

Аминокислоты в инертном органическом веществе илистой фракции лесостепных почв и глинистых осадочных пород плиоценового комплекса

© 2015. А. А. Шинкарёв¹, д.б.н., профессор, А. А. Шинкарёв (мл.)², к.г.-м.н., доцент,
Е. С. Руселик³, н.с., Р. В. Окунев¹, аспирант, Е. В. Тарасова¹, студент,
А. С. Ерофеева¹, студент

¹Казанский федеральный университет,

²Казанский национальный исследовательский технологический университет,

³Центральный научно-исследовательский институт геологии нерудных полезных ископаемых,
e-mail: ashinkar@mail.ru, alex.shinkarev@gmail.com

Исследован аминокислотный состав органического вещества, связанного тонкодисперсными фазами почв, и плиоценовых глин в форме, устойчивой к обработке H_2O_2 . В работе использовались профильные образцы лесостепных почв и образцы бентонитоподобных глин акчагыльского яруса верхнего плиоцена. Фракцию с размером частиц <2,5 мкм выделяли методом отмучивания из устойчивой суспензии после обработки образцов 1 моль/л CH_3COOH , отмывки их дистиллированной водой с последующей многократной обработкой в течение 30–40 дней H_2O_2 (30%) при комнатной температуре. Кислотный гидролиз илистой фракции проводили 6 моль/л HCl при 110°C в течение 24 часов. Определение аминокислотного состава проводили методом ВЭЖХ. В гидролизатах инертного органического вещества обнаружены типичные белковые аминокислоты. Группировка аминокислот в кислые, основные и нейтральные показывает, что в составе инертного органического вещества практически отсутствуют кислые аминокислоты. Основная часть аминокислот представлена нейтральными. В составе нейтральных аминокислот преобладают аминокислоты, не несущие парциальных зарядов и не сольватирующиеся водой. В основе закономерностей, определяющих особенности аминокислотного состава органического вещества, связанного тонкодисперсными минеральными фазами плиоценовых глин и лесостепных почв в устойчивой к окислению форме, лежит селективное связывание нейтральных и гидрофобных аминокислот, которое обусловлено физико-химическими причинами.

We investigated the amino acid composition of organic matter bounding fine-dispersed Pliocene clays and soils mineral phases in resistant to H_2O_2 treatment forms. In this work, forest-steppe soil profile samples and bentonite-like clay samples of Upper Pliocene Akchagylic Stage were used. The <2.5- μm fraction was separated by the elutriation of a stable suspension after the treatment of the samples with 1 mol/l CH_3COOH and their washing with distilled water. Then, they were multiply treated with 30% H_2O_2 at room temperature for 30–40 days. Acid hydrolysis was performed using 1 mol/l HCl at 110°C for 24 h. Amino acids were determined by HPLC. In the acid hydrolysis products of the stable organic matter typical proteinaceous amino acids are presented. We could see that the grouping of amino acids in acidic, basic and neutral groups show that in the composition of stable organic matter there are no acidic amino acids practically. The main part of their is presented by neutral amino acids. In the neutral amino acids composition amino acids not bearing partial charges and not solvated water prevail. At the heart of mechanism which define amino acid composition features of organic matter bounding fine-dispersed Pliocene clays and forest-steppe soils mineral phases in resistant to H_2O_2 treatment forms the selective binding of neutral and hydrophobic amino acids which is caused by the physical and chemical reasons lays.

Ключевые слова: органическое вещество, окислительная деструкция, пероксид водорода, аминокислотный состав, лесостепные почвы, бентониты.

Keywords: organic matter, oxidative degradation, hydrogen peroxide, amino acid composition, forest-steppe soils, bentonites.

Введение

Механизмы органо-минеральных взаимодействий в почвах пока недостаточно изучены, и в первую очередь это относится к образованию того пула органического углерода, который в ряде моделей круговорота определяется как устойчивое к биологической атаке

инертное органическое вещество (ОВ) [1, 2]. Биохимическая деструкция ОВ в значительной степени является окислительным процессом, поэтому к перспективным химическим процедурам для препаративного отделения инертного ОВ от менее устойчивых фракций органических компонентов относят обработку почв окислителями, например, H_2O_2 , $Na_2S_2O_8$

и NaOCl [3, 4]. В ряде работ принималось [5], что такая обработка удаляет органические компоненты с поверхностей глинистых минералов, не затрагивая межслоевого пространства, и в последние годы получены экспериментальные свидетельства присутствия устойчивого к окислительной деструкции ОВ в межслоевых промежутках глинистых минералов непосредственно в почвенных условиях [6, 7]. Этот феномен может иметь прямое отношение к характеристике структурных особенностей смектитов месторождений и проявлений вторичных бентонитов в Центральной России. Однако научный поиск в этом направлении ни в почвоведении, ни в осадочной геологии до настоящего времени практически не проводился.

