



Землеробство, грунтознавство, агрохімія

УДК 631.417.2 + 54.061:

54.062

© 2017

Є.В. Скрильник,

*доктор сільсько-
господарських наук*

О.І. Маклюк,

*кандидат
біологічних наук*

М.А. Попірний

*Національний науковий
центр «Інститут
грунтознавства та агрохімії
імені О.Н. Соколовського»*

ВПЛИВ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЧОРНОЗЕМУ ТИПОВОГО НА СКЛАД І ГІДРОФОБНО-ГІДРОФІЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГУМІНОВИХ КИСЛОТ ЗА РІЗНОГО ОБРОБІТКУ ҐРУНТУ

Мета. Вивчити вплив ферментативної активності оксидредуктаз чорнозему типового на склад і гідрофобно-гідрофільні властивості гумінових кислот (ГК) за різного обробітку ґрунту. **Методи.** Польовий, лабораторно-аналітичний, спектрометричний. **Результати.** Зростання поліфенолоксидазної активності за 10-річне використання нульового обробітку сприяє підвищенню гідрофобності ГК завдяки формуванню більшої кількості конденсованих неполярних ароматичних структур. За оранки відбувається переорганізація конформації макроструктури ГК, зумовленої формуванням полярніших гідрофільних структур ГК через зміну напряму оксидредуктазної активності, що сприяє більшій рухомості гумусу порівняно з нульовим обробітком і перелогом. **Висновки.** Використання нульового обробітку сприяє оборотній переорганізації функціональної макроструктури ГК завдяки зміні напряму оксидредуктазної активності у бік формування гідрофобних структур — неполярних ароматичних сполук.

Ключові слова: оксидредуктази, обробіток ґрунту, гумінові кислоти, неполярні ароматичні структури, гідрофобно-гідрофільні властивості, переорганізація конформації.

Ферментативна активність ґрунтів є важливим чинником формування кількісних та якісних показників гумусу. Зміни виявляються

як у разі залучення цілинних чорноземів у сільськогосподарське виробництво, так і за різних способів їх використання. Це впливає,

насамперед, на процеси біодеградації свіжої органічної речовини, а також на участь у формуванні структурних елементів гумусових речовин (ГР), тим самим зумовлюючи склад органічної речовини ґрунту (ОРГ) [1]. Трансформація складу гумусу зумовлює макроскопічну структурну організацію, що визначає функціональні властивості ГР до акумуляції та міграції різних елементів в екосистемі [2]. Організація макроструктури ГР — це формування надмолекулярних (супрамолекулярних) комплексів, створених у результаті самоорганізації щодо менших за розміром гетерогенних молекул та їх молекулярних асоціатів, утворених через біодеградацію відмерлих органічних решток [3].

Самоорганізація зумовлена термодинамічним процесом відбору найстабільніших органічних структур, характер агрегації яких залежить від рН та зумовлює гідрофобно-гідрофільні властивості (амфіфільність) ГР [4–6]. Стабілізація конформації надмолекулярного комплексу зумовлена різними слабкими міжмолекулярними взаємодіями (гідрофобними, Ван дер Ваальсовими, π - π , π -CH та ін.), які зумовлюють поліфункціональність ГР. Сильні ковалентні зв'язки утворюють найстійкіші структурні елементи, а саме ароматичні структури, які за молекулярної гідрофобної π - π асоціації формують гідрофобні домени [4, 5]. Установлено, що найбільший уміст вуглецю міститься у ковалентно спряжених (C=C) ароматичних структурах — низькомолекулярних сполуках [2]. За гідрофобної агрегації вони формують стійкі неполярні молекулярні домени, за гідрофільної — полярні рухомі та активні, тому фульвокислоти (ФК) дуже активні через гідрофільну організацію [3, 4]. Найбільша кількість гідрофобних ароматичних доменів мають саме гумінові кислоти (ГК), які зумовлюють високий уміст вуглецю у чорноземі типовому через активну мікробіологічну активність. Гідрофобне конденсоване «ядро» ГР — це слабо конденсовані спряжені ароматичні й гетероциклічні структури (2–3 кільця типу нафталену, антрацену), на відміну від висококонденсованої структури вугілля поєднані ковалентними зв'язками. Формування конденсованих ароматичних структур відбувається за вільно

