



МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ТАЁЖНЫХ ПОЧВ

© 2021 Е. Д. Лодыгин , Р. С. Василевич 

Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ул. Коммунистическая, 28, г. Сыктывкар, 167982, Россия.
E-mail: lodigin@ib.komisc.ru

Цель исследования: выявить влияние гидроморфизма и сельскохозяйственного использования на молекулярно-массовое распределение (ММР) препаратов гуминовых кислот (ГК) и фульвокислот (ФК), выделенных из почв Европейского северо-востока России. Оценить влияния кислотности среды на ММР ФК.

Место и время проведения. Исследования проведены на территории средней тайги (Максимовский стационар Института биологии ФИЦ КНЦ УрО РАН, расположенный в 8 км к западу от г. Сыктывкар и поле Сыктывкарского совхоза, в 5 км к юго-западу от г. Сыктывкар, на водоразделе рр. Сысола и Важел-ю) и северной тайги (в 3 км к западу от пст. Троицко-Печорск). Объектами исследования послужили гумусовые вещества, выделенные из типичной подзолистой (*Eutric Albic Retisol (Loamic)*), глееподзолистой (*Eutric Albic Stagnic Retisol (Loamic)*), торфянисто-подзолистой поверхностно-оглеенной (*Eutric Albic Stagnic Histic Retisol (Loamic)*) пахотной подзолистой (*arable Eutric Albic Retisol (Loamic)*) почв. Период отбора почв – с 1 по 30 августа 2014 года.

Методы. Количественный анализ ММР препаратов ГК и ФК выполнен с помощью жидкостной эксклюзионной хроматографии (гель-хроматографии) на гелях сефадекс G-25 и G-100 с непрерывной автоматической регистрацией оптической плотности элюата ($\lambda = 280$ нм) в проточной кварцевой кювете, колонка K 9460 см (Pharmacia, Швеция). В качестве элюента использовали дистиллированную воду, 0,05 M раствор NaOH и Tris-HCl-буфер с pH = 8,2.

Основные результаты. Проведены исследования ММР препаратов ГВ. Установлено, что ГК содержат три фракции с разной молекулярной массой: ≥ 150 kDa, 73–80 kDa и 13–23 kDa; ФК – две фракции: ≥ 5 kDa, 1–2 kDa. Невысокая молекулярная масса ФК, в совокупности с более высоким количеством кислородсодержащих функциональных групп, способствует их лучшей растворимости и миграционной способности в почвах. ГК автоморфных почв характеризуются высоким содержанием низкомолекулярных фракций, а доля высокомолекулярной фракции в ГК подстилки в 1,5–2,0 раза выше, чем в ГК подзолистого горизонта, что, возможно, обусловлено миграцией низкомолекулярной фракции вниз по профилю. Высокая доля кислой низкомолекулярной фракции в подзолистом горизонте способствует разложению почвенных минералов и их вымыванию в иллювиальный горизонт. Оценено влияние сельскохозяйственного использования почв на фракционный состав гумусовых соединений. Отмечено резкое увеличение доли высокомолекулярной фракции в препаратах ГК пахотной подзолистой почвы – в 2–4 раза по сравнению с ГК целинных подзолистых почв, что обусловлено окультуренностью пахотного горизонта, природой поступающих растительных остатков и повышенной микробиологической активностью освоенных почв. Изучено влияние кислотности среды на характер хроматограмм препаратов ФК, выделенных из основных типов почв Республики Коми. Показано, что в области высоких значений pH элюента (9–13) отсутствие фракционирования связано с ассоциацией ФК, изменением их конформации и эффектом “сверх-эксклюзии”. Элюирование дистиллированной водой (pH=6,5) позволяет проводить разделение ФК на две фракции с молекулярными массами ≥ 5 kDa и 1–2 kDa.

Ключевые слова: гуминовые кислоты; фульвокислоты; полидисперстность; эксклюзионная хроматография; подзолистые, болотно-подзолистые, пахотные почвы

Цитирование: Лодыгин Е.Д., Василевич Р.С. Молекулярно-массовое распределение гуминовых и фульвокислот таёжных почв // Почвы и окружающая среда. 2021. Том 4. № 4. e160. doi: [10.31251/pos.v4i4.160](https://doi.org/10.31251/pos.v4i4.160)

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших компонентов почв, влияющих на биологические, физические, физико-химические свойства и, в целом, на плодородие почв, является органическое вещество, глубокое и всестороннее изучение которого представляет собой важную задачу в теоретическом и практическом почвоведении (Орлов, 1996; Dergacheva et al., 2016). Гуминовые кислоты (ГК) и фульвокислоты (ФК) представляют собой полидисперсные смеси сложных по структуре

высокомолекулярных веществ, поэтому их фракционирование является одной из главных проблем химии гумуса (Perminova et al., 2005; Безносиков, Лодыгин, 2010). Изучение фракционного состава ГК и ФК необходимо для определения их роли в процессах почвообразования, в частности, для раскрытия механизмов взаимодействия гумусовых веществ (ГВ) с минеральными соединениями и регулирования агрегатного состава почв (Garcia et al., 2006; Olaetxea et al., 2018; Olk et al., 2019). Кроме того, в последние годы в научном сообществе активно обсуждаются основные концепции молекулярной организации ГВ. Ведутся дискуссии между сторонниками макромолекулярной теории строения ГВ, которые рассматривают их как полимеры (Schulten, Schnitzer, 1993), и супрамолекулярной теории, которая рассматривает ГВ как ассоциаты самоорганизующихся гетерогенных низкомолекулярных соединений (Piccolo, 2001; Piccolo et al., 2019). Во всех этих исследованиях особое внимание уделяется мягким приемам анализа гуминового материала, к которому относится метод гель-хроматографии (Трубецкой, Трубецкая, 2011; Lee, Nur, 2017; Василевич и др., 2019).

