

УДК 631.872:631.46

ЛИГНИНОВЫЕ ФЕНОЛЫ КАК ОСНОВА БИОПРЕПАРАТОВ

И. В. КОВАЛЕВ¹⁾, Н. О. КОВАЛЕВА¹⁾

¹⁾Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, 119991, г. Москва, Россия

Изучены содержание и состав лигнинных фенолов в растениях и почвах широтных поясов и вертикальных природных зон Северного Кавказа и Северо-Западного Тянь-Шаня. Выявлена особая роль лигнинных фенолов подземных органов растений в процессе гумификации. Показано, что при трансформации органического вещества от живых растительных тканей до гуминовых кислот почв возрастает степень окисленности биополимера. Рассчитана доля лигнинных фрагментов, остающихся неизменными при биотрансформации полимера в ряду *растительные ткани – опад – подстилки – почвы – гуминовые кислоты – погребенные гуминовые кислоты*. Продемонстрировано также, что биохимический состав растений оказывает решающее влияние на структуру гуминовых кислот почв. С помощью количественного анализа лигнинных фенолов и ¹³C-ЯМР-спектроскопии доказывается, что лигнин высших растений принимает участие в формировании как алифатических, так и ароматических частей молекул гуминовых кислот. Предложены области применения лигнинных фенолов в практике сельского хозяйства.

Ключевые слова: лигнинные фенолы; трансформация лигнина; гуминовые кислоты; биопрепараты; плодородие почв.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 17-14-01120п в рамках госзаданий Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова № 117031410017-4 и № 121040800146-3.

Образец цитирования:

Ковалев ИВ, Ковалева НО. Лигнинные фенолы как основа биопрепаратов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:29–42.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-29-42>

For citation:

Kovalev IV, Kovaleva NO. Lignin phenols as a basis for biopreparations. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:29–42. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-29-42>

Авторы:

Иван Васильевич Ковалев – доктор сельскохозяйственных наук; ведущий научный сотрудник кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения.

Наталья Олеговна Ковалева – доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией экологического почвоведения кафедры географии почв факультета почвоведения.

Authors:

Ivan V. Kovalev, doctor of science (agricultural science); leading researcher at the department of soil physics and reclamation, faculty of soil science.
kovalevmsu@mail.ru

Natalia O. Kovaleva, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of ecological soil science, department of soil geography, faculty of soil science.
natalia_kovaleva@mail.ru



LIGNIN PHENOLS AS A BASIS FOR BIOPREPARATIONS

I. V. KOVALEV^a, N. O. KOVALEVA^a

^aLomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Corresponding author: I. V. Kovalev (kovalevmsu@mail.ru)

The content and composition of lignin phenols in plants and soils of latitudinal zones and vertical natural zones of the North Caucasus and Northwest Tien Shan have been studied. The special role of lignin phenols of underground plant organs in the process of humification was revealed. It was shown that the oxidation degree of the biopolymer increases during the transformation of organic matter from living plant tissues to humic acids in soils. The fraction of lignin fragments that remain unchanged during the biotransformation of the polymer in the row *plant tissues – fall – litter – soils – humic acids – buried humic acids* is calculated. It has also been demonstrated that the biochemical composition of plants has a decisive effect on the structure of humic acids in soils. With the help of quantitative analysis of lignin phenols and ¹³C NMR spectroscopy, it is proved that lignin of higher plants is involved in the formation of humic acids, both aliphatic and aromatic parts of molecules. The areas of application of lignin phenols in the practice of agriculture and medicine are proposed.

Keywords: lignin phenols; transformation of lignin; humic acids; biomarkers; soil fertility.

Acknowledgements. We thank Russian Science Foundation for the financial support of this investigation (grant No. 17-14-01120п); state assignments of the Lomonosov Moscow State University No. 117031410017-4 and No. 121040800146-3.

Введение

Важнейшие экологические функции гуминовых веществ – физиологическая и биопротекторная – в настоящее время активно используются в прикладной области производителями и потребителями широчайшего круга гуминовых препаратов, получаемых из самых разных источников [1]. Например, гидролизный лигнин из отхода производства превратился в ценное сырье для сельского хозяйства (био-препараты и удобрения). Для этого потребовались анализ всего имеющегося материала и пересмотр отношения к лигнину [2]. Сейчас гуминовые препараты имеют исключительно широкий спектр использования – от традиционных областей применения в промышленности, растениеводстве и животноводстве до медицины и биотехнологий очистки и ремедиации загрязненных почв и ландшафтов. Так, экспериментально подтверждены возможность ассимиляции растениями готовых органических соединений, в частности гуминовых веществ и, как следствие, изменение биохимического состава растений и увеличение его энергоемкости, например рост содержания лигнина в проростках амаранта [3], хотя данная реалистичная мембранотропная гипотеза этого процесса пока не получила убедительного подтверждения.

Высокомолекулярные соединения лигнина, обладая ценными свойствами, находят широкое применение в производстве гуминовых препаратов для внесения в почву и растения. Однако понимание структуры макромолекул лигнина древесных и травянистых растений и дальнейшая их трансформация в почве все еще остаются малоизученными. Недостаточная изученность лигнина как одного из самых распространенных в биосфере биополимеров, поступающего в почву с надземной и подземной биомассой растений, была обусловлена трудностью его биохимической диагностики в почвах.