Главным источником монтмориллонитовых глин – бентонитов являются пласты преобразованного вулканического пепла, но в пределах Центральной России значимых месторождений подобного типа нет. В качестве альтернативных используются вторичные бентониты, отложенные в солоноватоводных или пресноводных бассейнах [8] за счёт продуктов деградации вторичных слюд при активном участии биокосных явлений. Структурные особенности глинистых минералов конкретной залежи могут быть результатом биокосных взаимодействий не только в процессе накопления осадков, но и на стадии выветривания на палеоводосборах [9], где зонами наиболее интенсивного взаимодействия ОВ с глинистыми минералами и реализации биокосных процессов являются неконсолидированные осадки и почвы. Начиная с девона, образование, разрушение, снос и переотложение материала почв или их погребение являются постоянным звеном осадочного процесса, и большая часть твёрдого речного стока представлена материалом почвенных профилей на той или иной стадии их развития [10]. Почвообразовательный процесс развивался также и на значительных территориях прибрежно-морских равнин. Развитие ландшафтов с активно протекающим почвообразованием, с большой долей вероятности, предполагается для низинных прибрежных равнин, возникших во время регрессии. При трансгрессиях обогащённый ОВ почвенный материал мог поступать в моря и накапливаться [11]. Следовательно, структурные особенности глин конкретной залежи могут иметь почвенную предысторию, а органоминеральные взаимодействия в почвах рассматриваться как звено осадочного процесса при формировании месторождений

и проявлений вторичных бентонитов в Центральной России.

Цель исследования – сравнительный анализ аминокислотного состава продуктов кислотного гидролиза, устойчивого к окислительной деструкции ОВ илистой фракции лесостепных почв, сформировавшихся на исходно вертикально однородных почвообразующих породах, и глинистых пород плиоценового комплекса с высоким содержанием смектитовой компоненты и наличием сингенетического ОВ.

Экспериментальная часть

В экспериментах с лесостепными почвами (табл. 1) использованы профильные образцы тёмно-серой лесной легкоглинистой почвы на жёлто-бурых карбонатных лёгких глинах (Алексеевский район РТ) и чернозёма выщелоченного среднемоющего тучного легкоглинистого на жёлто-бурых делювиальных карбонатных лёгких глинах (Камско-Устьинский район РТ). Исходная вертикальная однородность почвообразующих пород показана по отношениям концентраций Ti, Zr и Y [12]. В экспериментах с глинистыми осадочными породами (табл. 2) использованы бентонитоподобные глины акчагыльского яруса верхнего плиоцена, приуроченные к отложениям опреснённой лагунно-морской и пресноводной озёрно-болотной фаций, развитых в пределах Мелекесской впадины, Казанской седловины и южного купола Татарского свода.

Обработку H_2O_2 использовали как проверенный временем способ селективного удаления ОВ перед гранулометрическим и минеральным анализом глинистых пород и почв [13]. Появление новообразованной фазы оксалата кальция в пробах, содержащих карбонаты и обменный кальций, при обработке H_2O_2 хорошо известно, поэтому окислительной деструкции ОВ в образцах предшествовала обработка 0,1 моль/л раствором CH_3COOH , с последующей отмывкой деионизованной водой.

Обычная процедура удаления ОВ основана на обработке декальцированных и отмытых образцов свежими порциями водного раствора H_2O_2 без их предварительного высушивания [14]. Следует, однако, учитывать, что органические компоненты могут присутствовать и в межслоевых промежутках смектитов. Состояние предельного структурного набухания предполагает, что доступность органических компонентов в пористом объёме смектитов для молекул окислительного реагента будет опреде-

