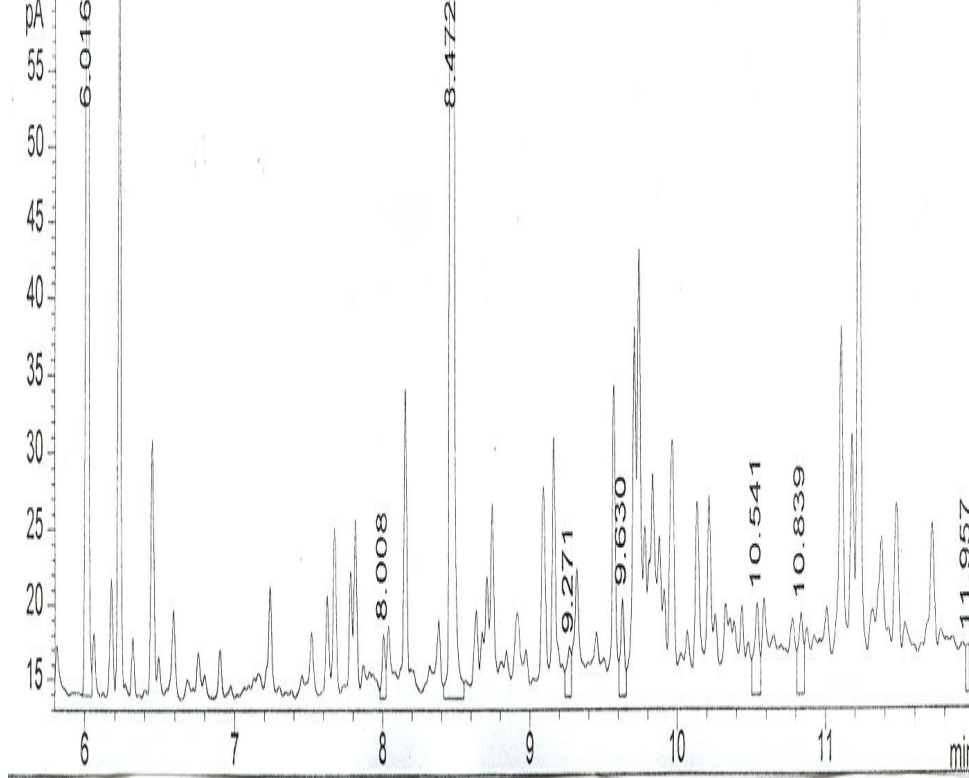


БИОХИМИЯ ЛИГНИНА В ПОЧВАХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ПЕРЕУВЛАЖНЕНИЯ



Ковалев И.В., Ковалева Н.О.

МГУ им. М.В.Ломоносова, ф-т почвоведения
ИЭП МГУ им. М.В.Ломоносова

- **Располагая знаниями о суммарном содержании и реже о структуре лигнина, либо в автоморфных, либо в болотных почвах, мы ничего не знаем о механизмах биохимических процессов его трансформации, протекающих в значительной части почв – в почвах периодического переувлажнения. Между тем временный или длительный сезонный застой влаги создает анаэробные условия в профилях почв с господством окислительных процессов и контрастным типом окислительно-восстановительного режима и на короткие сроки активизирует восстановительные процессы. Контрастность гидрологического режима должна отражаться и на свойствах органического вещества этих почв.**

Объект исследования: Коломенское ополье
(Московская обл.)



Брянское ополье

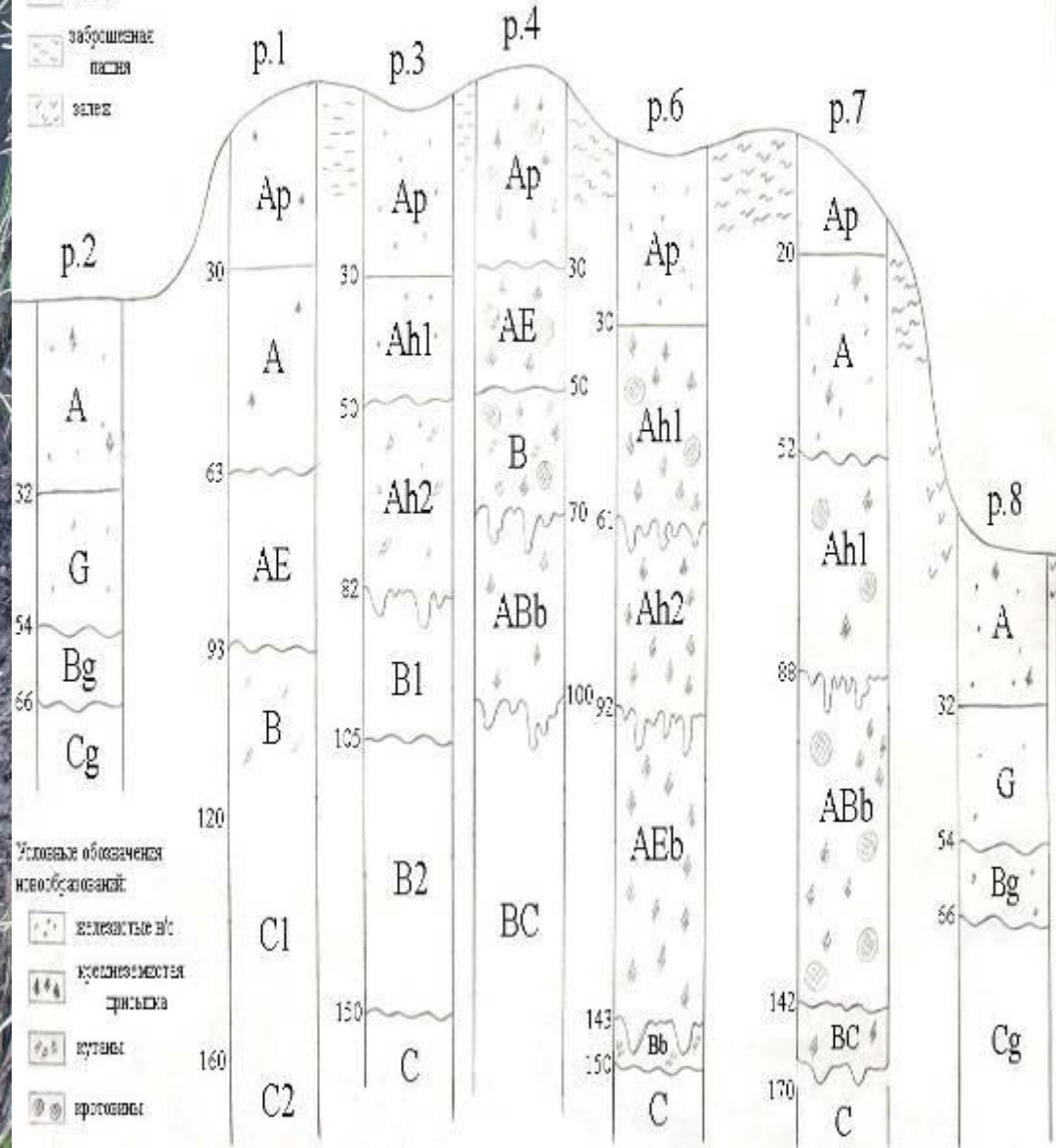


Брянское ополье



Характер использования территории:

- степь
- забрусшенная степь
- лес



Условные обозначения иллюстраций:

- железистые конкреции
- железистые конкреции
- железистые конкреции
- железистые конкреции

серия тисоватых по т.в.н. Профильный р.д. А_{p,fs,g'} (0-25 см) - В_{p,fs,g'} (25-32 см) - В1_{g''} (32-50 см) - В2_{g''} (50-95 см) - В3_{g'''} (95-125 см) - ВС_{g'''} (125-140 см).

Профиль этих почв имеет мраморовидную окраску иллювиальных горизонтов (особенно гор В2_{g''}), большое количество ортштейнов в гор. Ар и ЕВ и серо-голубые кутаны.



Методы исследования

- Для определения количественного содержания структурных фрагментов лигнина использовали метод мягкого щелочного гидролиза органического вещества почв оксидом меди в азотной среде с последующим использованием хроматографии тонкого слоя и газового хроматографического разделения (На газовом хроматографе с масс-спектрометром Hewlett-Packard Palo Alto CA USA фенолы разделялись на пламенно- ионизационном детекторе, оборудованном капиллярной колонкой. В качестве основного и маркирующего газа служил азот. Температура инжектора – +2500, детектора – +3000). Индивидуальные продукты реакции: ванилин, сиреневый альдегид, ванилиновая, сиреневая, п-кумаровая и феруловая кислоты - идентифицированы путем сравнения времени удерживания и пиков с известными компонентами и количествами, используемыми в качестве внешних стандартов
- (Методика Ertel J.R., Hedges J.I, 1984 в приведенной ниже модификации W.Amelung, 1997).

