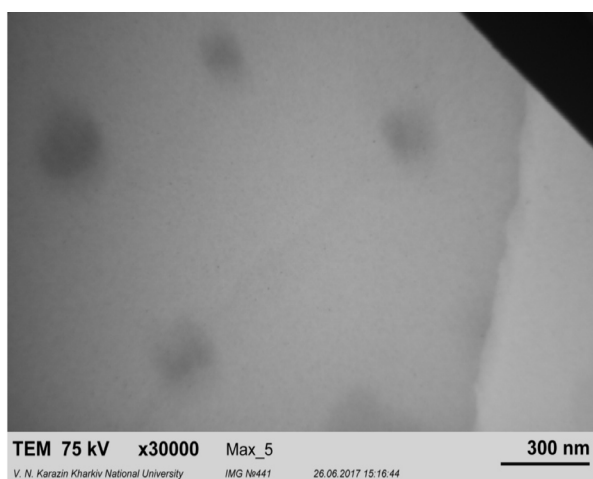


Рис. 6. Трансмиссионная электронная микроскопия образца ГК, выделенного из чернозема типичного после вспашки

Fig. 6. Transmission electron microscopy of a sample of humic acid isolated from chernozem typical after plowing

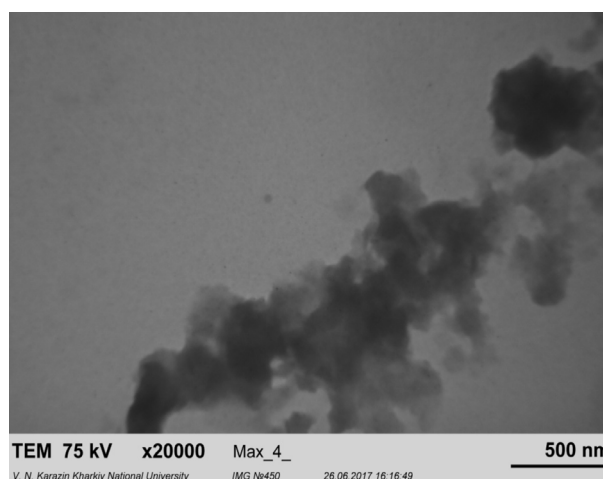


Рис. 7. Трансмиссионная электронная микроскопия образца ГК, выделенного из чернозема типичного, обработанного по технологии No till

Fig. 7. Transmission electron microscopy of a sample of humic acid isolated from chernozem typical, processed by technology No till

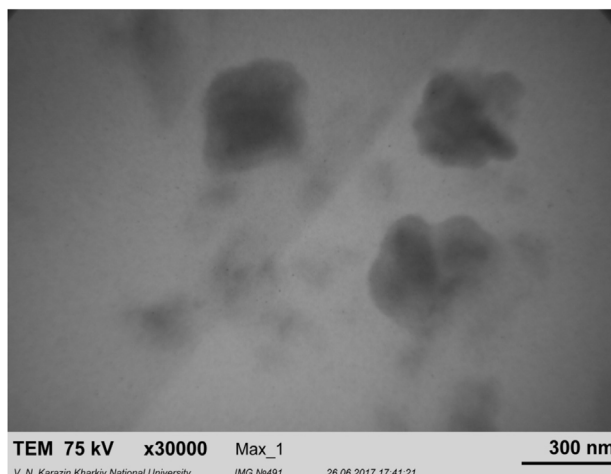


Рис. 8. Трансмиссионная электронная микроскопия образца ГК, экстрагированного из чернозема типичного, под залежью

Fig. 8. Transmission electron microscopy of a sample of humic acid extracted from typical chernozem under the deposit

Заключение. С помощью физико-химических методов установлено, что применение разных способов обработки почвы позволяет стабилизировать конформационную супраструктуру ГК путем изменения их амфифильного состава, обусловленного характером биodeградационных процессов в микробном сообществе чернозема типичного. Показано, что ГК, экстрагируемые из почвы под залежью, являются гетерогенными по амфифильному составу за счет стабилизации супраструктуры преимущественно дисперсионными гидрофобными силами, которые предохраняют гидрофильные домены лабильного пула ОВП от интенсивной биологической минерализации микробным сообществом чернозема типичного.