Гель-хроматография является эффективным методом разделения, очистки и анализа высокомолекулярных природных и синтетических соединений. Этот метод отличается простотой технических приемов и оборудования, мягкими условиями разделения, поэтому гель-хроматография за последние десятилетия получила широкое распространение в медицине, биологии, биохимии и почвоведении (Saiz-Jiminez et al., 2006; Trubetskoj et al., 2010). С ее помощью разделяют и исследуют самые различные объекты: животные и растительные белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и их компоненты, ферменты и др. Гель-хроматография в последнее время находит все большее применение при исследовании органического вещества почвы, в том числе его «неспецифических» (почвенные углеводы, липиды, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, пигменты и пр.) и «специфических» компонентов: гуминовых и фульвокислот (Першина и др., 1989; Lodygin, Vasilevich, 2020).

Цель работы – выявить влияние гидроморфизма и сельскохозяйственного использования почв на молекулярно-массовое распределение (ММР) препаратов ГК и ФК, выделенных из почв Европейского северо-востока России. Оценить влияния кислотности среды на ММР ФК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования гумусовых веществ проведены на типичной подзолистой (Eutric Albic Retisol (Loamic)), глееподзолистой (Eutric Albic Stagnic Retisol (Loamic)), торфянисто-подзолистой поверхностно-оглеенной (Eutric Albic Stagnic Histic Retisol (Loamic)) и пахотной подзолистой (arable Eutric Albic Retisol (Loamic)) почвах.

Разрезы типичной подзолистой и торфянисто-подзолистой поверхностно-оглеенной почв заложены в подзоне средней тайги на территории Максимовского стационара Института биологии ФИЦ КНЦ УрО РАН в 8 км к западу от г. Сыктывкара. Разрез типичной подзолистой почвы был заложен на вершине водораздела с абсолютной высотой 170 м над уровнем моря, на гребне микроповышения высотой около 1,5 м. Березово-еловый лес чернично-зеленомошный, много валежника. Разрез торфянисто-подзолистой поверхностно-оглеенной почвы заложен в 74 м от разреза подзолистой почвы в микролощине между низкими плоскими повышениями. Абсолютная высота над уровнем моря около 160 м. Березово-еловый долгомошно-сфагновый лес.

Участок глееподзолистой почвы заложен в подзоне северной тайги на вершине плоского межручейного увала в 3 км к западу от пст. Троицко-Печорск. Абсолютная высота над уровнем моря около 140 м. Ельник чернично-зеленомошный, в напочвенном покрове черника миртолистная (*Vaccinium myrtillus L.*), зеленые мхи.

Разрез пахотной подзолистой почвы расположен в подзоне средней тайги, на полях бывшего Сыктывкарского совхоза, в 5 км к юго-западу от г. Сыктывкара, на водоразделе рек Важел-ю и Сысола. Абсолютная высота над уровнем моря 145. Рельеф равнинный, с небольшими холмами. Срок сельскохозяйственного использования около 40 лет. Участок осушен крытой дренажной системой, засеян горохово-овсяной смесью.

Морфологическое описание и физико-химические свойства исследованных почв опубликованы ранее (Лодыгин, Безносиков, 2003; Lodygin, Shamrikova, 2021).

Препараты ГК и ФК выделены по методике М.М. Кононовой и Н.П. Бельчиковой (1961). Гель-хроматографирование препаратов ГК и ФК проводили на гелях сефадекс G-25 и G-100 с непрерывной автоматической регистрацией оптической плотности элюата ($\lambda = 280$ нм) в проточной кварцевой кювете, колонка К 9Ч60 см (Pharmacia, Швеция), объем аликвоты растворов ФК

и ГК 200 мкл, чувствительность фотометра ABS = 0,05, скорость элюирования 3 см³/ч, скорость диаграммной ленты самописца 1 см/ч. В качестве элюента использовали дистиллированную воду, 0,05 М раствор NaOH и Tris-HCl-буфер с pH = 8,2 (Досон и др., 1991). Определение рабочей области гелей проводили с использованием растворов голубого декстрана и бихромата аммония с концентрацией 1 мг/см³, градуировку колонки проводили по глобулярным белкам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке влияния кислотности среды на ММР гумусовых кислот установлено, что хроматограммы ФК разных типов почв в дистиллированной воде и 0,05 М растворе NaOH имеют разную форму: для щелочной среды, как правило, на хроматограммах присутствует один достаточно узкий ярко выраженный пик, а в случае дистиллированной воды хроматограммы размыты в пределах всей рабочей области геля и на них слабо обозначены два пика (рис. 1). Положения единственного пика на хроматограммах для щелочного и первого пика для нейтрального элюентов практически совпадают и близки к объему выхода голубого декстрана, а второй – смещен в область больших объемов элюата.