Схема метода

Почва

Окисление оксидом меди (CuO) в щелочной среде под давлением при 170°C в атмосфере N_2

Осаждение гуминовых кислот ($\text{pH}=2$, 2 н. NaOH), центрифугирование, промывание осадка подкисленной водой

Концентрирование продуктов окисления лигнина из раствора на хроматографических колонках C_{18} под давлением

Элюирование фенолов путем промывания колонок этилацетатом

Эвапорирование этилацетата из проб на ротаторном эвапораторе

Лигнин

Подготовка проб к хроматографированию (derivatизация)

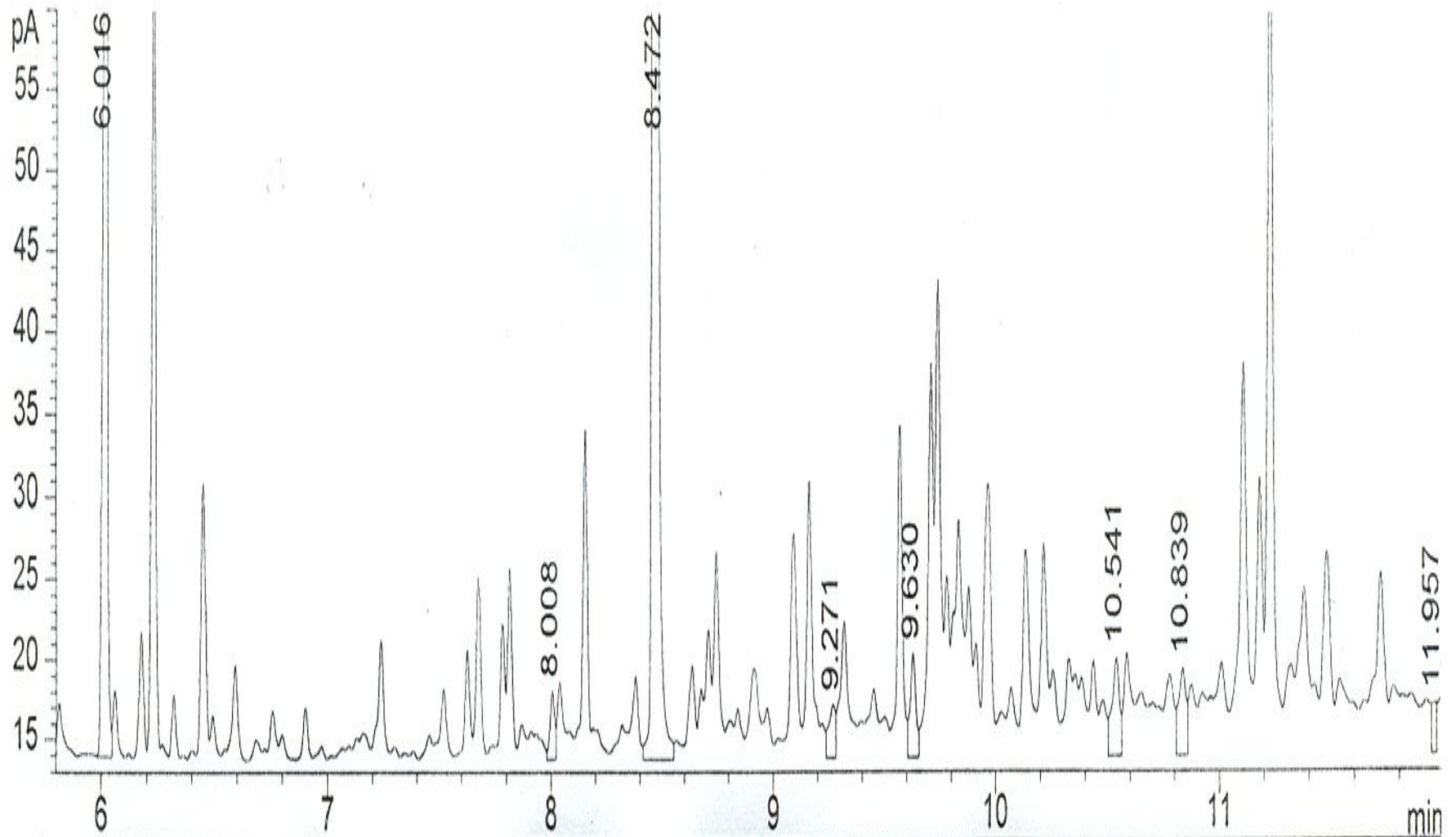
Разделение фенольных продуктов на газо-жидкостном хроматографе

Ванилин, ванилиновая кислота, сиреневый альдегид, сиреневая кислота, феруловая кислота, *p*-кумаровая кислота

Интеграция пиков

7. Ортштейны

FID1 A, (IVAN1603\18.D)



Щелочное окисление дает **11 фенолов**,

которые сгруппированы по их химической природе

в 4 структурных семейства:

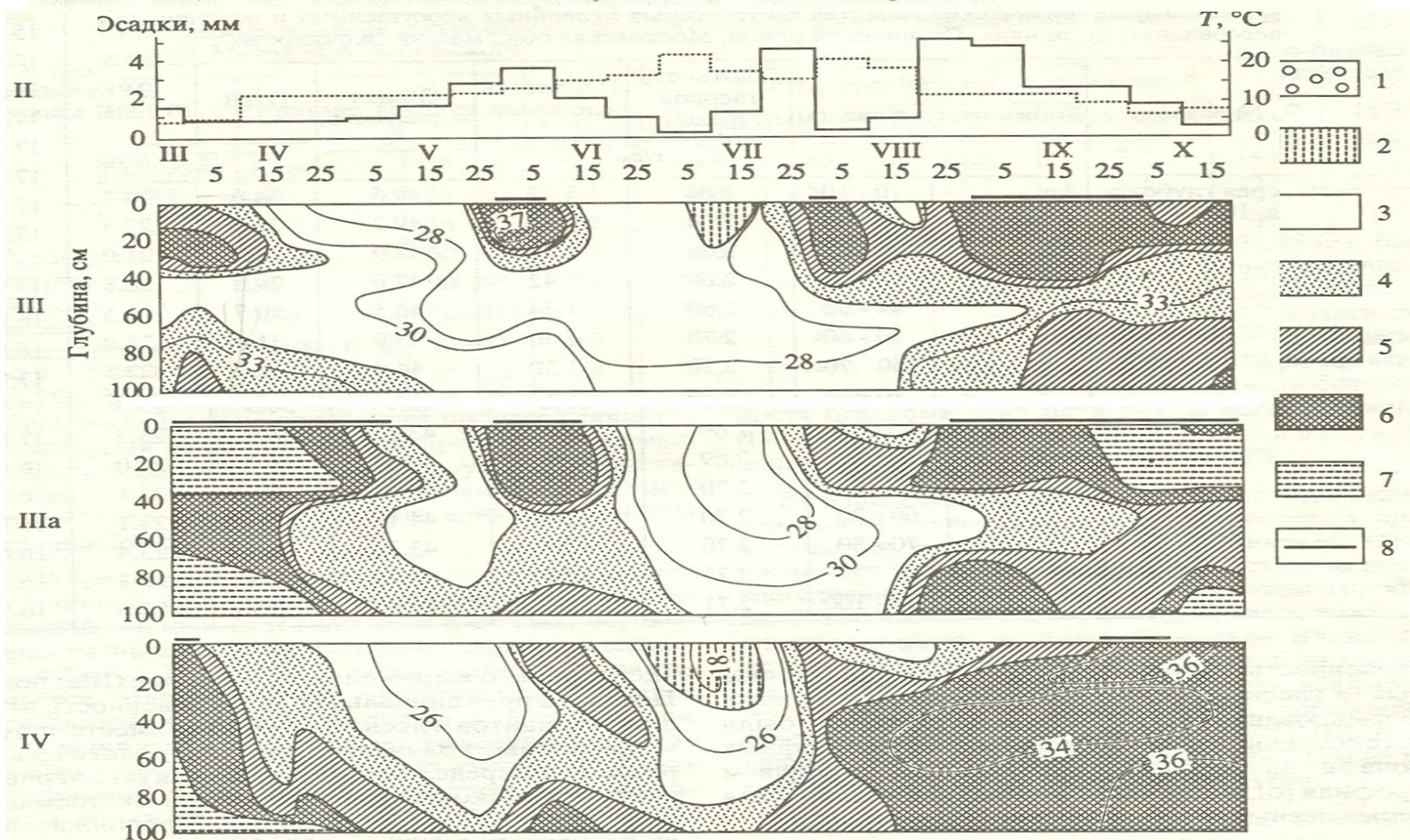
- **ванилиновые (V)**
- **сирингиловые или сиреневые (S)**
- **п-кумаровые (C)**
- **феруловые (F)**

V, S, C ----альдегиды, кетоны, кислоты;

