

УДК 631.471

DOI 10.17513/use.38108

ЛИПИДЫ МЕРЗЛОТНЫХ ЧЕРНОЗЕМОВ**Чимитдоржиева Э.О., Цыбенков Ю.Б.***Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ,**e-mail: erzhenach@mail.ru*

Цель работы заключалась в изучении характеристик липидов мерзлотных квазиглеевых черноземов юга Витимского плоскогорья с помощью элементного анализа и метода ^{13}C -ЯМР (Turbic Chernozems Molliglossic). ^{13}C -ЯМР-структура была определена с использованием метода ядерного магнитного резонанса на ЯМР-спектрометре Bruker AV-600 (резонансные частоты 600,18 МГц – ^1H и 150,93 МГц – ^{13}C), оснащенный датчиком с катушкой для подачи Z-градиентных импульсов. Анализатор CHNS/O Series II от компании Perkin Elmer использовался для определения элементного состава препаратов липидов. Также были получены ЯМР ^{13}C -спектры препаратов липидов черноземов квазиглеевых. Был проведен исследовательский анализ спектров, в котором были определены сигналы различных групп соединений, таких как этокси-группы, фенольные производные и алкеновые фрагменты. Также были указаны диапазоны химических сдвигов, которые характерны для определенных типов ядер углерода. Было выполнено сравнение содержания различных структурных элементов в пробах. Была обнаружена связь между составом липидов и уровнем влажности в черноземах квазиглеевых. Вероятно, увеличение влажности приведет к увеличению содержания непредельных компонентов. Были обнаружены некоторые изменения в элементном составе липидной фракции органического вещества почвы на глубине 0-20 см. Содержание атомов углерода и водорода немного уменьшилось, в то время как доля атомов азота и кислорода увеличилась. Исследование состава элементов и соотношения атомов вещества позволяет сделать вывод о доминировании алифатической составляющей в верхнем слое черноземов квазиглеевых.

Ключевые слова: липидная фракция органического вещества, ^{13}C -ЯМР-спектроскопия, элементный состав, углерод, чернозем квазиглеевый, юг Витимского плоскогорья

Работа выполнена по теме Госзадания № 121030100228-4 «Эволюционно-генетические, биогеохимические и продукционные функции почв Байкальского региона как компонента биосферы, оценка их ресурсного потенциала и разработка технологий рационального использования и охраны».

LIPIDS OF PERMAFROST CHERNOZEMS**Chimitdorzhieva E.O., Tsybenov Yu.B.***Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, e-mail: erzhenach@mail.ru*

The purpose of the work was to study the characteristics of lipids in frozen quasi-gley chernozems in the south of the Vitim Plateau using elemental analysis and the ^{13}C -NMR method (Turbic Chernozems Molliglossic). The ^{13}C -NMR structure was determined using the nuclear magnetic resonance method on a Bruker AV-600 NMR spectrometer (resonance frequencies 600.18 MHz – ^1H and 150.93 MHz – ^{13}C), equipped with a sensor with a coil for delivering Z-gradient pulses. A CHNS/O Series II analyzer from Perkin Elmer was used to determine the elemental composition of lipid preparations. ^{13}C NMR spectra of lipid preparations from quasi-gley chernozems were also obtained. An exploratory analysis of the spectra was carried out, in which the signals of various groups of compounds, such as ethoxy groups, phenolic derivatives and alkene fragments, were determined. The ranges of chemical shifts that are characteristic of certain types of carbon nuclei were also indicated. A comparison was made of the content of various structural elements in the samples. A relationship was discovered between the composition of lipids and the level of moisture in quasi-gley chernozems. It is likely that an increase in humidity will lead to an increase in the content of unsaturated components. Some changes were detected in the elemental composition of the lipid fraction of soil organic matter at a depth of 0-20 cm. The content of carbon and hydrogen atoms decreased slightly, while the proportion of nitrogen and oxygen atoms increased. The study of the composition of elements and the ratio of atoms of the substance allows us to conclude that the aliphatic component dominates in the upper layer of quasi-gley chernozems.