Изменение состава ГК вызывает перестройку слабых межмолекулярных связей, что обуславливает изменение реакционной способности ГК. Так, в составе ГК, выделенных из почвы после вспашки, имеется наибольшее количество кислородсодержащих групп в виде ОН– и С=О карбоксильных групп, что вызывает изменение реакционной активности в сторону ее увеличения. При этом отмечаемая стабилизация конформации ГК, преимущественно за счет Н-связей между кислородсодержащими группами ароматических структур, вызывает гидрофильную гидратацию и увеличение содержания свободной воды. После 9-летней вспашки чернозема типичного отмечается усиление минерализационного процесса за счет интенсификации разложения ОВП ферментами микробного ценоза, интенсивного перемешивания верхнего слоя почвы и доступа кислорода. Это приводит к снижению уровня общего углерода, увеличению содержания ФК в групповом составе ОВП и высвобождению лабильного углерода, общего азота и питательных элементов, доступных растению.

Использование No till приводит к увеличению в составе ГК неполярных ароматических структур и к снижению образования в составе ОВП лабильных доступных питательных веществ вследствие накопления трудноминерализуемого ОВП в исследуемых образцах чернозема типичного. Показано, что ГК, экстрагируемые из почвы после No till, способствуют перестройке супраструктуры благодаря уменьшению содержания свободной воды и гидрофобным взаимодействиям между неполярными гидрофобными ароматическими структурами.

Список использованных источников

1. Скрильник, С. В. Вплив систем обробітку та удобрення на гумусовий стан і вміст поживних речовин у чорноземі типовому/ С. В. Скрильник, О. С. Перебиговська, В. П. Москаленко // Агрохімія і ґрунтознавство : міжвідом. темат. наук. зб. / Нац. Наук. центр «Ін-т ґрунтознавства та агрохімії ім. О.Н.Соколовського». – Харків, 2008. – Вип. 68. – С. 90–94.
2. Quality and dynamics of soil organic matter in a typical chernozem of Ukraine under different long-term tillage systems / Y. Kravchenko [et al.] // Canadian J. of Soil Science. – 2012. – Vol. 92, N 3. – P. 429–438.