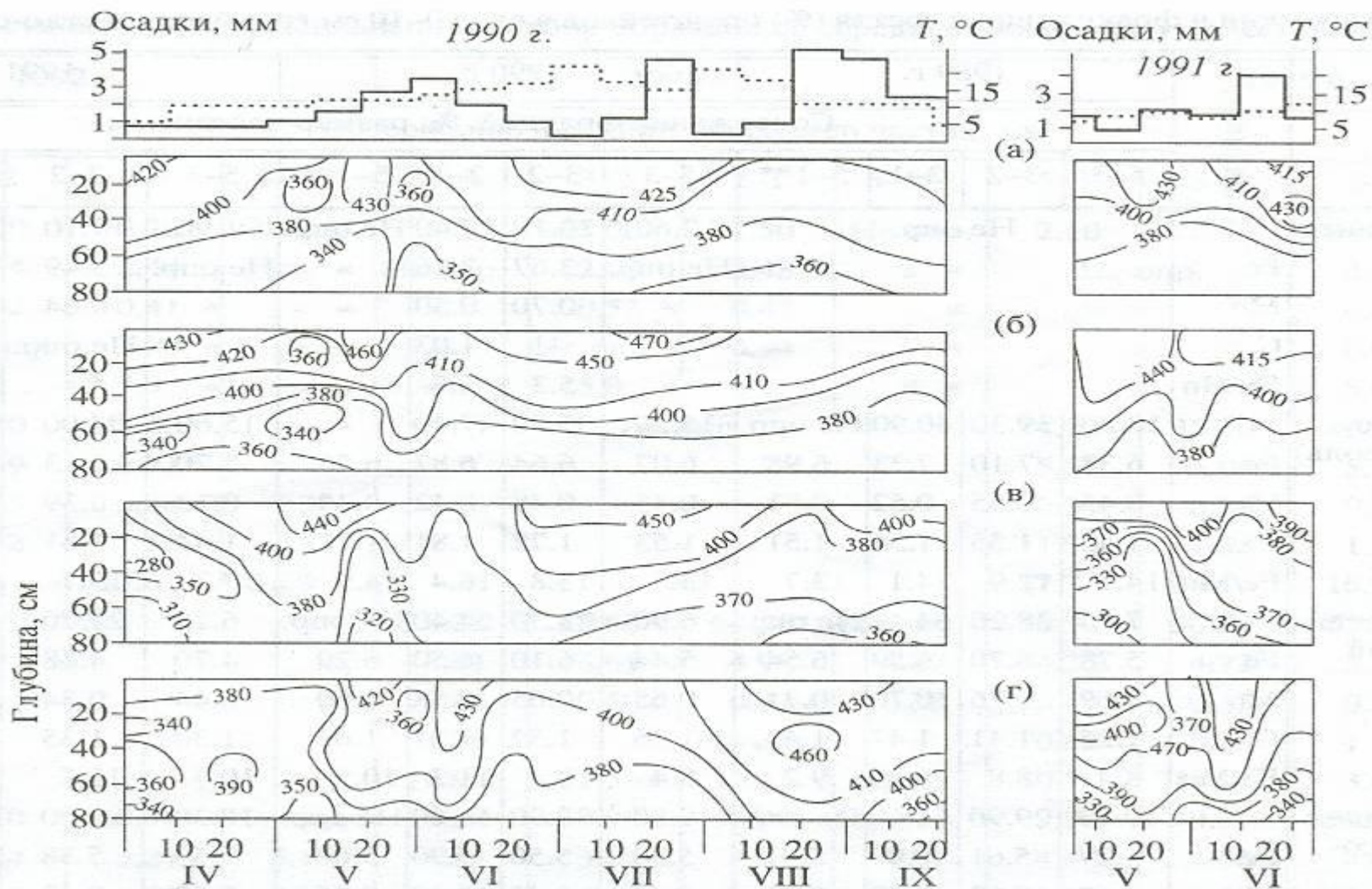
F---кислоты

Σ продуктов окисления лигнина (VSC)-----
общее содержание лигнина в образце

Рис. 1. Элементы водного режима светло-серых оглеенных неосушенных и осушенных почв (влажность в объемных процентах и категориях) в 1990-ом влажном году. Массив "Кочкарево". Почвы: I – светло-серая глееватая (типичная), осушенная гончарным дренажом; II – светло-серая глееватая (типичная), осушенная пластмассовым дренажом; III – светло-серая глееватая (типичная) недренированная; IIIa – светло-серая глееватая (экстремально выраженная) недренированная; IV – светло-серая глубокооглеенная недренированная. Категории влажности: 1 – менее влаги завядания (ВЗ); 2 – от ВЗ до влажности разрыва капиллярной связи (ВРК); 3 – от ВРК до 0.95 ППВ (предельной полевой влагоемкости); 4 – 0.95 ППВ - ППВ; 5 – ППВ - 1.05 ППВ; 6 – 1.05 ППВ - до полной влагоемкости – ПВ; 7 – ПВ - полная влагоемкость, верховодка; 8 – ≥ 0.75 ПВ гор. А пах.



Окислительно-восстановительный режим серых оглеенных почв



Окислительно-восстановительный режим (ОВП, мВ) светло-серых оглеенных осушенных и неосушенных почв. Почвы: светло-серые лесные: а – глиеватая, осушенная гончарным дренажом; б – глиеватая, осушенная пластмассовым дренажом; в – глиеватая, недренированная (контроль); г – глубокооглеенная ("автоморфная").

Брянское ополье

Почва	Горизонт, глубина, см	VSC, мг/г C _{общ.}
серая на микроповышении	Ap 0–30	5,80
	Eв 30–55	1,85
серая (со вторым гумусовым горизонтом) в микрозападине	Ap 0–33	9,09
	A 33–63	0,72
серая (глеевая) в ложбине	A 0–32	12,49
	Eв g'''' 32–54	4,99