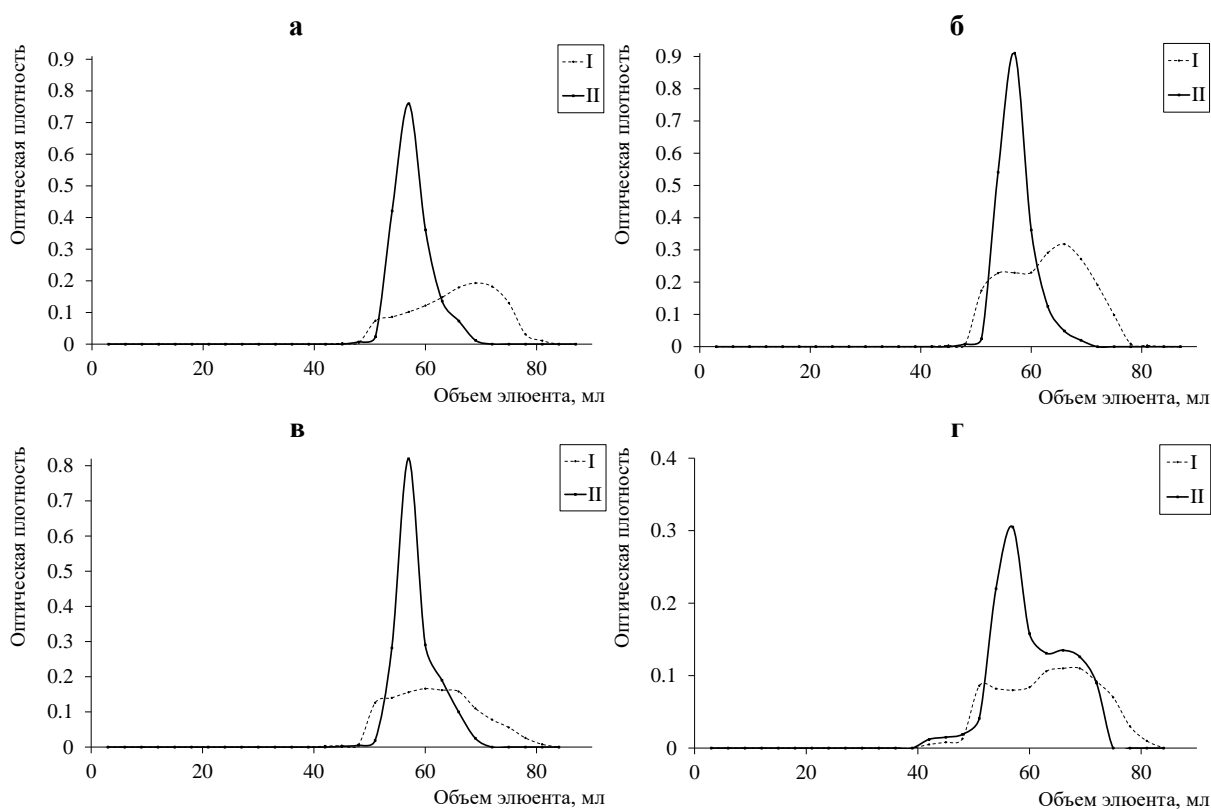


Рисунок 1. Гель-хроматограммы препаратов ФК типичной подзолистой (а – гор. А₀, б – А₂) и глееподзолистой (в – гор. А₀, г – А₂g) почв на геле сефадекс G-25. Элюенты: I – H₂O, II – 0,05 М NaOH.

Аналогичные тенденции для хроматограмм фульвокислот природных вод были обнаружены и другими исследователями (Першина и др., 1989). При гель-хроматографическом фракционировании, основанном на различии в размерах молекул, наблюдаемые формы хроматограмм для одних и тех же препаратов ФК могут быть интерпретированы с точки зрения различного характера существования ФК при различных значениях pH. Рост высокомолекулярного максимума по мере смещения pH элюента в щелочную область авторы объясняют ассоциацией ФК, приводящей к уменьшению времени их удерживания (Сироткина и др., 1974; Варшал и др., 1975). Этот же эффект может быть обусловлен и изменением конформации молекул ФК при различных pH: до достижения pK_a карбоксильных групп ФК 4,3–4,7 их молекулы в растворе имеют форму статистических клубков, которая изменяется по мере увеличения pH вследствие электростатического отталкивания ионизированных карбоксильных групп, приводя к увеличению линейных размеров молекул (Лодыгин, Шамрикова, 2021). Кроме того, в области высоких значений pH (9–13) на форму хроматограмм помимо конформационных процессов может оказывать влияние эффект «сверх-эксклюзии», так как сефадекс приобретает

частичный отрицательный заряд, при этом высокозаряженные полианионы ФК «выталкиваются» матрицей геля, снижая их время удерживания.

Таким образом, можно сделать заключение о возможности использования полученных гель-хроматограмм для установления ММР в препаратах фульвокислот. В случае щелочного элюента, использование геля G-25 неэффективно: препараты фульвокислот не фракционируются (монодисперсность препаратов ФК маловероятна в силу их природы) и выходят одним узким пиком, смещенным в высокомолекулярную область, что может быть связано как с эффектом «сверх-эксклюзии», так и с ассоциацией ФК, а также и с увеличением их линейных размеров, что приводит к кажущемуся увеличению молекулярных масс ФК. Если принять последний фактор, то в этих условиях можно добиться фракционирования ФК, используя гель другой марки, например, G-50 или G-75. В среде близкой к нейтральной молекулы ФК слабо ассоциированы и имеют одинаковую форму статистических клубков, размеры которых зависят от молекулярной массы, отсутствует их специфическая сорбция на поверхности матрицы геля за счет образования водородных связей и эффект «сверх-эксклюзии». Подобные условия существования ФК в растворе являются наиболее приемлемыми для определения ММР методом гель-хроматографирования. Использование дистиллированной воды в качестве элюента дало возможность получить слабо выраженные признаки частичного разделения ФК на геле G-25 на две фракции, что позволило в первом приближении сравнить качественный и количественный состав препаратов ФК подзолистых и глееподзолистых почв.