Неуклонное развитие методов тонкой биохимии почв и использование нанотехнологий в почвенных исследованиях дают возможность по-новому взглянуть на устоявшиеся научные парадигмы, в том числе теорию гумусообразования, в целях получения биопрепаратов с уникальными свойствами и разработки способов управления почвенным плодородием.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись:

- экосистемы горизонтального ряда – евразийские леса из сосны, лиственницы, кедра, ели, пихты, южнотаетжные березово-осиновые леса и агроэкосистемы, в том числе осушенные, Коломенского ополья Московской области, дубово-липовые широколиственные леса (Тульские засеки) на серых лесных почвах, березовые колки лесостепи и агроэкосистемы Брянской области на агросерых почвах и заповедник «Брянский лес», типичный чернозем (Курский биосферный заповедник), тропический лес Амазонии на красноземах (Бразилия);



• экосистемы вертикальных природных зон Тянь-Шаня – разнотравье степи на горных черноземах, можжевельниковое редколесье на горных коричневых почвах, орехово-плодовый лес на горных черно-коричневых почвах, сосновый лес и субальпийский луг на горных черноземовидных и горно-луговых субальпийских почвах и альпийский луг на горно-луговых альпийских почвах.

Поскольку результаты, получаемые общепринятыми методами выделения лигнина (лигнин Классона, остаточный лигнин), слишком грубы даже для растительных материалов и чрезвычайно завышены для образцов подстилки и почвы, была использована методика Ертеля и Хеджеса [4] в приведенной ниже модификации Амелунга [5; 6]. Определение лигнина в почвах включало щелочное окисление образца оксидом меди при 170 °С под давлением в азотной среде, осаждение гуминовых кислот, концентрацию фенольных продуктов под давлением на компактных одноразовых колонках С18. Колонки, после того как через них пропустили образец, высушивались, а лигнин растворялся в этилацетате. Процедура эвапорирования этилацетата на ротационном испарителе позволила выделить собственно препараты лигнина. Составляющие лигнин фенолы, после предварительной дериватизации и превращения их в триметилсилиловые эфиры на газовом хроматографе с масс-спектрометром Hewlett-Packard Palo Alto (США), разделялись на пламенно-ионизационном детекторе, оборудованном капиллярной колонкой. Индивидуальные продукты реакции – ванилин, синингильный альдегид, ванилиновая, синингильная, п-кумаровая и феруловая кислоты – идентифицированы путем сравнения времени удерживания (в минутах) и пиков с известными компонентами и количествами, используемыми в качестве внешних стандартов. Площади пиков интегрируются, и окончательные результаты представляются в миллиграммах на 1 г углерода (далее – $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$). Щелочное окисление исследуемых образцов оксидом меди дало 11 фенолов, которые сгруппированы по их химической природе в три структурных семейства: ванилиновые, или гваяциловые (V), синингильные, или сиреневые (S), циннамилловые (C), включая п-кумаровые (K) и феруловые (F), фенолы. Суммарное количество продуктов окисления лигнина (VSC) отражает его общее содержание в образце.

В препаратах гуминовых кислот были сняты ^{13}C -ЯМР-спектры. Препараты гуминовых кислот выделялись из исследуемых почв трехкратной экстракцией 0,1 н. NaOH и 0,4 моль/л NaF из декальцированных 0,05 н. H_2SO_4 образцов. После отделения коллоидов центрифугированием (2500 г, 15 мин; центрифуга Beckman J6 (США)) осуществляли очистку препаратов гуминовых кислот от минеральных солей электродиализом (MWCO 12 000–14 000). Отдиализованные и высушенные вымораживанием препараты гуминовых кислот (50 мг) растворяли в 0,6 мл 0,3 моль/л NaOD/D₂O. Съемка спектров осуществлялась на ЯМР-спектрометре Bruker Avance DRX 500 (Германия) при 290 К с частотой 25,18 МГц. В 10 препаратах гуминовых кислот выполнено определение содержания лигнинных фенолов [7]. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программ *Excel 2010* и *Statistica 20.0* (StatSoft Inc., США).

Результаты и их обсуждение

Разработана и апробирована системная методология изучения биохимического круговорота продуктов окисления лигнина в различных биотах и основных типах почв (серых лесных, черноземах, красноземах и др.), в том числе почв сельскохозяйственного использования. Трансформация биополимера впервые изучена практически во всех звеньях цепи, начиная от растительных тканей и опада и заканчивая гумусовыми веществами. Предложена научная гипотеза, объясняющая генезис продуктов окисления лигнина в составе гумуса отдельных типов почв в различных природных зонах и позициях ландшафта с учетом биохимического состава растений. Изучены факторы и установлены причинно-следственные связи состава органического вещества почв (гумуса) и биохимического состава различных частей растений, выявлена особая роль лигнинных фенолов подземных органов растений в процессе гумификации. Показаны закономерности трансформации лигнина в почвах в зависимости от термодинамических условий среды и агроантропогенного использования. Раскрыты пути и механизмы стабилизации продуктов окисления лигнина на всех уровнях структурной организации почв: в геохимически сопряженных катенах, по профилю почв, в почвенных агрегатах и конкреционных новообразованиях, гранулометрических фракциях, на уровне молекулярных взаимодействий [5; 7–10].