*----- VSC – суммарное количество продуктов окисления

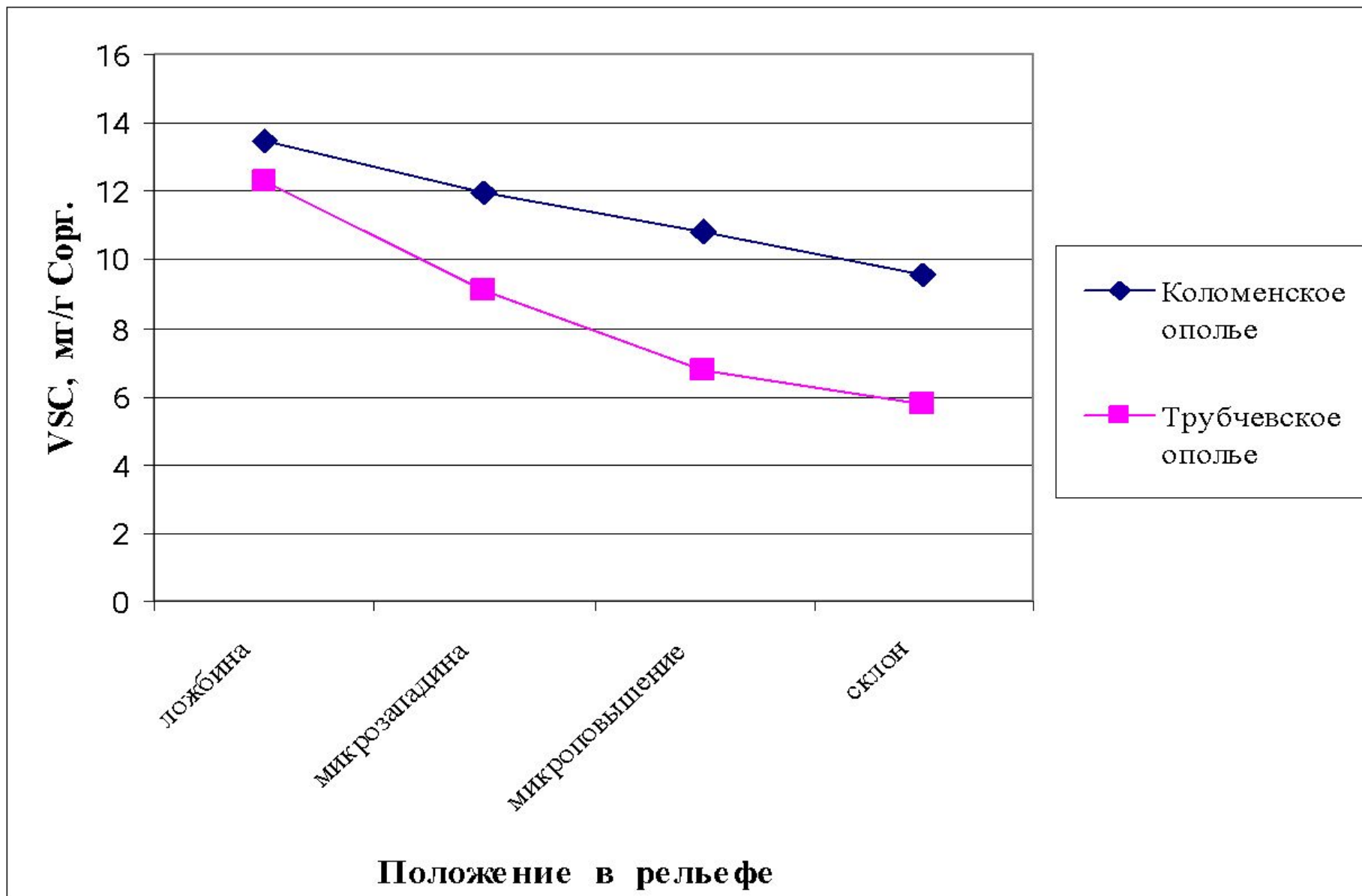
лигнина

Тульские Засеки

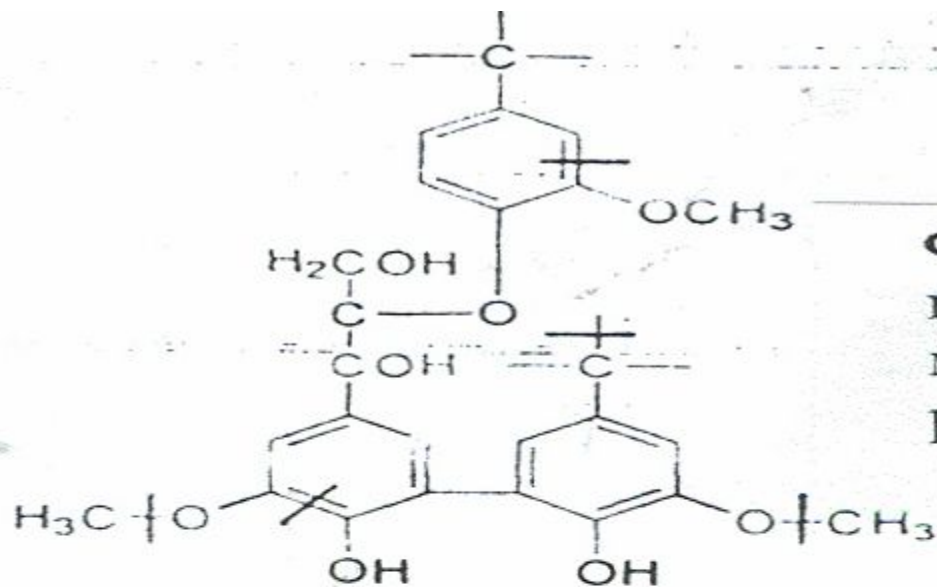
Почва	Горизонт, глубина, см	VSC, мг/г C _{общ.}
Темно-серая лесная	A 0–10	<u>14,60</u>
	Bt1 50–60	2,30
Серая лесная	A 0–10	11,90
	Bt2 50–60	2,60
Светло-серая лесная	A 0–10	12,20
	Bt2 50–60	1,20

*---- VSC – суммарное количество продуктов окисления
лигнина

Содержание продуктов окисления лигнина (VSC), мг г-1 Сорг. в почвах изучаемых катен.

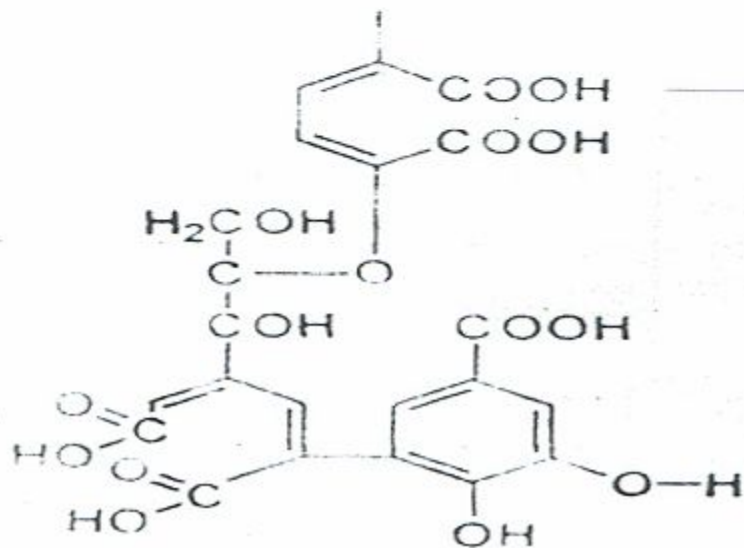


Деструкция лигнина, Haider, 1998



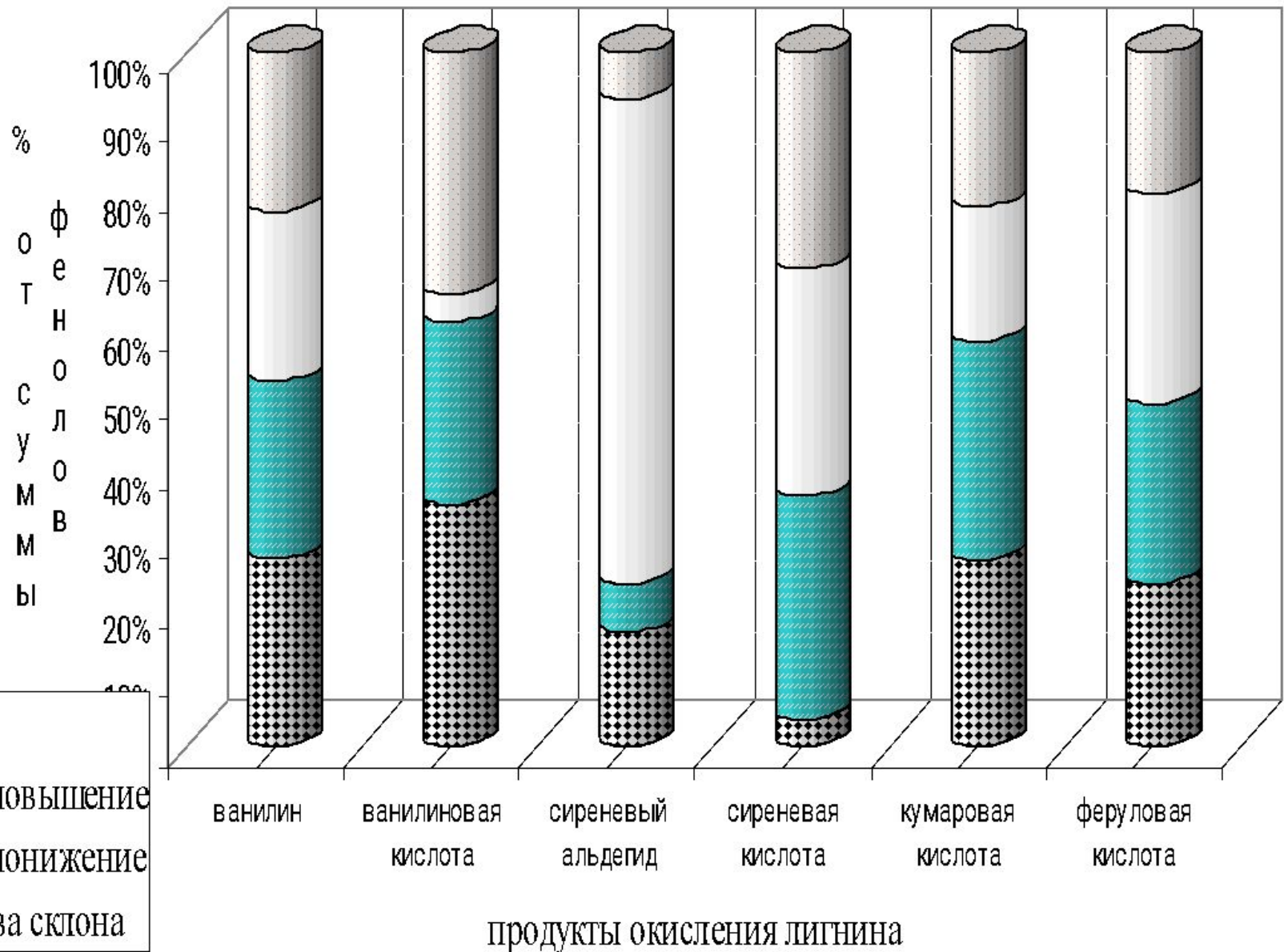
Фрагмент лигнина
и возможная реакция
микробного
расщепления

Ligninase / \downarrow H_2O_2



Частично
разрушенный
лигнин

Продукты окисления лигнина в серых почвах



«Лигниновые параметры» некоторых видов растений (Ковалева, Ковалев, 2006)

Экосистема	Лигнин, мг г ⁻¹ С _{общ}	V	S	C	V:S:C	S:V	C:F	C:V
Лес								
Еловый	9.42	4.87	2.19	2.36	2:1:1	0.45	0.86	0.49
Сосновый	13.70	6.77	3.73	3.19	2:1:1	0.55	1.13	0.47
Кедровый	3.08	1.47	0	1.11	1:0:1	0.02	0.83	0.70
Лиственничный	9.71	3.75	2.15	3.22	2:1:1	0.73	0.66	0.86
Тропический	7.79	3.94	3.78	0.22	1:1:0	0.96	0.44	0.06
Роца								
Осиновая	1.58	0.74	0.37	0.46	2:1:1	0.50	2.08	0.62
Березовая	12.49	7.54	3.77	1.78	4:2:1	0.53	0.83	0.23
Культурные злаки (пашня)	10.85	4.59	4.36	1.90	2:2:1	0.95	0.96	0.20
Можжевельное редколесье	62.56	32.67	18.83	11.06	3:2:1	0.58	0.68	0.32
под кроной на поляне	12.86	5.70	5.72	1.64	4:4:1	1.00	0.70	0.29