3. Орлов, Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / Д. С. Орлов. – М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 1990. – 325 с.
4. Wershaw, R. L. Molecular aggregation of humic substances / R. L. Wershaw // *Soil Science*. – 1999. – Vol. 164, N 11. – P. 803–813.
5. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances / A. Piccolo // *Soil Science*. – 2001. – Vol. 166, N 11. – P. 810–832.
6. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and application in soil science / A. Piccolo // *Advances in Agronomy*. – 2002. – Vol. 75. – P. 57–134.
7. Yonebayashi, K. Surface active properties of soil humic acids / K. Yonebayashi, T. Hattori // *Science of the Total Environment*. – 1987. – Vol. 62. – P. 55–64.
8. Милановский, Е. Ю. Амфифильные компоненты гумусовых веществ почв / Е. Ю. Милановский // *Почвоведение*. – 2000. – № 6. – С. 706–715.
9. Nebbioso, A. Advances in Humeomic: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid / A. Nebbioso, A. Piccolo // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 720. – P. 77–90.
10. Conformational changes of dissolved humic and fulvic superstructures with progressive iron complexation / A. Nuzzo [et al.] // *J. of Geochemical Exploration*. – 2013. – Vol. 129. – P. 1–5.
11. Овчинникова, М. Ф. Признаки и механизмы агрогенной трансформации гумусовых веществ дерново-подзолистой почвы / М. Ф. Овчинникова // *Агрохимия*. – 2012. – № 1. – С. 3–13.
12. Цапко, Ю. Л. Дискусійні проблеми гумусу / Ю. Л. Цапко // *Ґрунтознавство*. – 2015. – Т. 16, № 3–4. – С. 83–89.
13. Феноменология функциональных структурных моделей природных гумусовых и синтезированных гуминоподобных веществ / В. И. Ионенко [и др.] // *Сибир. вестн. с.-х. науки*. – 1988. – № 5. – С. 91–104.
14. Molecular dynamics simulations of water molecule-bridges in polar domains of humic acids / A. J. A. Aquino [et al.] // *Environmental Science and Technology*. – 2011. – Vol. 45, N 19. – P. 8411–8419.
15. Hydration and water holding properties of cross-linked lignite humic acids / Z. Cihlár [et al.] // *Geoderma*. – 2014. – Vol. 230–231. – P. 151–160.
16. Медведев, В. В. Нульовий обробіток ґрунту в європейських країнах / В. В. Медведев. – Харків : ЕДЕНА, 2010. – 200 с.
17. Шевченко, М. В. Ефективність мінімальних технологій обробітку ґрунту при вирощуванні зернових культур у лівобережному лісостепу / М. В. Шевченко // *Корми і кормовиробництво*. – 2014. – Вип. 79. – С. 56–61.
18. Якість ґрунту. Відбирання проб: ДСТУ 4287:2007. – [Чинний від 2004-30-04]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2005. – 9 с.
19. Якість ґрунту. Методи визначання органічної речовини: ДСТУ 4289:2004. – [Чинний від 2005-07-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2005. – 14 с. – (Національний стандарт України).
20. Якість ґрунту. Визначення загального азоту в модифікації ННЦ ІГА ім. О. Н. Соколовського: ДСТУ 4726:2004. – [Чинний від 2005-07-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2005. – 14 с. – (Національний стандарт України).
21. Якість ґрунту. Методи визначання доступної (лабільної) органічної речовини: ДСТУ 4732:2007. – [Чинний від 2008-01-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2008. – 12 с. – (Національний стандарт України).
22. Якість ґрунту. Визначення групового складу гумусу за методом Тюріна у модифікації Конової та Бельчикової: ДСТУ 7855:2015. – [Чинний від 2016-07-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2016. – 9 с. – (Національний стандарт України).
23. Якість ґрунту. Методи визначання валового фосфору і валового калію в модифікації ННЦ ІГА ім. О. Н. Соколовського: ДСТУ 4290:2004. – [Чинний від 2005-07-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2005. – 14 с. – (Національний стандарт України).
24. Орлов, Д. С. Практикум по химии гумуса : учеб. пособие / Д. С. Орлов, Л. А. Гришина. – М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 1981. – 271 с.
25. Николов, О. Т. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями / О. Т. Николов, Т. А. Жилиякова // *Журн. физ. химии*. – 1991. – Т. 65, № 5. – С. 1417–1420.
26. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М. : Наука, 1985. – 536 с.
27. Попірний, М. А. Вплив інтенсивності обробітку ґрунту на склад, фізичні та хімічні властивості другої фракції гумінових кислот, екстрагованих з чорнозему типового / М. А. Попірний, О. Т. Ніколов, Є. В. Скрильник // *Біофіз. вісн.* – 2016. – Т. 35, № 35. – С. 34–45.
28. Бахшиев, Н. Г. Введение в молекулярную спектроскопию : учеб. пособие / Н. Г. Бахшиев. – 2-е изд., испр. и доп. – Л. : Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1987. – 216 с.
29. Горбачевич, С. К. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий. Нелинейные эффекты / С. К. Горбачевич. – Минск : Изд-во Белорус. гос. ун-та, 2002. – 149 с.
30. Кудярова, А. Ю. Приложение фундаментальных положений химии к пониманию механизмов образования и трансформации гумусовых веществ (обзор литературных и собственных экспериментальных данных) / А. Ю. Кудярова // *Почвоведение*. – 2007. – № 9. – С. 1048–1063.
31. Stevenson, F. J. Infrared spectra of humic acid and related substances / F. J. Stevenson, K. M. Gosh // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1971. – Vol. 35, N 5. – P. 471–483.
32. Piccolo, A. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances / A. Piccolo, F. J. Stevenson // *Geoderma*. – 1982. – Vol. 27, N 3. – P. 195–208.
33. Supramolecular structure of humic acids by TEM with improved sample preparation and staining / M. Baalousha [et al.] // *Microscopy Research and Technique*. – 2005. – Vol. 66, N 6. – P. 299–306.