В частности, подтверждены существующие закономерности и обнаружены три известных типа лигнина.

Во-первых, лигнин хвойных растений (мягкий древесный лигнин), содержащий ванилиновые (гваяциловые) фенолы в качестве основной структурной единицы (до $60 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ – можжевельник, до $80 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ – опад пихты). Сиреневые и циннамилловые кислоты и альдегиды в хвое практически отсутствуют, и отношение синингильных фенолов к ванилиновым (S/V) близко к нулю. Впервые установлен химический состав лигнина из тканей можжевельника. Соотношение V : S : C в нем составило 41 : 1 : 2 [8; 9].



Во-вторых, лигнин лиственных деревьев (тяжелый древесный лигнин), преимущественно состоящий из примерно равного количества ванилиновых (гваяциловых) и сиригилловых (сиреневых) структур [8; 9]. При этом лигнин тканей лиственных пород горных лесов Кавказа (бук, каштан) почти не отличается от лигнина листвы пород умеренного пояса и орехово-плодового горного леса Тянь-Шаня и имеет действительно близкие количества ванилиновых и сиригилловых фенолов. Содержание циннамиловых (п-кумаровых и феруловых) фенолов близко к нулю. В мелколиственных породах умеренного пояса композиционные соотношения составили 4 : 4 : 1; 2 : 1 : 1, а в тканях широколиственных растений – 8 : 2 : 1. Отсутствие кумаровых и феруловых фенолов и нехарактерные для широколиственных пород следовые количества сиреневого альдегида обнаруживают опад тропических древесных растений Амазонии, п-кумаровые кислоты отсутствуют и в древесине хвойных растений – сосны и можжевельника.

В-третьих, лигнин травянистых растений, которым присуще наибольшее количество циннамиловых структурных единиц: их содержание в степных и луговых злаках и разнотравье возрастает до 20–30 мг · г⁻¹ C_{орг}, что в 4–6 раз больше, чем у древесных растений. Феруловые кислоты ассоциированы главным образом с гемицеллюлозами в клеточных стенках волокон злаков [8; 9].

Таким образом, полученные данные не противоречат известным закономерностям формирования обсуждаемого биополимера в природе [11] и подтверждают существование трех групп источников лигнина в почве. Первая группа – хвоя и древесина хвойных пород с ванилиновыми (гваяциловыми) фенолами в качестве основной структурной единицы, вторая группа – недревесные ткани лиственных деревьев, состоящие из ванилиновых и сиригилловых фенолов, третья группа – травы, содержащие не только ванилиновые (гваяциловые) и сиригилловые, но и кумаровые и феруловые фенолы, последние преимущественно сосредоточены в тканях злаков. Окисление и хроматографическое разделение биополимеров лигнина на простые фенолы позволяют получить информацию о типах растительных тканей. Кроме того, параметр S/V может использоваться для разделения тканей голосеменных и покрытосеменных растений, а параметр C/V (отношение циннамиловых фенолов к ванилиновым) – для разделения органического вещества древесного и недревесного происхождения. Тип растительных тканей изначально создает неравные условия для превращения ароматических компонентов растительного происхождения в ароматические соединения почв.

Лигнин (VSC) в подстилках, ветоши. Выделение продуктов окисления лигнина из подстилок разных типов растительных ассоциаций показало, что различия лигниновых параметров в них менее контрастны, а содержание лигнина значительно ниже, чем в живых растительных тканях.

Минимальное содержание лигнина отмечено для горизонтов F и H подстилок елового (3,06 мг · г⁻¹ C_{орг}), кедрового (3,08 мг · г⁻¹ C_{орг}) [8], осинового (4 мг на 100 г почвы) и букового (6,5 мг на 100 г почвы) лесов. Максимальные запасы лигнина обнаружены в высокогорных экосистемах можжевельного редколесья (491 мг на 100 г почвы) и пихтового леса (186 мг на 100 г почвы). Березовые криволесья (26 мг на 100 г), орехово-плодовый (53 мг на 100 г) и сосновый (42 мг на 100 г) леса отличаются средним содержанием лигнина в подстилках. Хотя композиционно подстилки повторяют присущие живым тканям закономерности: подстилки хвойных пород характеризуются накоплением ванилиновых (гваяциловых) фенолов – до 33 мг · г⁻¹ C_{орг} под кроной можжевельника – и сохраняют тенденцию к меньшему содержанию сиригилловых и циннамиловых (п-кумаровых и феруловых) структур (табл. 1).