Keywords: lipid fraction of organic matter, ^{13}C NMR spectroscopy, elemental composition, carbon, quasi-gley chernozem, south of the Vitim Plateau

The work was carried out on the topic of State Assignment No. 121030100228-4 “Evolutionary-genetic, biogeochemical and production functions of soils in the Baikal region as a component of the biosphere, assessment of their resource potential and development of technologies for rational use and protection”.

Почвенные липиды представляют собой сложную смесь соединений, растворяющихся в органических растворителях или их смесях. В состав этой фракции входят свободные жирные кислоты, полярные или неполярные липиды, стероиды, воски и смолы. Термин

«липиды» в почвоведении пришел из области биохимии, где они относятся к сложным соединениям эфиров жирных кислот и спиртов (включая их производные).

Уровень содержания липидов в гумусово-аккумулятивных горизонтах почв за-

висит от степени гумификации и количества гуминовых кислот. Почвенные липиды играют важную роль в формировании структуры органического вещества почвы. Количество липидов в почвах с высокой степенью гумификации незначительно и составляет в среднем 3%. Тем не менее даже в небольших количествах липиды выполняют важные функции в почвах, включая влияние на способность почвенных частиц абсорбировать вещества, скорость разложения органического материала и энергетические процессы, структуру и функционирование микробного комплекса [1].

Ранее было отмечено, что растения влияют на содержание и играют важную роль в поставке липидов в почву [1; 2]. Следовательно, количество и характеристики растительных остатков имеют основное значение для содержания липидов в почве. Компоненты липидов в почве могут быть изменены различными факторами, такими как тип растительности, содержание углерода органического и влаги в почве, условия использования земель [3; 4].

В верхних горизонтах почв содержание липидов на 2–3 порядка меньше содержания органического вещества. Липиды в почвах обычно распределены таким образом, что их концентрация резко уменьшается по мере проникновения вниз, практически достигая нулевых значений в почвообразующих породах. Самые плодородные почвы обычно бедны липидами. Присутствие липидов может даже быть связано с содержанием гумуса, а также аэрацией почвы. Стабильность содержания липидов в почвах связана с их устойчивостью и имеет важное значение для определения процессов формирования почвы.

Различные исследования показывают, что содержание липидов может иметь влияние на распределение углерода между компонентами микробиоты почвы. Состав липидов также определяет характеристики энергетических потоков между разными уровнями трофической цепи в экосистеме [5; 6]. В качестве примера можно привести научное исследование, где сравнивалось содержание липидов и углерода в почвах лесных насаждений разного возраста с помощью специальных методов анализа. Было обнаружено, что присутствие липидов непосредственно связано с содержанием углерода в почве. Существует очень высокая корреляция между данными по содержанию липидов и общим содержанием органического вещества, а также содержа-

нием растворенного органического вещества, с коэффициентом корреляции Пирсона, превышающим 0,998. Было обнаружено наибольшее количество липидов в почвах, где прошло более двух столетий с начала роста деревьев. В почвенных образцах, взятых с обрабатываемых полей, которые граничат с лесными полосами различного возраста, содержание липидов и углерода было одинаково и значительно ниже, чем в почве лесополос [7].

Изучение липидной фракции органического вещества в мерзлотных почвах Забайкалья, которое ранее не проводилось, является актуальной задачей.

Цель исследования заключается в анализе структуры и состава липидной фракции органического вещества в черноземах квазиглеевых юга Витимского плоскогорья в Западном Забайкалье с использованием элементного анализа и метода ^{13}C -ЯМР.

Материалы и методы исследования

Для данного исследования были выбраны черноземы квазиглеевые, расположенные в Еравнинской котловине юга Витимского плоскогорья в Западном Забайкалье.