В качестве критерия вклада фракций в ММР принимали процентное соотношение площадей под участками кривой элюирования, соответствующих различным фракциям. Поскольку на полученных нами хроматограммах полного фракционирования ФК нет, то проводили разделение пиков двух фракций I и II. Правое плечо первого пика в области V_0 (фракция I) изображали как симметричное отражение левого плеча относительно вертикали, проходящей через его максимум. Левое плечо второго пика (фракция II) получали как разность между оптической плотностью элюата и оптической плотностью правого плеча первой фракции при одинаковых объемах элюата. Положение максимума первого пика на всех хроматограммах близко к объему выхода голубого декстрана, поэтому средняя молекулярная масса первой фракций ФК более 5 kDa. Результаты ММР для препаратов ФК подзолистых и глееподзолистых почв показывают, что содержание низкомолекулярной фракции во всех препаратах ФК в 2,5–3 раза выше, чем высокомолекулярной (табл. 1).

Таблица 1

Средние молекулярные массы препаратов фульвокислот и их содержание (G-25, элюент – дистиллированная вода)

Горизонт, (глубина, см)	Фракция I		Фракция II	
	M, kDa	Массовая доля, %	M, kDa	Массовая доля, %
Типичная подзолистая				
A ₀ (0–5)	> 5	23,2	1,2	76,8
A ₂ (5–10)	> 5	30,4	1,6	69,6
Глееподзолистая				
A ₀ (0–5)	> 5	36,0	2,2	64,0
A _{2g} (5–10)	> 5	28,0	1,6	72,0

Сравнение ММР препаратов ФК, выделенных из глееподзолистой почвы показало, что доля низкомолекулярной фракции ФК равномерно увеличивается вниз по профилю. В органогенных горизонтах за счет деятельности микроорганизмов происходит деструкция растительных остатков с последующим образованием гуминовых веществ, из которых легкорастворимые в воде низкомолекулярные фракции ФК мигрируют вниз по профилю почвы, что приводит, соответственно, к увеличению их относительного содержания в подзолистом горизонте по сравнению с высокомолекулярной фракцией ФК. По профилю типичной подзолистой почвы содержание низкомолекулярной фракции ФК уменьшается, что, по-видимому, связано с относительным ослаблением массообмена между горизонтами вследствие меньшего увлажнения. Сопоставление ММР ФК типичной подзолистой и глееподзолистой почв показывает, что в подстилочном горизонте A₀ типичной подзолистой почвы доля низкомолекулярной фракции

несколько выше, чем в глееподзолистой почве, а в нижележащем подзолистом горизонте относительное содержание фракций практически совпадает. Данный факт может быть объяснен спецификой растительного опада, гидротермическими и микробиологическими особенностями формирования фульвокислот в исследуемых почвах.

Для выявления особенностей ММР препаратов ГК из верхних генетических горизонтов подзолистых, торфянисто-подзолистых поверхностно-оглеенных и пахотных подзолистых почв были выделены препараты ГК и сняты их хроматограммы на геле G-100 (рис. 2).

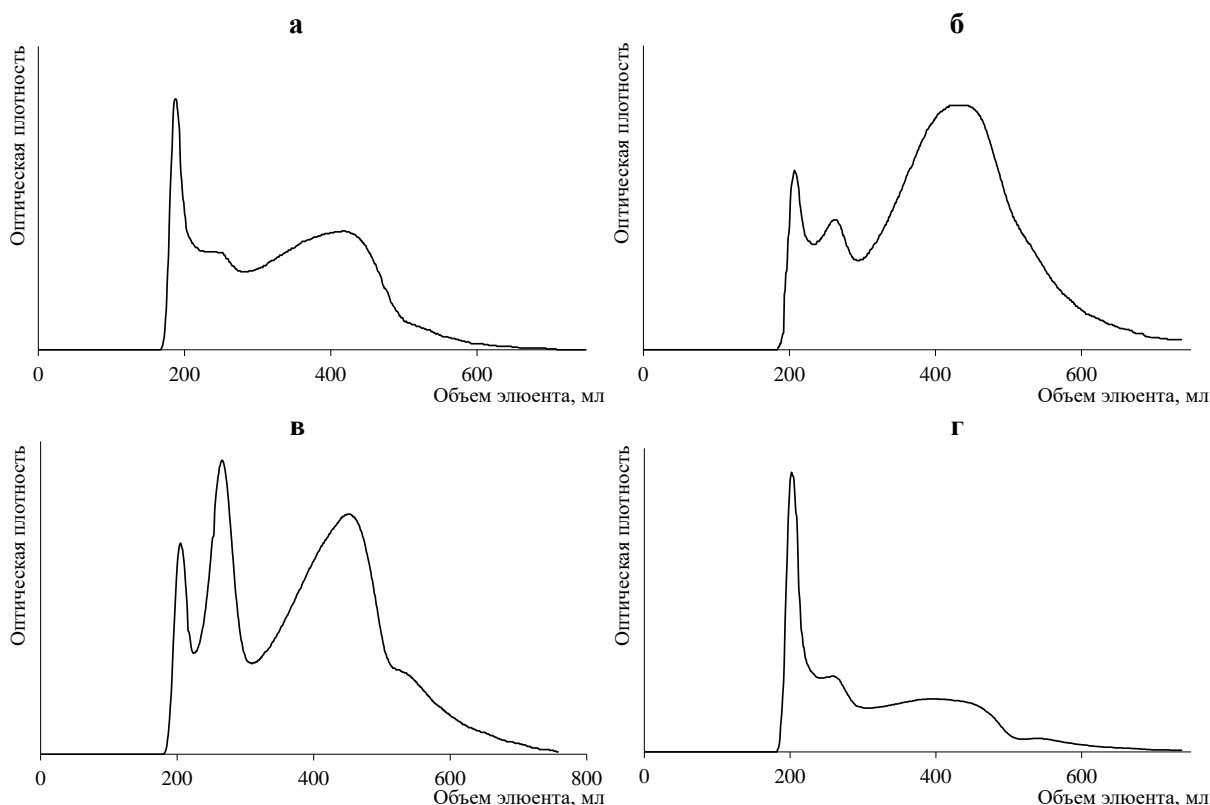


Рисунок 2. Гель-хроматограммы препаратов ГК из типичной подзолистой (а – гор. A_0 , б – A_2), торфянисто-подзолисто-глеевой (в – гор. A_2hg) и пахотной подзолистой (г – $A_{пах}$) почвы на геле сефадекс G-100. Элюент – Tris-HCl-буфер