Таблица 1

Содержание лигнина, лигниновые параметры
в горизонтах F и H лесных подстилок хвойных пород

Table 1

Lignin content, lignin parameters
in the F and H horizons of coniferous forest litters

Экосистема	Лигнин (VSC)*, мг · г ⁻¹ C _{орг}	V	S	C	S/V	C/V	K/F	V : S : C
Еловый лес	3,06 ± 0,08	1,24	1,14	0,68	0,92	0,55	0	2 : 1 : 1
Сосновый лес	13,70 ± 2,34	6,77	3,73	3,19	0,55	1,47	1,13	2 : 1 : 1
Кедровый лес	3,08 ± 0,67	1,47	0	1,11	0	0,83	0,70	1 : 0 : 1
Лиственный лес	9,71 ± 2,11	3,75	2,15	3,22	0,73	0,86	0,66	2 : 1 : 1
Пихтовый лес	5,77 ± 0,23	3,45	1,57	0,75	0,46	0,22	0	5 : 2 : 1
Тропический лес	7,79 ± 3,12	3,94	3,78	0,22	0,96	0,06	0,44	1 : 1 : 0
Можжевельный лес: под кроной	62,56 ± 5,67	32,70	18,83	11,06	0,58	0,32	0,68	3 : 2 : 1
на поляне	12,86 ± 1,99	5,70	5,72	1,64	1,00	0,29	0,70	4 : 4 : 1

Примечание. * – среднее значение плюс-минус стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 4-5$); K/F – отношение кумаровых кислот к феруловым.



Подстилки лиственных пород имеют примерно равные соотношения ванилиновых и сиригильовых фенолов и меньшее, по сравнению с кумаровыми, количество феруловых кислот ($V : S : C = 4 : 4 : 1$; $2 : 1 : 1$) (табл. 2). Значительное уменьшение продуктов окисления лигнина (VSC) характерно для буково-грабово-каштанового опада (с $10,4$ до $2,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$), опада в березовой (с $24,5$ до $10,9 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$) и осиновой (с $9,3$ до $1,6 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$) рощах.

Таблица 2

Содержание лигнина, лигниновые параметры
в горизонтах F и H лесных подстилок лиственных пород

Table 2

Lignin content, lignin parameters
in the F and H horizons of forest litters of deciduous species

Экосистема	Лигнин (VSC)*, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$	V	S	C	S/V	C/V	K/F	V : S : C
Орехово-плодовый лес	$9,10 \pm 1,02$	4,33	3,74	1,03	0,86	0,24	0,72	4 : 4 : 1
Буково-грабово-каштановый лес	$2,16 \pm 0,06$	0,71	0,73	0,17	0,58	0,17	0	4 : 4 : 1
Осиновая роща	$1,58 \pm 0,32$	0,74	0,47	0,46	0,50	0,62	2,08	2 : 1 : 1
Березовая роща	$10,87 \pm 0,21$	7,54	1,95	1,78	0,53	0,23	0,83	4 : 1 : 1

*Среднее значение плюс-минус стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 4$).

В то же время слои войлока и ветоши травянистых растений демонстрируют отчетливое накопление циннамиловых фенолов и особенно феруловых кислот (параметр $K/F < 1$), причем в слоях ветоши это ярко выражено (до $21,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$) (табл. 3).

Таблица 3

Содержание лигнина, лигниновые параметры
в войлоке, ветоши травянистых экосистем

Table 3

Lignin content, lignin parameters in fall of herbaceous ecosystems

Экосистема	Войлок или ветошь	Лигнин (VSC)*, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$	V	S	C	S/V	C/V	K/F	V : S : C
Ткани злаков									
Степь	Войлок	$10,12 \pm 2,67$	4,17	4,31	4,63	1,03	1,11	0,39	1 : 1 : 1
Субальпийский луг	Ветошь	$26,47 \pm 4,11$	5,70	5,72	15,05	1,00	2,64	0,70	1 : 1 : 3
Культурные злаки	Ветошь	$10,85 \pm 0,98$	4,59	4,36	4,90	0,95	1,07	0,96	1 : 1 : 1
Ткани разнотравья									
Степь	Войлок	$13,06 \pm 1,12$	5,71	5,72	5,64	1,00	0,29	0,69	1 : 1 : 1
Альпийский луг	Ветошь	$81,68 \pm 5,34$	21,24	38,39	22,05	2,73	0,77	1,08	1 : 2 : 1

*Среднее значение плюс-минус стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 5-6$).

Таким образом, природа растительных тканей в горизонтах подстилок отчетливо диагностируется.

Лигнин (VSC) в корнях растений. В ходе исследования обнаружено, что наибольшее содержание лигниновых фенолов свойственно не надземным, а подземным тканям растений. Во всех случаях, будь то древесный или травянистый растительный покров, преобладает лигнин корней (до $66 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ в древесине корней можжевельника и до 46 и $49 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ в корнях злаков на глубине $0-30$ и $30-60$ см соответственно) [8]. Коэффициент корреляции между содержанием лигнина в почве и биомассой корней составил $0,92-0,99$ ($p < 0,05$).

Наибольший вклад корневого лигнина отмечен в луговых экосистемах, особенно в степных сообществах со значительным преобладанием подземной биомассы над надземной, где отношение подземных органов к надземным достигает 20 (рис. 1, а, б). В лесных экосистемах это отношение значительно ниже – $3-7$ (см. рис. 1, в).

Наименьшая роль корней в круговороте лигнина обнаружена в агроантропогенных экосистемах (рис. 2) с равными долями надземной и подземной биомассы ($П/Н \approx 1$). Соотношения лигниновых фенолов в корневой биомассе повторяют закономерности, свойственные надземным органам.