Таблица 1

Содержание органического углерода в профильных образцах лесостепных почв

Горизонт	Мощность, см	Глубина взятия образца, см	C, %
<i>Тёмно-серая лесная почва</i>			
A ₀	0–4		
A ₁	4–31	4–10	8,36
		10–20	4,78
		20–30	3,60
AB	31–45	30–40	2,50
B ₁	45–64	50–60	0,76
B ₂	64–110	80–90	0,54
BC _K	110–130	110–120	0,29
C _K	>130	140–150	0,27
<i>Чернозём выщелоченный</i>			
A _д	0–5		
A ₁	5–42	5–15	5,82
		15–25	4,68
		25–35	3,53
		35–42	2,80
AB	42–62	46–56	1,98
B ₁	62–82	65–75	1,11
B _{2K}	82–119	95–105	0,42
BC _K	119–137	125–135	0,31
C _K	>137	140–150	0,26

Таблица 2

Содержание органического углерода во фракции <10 мкм образцов плиоценовых глин, выделенной после удаления карбонатов

Номер образца	Название и местоположение объекта	C, %
18	Бехтеревское месторождение (Елабужский район РТ)	0,96
19	Муслюмкинское проявление (Чистопольский район РТ)	1,24
21		1,27
22		1,34
23	Берёзовское месторождение (Нурлатский район РТ)	1,80
24	Тарн-Варское месторождение (Нурлатский район РТ)	1,30
25	Верхне-Нурлатское месторождение (Нурлатский район РТ)	1,16
26		1,24
27		1,07
28	Апастовское месторождение (Апастовский район РТ)	1,55
30	Верхне-Табынское месторождение (Муслюмовский район РТ)	0,49
31		0,61

ляться транспортным процессом межфазного молекулярно-диффузионного переноса в межслоевом пространстве. Кинетика этого процесса может быть очень медленной, однако полноту удаления ОВ можно попытаться повысить, накладывая на кинетику внутренней диффузии кинетику гидратации путём повторения обработки окислительным реагентом после высушивания обработанного образца.

В экспериментах с окислительной деструкцией пероксидом водорода последовательность операций включала обработку образцов 0,1 моль/л раствором CH₃COOH, отмывку их деионизованной водой, многократную обработку в течение 30–40 дней 30% H₂O₂ при комнатной температуре, отделение фракции частиц со стоксовым эквивалентным диаметром <2,5 мкм (после расчётной седи-

ментации в столбе жидкости), её высушивание и гомогенизацию. Проводили несколько повторных обработок 30% H_2O_2 отдельных препаратов фракции <2,5 мкм, каждый раз после высушивания обработанной пробы.

Для сравнительных исследований из профильных образцов лесостепных почв и образцов глинистых пород выделяли фракцию <2,5 мкм методом отмучивания из устойчивой суспензии, полученной после обработки 1 моль/л CH_3COOH и ультразвуком при частоте 22 Гц без обработки 30% H_2O_2 .

Кислотный гидролиз илистой фракции проводили 6 моль/л HCl при 110°C в течение 24 ч. Гидролизат отделяли от негидролизуемого остатка центрифугированием и выпаривали при 50°C в вакууме. К сухому остатку добавляли деионизованную воду и выпаривание повторяли. Операцию повторяли трижды, после чего остаток растворяли в смеси метанола, воды и триэтиламина. Определение аминокислотного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Flexar, производства Perkin Elmer. В качестве модификатора использовали фенилизотиоцианат (Sigma Aldrich). Хроматографическая колонка Brownlee Analytical C18 размером 150×4,6 мм. Обработку результатов проводили с помощью программы «Chromera».

Содержание органического углерода определяли на СНН анализаторе PE 2400

Series II производства Perkin Elmer. Спектры отражения регистрировали на спектрофотометре V-650 производства Jasco (программное обеспечение Spectra Manager II). Цветовые характеристики определяли на спектрофотометре X-RiteColor Digital Swatchbook DTP22 производства X-Rite, Inc. (программное обеспечение X-Rite ColorPort 2.0.5).

Обработку данных проводили с использованием MS Excel.

Результаты и их обсуждение

Остаточное содержание органического углерода во фракции <2,5 мкм после одного цикла обработки 30% H_2O_2 показывает сильную (лесостепные почвы) и среднюю (плиоценовые глины) прямую корреляционную связь с содержанием органического углерода в исходных образцах. Для лесостепных почв это явление было обнаружено ранее [15].

Повторение циклов обработки фракции <2,5 мкм окислительным реагентом и высушивания обработанного образца приводит к дополнительному удалению ОВ из препаратов (рис. 1). Однако более чем двукратное повторение циклов обработки окислителем нецелесообразно, поскольку остающиеся органические компоненты явно обладают повышенной устойчивостью к окислительной деструкции.