Гель-хроматограммы ГК из горизонтов A_0 и A_2 типичной подзолистой почвы имеют три максимума, соответствующие трем фракциям ГК. Положения пиков практически совпадают, а их площади разные, что свидетельствует не только о равенстве средних молекулярных масс соответствующих фракций, но и об их различном относительном содержании в исследуемых образцах (табл. 2). Для гуминовых кислот из обоих горизонтов (A_0 и A_2) типичной подзолистой почвы характерно высокое содержание (60–70%) низкомолекулярной фракции ГК с молекулярными массами 16–17 kDa, доли средних фракций (80 kDa) практически совпадают (16–17%), а доля высокомолекулярных фракций (> 150 kDa) в верхнем горизонте A_0 в 1,5–2 раза выше, чем в горизонте A_2 . На наш взгляд, различие объясняется тем, что в ГК подстилочного горизонта A_0 относительно велика доля прогуминовых кислот. ГК из торфянисто-подзолистой поверхностно-оглеенной почвы отличаются от ГК подзолистой почвы относительно высоким содержанием фракции с молекулярной массой 73 kDa, что свидетельствует о низкой биологической активности гидроморфных болотно-подзолистых почв, по сравнению с автоморфными подзолистыми. Это приводит к накоплению средней фракции ГК, представленной слабогумифицированными соединениями.

При сравнении данных о ММР препаратов ГК из целинных и пахотных подзолистых почв, следует отметить резкое увеличение доли высокомолекулярной фракции ГК в пахотной почве – в 2–4 раза. Это объясняется тем, что при сельскохозяйственном освоении и использовании резко меняется природа поступающих растительных остатков по сравнению с целинными аналогами, а также вносятся органические удобрения (торфо-навозные компосты), чьи гумусовые вещества обогащены новообразованными ГК, возникающими за счет окисления растительных остатков. Кроме того, освоение почв усиливает микробиологическую активность, что в свою очередь

приводит к усилению процессов гумификации и образованию более зрелых, биотермодинамически устойчивых ГК, имеющих большую молекулярную массу и обеспечивающих плодородие почв.

Таблица 2

Средние молекулярные массы фракций препаратов гуминовых кислот и их относительное содержание (G-100, элюент – Tris-HCl-буфер, pH = 8,2)

Горизонт (глубина, см)	Фракция I		Фракция II		Фракция III	
	М, kDa	Массовая доля, %	М, kDa	Массовая доля, %	М, kDa	Массовая доля, %
Типичная подзолистая						
A ₀ (0–5)	>150	21,3	80,2	15,8	16,7	62,9
A ₂ (5–10)	>150	13,0	80,2	17,4	16,4	69,6
Торфянисто-подзолистая поверхностно-оглеенная						
A _{2hg} (12–20)	>150	9,8	73,2	26,8	13,4	63,4
Пахотная подзолистая						
A _{пах} (0–30)	>150	40,0	78,7	13,5	22,8	46,5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования ММР препаратов ГВ. Установлено, что ГК содержат три фракции с разной молекулярной массой: ≥ 150 kDa, 73–80 kDa и 13–23 kDa; ФК – две фракции: ≥ 5 kDa, 1–2 kDa. Невысокая молекулярная масса ФК, в совокупности с большим количеством кислородсодержащих функциональных групп, способствует их лучшей растворимости и миграционной способности в почвах. ГК автоморфных почв характеризуются высоким содержанием низкомолекулярных фракций, а доля высокомолекулярной фракции в ГК подстилки в 1,5–2,0 раза выше, чем в ГК подзолистого горизонта, что, возможно, обусловлено миграцией низкомолекулярной фракции вниз по профилю. Высокая доля кислой низкомолекулярной фракции в подзолистом горизонте способствует разложению почвенных минералов и их вымыванию в иллювиальный горизонт.

Оценено влияние сельскохозяйственного использования почв на фракционный состав гумусовых соединений. Отмечено резкое увеличение доли высокомолекулярной фракции в препаратах ГК пахотной подзолистой почвы – в 2–4 раза по сравнению с ГК целинных подзолистых почв, что обусловлено окультуренностью пахотного горизонта, природой поступающих растительных остатков и повышенной микробиологической активностью освоенных почв.

Установлено влияние кислотности среды на характер хроматограмм препаратов ФК, выделенных из основных типов почв Республики Коми. Показано, что в области высоких значений pH элюента (9–13) отсутствие фракционирования связано с ассоциацией ФК, изменением их конформации и эффектом “сверх-эксклюзии”. Элюирование дистиллированной водой (pH=6,5) позволяет проводить разделение ФК на две фракции с молекулярными массами ≥ 5 kDa и 1–2 kDa.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (№ Гр. АААА-А17-117122290011-5).