Примечание. VSC – суммарное количество продуктов окисления лигнина;
V – ванилиновые фенолы; S – сирингиловые фенолы; C – коричные фенолы

«Лигниновые параметры»
(КОЛОМЕНСКОЕ ОПОЛЬЕ)

Светло-серая почва	Лигнин, (VSC) мг/г С	V	S	C	V:S:C	S:V
глубоко оглеен ная	10,9	42	40	18	2:2:1	0,95
глееватая	11,9	41	41	18	2:1:1	1,02

Примечание. **V** – ванилиновые фенолы;
S – сирингиловые фенолы;
C – коричные фенолы

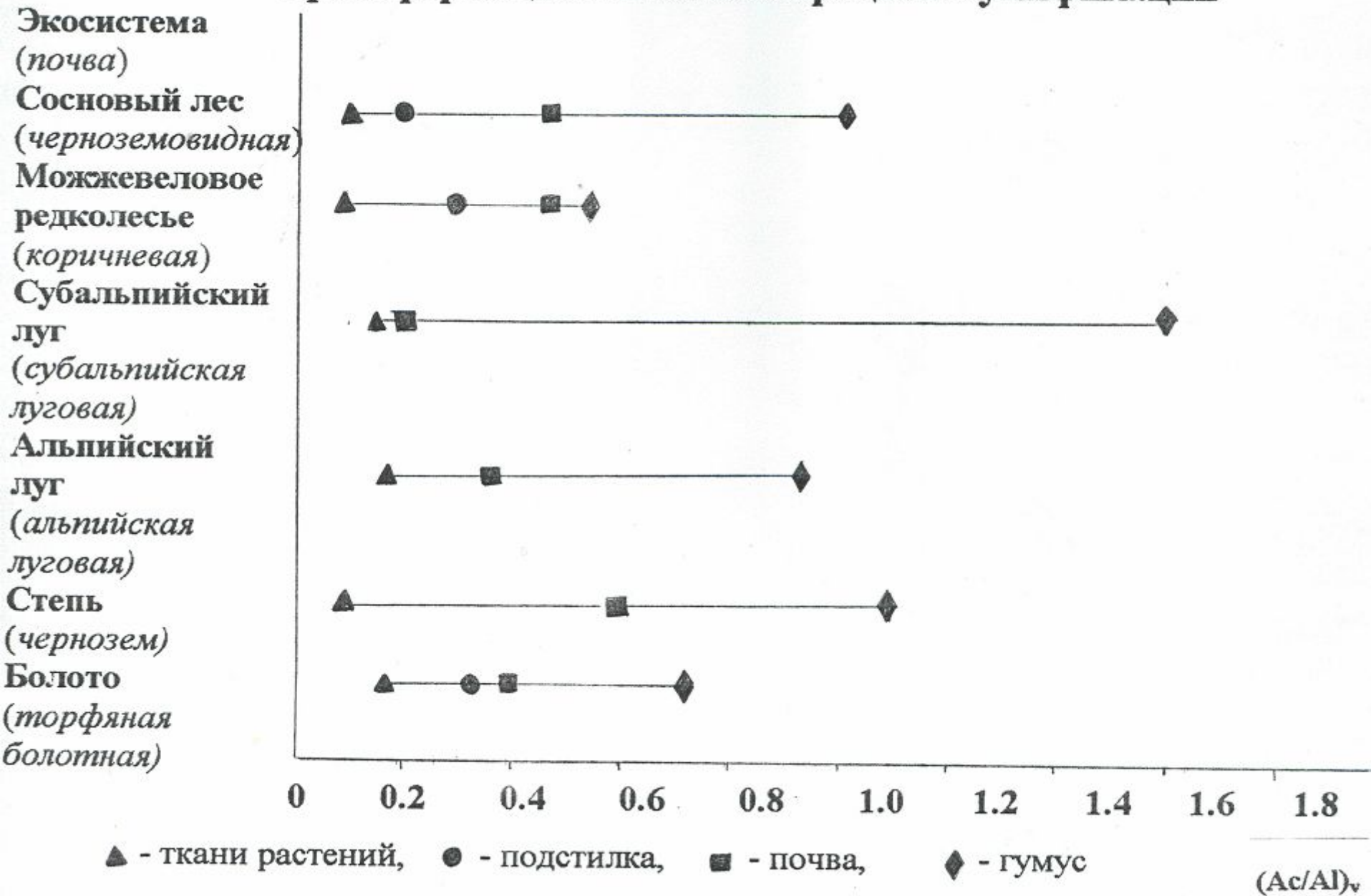
Тульские Засеки

Почва	Горизонт, глубина, см	VSC, мг/г C _{орг.}	C/N	T, %
Темно-серая лесная	A 0–10	14,60	<u>0,80</u>	10,22
	Bt1 50–60	2,30	0,55	9,20
Серая лесная	A 0–10	11,90	<u>0,73</u>	10,72
	Bt2 50–60	2,60	0,33	2,95

Брянское ополье

Почва	Горизонт, глубина , см	VSC, мг/г C _{орг.}	S/V	C/V	C/F
Серая лесная глеевая	A 0–32	12,49	1,50	0,94	0,83
	EBg''' 32–54	4,99	2,46	1,49	1,68
Темно-серая лесная	Ap 0–20	6,77	2,13	1,41	0,88
	A 30–50	0,79	0,65	0,00	0,00
Серая лесная	Ap 0–30	5,80	2,84	1,16	0,79
	EB 30–55	1,85	3,09	5,43	2,39

Трансформация лигнина в процессе гумификации



Показатели трансформации лигнина в серых лесных почвах,

(Брянское ополье)

Почва	Горизонт, глубина, см	мг/г Собщ.,		
		VSC, мг/г C _{общ.}	Ванилиновые <u>кислоты</u> / ванилин	Сиреневые <u>кислоты</u> / сиреневые альдегиды
серая на микрופовы шении	Ap 0–30	5,8	0,28	0,37
серая (глеевая) в ложбине	A 0–32	12,5	0,56	0,05

* VSC

Показатели трансформации лигнина в серых лесных окультуренных почвах, мг/г Собщ.

Почва	Брянское ополье		T, %
	Горизонт, глубина, см	VSC, мг/г C _{общ.}	
серая на микроповышении	Ap 0–30	5,80	9,2
	Eв 30–55	1,85	33,4
серая (со вторым гумусовым горизонтом) в микрозападине	Ap 0–33	9,09	11,2
	A 33–63	0,72	50,1
серая (глеевая) в ложбине	A 0–32	12,49	22,1
	Eвg'''32–54	4,99	41,3

* VSC – суммарное количество продуктов окисления

Показатели трансформации лигнина, мг/г С_{общ} гор. Ар серых оглеенных почв, (Коломенское ополье)

Почва	VSC, мг/г С _{общ} .	Ванилино вые к-ты / ванилин (Ac/Al) _v	Сире- невые к-ты / сире- невые альдегиды (Ac/Al) _s	% измененности боковых цепочек по отношению лигнина к исходным растительным тканям (Т,%)	$\frac{VSC}{N}$
Глубоко оглеенная, n = 4	10,8 ± 0,7	0,23 ± 0,03	0,44 ± 0,07	7,9	86
Глееватая n = 5	11,9 ± 1,2	0,16 ± 0,01	0,32 ± 0,03	5,8	65

*----- VSC – суммарное количество продуктов окисления лигнина

**----- $T = 74 - (100 - K)(1 + (Ac/Al)_v)^{-1}$, (Hedges J.I, Ertel J.R., 1984)

где Т – % измененности боковых цепочек, (Ac/Al)_v – отношение количества фенольных кислот к альдегидам в ванилиновых единицах, К – содержание кетонов в исходных растительных тканях (%ketone).