В Еравнинской котловине встречается чернозем квазиглеевый, который можно назвать полугидроморфным аналогом черноземов, развивающимся в автоморфных условиях. Характеристики почв свидетельствуют о высоком плодородии, высоком содержании карбонатов и наличии признаков оглеения в нижних горизонтах и материнской породе. Гидроморфизм данных почв связан с близким расположением мерзлоты.

Характеристика температурного режима исследуемых почв указывает на их принадлежность к мерзлотному типу. Вследствие этого уровень теплообеспеченности данных почв является недостаточным, особенно весной и ранней осенью. Мерзлота создает специфичный водный режим, когда доступ влаги грунтовых вод ограничен и количество осадков полностью определяет уровень влагоснабжения. У мерзлотных черноземов в начале лета, особенно в период засушливых лет, наблюдается недостаток влаги в верхних слоях почвы. Однако этот недостаток существенно снижается благодаря освобождению влаги при оттаивании. Тип водного режима этих почв относится к типу, который характеризуется как периодически промывной.

Криогенные процессы изменяют состояние почвы и приводят к формированию

уникальных характеристик в ее структуре, свойствах и функционировании. Среди негативных последствий мерзлоты для почвы можно отметить потерю гумуса в корнеобитаемом слое растений из-за различных мерзлотных процессов и явлений. На биопродуктивность почв оказывает влияние многолетняя мерзлота, действующая как холодный экран.

Физико-химические параметры исследуемых почв нами опубликованы ранее [8; 9].

Была использована стандартная техника экстрагирования в аппарате Сокслета с помощью 200 мл азеотропной смеси спирта с бензолом в соотношении 1:2 по объему для извлечения липидов из почвы [10]. Навеска почвы составляла 20 г и помещалась в патрон из фильтровальной бумаги. Использование специальной смеси может ускорить процесс извлечения липидов из почвы и сократить расход растворителя. Экстрагирование проводится в течение 24 часов. В среднем окрашивание свежих порций растворителя обычно заканчивается в течение 12 часов. Однако из-за того, что не все компоненты липидов окрашены, время экстракции увеличивается до 24 часов для всех типов почв. Это дает возможность получить сопоставимые результаты, не учитывая наличие окрашенных компонентов в составе липидов. Затем основная часть растворителя удаляется с помощью роторного испарителя, а препарат высушивается до воздушно-сухого состояния.

Исследование структурных компонентов препаратов липидов (спектры ^{13}C -ЯМР) определено методами ядерного магнитного резонанса на ЯМР-спектрометре Bruker AV-600 (резонансные частоты 600,18 МГц – ^1H и 150,93 МГц – ^{13}C), снабженном датчиком с катушкой для подачи Z-градиентных импульсов.

Для исследования всё количество предоставленной пробы растворяли в 520 мкл дейтерированного хлороформа (CDCl_3) и помещали в 5-мм ЯМР-ампулу. После исследования раствор помещался в исходный эппендорф, растворитель испарялся на воздухе.

Записывали спектры магнитного резонанса на протонах (ЯМР ^1H) и на ядрах углерода-13 с подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами (ЯМР ^{13}C). Использовали импульсные программы фирмы Bruker – zg30 и zgpg.

Элементный состав липидов в препаратах определен с помощью прибора CHNS/O Series 2 компании Perkin Elmer.

Результаты исследования и их обсуждение

Большинство методов определения химической природы природного органического вещества в почве, отложениях и воде требует предварительных этапов экстракции или концентрирования, которые не являются количественными и создают артефакты. Анализ ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с ^{13}C позволяет избежать этих проблем. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в настоящее время является стандартным аналитическим методом, который применяется различными способами для изучения липидов. ЯМР позволяет исследовать молекулярные структуры, которые могут принимать липиды, их молекулярный порядок и динамику. Информацию можно получить с минимальным химическим возмущением, хотя присущая ЯМР низкая чувствительность может иметь практические ограничения [11]. ЯМР используют в качестве инструмента для выявления молекулярных подробностей о липидах во многих различных полиморфных формах и формах образцов, а также чтобы понять термодинамическое поведение, молекулярные взаимодействия с другими компонентами мембраны, ионами и влияние pH на свойства липидов. Присущая этому методу нечувствительность, по сравнению с некоторыми другими биофизическими методами, частично перевешивается отсутствием химических возмущений при наблюдении либо естественно видимых изотопов ЯМР, либо посредством не возмущающего меченя [11]. Молекулярная характеристика почвенных липидов дает ценную биогеохимическую информацию о влиянии растительности, микроорганизмов и абиотических факторов на процесс депонирования почвенного углерода. Липиды почвы ведут себя как биомаркерные фракции почвы при анализе с помощью ^{13}C -ЯМР в целом [12].