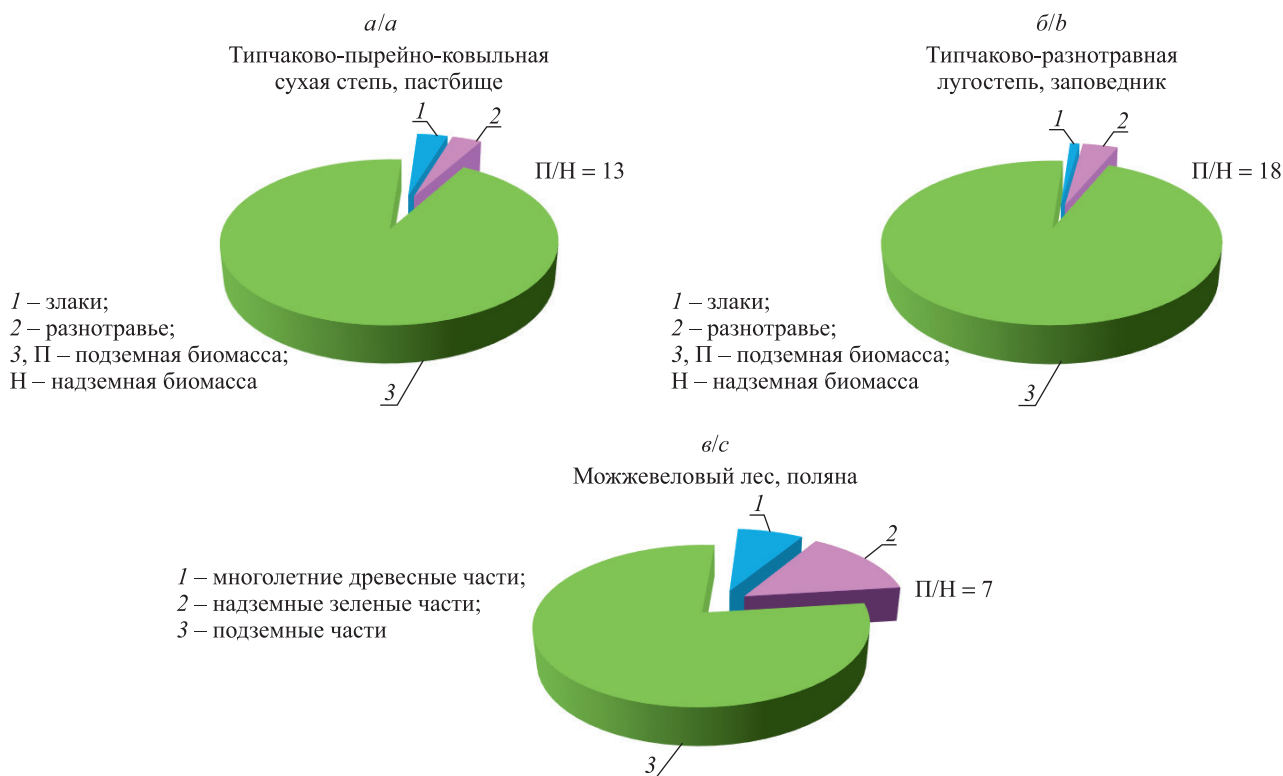


Рис. 1. Структура биомассы растительных сообществ ($r = 0,92-0,99$; $p < 0,05$):
а – степная экосистема; б – луговая экосистема; в – лесная экосистема

Fig. 1. The structure of the biomass of plant communities ($r = 0,92-0,99$; $p < 0,05$):
а – steppe ecosystem; б – meadow ecosystem; в – forest ecosystem

Условия разложения лигнина в почве. Дальнейшие превращения полимера в почвах определяются гидротермическими условиями среды и физико-химическими свойствами почв, активностью микробиоты, способной продуцировать различные лигнинпероксидазы, Мп-пероксидазы, фенолоксидазы, лакказы и разрушать лигнин [12]. В результате совместных действий смешанных микробных популяций достигается синергетический эффект трансформации лигниновых структур, прежде всего имеют место реакции расщепления и деструкции боковых цепочек биополимера.

Для характеристики интенсивности разложения и трансформации лигнина в почвах используется отношение кислот к альдегидам в единицах ванилина или сирингила как мера степени окисленности молекулы [5; 6; 13]. Этот параметр применяется в расчете степени измененности боковых цепочек по сравнению с исходной растительной тканью. Дж. Эртель и Дж. Хеджес [4] убедительно показали, что с увеличением степени разложенности лигнина возрастает количество ароматических кислот по отношению к количеству ароматических альдегидов, и разработали формулу для расчета степени измененности боковых цепочек биополимера (параметр Т, %):

$$T = 74 - (100 - K)(1 + (Ac/Al)_v)^{-1},$$

где $(Ac/Al)_v$ – отношение ванилиновых кислот к ванилиновым альдегидам; K – содержание кетонов в исходных растительных тканях, %.

Высокая цифра выхода продуктов окисления лигнина (VSC) и низкие величины отношения кислот к альдегидам в подстилках и гумусовых горизонтах почв гумидных ландшафтов являются закономерным следствием пока слабого изменения растительных остатков, а значит, слабой трансформации боковых цепочек ароматических структур лигнина в органическом веществе почв.