радикальної реакції окиснення хінонів через семихінонні (СХ) радикали [2]. Процес вільнорадикальної реакції конденсації каталізується поліфенолоксидазами. Це приводить до оксидазної полімеризації та утворення ковалентних з'єднань (типу –С–О–, –С–С– зв'язки), що формують неполярні ароматичні структури [3]. Важливими елементами конденсованих структур ГР є оксигенові функціональні групи: карбонільні групи кетонів (–С=О) та карбоксильні групи (–COOH). Метоксильні групи (–OCH₃) лігнінових структур ОРГ зазнають процесів дегідратації, що впливає на розташування (конформацію) та активність оксигеновісних функціональних груп ГК [3–5].

Інтенсивний обробіток чорноземів підсилює мінералізаційний процес в ОРГ, що призводить до дегуміфікації, яка зумовлена необоротною переорганізацією надмолекулярного комплексу ГК з подальшим розпадом функціональної саморегульовальної макроструктури гумусу [1, 7]. З огляду на це в практику землеробства було введено ресурсоощадні технології обробітку ґрунту, які сприятимуть відновленню біорізноманіття, родючості та поліпшенню екологічного стану загалом [7]. Серед таких технологій, які успішно використовують у різних західних країнах для підвищення вмісту, якості гумусу та глобальної стабілізації CO₂, є нульова система обробітку (no-till) [1].

Тому вивчення зміни складу структурних компонентів у макроструктурі ГК та їх амфіфільних властивостей, зумовлених зміною ферментативних процесів за умов різного обробітку, є актуальним і доцільним.

Мета досліджень — виявити вплив різного обробітку через зміну оксидоредуктанної активності чорнозему типового на вміст ароматичних структур і амфіфільні властивості ГК.

Матеріали та методи досліджень. Відбір ґрунтових зразків проводили на експериментальному полі кафедри землеробства Харківського національного аграрного університету імені В.В. Докучаєва. Схема дослідів: 1 — контроль (40-річний переліг); 2 — оранка на глибину 20–22 см; 3 — чизель (20–22 см) після 10-річного використання no-till. Зразки ґрунту для біохімічного аналізу відбирали за загальноприйнятою

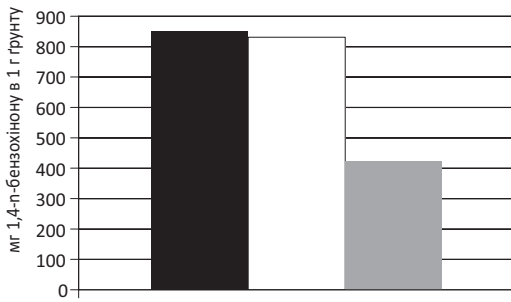


Рис. 1. Активність поліфенолоксидаз у чорноземі типовому за різного його обробітку: ■ – переліг; □ – чизель по-till; ■ – оранка (для рис. 1 і 2)

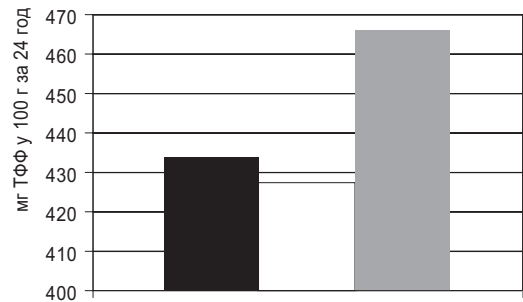


Рис. 2. Активність дегідрогеназ у чорноземі типовому за різного його обробітку

методикою з 0–20 см шару [8]. Визначення активності оксидоредуктаз (поліфенолоксидаз і дегідрогеназ) проводили за методикою [8]. Екстрагування ГК з ґрунтових зразків проводили за ДСТУ 7606:2014 [9].