Визуальная оценка препаратов фракции <2,5 мкм лесостепных почв и пород плиоце-

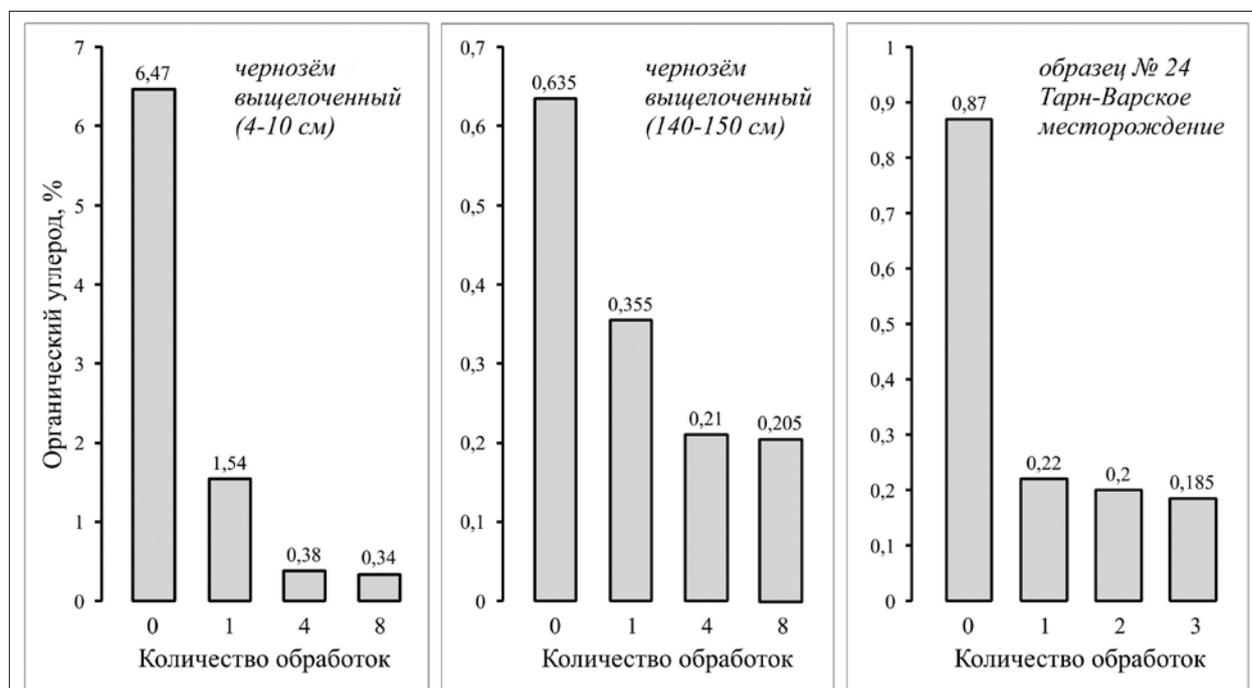


Рис. 1. Влияние повторных обработок H_2O_2 фракции <2,5 мкм образцов выщелоченного чернозёма и плиоценовой глины на содержание органического углерода.