Почва	Горизонт, глубина, см	VSC, мг/г $C_{общ.}$	Ванилино- вые к-ты / ванилин (Ac/Al) _v	Сиреневые к-ты / сиреневые альдегиды (Ac/Al) _s	% измененности боковых цепочек по отношению лигнина к исходным растительным тканям (Т,%)
Глееватая n = 5	Ap fs,g' 10–20	11,9 ± 1,2	0,16 ± 0,01	0,32 ± 0,03	5,8
Глееватая осушенная, n = 6	Ap fs,g' 10–20	9,6 ± 0,5	0,18 ± 0,01	0,41 ± 0,01	6,5

<p>Почва (серая лесная)</p>	<p>Масса конкреций, г/100 г почвы</p>
<p>Глубоко оглеенная «автоморфная»</p>	 <p>0,3</p>
<p>Глееватая (контроль)</p>	 <p>2,2</p>



VSC, мг г⁻¹ С

1-2_{мм}

2-3_{мм}

3-5_{мм}



**Глубоко
оглеенная
«автоморфная»**

1,3

1,2

-***

Глееватая

1,3

1,4

1,1

**** ----- конкреции фракции >3 мм в почве единичны**

“Лигниновые” параметры

Глее ватая почва	Фракция, мм	$VSC,$ $мг\ г^{-1}\ C_{общ}$	Ванили новые кислоты / ванилин (Ac/Al)v	Сиреневые кислоты / сиреневые альдегиды (Ac/Al)s	Измененность боковых цепочек лигнина по отношению к исходным растительны м тканям (T,%)
Мелкозем, n = 5 	гор. Ар	11,9	0,19	0,37	5,8
Орт- штейны, n = 5	1-2	<u>1,2</u>	<u>0,65</u>	<u>1,41</u>	<u>20,8</u>


Продукты окисления лигнина в ортштейнах серых почв, мг г⁻¹ С

Почва	n	Фракции, мм	VSC, мг/г С _{общ.}	Ванилиновая к-та	Сиреневая к-та	Кумаровая к-та	Феруловая к-та
Глубоко оглеенная	n = 4	1-2	<u>1,30</u>	0,13	0,20	0,15	0,08
Глееватая (контроль)	n = 5	1-2	<u>1,34</u>	0,17	0,28	0,20	0,12
	n = 4	2-3	1,08	0,18	0,29	0,21	0,11
	n = 4	3-5	0,81	0,19	0,30	0,21	0,06

Показатели трансформации лигнина в орштейнах серых лесных почв, мг/г C_{общ.}

Орштейны серых оглеен- ных почв 	Фрак- ция, мм	VSC, мг г ⁻¹ C _{общ} орштейнов	Ванили новые кислоты / ванилин (Ac/Al) _v	Сиреневые кислоты / сиреневые альдегиды (Ac/Al) _s	Измененность боковых цепочек лигнина по отношению к исходным растительным тканям (Т,%)
Глубоко оглеенная, n = 4	1-2	<u>1,30</u>	0,2	1,1	<u>8,1</u>
Глееватая, Σn = 12 	1-2	<u>1,34</u>	0,7	1,7	<u>19,2</u>
	2-3	1,31	0,6	1,0	22,7
	3-5	0,81	0,6	1,5	24,6

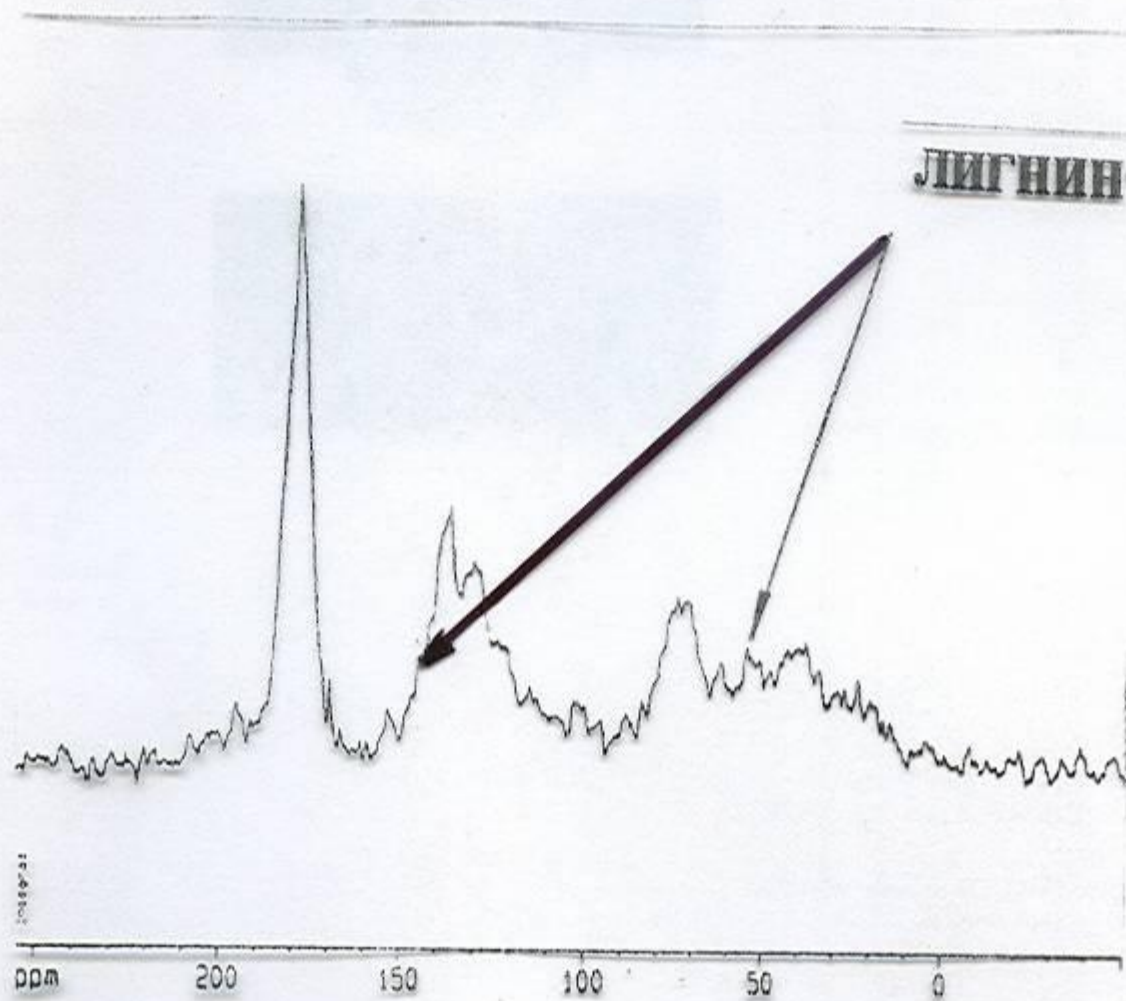
* ---- VSC – суммарное количество продуктов окисления лигнина

<p>Почва (серая лесная)</p> 	<p>Масса конкреций, г/100 г почвы</p>	<p><u>VSC, мг/г С</u> <i>K_{VSC}</i> *(лигнин)</p>		
<p>Глееватая (контроль)</p>	<p>2,2</p>	<p><u>1,3</u> <i>0,11</i></p>	<p><u>1,4</u> <i>0,12</i></p>	<p><u>1,1</u> <i>0,09</i></p>



* --- коэффициент концентрирования элемента или соединения в конкрециях;

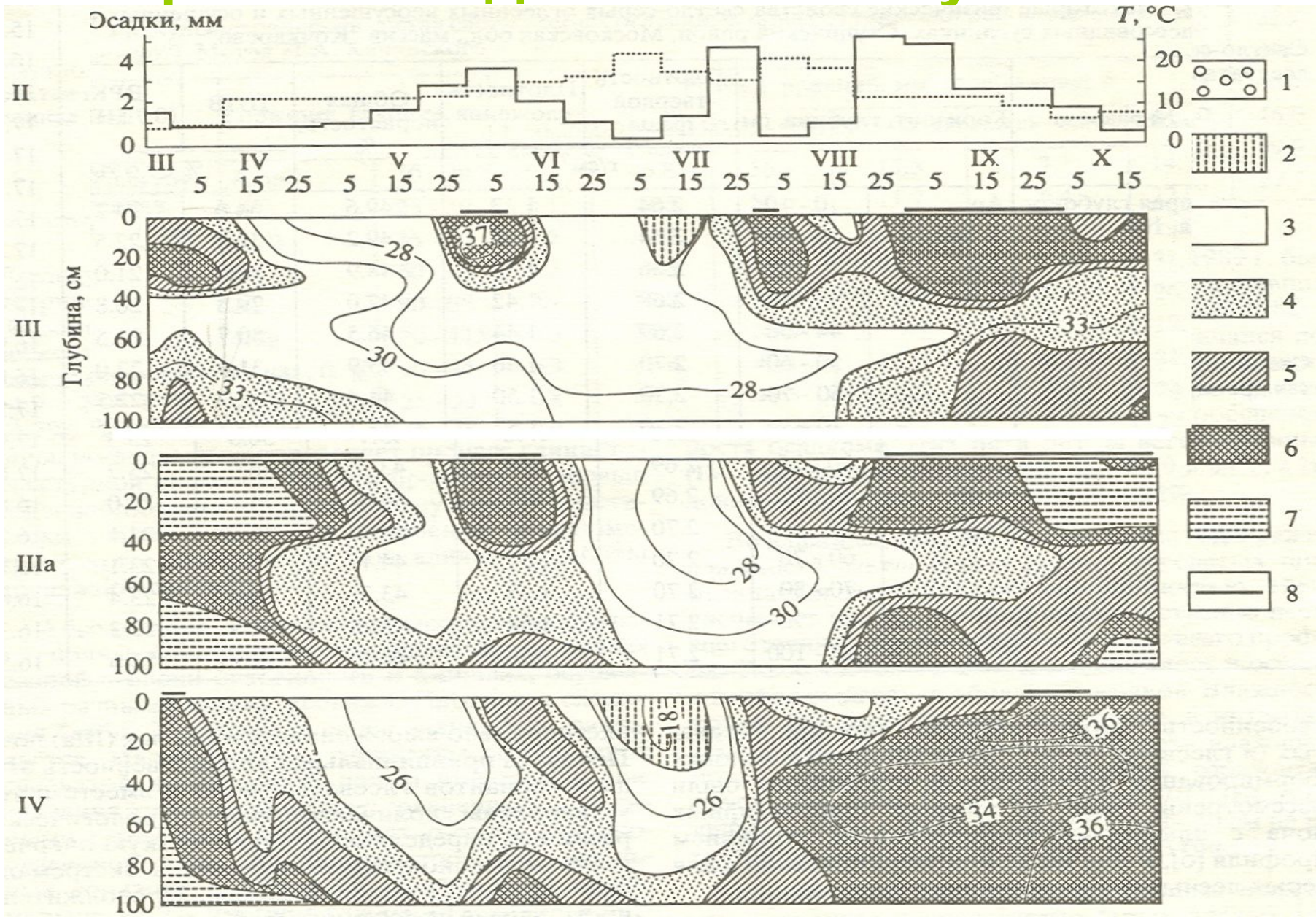
^{13}C ЯМР – спектр гумусовых кислот из железисто-марганцевых новообразований (светло-серая лесная почва)