Інфрачервону Фур'є-спектроскопію пропускання (ІЧ Фур'є-спектроскопія трансмісії) ГК проводили на спектрометрі Agilent Technologies Cary 630 у стандартній області вимірювання 500–4000 см⁻¹ (у пресованих таблетках з КВг). Дослідження електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) ГК проводили в кварцових амулах фірми JEOL за допомогою спектрометра JES-ME-3x, який працює в 3-сантиметровому діапазоні довжин хвиль (X-band) з частотою модуляції 100 кГц. Як стандарт під час визначення спінової та орбітальної взаємодії (g-фактора) та інтенсивності ЕПР спектра використовували полікристалічний зразок ДФПГ (дифенілпікрілгідразил), середнє значення g-фактора якого дорівнює значенню вільного електрона 2,0036±0,0003. Концентрацію СХ радикалів установлювали методом порівняння відносних амплітуд сигналів (Гаус), для яких g-фактор однаковий із вільним електроном (~2,00). Проникну гель-хроматографію проводили на сефадексі Г-200. Елюцію (вихід фракцій за розмірами) проводили розчином 0,1 н NaOH. Реєстрацію молекулярних фракцій проводили за поглинання спектра ароматичними структурами та їх оксигеновмісними функціональними групами за довжини хвилі 465 нм.

Результати досліджень. Активність оксидоредуктаз чорнозему типового свідчать

про зниження активності поліфенолоксидаз після інтенсивного обробітку ґрунту (оранки) порівняно з перелогом (рис. 1).

Установлено, що за оранки на експериментальному полі відбувається зменшення вмісту гумусу через посилення мінералізаційного процесу [10]. Підвищення активності біодеградації ОРГ зумовлено перемішуванням глибших шарів ґрунту, що призводить до зменшення поліфенолоксидазної активності, але підвищення активності дегідрогеназ (рис. 2) через розклад свіжого ОРГ в умовах кращої аерації 0–20 см шару ґрунту, які відщеплюють водень від субстрату, деблокуючи оксигеновмісні ланцюги ГР.

Підвищення активності дегідрогеназ пов'язано із біодеградацією свіжої ОРГ та вузьким співвідношенням вуглецю і азоту [10]. За оранки відбувається зміна напрямів трансформації ОВР, що зумовлено активними дегідратаційними процесами в ОРГ, та зменшенням поліфенолоксидазної активності, що визначає зменшення відбору стійких сполук, але збільшення швидкості біологічної мінералізації менш стійких.

За результатами ІЧ Фур'є-спектроскопії, на усіх спектрах досліджуваних солей ГК (рис. 3) чітко виявляються структурні елементи ГК, які відрізняються відносною амплітудою поглинання. У короткохвильовій області одержаних спектрів є широка смуга поглинання з максимумом за 3450 см⁻¹. Її наявність пов'язана з гідроксильними та фенолгідроксильними групами (–OH), що беруть участь у міжмолекулярних Н-зв'язках. Дуплет смуг за 2900 та 2800 см⁻¹ зумовлений валентними коливаннями С–Н

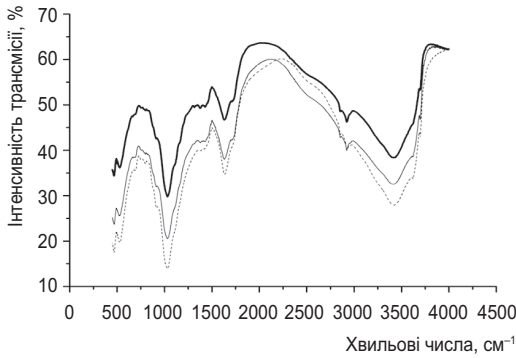


Рис. 3. ІЧ Фур'є-спектри поглинань ГК чорнозему типового за різного його обробітку: — переліг; — — оранка; — — чизель no-till