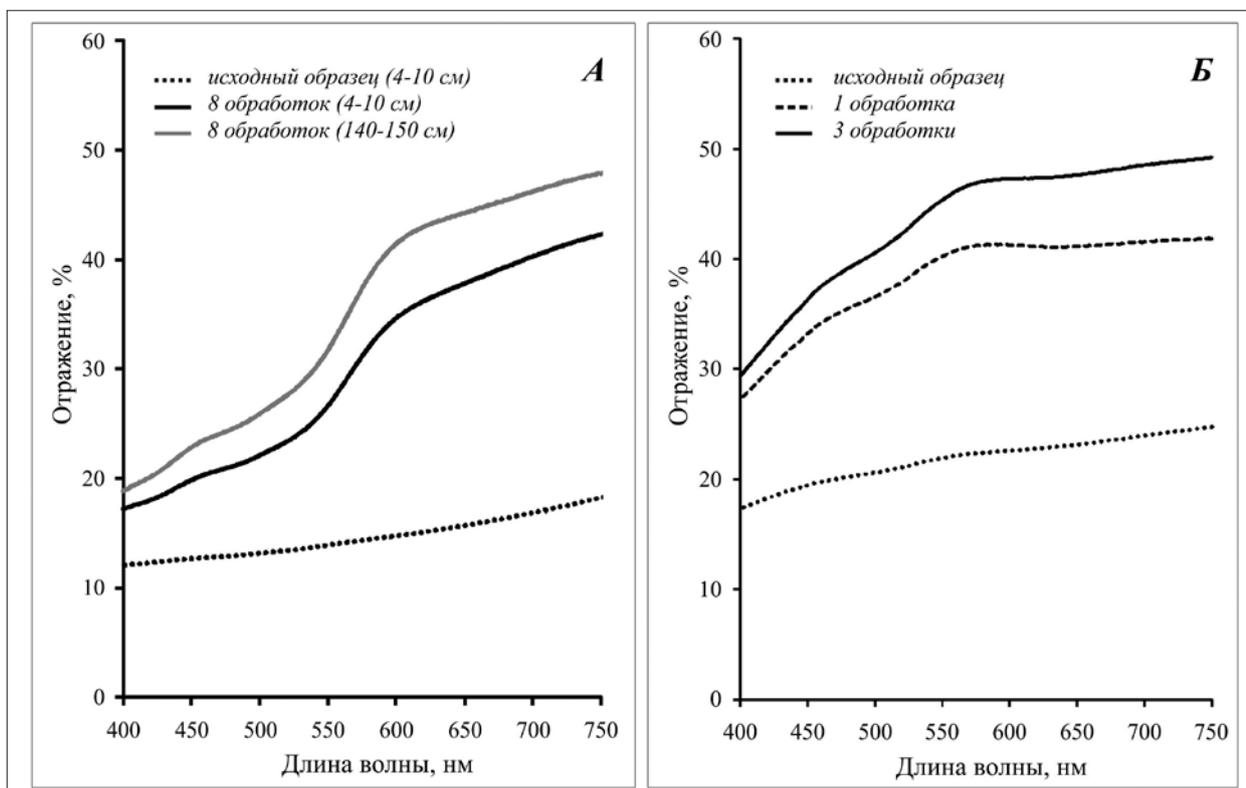


Рис. 2. Влияние повторных обработок H_2O_2 фракции <2,5 мкм образцов выщелоченного чернозёма (А) и палеоценовой глины Тарн-Барского месторождения (Б) на спектры отражения.

нового комплекса, выделенных без обработки и после обработки пероксидом водорода, показывает, что окислительная деструкция ОВ приводит к существенному осветлению окраски. По спектрам отражения в видимой области исходные образцы характеризуются регулярно увеличивающимся отражением, выражающимся в форме простой выпуклой кривой (рис. 2). Обработка окислителями приводит к сильному увеличению отражения. При этом на спектрах отражения появляются перегибы в областях 400–500 и 500–600 нм. Они вполне очевидно связаны с присутствием в образцах соединений железа (валовое содержание Fe_2O_3 в исходных образцах лесостепных почв и палеоценовых глин варьирует в интервалах 4,09–5,51% и 7,72–9,94% на прокалённую массу, соответственно), окраска которых уже в меньшей степени маскируется сингенетическим ОВ.

Численная оценка цвета в цветовом пространстве CIELAB показывает, что обработка пероксидом водорода приводит к росту значений координаты L (светлоты). Особенно чётко это проявляется для образцов из верхних слоёв лесостепных почв (рис. 3). На рисунке 4 приведены результаты сопоставления значений координаты L с содержанием органического углерода в препаратах палеоценовых глин

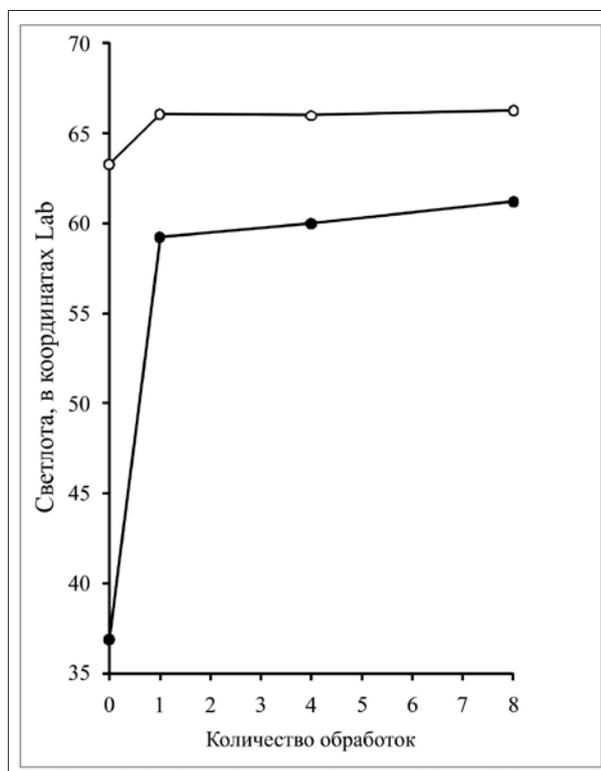


Рис. 3. Влияние повторных обработок H_2O_2 фракции <2,5 мкм образцов выщелоченного чернозёма на значения координаты L в цветовом пространстве CIELAB.