Распределение углерода в молекулах гумусовых кислот серых лесных почв и конкреций (по данным ЯМР- спектроскопии), % от площади спектра

Препараты гуминовых кислот из:	Углерод алифатических структур, C _{Al}		Углерод ароматических структур, C _{Ar}	Углерод карбоксильных структур, C _{COOH}	Ароматичность, % $\frac{Ar}{Ar + Al}$	<u>Сгк</u> Сфк	Ar = Al — A k
	C _{Alk}	C _{Alk-O}					
	0-52 ppm	52-106 ppm	106-160 ppm	160-200 ppm			
Глееватая почва	21,1	42,8	17,7	18,4	<u>21,7</u>	1,0	0
Конкреции глееватой почвы	18,1	16,2	35,5	30,2	<u>50,9</u>	0,5	1

Трансформация гидрологического режима под влиянием осушения





Масса ортштейнов на 100 г почвы в гор.Ар, осушенных пластмассовым и гончарным дренажом и неосушенных серых глееватых почв

Почва	1989 г.	1990 г.	1991 г.	1992 г.	1994 г.	1995 г.	1996 г.	2000 г.
	Масса ортштейнов в г на 100 г абсолютно сухой почвы							
Глееватая (пластмассовый дренаж - середина междренья)	1.38	1.42	1.35	1.37	1.01	1.13 ± 0.052	1.11 ± 0.078	1.12 ± 0.067
Глееватая (гончарный дренаж - середина междренья)	1.17	1.20	1.18	1.16	0.80	0.82 ± 0.051	0.84 ± 0.034	0.90 ± 0.051
Глееватая неосушенная	2.30	2.19	2.26	2.14	2.20	2.16 ± 0.140	не опр.	не опр.
Глубокоогленная	не опр.				0.27	0.26 ± 0.015	0.26 ± 0.040	0.28

Примечание.

n = 5. При этом, каждый смешанный образец (весом около 2 кг)
производился из 15 точек опробования

**Динамика распределения С и N (%) в ортштейнах (слой 0-10 см) серых лесных
оглеенных почв.**

Почва	Элемент	1989-1992 ГГ. (n=6)			1996 Г. (n=6)			2007 Г. (n=6)		
		Ф Р А К Ц И Я, мм								
		1--2	2--3	3--5	1--2	2--3	3--5	1--2	2--3	3--5
		Среднее (\bar{X})								
Глееватая неосушенная (контроль)	С, %	1,75	1,73	1,60	1,68	1,66	1,55			
	N, %	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14			
	C/N	12,0	11,7	11,5	11,9	11,7	11,3			
Глееватая, осушенная гончарным дренажом	С, %	1,62*	1,50*	1,43*	1,44	1,18	1,11	1,28**	1,00**	0,94**
	N, %	0,15°	0,14°	0,14°	0,12	0,11	0,10	0,12**	0,11**	0,10**
	C/N	10,8	10,7	10,4	12,0	11,1	11,4	10,2	10,2	9,5
Глееватая, осушенная пластмассовым дренажом	С, %	1,65*	1,56*	1,51*	1,41	1,26	1,19	1,31**	1,17**	0,10**
	N, %	0,14°	0,14°	0,14°	0,11	0,11	0,10	0,12**	0,12**	0,11**
	C/N	11,5	11,2	10,7	12,4	11,6	11,6	10,5	10,0	9,4

n ----- повторность;

***** ----- статистически значимое уменьшение содержания углерода к контролю при $p < 0,95$;

° ----- статистически значимое уменьшение содержания азота к контролю при $p < 0,80$;

****** ----- статистически значимое уменьшение содержания углерода и азота по отношению к первым годам (1989-1992 гг.) последствий дренажа при $p < 0,95$

Почва (серая лесная)	$\frac{P_2O_5}{K_p^*}, \%$			$R_{подв}$ $K_p^*_{подв.}$ Мг/100 г			$R_{орг}$ $K_p^*_{орг}$ Мг/100 г		
	1-2	2-3	3-5	1-2	2-3	3-5	1-2	2-3	3-5
Глееватая (контроль)	$\frac{0,3}{1,5}$	$\frac{0,2}{1,2}$	$\frac{0,2}{1,5}$	$\Sigma = \underline{172,4}$ 5,2			$\Sigma = \underline{33}$ 0,7		
Глееватая, осушенная дренажом	$\frac{0,3}{1,6}$	$\frac{0,2}{1,5}$	$\frac{0,2}{1,4}$	$\Sigma = \underline{120}$ 3,1			$\Sigma = \underline{25}$ 0,8		

* --- коэффициент концентрирования элемента или соединения в конкрециях;

Квантильное распределение показателей трансформации лигнина
в орштейнах серых почв.

Глееватые почвы: а –осушенная в 1989-92 гг.; б –осушенная в 1999-2000 гг.

Фракции орштейнов: 1-2 мм; 2-3 мм; 3-5 мм

*-----Статистически значимое уменьшение ($p < 0,01$)

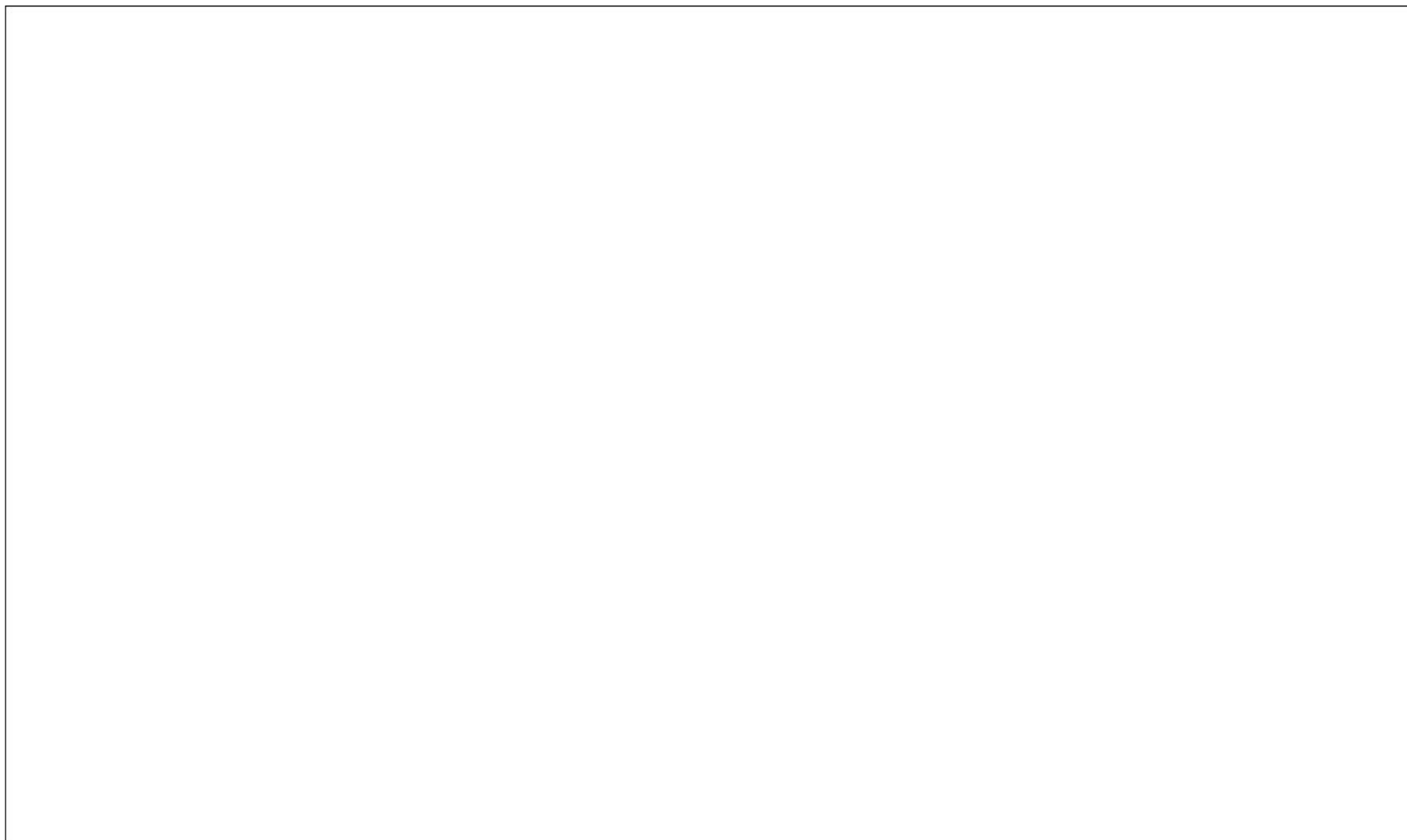
продуктов окисления лигнина (VSC, мг г⁻¹ С),