References

1. Skril'nik E. V., Perebikovs'ka O. S., Moskalenko V. P. Influence of systems of cultivation and fertilization on the humus state and nutrient content in chernozem typical. *Agrokhimiya i gruntoznavstvo: mizhvidomchii tematichnii naukovii zbirnik = AgroChemistry and Soil Science: a collected papers*. Kharkiv, 2008, Iss. 68, pp. 90–94 (in Ukrainian).
2. Kravchenko Y., Rogovska N., Petrenko L., Zhang X., Song C., Chen Y. Quality and dynamics of soil organic matter in a typical chernozem of Ukraine under different long-term tillage systems. *Canadian Journal of Soil Science*, 2012, vol. 92, no. 3, pp. 429–438. DOI: 10.4141/cjss2010-053
3. Orlov D. S. *Soil humus acids and general theory of humification*. Moscow, Moscow State University Publ., 1990. 325 p. (in Russian).
4. Wershaw R. L. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Science*, 1999, vol. 164, no. 11, pp. 803–813. DOI: 10.1097/00010694-199911000-00004
5. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 2001, vol. 166, no. 11, pp. 810–832. DOI: 10.1097/00010694-200111000-00007
6. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and application in soil science. *Advances in Agronomy*, 2002, vol. 75, pp. 57–134. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7
7. Yonebayashi K., Hattori T. Surface active properties of soil humic acids. *Science of the Total Environment*, 1987, vol. 62, pp. 55–64. DOI: 10.1016/0048-9697(87)90481-5
8. Milanovskii E. Yu. Amphiphilous Components of Soil Humic Substances. *Eurasian Soil Science*, 2000, vol. 33, no. 6, pp. 617–625.
9. Nebbioso A., Piccolo A. Advances in Humeomic: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*, 2012, vol. 720, pp. 77–90. DOI: 10.1016/j.aca.2012.01.027
10. Nuzzo A., Sánchez A., Fontaine B., Piccolo A. Conformational changes of dissolved humic and fulvic superstructures with progressive iron complexation. *Journal of Geochemical Exploration*, 2013, vol. 129, pp. 1–5. DOI: 10.1016/j.gexplo.2013.01.010
11. Ovchinnikova M. F. Attributes and mechanism of the agrogenic transformation of humic substances in soddy-podzolic soil. *Agrokhimiya [Agrochemistry]*, 2012, no. 1, pp. 3–13 (in Russian).
12. Tsapko Yu. L. Discussion problems of humus nature. *Gruntoznavstvo [Soil Science]*, 2015, vol. 16, no. 3–4, pp. 83–89 (in Ukrainian).
13. Ionenko V. I., Golovachev E. A., Sukacheva O. I., Kotlyarenko I. P., Beskrovnyi A. M. Phenomenology of functional structural models of natural humus and synthesized humic-like substances. *Sibirskii vestnik sel'skhozyaistvennoi nauki [Siberian Herald of Agricultural Science]*, 1988, no. 5, pp. 91–104 (in Russian).
14. Aquino A. J. A., Tunega D., Pašalić H., Schaumann G. E., Haberhauer G., Gerzabek M. H., Lischka H. Molecular dynamics simulations of water molecule-bridges in polar domains of humic acids. *Environmental Science and Technology*, 2011, vol. 45, no. 19, pp. 8411–8419. DOI: 10.1021/es201831g
15. Cihlář Z., Vojtová L., Conte P., Nasir S., Kučerik J. Hydration and water holding properties of cross-linked lignite humic acids. *Geoderma*, 2014, vol. 230–231, pp. 151–160. DOI: 10.1016/j.geoderma.2014.04.018
16. Medvedev V. V. *Soil cultivation in European countries*. Kharkiv, EDENA Publ., 2010. 200 p. (in Ukrainian).
17. Shevchenko M. V. Efficiency of the minimum tillage technologies in growing grain crops in the left-bank forest-steppe. *Kormi i kormovirobnitstvo [Feed and Feed Production]*, 2014, iss. 79, pp. 56–61 (in Ukrainian).
18. Soil quality. Sample selection: SSU 4287:2007 [Introduction of 2004–30–04]. Kiev, Gospotrebstandart Ukrainy, 2005. 9 p. (in Ukrainian).
19. *Quality of soil. Methods of determination of organic matter*: SSU 4289:2004 [Introduction of 2005–07–01]. Kiev, Gospotrebstandart Ukrainy, 2005. 14 p. (Natsional'nyi standart Ukrainy) (in Ukrainian).
20. *Quality of soil. Determination of total nitrogen in the modification of the NSC IPA named after A. N. Sokolovsky*: SSU 4726:2004 [Introduction of 2005–07–01]. Kiev, Gospotrebstandart Ukrainy, 2005. 14 p. (Natsional'nyi standart Ukrainy) (in Ukrainian).
21. *Quality of soil. Methods for the determination of available (labile) organic matter*: SSU 4732:2007 [Introduction of 2008–01–01]. Kiev, Gospotrebstandart Ukrainy, 2008. 12 p. (Natsional'nyi standart Ukrainy) (in Ukrainian).
22. *Quality of soil. Determination of the group composition of humus by the method of Tyurin in the modification of Kononova and Belchikov*: SSU 7855:2015 [Introduction of 2016–07–01]. Kiev, Gospotrebstandart Ukrainy, 2016. 9 p. (Natsional'nyi standart Ukrainy) (in Ukrainian).
23. *Quality of soil. Methods for determination of total phosphorus and gross potassium in the modification of the NNC IPA named after A. N. Sokolovsky*: SSU 4290:2004 [Introduction of 2005–07–01]. Kiev, Gospotrebstandart Ukrainy, 2005. 14 p. (Natsional'nyi standart Ukrainy) (in Ukrainian).
24. Orlov D. S., Grishina L. O. *Practical course on the chemistry of humus*. Moscow, Moscow State University Publ., 1981. 272 p. (in Russian).
25. Nikolov O. T., Zhilyakova T. A. Measurement of the complex dielectric permittivity of liquid dielectrics with large losses. *Zhurnal fizicheskoi khimii = Russian Journal of Physical Chemistry A*, 1991, vol. 65, no. 5, pp. 1417–1420 (in Russian).
26. Osterman L. A. *Chromatography of proteins and nucleic acids*. Moscow, Nauka Publ., 1985. 536 p. (in Russian).
27. Popirny M. A., Nikolov O. T., Skril'nik E. V. Effect of soil treatment intensity on the composition, physical and chemical properties of the second fraction of humic acids extracted from typical chernozem. *Biofizichnii visnik = Biophysical Bulletin*, 2016, vol. 1, no. 35, pp. 34–45 (in Ukrainian).