ЛИТЕРАТУРА

1. Безносиков В.А., Лодыгин Е.Д. Высокомолекулярные органические соединения в почвах // *Известия Коми Научного Центра УрО РАН*. 2010. № 1. С. 24–30.
2. Варшал Г.М., Инцирвели Л.Н., Сироткина И.С., Колосов И.В. Об ассоциации фульвокислот в водных растворах // *Геохимия*. 1975. № 10. С. 1581–1585.
3. Василевич Р.С., Вежов К.С., Лодыгин Е.Д. Молекулярно-массовое распределение гуминовых кислот мерзлотных бугристых торфяников Европейского Севера-Востока России // *Известия Томского*

- политехнического университета. *Инжиниринг георесурсов*. 2019. Т. 330. № 8. С. 146–154. doi: [10.18799/24131830/2019/8/2220](https://doi.org/10.18799/24131830/2019/8/2220)
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991. 544 с.
5. Кононова М.М., Бельчикова Н.П. Ускоренные методы определения состава гумуса минеральных почв // *Почвоведение*. 1961. № 10. С. 75–87.
6. Лодыгин Е.Д., Безносиков В.А. Изучение молекулярной структуры гумусовых кислот подзолистых и болотно-подзолистых почв методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии // *Почвоведение*. 2003. № 9. С. 1085–1094.
7. Орлов Д.С. *Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации*. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 325 с.
8. Першина И.В., Вермул В.М., Поленова Т.В., Иванова Е.К. Исследование ММР и спектральных характеристик ФК природных вод // *Вестник МГУ*. 1989. Т. 30. № 2. С. 176–181.
9. Сироткина И.С., Варшал Г.М., Лурье Ю.Ю., Степанова Н.П. Применение целлюлозных сорбентов и сефадексов в систематическом анализе органических веществ природных вод // *ЖАХ*. 1974. Т. 29. № 8. С. 1626–1633.
10. Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е. ^{13}C -ЯМР анализ компонентов гуминовой кислоты чернозема и ее фракций различного молекулярного размера и электрофоретической подвижности // *Почвоведение*. 2011. № 11. С. 311–316.
11. Dergacheva M., Fedeneva I., Bazhina N., Nekrasova O., Zenin V. Shestakovo site of Western Siberia (Russia): Pedogenic features, humic substances and paleoenvironment reconstructions for last 20-25 ka, *Quaternary International*, 2016, Vol. 420, p. 199–207. doi: [10.1016/j.quaint.2015.10.087](https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.10.087)
12. Garcia A.C., Souza L.G.A., Pereira M.G., Castro R.N., Garcia-Mina J.M., Zonta E., Lisboa F.J.G., Barbara R.L.L. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants, *Sci. Rep.*, 2006, Vol. 6, p. 20798. doi: [10.1038/srep20798](https://doi.org/10.1038/srep20798)
13. Lee Y.-K., Hur J. Using two-dimensional correlation size exclusion chromatography (2D-COSEC) to explore the size-dependent heterogeneity of humic substances for copper binding, *Environ. Pollut.*, 2017, Vol. 227, p. 490–497. doi: [10.1016/j.envpol.2017.04.099](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.099)
14. Lodygin E., Shamrikova E. Use of the pK spectroscopy method in the study of protolytic properties of humic substances and other soil polyelectrolytes, *Agronomy*, 2021, Vol. 11, No. 6, Art. No. 1051. doi: [10.3390/agronomy11061051](https://doi.org/10.3390/agronomy11061051)
15. Lodygin E., Vasilevich R. Molecular-mass distribution of humic substances from Arctic soils according to size exclusion chromatography, *Polish Polar Res*, 2020, Vol. 41, No. 4, p. 271–287. doi: [10.24425/ppr.2020.134792](https://doi.org/10.24425/ppr.2020.134792)
16. Olaetxea M., De Hita D., Garcia A., Fuentes M., Baigorri R., Mora V., Garica M., Urrutia O., Erro J., Zamarreño A.M., Barbara R.L., Garcia-Mina J.M. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot growth, *Appl. Soil. Eco.*, 2018, Vol. 123, p. 521–537. doi: [10.1016/J.APSSOIL.2017.06.007](https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2017.06.007)
17. Olk D.C., Bloom P.R., Perdue E.M., McKnight D.M., Chen Y., Farenhorst A., Senesi N., Chin Y.-P., Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N., Harir M. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters, *J. Environ. Qua.*, 2019, Vol. 48, No. 2, p. 217–232. doi: [10.2134/jeq2019.02.0041er](https://doi.org/10.2134/jeq2019.02.0041er)
18. Perminova I.V., Hatfield K. *Remediation chemistry of humic substances: theory and implications for technology*, Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. NATO Science Series (Series IV: Earth and Environmental Series), Vol. 52, Dordrecht: Springer, 2005, p. 30–36. doi: [10.1007/1-4020-3252-8_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-3252-8_1)
19. Piccolo A. *The supramolecular structure of humic substances*, *Soil Sci.*, 2001, Vol. 166, No. 11, p. 810–832.
20. Piccolo A., Riccardo S., Savy D., Drosos M., Cozzolino V. *The soil humeome: chemical structure, functions and technological perspectives* Sustainable Agrochemistry. Cham: Springer, 2019. doi: [10.1007/978-3-030-17891-8_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17891-8_7)
21. Saiz-Jimenez C., Hermosin B., Trubetskaya O.E., Reznikova O.I., Afanas'eva G.V., Trubetskoj O.A. Thermochemolysis of genetically different soil humic acids and their fractions obtained by tandem SEC–PAGE, *Geoderma*, 2006, Vol. 131, No. 1–2, p. 22–32. doi: [10.1016/J.GEODERMA.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2005.03.001)
22. Schulten H.R., Schnitzer M. A State of the art structural concept for humic substances, *Naturwissenschaften*, 1993, Vol. 80, No.1, p. 29–30. doi: [10.1007/BF01139754](https://doi.org/10.1007/BF01139754)
23. Trubetskoj O.A., Hatcher P.G., Trubetskaya O.E. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopy of chernozem soil humic acid fractionated by combined size-exclusion chromatography and electrophoresis, *Chem. Ecol.*, 2010, Vol. 26, No. 4, p. 315–325. doi: [10.1080/02757541003785825](https://doi.org/10.1080/02757541003785825)

Поступила в редакцию 23.12.2021

Принята 27.12.2021

Опубликована 30.12.2021

Сведения об авторах:

Лодыгин Евгений Дмитриевич – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела почвоведения Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, Россия); lodygin@ib.komisc.ru

Василевич Роман Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела почвоведения Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, Россия); vasilevich.r.s@ib.komisc.ru

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.