Полученные ^{13}C -ЯМР-спектры для чернозема квазиглеевого приведены на рисунке 1. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировались в диапазоне от -10 до 240 м.д. относительно тетраметилсилана. Намагниченность ядер углерода индуцировали 90° импульсом, время, которое занял спад свободной индукции, 0.87 секунды, время задержки для релаксации 5 с. Длительность одного эксперимента ЯМР составляла от 7.2 до 6.5 часов. Для калибровки спектров использовался сигнал дейтерированного растворителя (CDCl_3 , 77.0 м.д.).

Для улучшения соотношения «сигнал – шум» было использовано два варианта обработки зарегистрированных сигналов спада свободной индукции. В первом варианте сигналы были умножены на спадающую экспоненту с параметром уширения спектральной линии (lb) 10 Гц, чтобы уменьшить перекрытие сигналов. Во втором варианте параметр уширения спектральной линии (lb) был установлен на 100 Гц, чтобы лучше наблюдать широкие группы сигналов. С помощью дальнейшего использования преобразования Фурье был осуществлен переход от временной развертки сигнала к частотной развертке, измеряемой в миллионных долях от частоты спектрометра.

Выравнивание базовой линии проводили с использованием линейной функции. Выполняли интегрирование интенсивности групп сигналов, расположенных в отдельных областях спектра, деление на которые проводили в соответствии с литературными аналогиями характерных спектральных областей различных структурных фрагментов [13; 14]. Сигнал растворителя (75-79 м.д. для $\text{lb}=10$ Гц) исключали из интегрируемой области.

Необходимо отметить, что условия регистрации не позволяют использовать интегральные интенсивности в спектрах ЯМР ^{13}C для количественного измерения состава проб, поскольку не проводились исследования влияния различий в скорости T_1 релаксации, а также для усиления сигналов углерода использовался эффект Оверхаузера. Однако интегральные интенсивности возможно использовать для сравнения спектров двух проб, полученных в тех же условиях регистрации.

Отнесения сигналов в спектрах ^{13}C органического вещества почв рассматривается в обзоре [14]. Для исследуемых проб в спектрах приняты следующие отнесения согласно [13].

На рисунках 1 и 2 спектры всех исследуемых проб приведены в одной шкале химических сдвигов. Как можно видеть, спектры всех проб схожи между собой: наблюдаемые сигналы расположены в широкой спектральной области (от ~ 10 до ~ 180 м.д.), в области углеродов алифатических фрагментов рисунок максимумов сигналов совпадает.