28. Bakhshiev N. G. *Introduction to molecular spectroscopy*. 2nd ed. Leningrad, Leningrad State University Publ., 1987. 216 p. (in Russian).
29. Gorbatsevich S. K. *Spectroscopy of intermolecular interactions. Nonlinear effects*. Minsk, Belarusian State University Publ., 2002. 149 p. (in Russian).
30. Kudayarova A. Yu. Application of basic chemical concepts to understanding the formation and transformation mechanisms of humic substances: A review of publications and own experimental data. *Eurasian Soil Science*, 2007, vol. 40, no. 9, pp. 934–948. DOI: 10.1134/s1064229307090037
31. Stevenson F. J., Gosh K. M. Infrared spectra of humic acid and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1971, vol. 35, no. 5, pp. 471–483. DOI: 10.1016/0016-7037(71)90044-5
32. Piccolo A., Stevenson F. J. Infrared spectra of Cu²⁺, Pb²⁺ and Ca²⁺ complexes of coil humic substances. *Geoderma*, 1982, no. 27, vol. 27, no 3, pp. 195–208. DOI: 10.1016/0016-7061(82)90030-1
33. Baalousha M., Motelica-Heino M., Galaup S., Le Coustumer P. Supramolecular structure of humic acids by TEM with improved sample preparation and staining. *Microscopy Research and Technique*, 2005, vol. 66, no. 6, pp. 299–306. DOI: 10.1002/jemt.20173

Информация об авторах

Скрыльник Евгений Владимирович – д-р с.-х. наук, заведующий лабораторией. Институт почвоведения и агрохимии имени А. Н. Соколовского (ул. Чайковская, 4, 61024, г. Харьков, Украина). E-mail: orgminlab@gmail.com.

Шевченко Николай Викторович – д-р с.-х. наук, заведующий кафедрой. Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева (62483, Харьковская обл., Харьковский р-н, п/о «Докучаевское 2»). E-mail: nniagbio@email.

Попирный Максим Анатольевич – мл. науч. сотрудник. Институт почвоведения и агрохимии имени А. Н. Соколовского (ул. Чайковская, 4, 61024, г. Харьков, Украина). E-mail: max.popirny@gmail.com.

Николов Олег Тимофеевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник. Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина (пл. Свободы, 4, 61022, г. Харьков, Украина).

Information about the authors

Eugene V. Skrylnyk – D. Sc. (Agricult.), Head of the Laboratory. O. N. Sokolovsky Institute for Soil Science and Agrochemistry Research (4, Chaikovskaya Str., 61024, Kharkiv, Ukraine). E-mail: orgminlab@gmail.com.

Nikolay V. Shevchenko – D. Sc. (Agricult.), Head of the Department. Kharkiv National Agrarian University named after V. V. Dokuchayev (62483, Kharkiv reg., Kharkiv dis., p/d “Dokuchayev 2”). E-mail: nniagbio@email.

Maxim A. Popirny – Researcher. O. N. Sokolovsky Institute for Soil Science and Agrochemistry Research (4, Chaikovskaya Str., 61024, Kharkiv, Ukraine). E-mail: max.popirny@gmail.com.

Oleg T. Nikolov – Ph. D. (Phys. and Math.), Leading researcher. V. N. Karazin Kharkiv National University (4, Svobody Sq., 61022, Kharkiv, Ukraine).