выделенных без обработки и после обработки пероксидом водорода. Для всех этих показателей расчётные значения статистики критерия Шапиро-Уилка выше критического значения для уровня значимости $\alpha = 0,05$, что позволяет использовать параметрический показатель – коэффициент корреляции Пирсона. Результаты корреляционного анализа и в том, и в другом случае показывают сильную обратную связь на уровне значимости $\alpha = 0,001$. Таким образом, можно заключить, что изменение окраски вполне однозначно связано с удалением сингенетического ОВ.

Спектры рентгеновской дифракции образцов фракции <2,5 мкм после кислотного гидролиза свидетельствуют, что обработка 6 моль/л HCl удаляет значительную часть глинистых минералов. В остатке преобладают аморфные фазы. Оставшиеся глинистые фазы, судя по рефлексу при 10Å, относятся к слюдам.

В гидролизатах инертного ОВ илистой фракции профильных образцов лесостепных почв и образцов из месторождений бентонитоподобных глин плиоценового комплекса обнаружены типичные белковые аминокислоты. Группировка аминокислот в кислые, основные и нейтральные показала, что в составе инертного ОВ лесостепных почв и плиоценовых глин практически отсутствуют кислые аминокислоты (рис. 5). Их содержание почти на порядок ниже, чем в препаратах илистой фракции, выделенных после удаления карбонатов, но без обработки 30%-ным H₂O₂. Основная часть аминокислот представлена нейтральными. В составе нейтральных аминокислот преобладают аминокислоты, не

несущие парциальных зарядов и не сольватирующиеся водой (гидрофобные). Групповые составы аминокислот инертного ОВ в илистой фракции лесостепных почв и плиоценовых глин достаточно подобны.

Установлено, что повторение последовательных циклов обработки препаратов илистой фракции лесостепных почв и плиоценовых глин 30%-ным H₂O₂ и высушивания, не приводит к удалению аминокислот из инертного ОВ. При этом основные закономерности группового состава аминокислот не претерпевают особенных изменений (табл. 3).

Результаты анализа аминокислотного состава гидролизатов ОВ препаратов илистой фракции лесостепных почв и осадочных пород получены при соблюдении полностью однотипной прописи пробоподготовки и анализа для всех сравниваемых образцов. Поэтому основные закономерности группового состава аминокислот гидролизатов инертного ОВ, полученные методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией фенилизотиоцианатом, не вызывают сомнений. Однако в процессе модификации аминокислот этим реагентом могут наблюдаться потери (по-

Таблица 3

Влияние повторных обработок илистой фракции из горизонта A₁ (слой 15–25 см) выщелоченного чернозёма окислительным реагентом на аминокислотный состав гидролизатов, в мольных %

Аминокислота	Без обработки	Один цикл обработки H ₂ O ₂	Четыре цикла обработок H ₂ O ₂
Lys	4,43	3,38	6,10
His	3,51	6,79	6,36
Arg	3,96	5,74	6,42
Основные:	11,90	15,91	18,89
Asp	6,91	0,97	0,34
Glu	13,16	2,48	1,29
Кислые:	20,06	3,46	1,62
Tre	5,58	4,33	2,11
Ser	6,32	8,96	6,11
Гидрофильные:	43,86	32,66	28,73
Pro+Ala	17,65	21,49	23,96
Gly	16,05	14,87	14,37
Val	7,89	9,46	9,50
Ile	4,19	5,29	5,44
Leu	5,42	10,80	12,08
Phe	2,23	3,19	4,05
Гидрофобные:	53,43	65,10	69,40
Tyr	2,70	2,25	1,88
Нейтральные	68,03	80,63	79,49