На основании многочисленных данных о содержании лигнина и его трансформации в почвах широтной зональности показана линейная зависимость увеличения степени измененности боковых цепочек лигниновых структур в ряду от светло-серых почв к черноземам и красноземам (рис. 3). Так, в почвах южной тайги она составляет 5–8 %, в лесостепи – 9–10 %, в черноземах – 10–12 %, достигая максимальных значений в красноземах – до 30–50 %, т. е. фактически следует за величиной периода биологической активности (ПБА). Невысокие значения степени измененности боковых цепочек лигниновых структур по сравнению с исходной растительной тканью, типичные для светло-серых почв Московской области, по-видимому, являются прямым отражением механизма (действия) встраивания неизменных фенольных структур в молекулу гуминовых кислот.

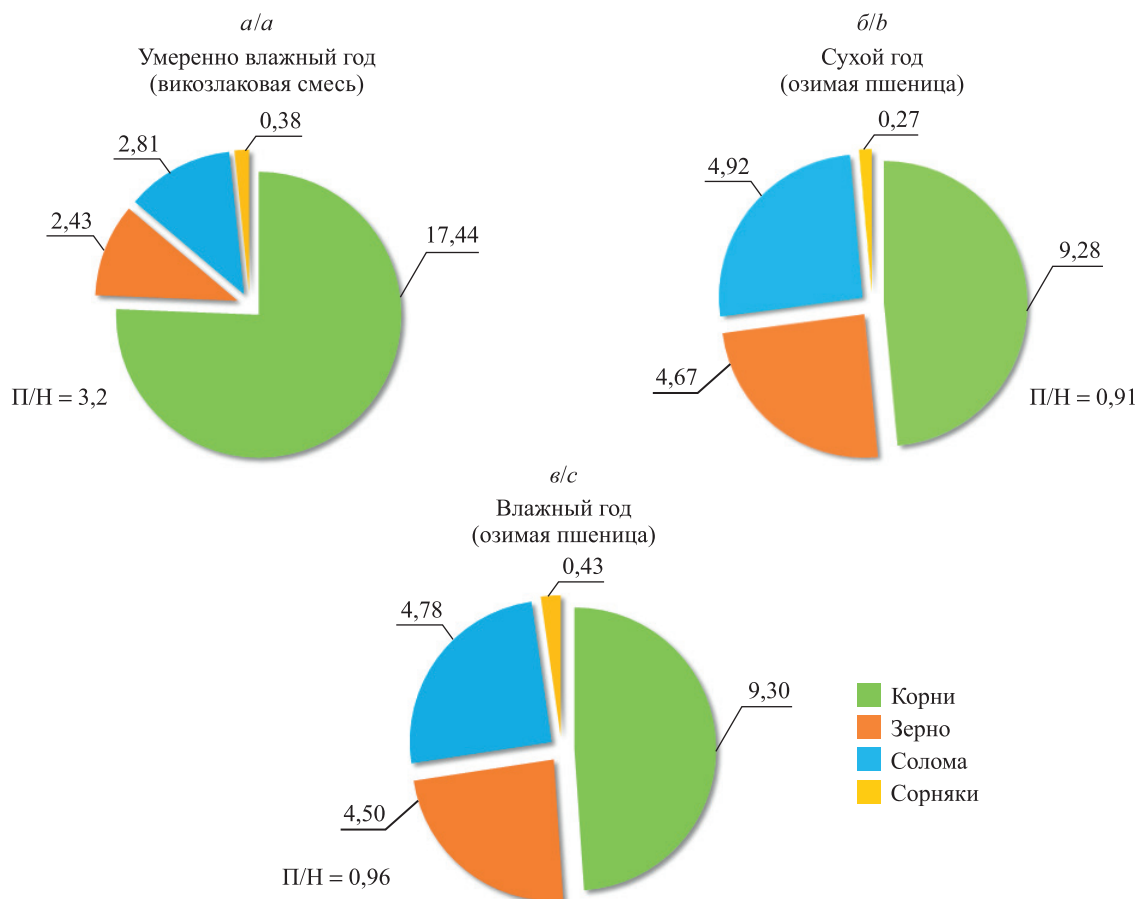


Рис. 2. Структура биомассы растительных сообществ ($r = 0,96-0,97$; $p < 0,05$) агроантропогенной экосистемы, т/га
Fig. 2. The biomass structure of plant communities ($r = 0,96-0,97$; $p < 0,05$) of the agro-anthropogenic ecosystem, t/ha