Статья доступна по лицензии [Creative Commons Attribution 4.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

MOLECULAR-MASS DISTRIBUTION OF HUMUS ACIDS OF TAIGA SOILS

© 2021 E. D. Lodygin , R. S. Vasilevich 

Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 28, Kommunisticheskaya st., Syktyvkar, Russia. E-mail: lodygin@ib.komisc.ru

Purpose of the study: *to reveal the influence of hydromorphism and agricultural use on the molecular-mass distribution (MMD) of humic (HAs) and fulvic acids (FAs) isolated from the soils of the European northeast of Russia. To assess the influence of the acidity of the medium on the MWD of FAs.*

Place and time of the event. *The studies were carried out on the territory of the middle taiga (Maksimovsky station of the Institute of Biology of the Federal Research Center of the KSC UB RAS, located 8 km west of the city of Syktyvkar and the field of the Syktyvkar state farm, 5 km south-west of Syktyvkar, on the watershed of the Sysola and Vazhel-yu rivers) and northern taiga (3 km west of the Troitsko-Pechorsk station). The objects of the study were humic substances isolated from typical podzolic (Eutric Albic Retisol (Loamic)), gleypodzolic (Eutric Albic Stagnic Retisol (Loamic)), peaty-podzolic surface-gleyed (Eutric Albic Stagnic Histic Retisol (Loamic Eutric Albic Retisol (Loamic)) soils. The soil sampling period is from 1 to 30 August 2014.*

Methodology. *Quantitative analysis of the MMD of HA and FA preparations was performed using liquid size exclusion chromatography (gel chromatography) on Sephadex G-25 and G-100 gels with continuous automatic registration of the optical density of the eluate ($\lambda = 280$ nm) in a quartz flow cell, K 9 × 60 cm column (Pharmacia, Sweden). Distilled water, 0.05 M NaOH solution, and Tris-HCl buffer with pH = 8.2 were used as the eluent.*

Main results. *Studies of the MMD of humic substances have been carried out. It was found that HAs contain three fractions with different molecular weights: ≥ 150 kDa, 73–80 kDa, and 13–23 kDa; FAs – two fractions: ≥ 5 kDa, 1–2 kDa. The low molecular weight of FAs, together with a large amount of oxygen-containing functional groups, contributes to their better solubility and migration ability in soils. The HAs of automorphic soils are characterized by a high content of low molecular weight fractions, and the proportion of the high molecular weight fraction in the HAs of the litter is 1.5–2.0 times higher than in the HAs of the podzolic horizon, which may be due to the migration of the low molecular weight fraction down the profile. The high proportion of the acidic low molecular weight fraction in the podzolic horizon promotes the decomposition of soil minerals and their leaching into the illuvial horizon. The influence of agricultural use of soils on the fractional composition of humic compounds is estimated. A sharp increase in the share of the high molecular weight fraction in the preparations of HAs of arable podzolic soil by 2–4 times compared with the HAs of virgin podzolic soils was noted, which is due to the cultivation of the arable horizon, the nature of the incoming plant residues and the increased microbiological activity of the developed soils. The effect of acidity of the medium on the character of chromatograms of FA preparations isolated from the main types of soils of the Komi Republic was studied. It has been shown that in the region of high pH values of the eluent 9–13, the absence of fractionation is associated with the association of FAs, a change in their conformation, and the effect of “over-exclusion”. Elution with distilled water (pH = 6.5) allows the separation of FAs into two fractions with molecular weights ≥ 5 kDa and 1–2 kDa.*

Key words: *humic acids; fulvic acids; polydispersity; size exclusion chromatography; podzolic; bog-podzolic; arable soil*

How to cite: *Lodygin E.D., Vasilevich R.S. Molecular-mass distribution of humus acids of taiga soils // The Journal of Soils and Environment. 2021. 4(4). e160. doi: [10.31251/pos.v4i4.160](https://doi.org/10.31251/pos.v4i4.160) (in Russian with English abstract).*