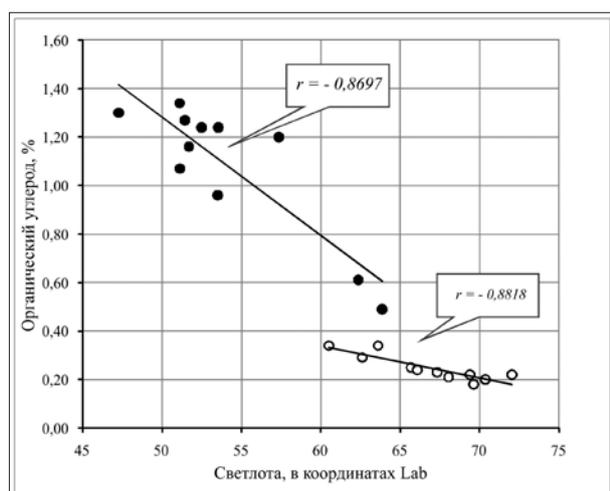


Рис. 4. Зависимость между содержанием органического углерода в образцах плиоценовых глин до (●) и после одного (○) цикла обработки H₂O₂ и значениями координаты L в цветовом пространстве CIELAB.

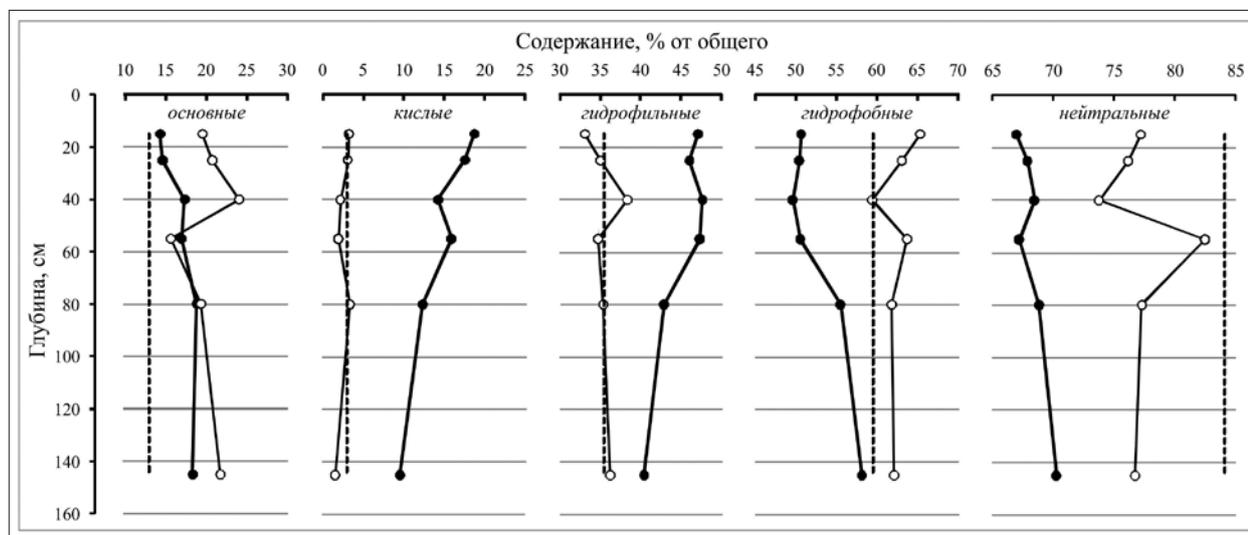


Рис. 5. Групповой состав аминокислот кислотных гидролизатов органического вещества фракции <2,5 мкм тёмно-серой лесной почвы до (●) и после одного (○) цикла обработки H₂O₂. Штриховой линией показано среднее содержание групп аминокислот в иллитовой фракции плейстоценовых глин после одного цикла обработки H₂O₂.

ниженный выход) аспарагиновой и глутаминовой кислот и матричные влияния со стороны основы пробы, которые в конечном итоге завышают или занижают результаты [16, 17]. Наиболее совершенным методом количественного анализа аминокислотного состава в настоящее время является ионообменная хроматография с шаговым градиентом pH и послеколоночной дериватизацией нингидрином. Целесообразно провести анализ аминокислотного состава гидролизатов с использованием классического аминокислотного анализатора.

Заключение

Присутствие полипептидов в составе инертного ОВ представляется маловероятным. Реалистичные объяснения, имеющие ясный физический смысл, могут быть основаны на сорбции низкомолекулярных органических компонентов на поверхностях глинистых минералов с лабильной кристаллической решёткой. Определяющими становятся сродство молекул аминокислот к фазе водного раствора и сродство их к функциональным группам минеральных поверхностей. В основе закономерностей, определяющих особенности аминокислотного состава ОВ, связанного тонкодисперсными минеральными фазами лесостепных почв в устойчивой к окислению форме лежит селективное связывание нейтральных и гидрофобных аминокислот, которое обусловлено физико-химическими причинами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-01599-а).