у CH_2 - та CH_3 -групах і підтверджується наявністю смуг деформаційних коливань метоксильних іонізованих груп за 1440 і 1375 cm^{-1} . Оксигеновмісні функціональні групи виявляються за 1710–1725 cm^{-1} , що зумовлено коливаннями $\text{C}=\text{O}$ у карбоксильних групах – COOH .

Широкий діапазон від 1800 до 2500 cm^{-1} вважають не інформативним, але його нахил і форма зумовлені молекулярно-масовими параметрами ГК [11]. Ароматичні структури зумовлені чіткою смугою за 1625 cm^{-1} , що зумовлена коливаннями спряжених вуглецевих атомів циклічних і гетероциклічних сполук.

Форма ІЧ спектрів свідчить про подібність у макроструктурі усіх досліджуваних ГК, але відрізняється амплітудами поглинань, нахилом лінії спектра від 1800 до 2500 cm^{-1} , інтенсивністю смуг за 1440, 1375 та 1330 cm^{-1} , а також амплітудою коливань спряжених ароматичних сполук за 1625 cm^{-1} . Обробіток чорнозему типового призвів до зменшення інтенсивності поглинань аліфатичних структур, порівняно з перелогом, особливо після оранки на смузі 2800 cm^{-1} , що пов'язано з відщепленням аліфатичних гідрофільних груп. За no-till відбувається збільшення амплітуди поглинань ароматичних спряжених сполук, що пов'язано з підвищенням активності поліфенолоксидаз, але спектр від 1800 до 2500 cm^{-1} має подібну направленість з оранкою, що свідчить про різницю у молекулярно-масових

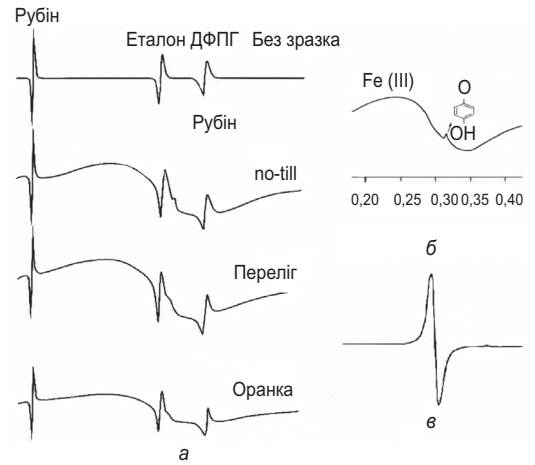


Рис. 4. Спектри ЕПР досліджуваних ГК чорнозему типового за різного його обробітку

властивостях порівняно з перелогом. За оранкою чітко виявляються смуги 1440, 1375 та 1330 cm^{-1} , що зумовлено метильними та метоксильними групами. Це, вірогідно, пов'язано з підвищенням активності дегідрогеназ і перебудови розташування функціональних груп.

На рис. 4, а наведено спектри радіочастотної ЕПР спектроскопії виділених ГК з чорнозему типового за різного обробітку ґрунту.

Спектри ЕПР мають величину g-фактора 2,0036, близьку до g-фактора ДФПГ, та широку нероздільну лінію між точками перегину кривої поглинання близько 0,1 Тесла. Це зумовлено наявністю хелатних металокомплексів із залізом (III), утворених у результаті електронної перебудови спряженої системи та усупільнення делокалізованого електрона під час екстрагування ГК (рис. 4, б). У районі g-фактора ДФПГ 2,0036 спостерігається вузьке «плече», що відповідає сигналу СХ радикалів в області 0,33–0,35 Тесла (рис. 4, б), які виявляються у вигляді вузького сигналу (рис. 4, в).