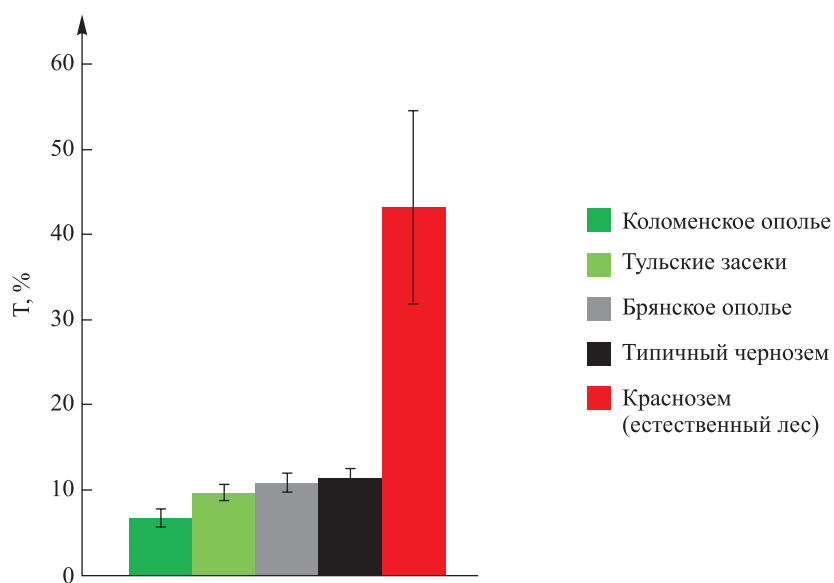


Рис. 3. Диаграмма степени измененности боковых цепочек лигнина по отношению к исходным растительным тканям (Т) в почвах широтной зональности. «Усы» обозначают стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 4-8$)

Fig. 3. The diagram of the change degree in the side chains of lignin in relation to the original plant tissues (T) in the soils of latitudinal zones. «Mustache» denotes standart deviation ($p < 0,05$; $n = 4-8$)



Линейная зависимость степени трансформации лигнина от гидротермических условий хорошо проявляется и в горных экосистемах. Например, в гумидных условиях Северного Кавказа степень измененности боковых цепочек лигнина составляет 5 % для чернозема и 1,5 % для субальпийских почв, в аридных условиях Средней Азии – 20–25 % для горного чернозема и 3 % для альпийских луговых почв [9].

Лигниновые фенолы как структурные фрагменты гуминовых кислот. В целом гуминовые кислоты по содержанию продуктов окисления лигнина и лигниновым параметрам (табл. 4) похожи на образцы почв, наследуют характерные свойства растительных тканей, но демонстрируют бóльшую упорядоченность структурных фрагментов лигнина. Пропорции ванилиновых, сиригилловых и циннамиловых фенолов в них оказались одинаковыми для разных типов травянистых экосистем (1 : 1 : 1 – от степи до субальпийского луга) и характеризуют, как показано выше, ткани травянистых растений. Композиционные отношения 3 : 4 : 1 свойственны гуминовым кислотам из горизонтов коричневой почвы можжевельного леса и отражают свойства растительных тканей можжевельника.

Таблица 4

**Продукты окисления лигнина в препаратах
гуминовых кислот, выделенных из различных типов почв**

Table 4

**Lignin oxidation products in preparations
of humic acids isolated from different types of soils**

Почва	Горизонт, глубина, см	Лигнин (VSC), мг · г ⁻¹ C _{орг}	V	S	C	V : S : C
Светло-серая	Ap, 0–20	2,37	1,08	1,21	0,89	1 : 1 : 1
Чернозем	A, 12–38	3,32	0,73	0,95	1,65	1 : 1 : 2
Горно-луговая черноземовидная	A, 0–23	5,10	1,48	1,93	1,70	1 : 1 : 1
Горно-луговая субальпийская	A, 5–35	3,66	1,59	0,56	0,75	2 : 1 : 1
Коричневая (можжевельный лес)	A, 4–34	1,83	0,85	0,90	0,24	3 : 4 : 1
Горно-луговая альпийская	A, 3–20	2,06	0,55	0,77	0,74	1 : 1 : 1

Из представленных в табл. 5 и на рис. 4 данных также следует, что с увеличением степени трансформации лигнина в ряду *растительные ткани – опад – подстилка – почвы – гуминовые кислоты – погребенные гуминовые кислоты* возрастает количество ароматических кислот по отношению к количеству альдегидов во всех типах объектов, независимо от общего содержания лигнина в них, и достигает максимума в препаратах гуминовых кислот из погребенных почв. Гуминовые кислоты, по сравнению с почвами, дают более кислую фенольную смесь: отношения кислот к альдегидам в препаратах гуминовых кислот превышают аналогичные отношения в экстрактах из почв. Тем самым полученные результаты подтверждают положение о нарастающем карбоксилировании лигниновых остатков как о главном процессе их трансформации в гумус. Реакции деструкции, по-видимому, возникают прежде всего в боковых цепочках лигнина, образуя фенилкарбоновые кислоты как первые специфические соединения.

Таблица 5

**Величины отношения кислот к альдегидам*
в экосистемах на разных стадиях трансформации лигнина**

Table 5

**Values of the ratio of acids
to aldehydes at different stages of lignin transformation**

Экосистема	Ткани растений	Подстилка	Почва	Гуминовые кислоты
Сосновый лес	0,11	0,20	0,48	0,96
Можжевельное редколесье: под кроной на поляне	0,08 0,14	0,29 –	0,44 0,21	0,52 1,50
Пашня	0,09	–	0,60	1,05
Березовая роща	0,57	0,60	0,65	–
Тропический лес	0,13	–	2,26	–
Болото	0,18	0,34	0,40	0,73

*Среднее арифметическое значение ($n = 2-5$).