REFERENCES

1. Beznosikov V.A., Lodygin E.D. High-molecular organic compounds in soils, *News of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2010, No. 1, p. 24–30. (in Russian)
2. Varshal G.M., Intskirveli L.N., Sirotkina I.S., Kolosov I.V. Association of fulvic acids in aqueous solutions, *Geochemistry*, 1975, No. 10, p. 1581–1585. (in Russian)
3. Vasilevich R.S., Vezhov K.S., Lodygin E.D. Molecular-mass distribution of humic acids of permafrost peat mounds from the European North–East of Russia, *Bull. Tomsk Polytech. Univ. Geo Assets Eng.*, 2019, Vol. 330, No. 8, p. 146–154. doi: [10.18799/24131830/2019/8/2220](https://doi.org/10.18799/24131830/2019/8/2220)
4. Dawson R., Elliot D., Elliot W., Jones K. *Biochemist's Handbook*. Moscow: Mir Publ., 1991, 544 p. (in Russian)
5. Kononova M.M., Belchikova N.P. Accelerated methods for determining the composition of humus in mineral soils, *Eurasian Soil Sci.*, 1961, No. 10, p. 75–87. (in Russian)
6. Lodygin E.D., Beznosikov V.A. The ^{13}C NMR study of the molecular structure of humus acids from podzolic and bog-podzolic soils, *Eurasian Soil Sci.*, 2003, Vol. 36, No. 9, p. 967–975.
7. Orlov D.S. *Humic substances of soils and general theory of humification*. London: Taylor & Francis, 1995, 325 p.
8. Pershina I.V., Vermul V.M., Polenova T.V., Ivanova E.K. Investigation of MMD and spectral characteristics of PCs in natural waters, *Moscow State University Bulletin*, 1989, Vol. 30, No. 2, p. 176–181. (in Russian)
9. Sirotkina I.S., Varshal G.M., Lurie Yu.Yu., Stepanova N.P. The use of cellulose sorbents and Sephadexes in the systematic analysis of organic substances in natural waters, *Journal of Analytical Chemistry*, 1974, Vol. 29, No. 8, p. 1626–1633. (in Russian)
10. Trubetskoi O.A., Trubetskaya O.E. ^{13}C -NMR analysis of components of chernozem humic acids and their fractions with different molecular sizes and electrophoretic mobilities, *Eurasian Soil Sci.*, 2011, Vol. 44, No. 3, p. 281–285. doi: [10.1134/S1064229311030148](https://doi.org/10.1134/S1064229311030148)
11. Dergacheva M., Fedeneva I., Bazhina N., Nekrasova O., Zenin V. Shestakovo site of Western Siberia (Russia): Pedogenic features, humic substances and paleoenvironment reconstructions for last 20–25 ka, *Quatern. Int.*, 2016, Vol. 420, p. 199–207. doi: [10.1016/j.quaint.2015.10.087](https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.10.087)
12. Garcia A.C., Souza L.G.A., Pereira M.G., Castro R.N., García-Mina J.M., Zonta E., Lisboa F.J.G., Barbara R.L.L. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants, *Sci. Rep.*, 2006, Vol. 6, p. 20798. doi: [10.1038/srep20798](https://doi.org/10.1038/srep20798)
13. Lee Y.-K., Hur J. Using two-dimensional correlation size exclusion chromatography (2D-COSEC) to explore the size-dependent heterogeneity of humic substances for copper binding, *Environ. Pollut.*, 2017, Vol. 227, p. 490–497. doi: [10.1016/j.envpol.2017.04.099](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.099)
14. Lodygin E., Shamrikova E. Use of the pK spectroscopy method in the study of protolytic properties of humic substances and other soil polyelectrolytes, *Agronomy*, 2021, Vol. 11, No. 6, Art. No. 1051. doi: [10.3390/agronomy11061051](https://doi.org/10.3390/agronomy11061051)
15. Lodygin E., Vasilevich R. Molecular-mass distribution of humic substances from Arctic soils according to size exclusion chromatography, *Polish Polar Res*, 2020, Vol. 41, No. 4, p. 271–287. doi: [10.24425/ppr.2020.134792](https://doi.org/10.24425/ppr.2020.134792)
16. Olaetxea M., De Hita D., García A., Fuentes M., Baigorri R., Mora V., Garica M., Urrutia O., Erro J., Zamarreño A.M., Barbara R.L., Garcia-Mina J.M. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot growth, *Appl. Soil. Eco.*, 2018, Vol. 123, p. 521–537. doi: [10.1016/J.APSSOIL.2017.06.007](https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2017.06.007)
17. Olk D.C., Bloom P.R., Perdue E.M., McKnight D.M., Chen Y., Fahrenhorst A., Senesi N., Chin Y.-P., Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N., Harir M. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters, *J. Environ. Qua.*, 2019, Vol. 48, No. 2, p. 217–232. doi: [10.2134/jeq2019.02.0041er](https://doi.org/10.2134/jeq2019.02.0041er)
18. Perminova I.V., Hatfield K. *Remediation chemistry of humic substances: theory and implications for technology*. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. NATO Science Series (Series IV: Earth and Environmental Series), Vol. 52. Dordrecht: Springer, 2005, p. 30–36. doi: [10.1007/1-4020-3252-8_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-3252-8_1)
19. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances, *Soil Sci.*, 2001, Vol. 166, No.11, p. 810–832.
20. Piccolo A., Riccardo S., Savy D., Drosos M., Cozzolino V. *The soil humeome: chemical structure, functions and technological perspectives* Sustainable Agrochemistry. Cham: Springer, 2019. doi: [10.1007/978-3-030-17891-8_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17891-8_7)
21. Saiz-Jimenez C., Hermosin B., Trubetskaya O.E., Reznikova O.I., Afanas'eva G.V., Trubetskoy O.A. Thermochemolysis of genetically different soil humic acids and their fractions obtained by tandem SEC–PAGE, *Geoderma*, 2006, Vol. 131, No. 1–2, p. 22–32. doi: [10.1016/J.GEODERMA.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2005.03.001)
22. Schulten H.R., Schnitzer M. A State of the art structural concept for humic substances, *Naturwissenschaften*, 1993, Vol. 80, No. 1, p. 29–30. doi: [10.1007/BF01139754](https://doi.org/10.1007/BF01139754)
23. Trubetskoy O.A., Hatcher P.G., Trubetskaya O.E. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopy of chernozem soil humic acid fractionated by combined size-exclusion chromatography and electrophoresis, *Chem. Ecol.*, 2010, Vol. 26, No. 4, p. 315–325. doi: [10.1080/02757541003785825](https://doi.org/10.1080/02757541003785825)

Received 23 December 2021

Accepted 27 December 2021

Published 30 December 2021

About the author(s):

Lodygin Evgeny Dmitrievich – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher, Department of Soil Science, Institute of Biology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal Research Center of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russia); lodygin@ib.komisc.ru

Vasilevich Roman Sergeevich – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Soil Science, Institute of Biology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal Research Center of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russia); vasilevich.r.s@ib.komisc.ru

The authors read and approved the final manuscript



The article is available under [Creative Commons Attribution 4.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)