Форма ліній сигналу СХ радикалів мають однакову форму, але різну амплітуду (рис. 5), що пов'язано з концентрацією різних циклічних ароматичних структур у ГК (хінонових поліконденсатів). Амплітуда сигналу СХ радикалів зменшується за оранки, на якій зменшується поліфенолоксидазна

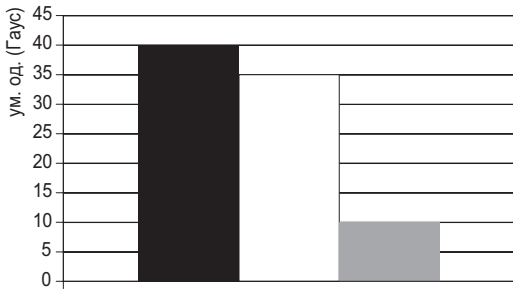


Рис. 5. Інтенсивність сигналу СХ радикалів ГК за різного обробітку чорнозему типового: ■ — переліг; □ — no-till; ■ — оранка

активність, що також підтверджується ІЧ-спектрами. За використання no-till відбувається збільшення амплітуди СХ радикалів, що зумовлено підвищенням поліфенолоксидазної активності чорнозему типового. Це характеризується збільшенням ковалентних зв'язків і гідрофобних доменів у макроструктурі ГК.

На профілі молекулярного розподілу за розміром молекул ГК (рис. 6) за цього об'єму елюції наведено бімодальний розподіл фракцій.

Більшого розміру молекули, які зумовлюють елюцію першої фракції, характеризуються полярними ароматичними та гетероциклічними структурами з більшою кількістю функціональних кисневмісних груп, що за агрегації утворюють розгалужені гідрофільні домени, які стабілізуються Н-зв'язками. Друга фракція пов'язана з меншим розміром молекул (також низькомолекулярними сполуками) — це неполярні ароматичні поліконденсати з ковалентними зв'язками меншого розміру, які асоціюються за допомогою гідрофобних міжмолекулярних взаємодій та зумовлюють гідрофобний характер фракції. Профіль ГК перелігу свідчить про наявність більшої кількості неполярних гідрофобних структур завдяки найінтенсивнішому поглинанню спектра за довжини хвилі 465 нм другою фракцією та слабким поглинанням першою.

За оранки відбувається зміна об'єму елюції та інтенсивності поглинання за довжини хвилі 465 нм, що свідчить про молекулярну переорганізацію конформації та зміну амфіфільних властивостей

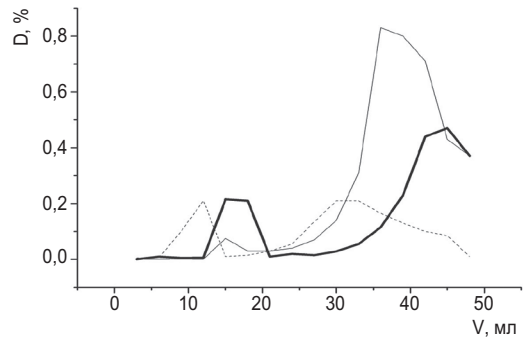


Рис. 6. Профіль молекулярного розподілу за розмірами молекул ГК залежно від обробітку чорнозему типового (D, % — інтенсивність поглинання за довжиною хвилі 465 нм; V — об'єм елюції): — — переліг; — оранка; — — no-till