Почвы: а –осушенная в **1989-92** гг.; б –осушенная в **1999-2000** гг.

Фракции орштейнов: 1-2 мм; 2-3 мм; 3-5 мм

****-----Статистически значимое увеличение отношений ($p < 0,05$)**

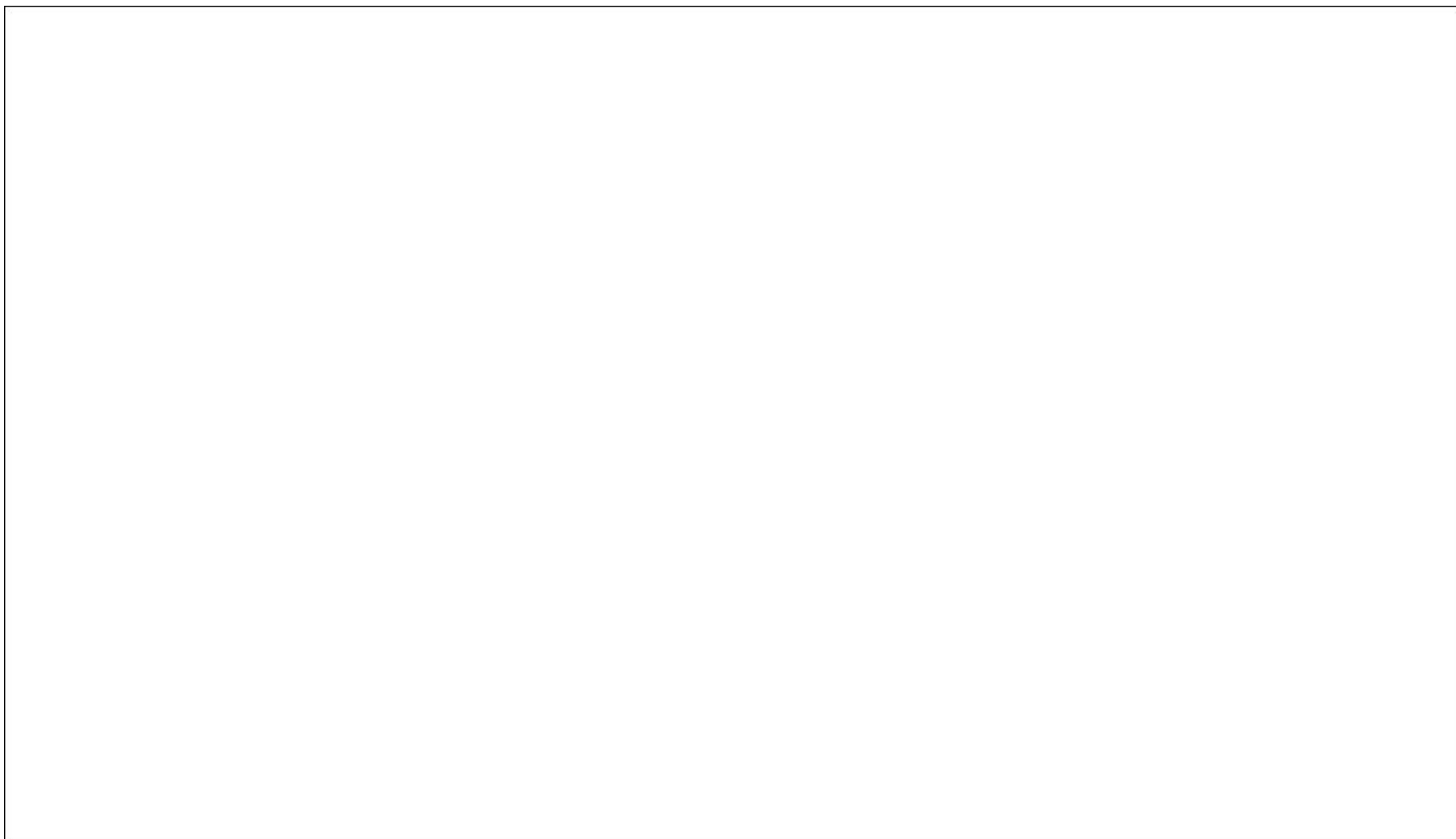
ванилиновые кислоты/ванилин, (ac/al)v



Почвы: а –осушенная в 1989-92 гг.; б –осушенная в 1999-2000 гг.
Фракции ортштейнов: 1-2 мм; 2-3 мм; 3-5 мм

Статистически значимое увеличение отношений (p < 0,05)

сиреневые кислоты/сиреневые альдегиды (ac/al)s



Показатели трансформации лигнина в орштейнах

Орштейны серых оглеенных почв	n (повтор ность)	Фрак ция, мм	<u>Лигнин</u> N	Измененность боковых цепочек лигнина по отношению к исходным растительным тканям (T,%)
Глееватая, осушенная пластмассовым и гончарным дренажом в 1989-1992 гг.	9	1-2	14	23
	8	2-3	12	20
	8	3-5	<u>11</u>	<u>12</u>
Глееватая, осушенная пластмассовым и гончарным дренажом в 1999-2000 гг..	10	1-2	13	24
	9	2-3	12	22
	9	3-5	<u>8</u>	<u>25</u>

Распределение углерода в молекулах гумусовых кислот конкреций серых лесных почв (по данным ЯМР- спектроскопии), % от площади спектра

Препараты гуминовых кислот из:	Углерод алифатических структур, C _{Al}		Углерод аромати ческих структур C _{Ar}	Углерод карбокси льных структур, C _{COOH}	Аромати чность , % $\frac{Ar}{Ar + Al}$	$\frac{Ar}{Al} = \frac{Ar}{Alk + Alk-O}$
	C _{Alk}	C _{Alk-O}				
	0-52 ppm	52-106 ppm	106-160 ppm	160-200 ppm		
<u>Конкреции глеевой</u> почвы	18,1	16,2	35,5	30,2	<u>50,9</u>	1,0
<u>Конкреции глеевой осушенной</u> почвы	19,1	23,1	29,3	28,5	<u>41,0</u>	0,7

Обнаружено, что в формировании гумуса серых лесных почв принимают участие только ткани покрытосеменных (лиственных и травянистых) растений. Причем пропорции лигнинных фенолов не изменились ни под влиянием распашки, ни под влиянием осушения.

В пределах изучаемых катен во всех районах исследования максимум накопления фенольных соединений приходится на почвы мезопонижений с длительным господством восстановительных условий во всем профиле и почвы микрозападин, обладающих в весенний период двухъярусной верховодкой. Наиболее дренированные разности почв, приуроченные к водораздельным микроповышениям и склонам, обладают наименьшими количествами фенолов. Минерализация ароматических соединений лигнина в аэробных условиях сопровождается значительным увеличением доли фенольных кислот.

Лигнинные параметры вторых гумусовых горизонтов резко отличны от

В Fe-Mn ортштейнах серых лесных почв обнаружен лигнин высших растений. Его фракционный состав соответствует типу господствующей растительности.

С увеличением размера ортштейнов количество продуктов окисления лигнина в них уменьшается за счет минерализации.

Независимо от степени гидроморфизма серых лесных почв количество лигниновых продуктов в ортштейнах в **10 раз меньше, чем в мелкоземе вмещающего горизонта**

В ортштейнах гидроморфных почв преобладают фенольные кислоты над альдегидами.

Осушение (12 лет) вызывает глубокую разрушительную трансформацию и таких, казалось бы, устойчивых соединений как лигнин в ортштейнах, особенно в крупных фракциях.

*** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-49727) и **DAAD (в Байройтском университете ФРГ)****

**Спасибо
за внимание!**