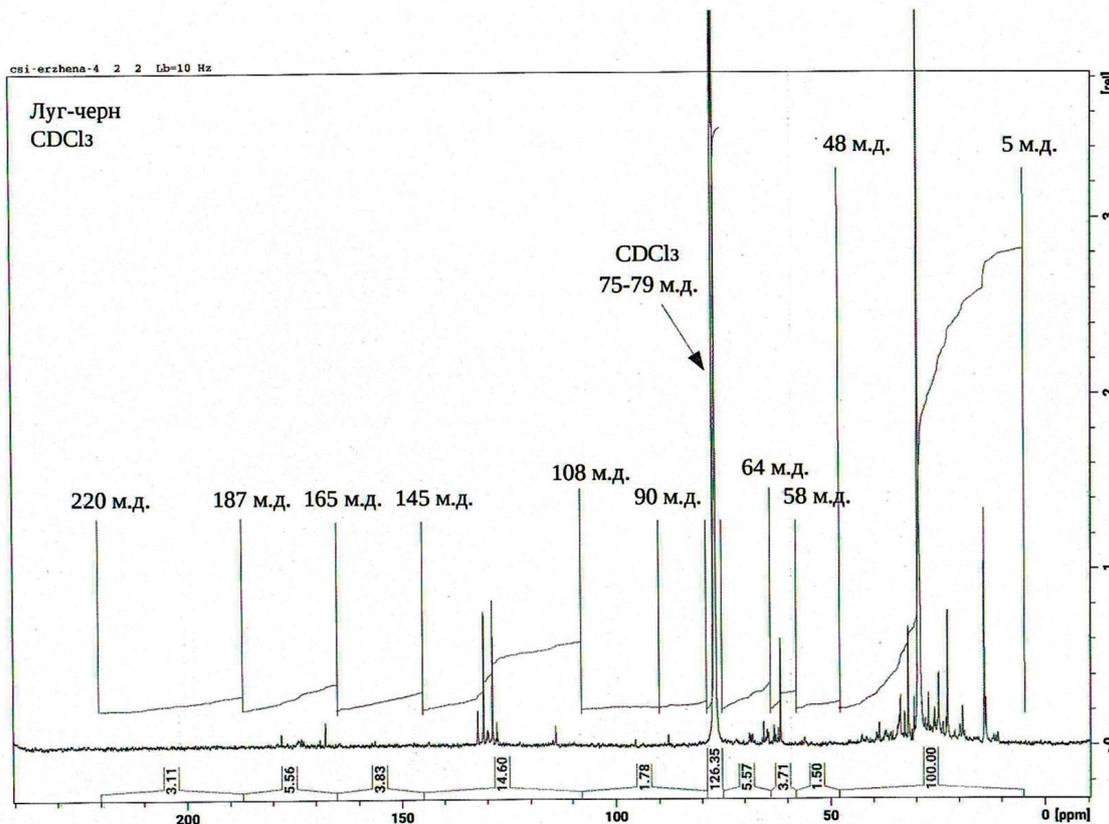


Рис. 1. Спектр ЯМР ^{13}C препаратов липидов черноземов квазиглеевых
Взвешивающая функция для сигнала ССИ – экспонента, $\text{LB}=10$ Гц