ГК, зумовлену зміною складу ароматичних структур ГК. За оранки відбувається збільшення поглинання першої гідрофільної фракції, але зменшення поглинання за об'єму елюції гідрофобної фракції. Це пов'язано з переорганізацією неполярних низькомолекулярних гідрофобних сполук чорнозему типового у гідрофільні молекулярні асоціати більшого розміру, які активно вступають в реакції з металами, утворюючи металокомплекси типу хелатів [4, 5, 10]. Підвищення реакційної здатності завдяки гідрофільній переорганізації пов'язано з підвищенням дегідрогеназної активності через деблокування кисневмісних груп ароматичних структур, що збільшує рухомість гумусу та активне відщеплення бокових аліфатичних груп ГК. Тому втрата вуглецю після оранки пов'язана зі зменшенням низькомолекулярних ароматичних гідрофобних доменів через їх переорганізацію у рухомі гідрофільні домени, які відщеплюються у вигляді гідрофільних аліфатичних груп [1, 2, 6, 7, 10]. За 10-літнє використання no-till профіль елюції свідчить про підвищення кількості гідрофобних структур і збільшення швидкості елюції. Це зумовлено оборотною переорганізацією конформації ГК у бік формування гідрофобних доменів через збільшення кількості формування ковалентних зв'язків під час оксидазної полімеризації хінонів (поліконденсації), що каталізується поліфенолоксидазами.

Висновки

Інтенсивний обробіток чорнозему типового призводить до зміни оксидредуктазної активності через підвищення біологічної мінералізації та зменшення стійкості гумусової системи, зумовлене зменшенням стійких до розкладу ароматичних неполярних поліциклічних структур ГК. За no-till відбувається підвищення поліфенолоксидазної активності, що приводить до збільшення числа ковалентних зв'язків у спряжених поліциклічних ароматичних структурах через оксидазну полімеризацію (конденсацію), що зумовлює збільшення

неполярних гідрофобних і стійких ГК.

Активність дегідрогенази збільшується за оранки через деблокування оксигеновмісних функціональних груп, зумовлене активною мінералізацією свіжої органічної речовини. За no-till збільшення амплітуди сигналу СХ радикалів, інтенсивності поглинання спряжених ароматичних вуглецевих структур свідчить про збільшення ароматичних гідрофобних структур ГК. Установлено, що використання no-till спричиняє оборотну переорганізацію функціональної макроструктури ГК.

Бібліографія

1. *Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies*/C. Bayer, L. Martin-Neto, J. Mielniczuk et al.//Geoderma. — 2002. — № 105. — P. 81–92.
2. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации/Д.С. Орлов. — М.: МГУ, 1990. — 325 с.
3. *Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humic chemistry and application in Soil Science*/A. Piccolo//Advances in Agronomy. — 2002. — № 75. — P. 57–133.
4. *Wershaw R.L. Molecular aggregation of humic substances*/R.L. Wershaw, L. Robert//Soil Science. — 1999. — № 164. — P. 803–813.
5. *Милановский Е.Ю. Амфифильные компоненты гумусовых веществ почв*/Е.Ю.Милановский//Почвоведение. — 2000. — № 6. — С. 706–715.
6. *Цапко Ю.Л. Дискусійні проблеми гумусу*/Ю.Л. Цапко//Ґрунтознавство. — 2015. — № 3–4. — С. 83–89.
7. *Kravchenko Y. Quality and dynamics of soil organic matter in a typical Chernozem of Ukraine under different long-term tillage systems*/Y. Kravchenko, N. Rogovska, L. Petrenko//Canadian J. of Soil Science. — 2012. — № 92. — P. 429–438.
8. *Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии*/Ф.Х. Хазиев. — М.: Наука, 2005. — 252 с.
9. *Якість ґрунту. Методи препаративного виділення гумусових речовин: ДСТУ 7606:2014.* — [Чинний від 29 грудня 2014 р.]. — К.: Мінекономрозвитку України, 2014. — 8 с. — (Національний стандарт України).
10. *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. Скрильчик//Біофізичний вісн. Харків. нац. ун-ту. — Сер.: Біологія. — 2016. — Вип. 35 (10). — С. 34–45.
11. *Dormaar J.F. Infrared spectra of humic acids from soils formed under grass or trees*/J.F. Dormaar//Geoderma. — 1967. — № 1. — P. 37–45.

Надійшла 18.04.2017.