Литература

1. Franko U., Oelschlägel B., Schenk S. Simulation of temperature-, water- and nitrogen dynamics using the model CANDY // *Ecol. Model.* 1995. V. 81. P. 213–222.
2. Jenkinson D.S. The turnover of organic carbon and nitrogen in soil // *Philosophical Transactions of the Royal Society London Series B–Biology Sciences.* 1990. V. 329. P. 361–368.
3. Eusterhues K., Rumpel C., Kögel-Knabner I. Stabilization of soil organic matter isolated via oxidative degradation // *Org. Geochem.* 2005. V. 36. P. 1567–1575.
4. Siregar A., Kleber M., Mikutta R., Jahn R. Sodium hypochlorite oxidation reduces soil organic matter concentrations without affecting inorganic soil constituents // *Europ. J. Soil Sci.* 2005. V. 56. P. 481–490.
5. Schulten H.R., Leinweber P., Theng B.K.G. Characterization of organic matter in an interlayer clay-organic-complex from soil by pyrolysis methylation-mass spectrometry // *Geoderma.* 1996. V. 69. P. 105–118.
6. Шинкарёв А.А., Гиниятуллин К.Г., Лыгина Т.Э., Шинкарёв А.А. (мл), Кринари Г.А., Губайдуллина А.М., Латыпов М.К. Специфическая стабилизация органического вещества в органо-сметитовых комплексах и некоторые аспекты её прикладного применения // *Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований. Том IV: Экологическая безопасность, инновации и устойчивое развитие. Образование для устойчивого развития.* Казань: Изд-во «Отечество», 2009. С. 274–278.
7. Skiba M., Szczerba M., Skiba S., Bish D.L., Grybos M. The nature of interlayering in clays from a podzol (Spodosol) from the Tatra Mountains, Poland // *Geoderma.* 2011. V. 160. P. 425–433.

8. Минерогения верхнепермского и мезокайнозойского комплексов Республики Татарстан / Под ред. И.А. Ларочкиной, Е.М. Аксенова. Казань: Изд-во Казанск. ун-та, 2007. 456 с.
9. Фролов В.Т. Литология. Кн. 2. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993. 432 с.
10. Nichols G. *Sedimentology and stratigraphy*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 419 p.
11. Гаврилов Ю.О. Закономерности накопления и распределения органического вещества в осадках и осадочных породах // *Осадочные бассейны: методика изучения, строение и эволюция*. М.: Научный мир, 2004. С. 94–103.
12. Шинкарёв А.А., Корнилова А.Г., Лыгина Т.З., Гиниятуллин К.Г., Гильмутдинов Р.Р. Использование элементного анализа для оценки исходной вертикальной однородности почвообразующей породы // *Учёные записки Казанского государственного ун-та. Естеств. науки*. 2010. Т. 152. Кн. 4. С. 78–91.
13. Pansu M., Gautheyrou J. *Handbook of soil analysis. Mineralogical, organic and inorganic methods*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. 993 p.
14. Carrado K.A., Decarreau A., Petit S., Bergaya F., Lagaly G. *Synthetic clay minerals and purification of natural clays // Handbook of Clay Science. V. 1. Developments in Clay Science*. Amsterdam: Elsevier Ltd, 2006. P. 115–140.
15. Гиниятуллин К.Г., Шинкарёв (мл.) А.А., Шинкарёв А.А., Кринари Г.А., Лыгина Т.З., Губайдуллина А.М., Корнилова А.Г., Мельников Л.В. Необратимая фиксация органических компонентов в лабильных промежутках как механизм кинетической стабилизации глино-органических структур // *Почвоведение*. 2012. № 11. С. 1211–1225.
16. Gonzalez-Castro M.J., Lopez-Hernandez J., Simal-Lozano J., Oruna-Concha M.J. Determination of amino acids in green beans by derivatization with phenylisothiocyanate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *J. Chromatogr. Sci.* 1997. V. 35. P. 181–185.
17. Lai F., Mayer A., Sheehan T. Matrix effects in the derivatization of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and phenylisothiocyanate // *Biotechniques*. 1991. V. 11. P. 236–244.