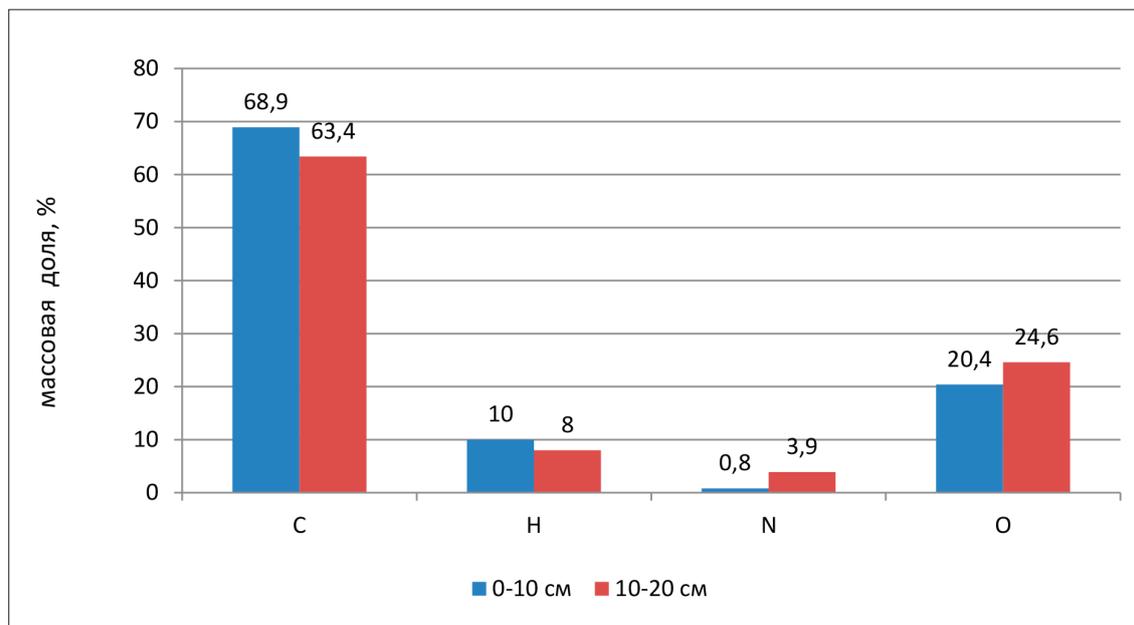


Рис. 2. Элементный состав препаратов липидов черноземов квазиглеевых ($n=3$)

В спектре ЯМР ^{13}C препарата липида чернозема квазиглевого наблюдаются выделяющиеся на фоне других сигналов два относительно интенсивных узких сигнала 14.1 и 61.6 м.д., а в спектре ЯМР ^1H имеются относительно интенсивный триплет 1.35 м.д. и квартет 4.35 м.д. Это указывает на наличие этокси-группы, входящей в состав сложных эфиров.

Совместный анализ спектров ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C , а также рассмотрение ближних корреляций (HSQC) позволяет определить ещё несколько характерных сигналов.

В спектрах ЯМР ^1H препаратов липидов чернозема квазиглевого имеется пара самых слабополюсных мультиплетов примерно равной интенсивности ~ 7.5 и ~ 7.7 м.д. Данные сигналы дают корреляционные кросс-пики с сигналами углерода 128.9 и 130.9 м.д., для которых наблюдается ещё один характерный сигнал данной группы – 156.2 м.д. (=C-OR). Этот набор сигналов возможно отнести к производным фенолов, содержащих заместитель в пара-положении.

В спектрах ЯМР ^1H всех исследованных проб имеется группа сигналов ~ 5.3 м.д., коррелирующих с углеродами ~ 129.7 м.д. Химические сдвиги данных сигналов позволяют предположить их отнесение к алкеновым частям алифатических фрагментов молекул.

В препарате липида чернозема квазиглевого содержание алифатических фрагментов относительно суммарного содержа-

ния ароматических фрагментов достаточно высокое.

Ранее проведенные исследования указывают на связь между липидными компонентами и гидроморфизмом почвы [15]. Предположительно, если усилить степень гидроморфизма, то доля неопределённых компонентов увеличится. Это согласуется с результатами исследований Е.Д. Лодыгина и В.А. Безносикова [15]. Причина такого явления – слабый процесс разложения растительных остатков с ароматическими структурами лигнина в полугидроморфных почвах.

Содержание углерода и водорода в липидной фракции почвенного органического вещества в слое 10–20 см уменьшилось (рис. 2), в то время как доля азота и кислорода увеличилась. Отношение Н/С, которое указывает на ароматичность препаратов, увеличилось с 0,8 в слое 0–10 см до 1,5 в слое 10-20 см. Эти результаты свидетельствуют о том, что липидная фракция в гумусово-аккумулятивном горизонте черноземов квазиглеевых имеет алифатическую природу.

Заключение

Анализ ^{13}C -ЯМР-спектров липидов и их сравнение с теоретическими ^{13}C -ЯМР-спектрами жирных кислот и их эфиров позволяют предположить, что большая часть липидов, обнаруженных в почве, состоит из жирных кислот и их эфиров. Это факт объясняет, почему основная часть атомов

углерода (более 90%) в молекулярной структуре липидов представлена алифатическими цепочками.

В черноземах квазиглеевых обнаружена зависимость между липидными компонентами и гидроморфизмом почвы. Возможно, увеличение гидроморфизма будет сопровождаться увеличением количества компонентов, которые не являются предельными. Элементный состав препаратов липидов черноземов квазиглеевых показал преобладание алифатической структуры.

Список литературы

1. Jansen B., Wiesenberg G.L.B. Opportunities and limitations related to the application of plant-derived lipid molecular proxies in soil science // *Soil*. 2017. № 3. P. 211–234. DOI: 10.5194/soil-3-211-2017.
2. Simpson M.J., Simpson A.J. The chemical ecology of soil organic matter molecular constituents // *J. Chem. Ecol.* 2012. № 38. P. 768–784. DOI: 10.1007/s10886-012-0122-x.
3. Mueller K.E., Polissar P.J., Oleksyn J., Freeman K.H. Differentiating temperate tree species and their organs using lipid bio-markers in leaves, roots and soil // *Org. Geochem.* 2012. № 52. P. 130–141. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2012.08.014.
4. Верховцева Н.В., Терехова В.А., Пукальчик М.А., Водолазов И.Р., Шитиков В.К. Структура сообществ микроорганизмов в урбаноземах, реконструированная по липидным маркерам // *Проблемы агрохимии и экологии*. 2015. № 3. С. 45–53.
5. Dippold M., Kuzyakov Ya.A. Direct incorporation of fatty acids into microbial phospholipids in soils: Position-specific labeling tells the story // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2016. № 174. P. 211–221. DOI: 10.1016/j.gca.2015.10.032.
6. Reiffarth D.G., Petticrew E.L., Owens P.N., Lobb D.A. Sources of variability in fatty acid (FA) biomarkers in the application of compound-specific stable isotopes (CSSIs) to soil and sediment fingerprinting and tracing: a review // *Sci. Total Environ.* 2016. № 565. P. 8–27. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.137.
7. Szajdak W., Maryganova V., Skakovskii E., Tychinskaya L. ¹H and ¹³C NMR spectroscopic studies of hexane-extractable lipids from soils under shelterbelts of different age and composition of plants // *Chemosphere*. 2015. V. 119. P. 1422–1427.
8. Чимитдоржиева Г.Д., Чимитдоржиева Э.О., Мильхеев Е.Ю., Цыбенков Ю.Б., Дмитриев А.В., Чимитдоржиев Т.Н., Егорова Р.А., Солдатова З.А., Андреева Д.Б., Корсунова Ц.Д.Ц., Давыдова Т.В. Почвы криогенных форм рельефа на юге Витимского плоскогорья: распространение и роль в распределении пулов почвенного углерода // *Почвоведение*. 2019. № 9. С. 1029–1038.
9. Чимитдоржиева Г.Д., Цыбенков Ю.Б., Чимитдоржиева Э.О., Мильхеев Е.Ю., Чимитдоржиев Т.Н. Влияние криогенеза на биоту почв (на примере юга Витимского плоскогорья) // *Сибирский экологический журнал*. 2020. Т. 27, № 1. С. 3–12.
10. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1981. 272 с.
11. Watts A. NMR of Lipids // *Encyclopedia of Biophysics*. 2013. P. 1727–1738. DOI: 10.1007/978-3-642-16712-6_556.
12. Almendros G., Tinoco P., González-V., Francisco J., Lüdemann H-D., Sanz J., Velasco F. ¹³C-NMR of forest soil lipids // *Soil Science*. 2001. V. 166(3). P. 186–196.
13. Холодов В.А., Константинов А.И., Кудрявцев А.В., Перминова И.В. Строение гуминовых кислот почв зонального ряда по данным спектроскопии ЯМР¹³ // *Почвоведение*. 2011. № 9. С. 1064–1073.
14. Чуков С.Н., Лодыгин Е.Д., Абакумов Е.В. Использование ¹³C ЯМР-спектроскопии в исследовании органического вещества почв (обзор) // *Почвоведение*. 2018. № 8. С. 952–964.
15. Lodygin E.D., Beznosikov V.A. The structure of the lipid fraction of humus isolated from podzolic and peaty-podzolic gleys // *Eur. Soil Sci.* 2003. V. 36. № 1. P. 46–50.