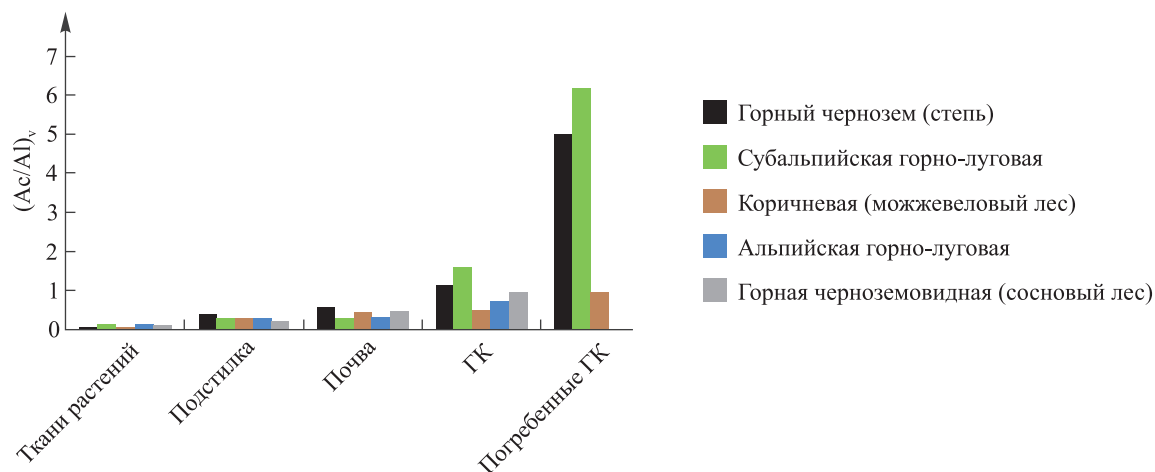


Рис. 4. Величины отношения ванилиновых кислот к ванилину ((Ac/Al)_v) на разных стадиях трансформации лигнина в ряду растительные ткани – опад – подстилки – почвы – гуминовые кислоты (ГК) – погребенные гуминовые кислоты
Fig. 4. Values of the ratio of vanillic acids to vanillin ((Ac/Al)_v) parameter at different stages of lignin transformation in the series plant tissues – fall – litter – soils – humic acids – buried humic acids

Таким образом, метод окисления и хроматографического разделения биополимеров лигнина позволяет получить информацию о типах растительных тканей в подстилках и почвах, исследовать механизмы трансформации лигнина в гуминовые кислоты. Гетерогенность генезиса лигнина обуславливает возможность возникновения большого числа разнообразных низко- и высокомолекулярных продуктов разложения (ванилиновых, сиригилловых, феруловых и кумаровых семейств), сохраняющих композиционный состав биополимера в ряду растительные ткани – опад – подстилки – почвы – гуминовые кислоты – погребенные гуминовые кислоты. Данный факт подтверждает образование в почвах унифицированных гуминовых веществ специфической природы, в формировании которых, наряду с прочими ароматическими соединениями, участвует лигнин высших растений.

С помощью количественного анализа лигнинных фенолов и ¹³C-ЯМР-спектроскопии также доказывается, что лигнин высших растений принимает участие в формировании специфических соединений гумуса почв, входя структурными фрагментами как в алифатическую (пики при 56 ppm), так и в ароматическую (пики при 147 ppm) часть молекул гуминовых кислот. Площади пиков лигнинных структур одинаковы в ароматической и алифатической частях молекул горно-луговых альпийских почв (табл. 6, рис. 5). В почвах зональных рядов ароматические фрагменты лигнинного происхождения преобладают в алифатической части спектра светло-серых почв Коломенского ополья и оглеенных почв аккумулятивных позиций ландшафта.

Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC) в гумусовых горизонтах почв гумидных ландшафтов и площадью пика лигнинного происхождения в алифатической части ¹³C-ЯМР-спектра при 56 ppm составил 0,94 ($p < 0,05$) (рис. 6).

В гуминовых кислотах почв лесостепи, сформированных на лёссе, а также в черноземах вклад ароматических лигнинных фрагментов в ядерной части молекул в 2 раза больше, чем в периферийной части (рис. 7).

Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC) в гумусовых горизонтах почв и площадью пика лигнинного происхождения в ароматической части ¹³C-ЯМР-спектра при 147 ppm составил 0,93 ($p < 0,05$) (рис. 8).

Сравнение ¹³C-ЯМР-спектров нативных препаратов лигнина (рис. 9), выделенных из разных пород древесных и травянистых растений, со спектром молекулы гуминовой кислоты [7] (рис. 10) позволило впервые обнаружить, что, во-первых, спектр пиков, наследуемых гуминовой кислотой от растительной ткани, весьма широк. Они отчетливо диагностируются при 102; 115; 119; 131; 152; 160 ppm (см. табл. 6).

Во-вторых, набор пиков разнороден в спектрах различных растений, следовательно, в молекулах гуминовых кислот разных почв он тоже должен отличаться. Это означает, что различия в химическом строении лигнина хвойных и лиственных пород, злаковых и травянистых растений заключаются не только в количественном содержании основных типов межмономерных связей β—О—4, β—5, β—β, C_{аром}—C (см. табл. 6), но и в композиционном составе макромолекул, т. е. в соотношении трех типов мономерных звеньев – ванилиновых (гваяциловых), сиригилловых и п-кумаровых (V : S : C).

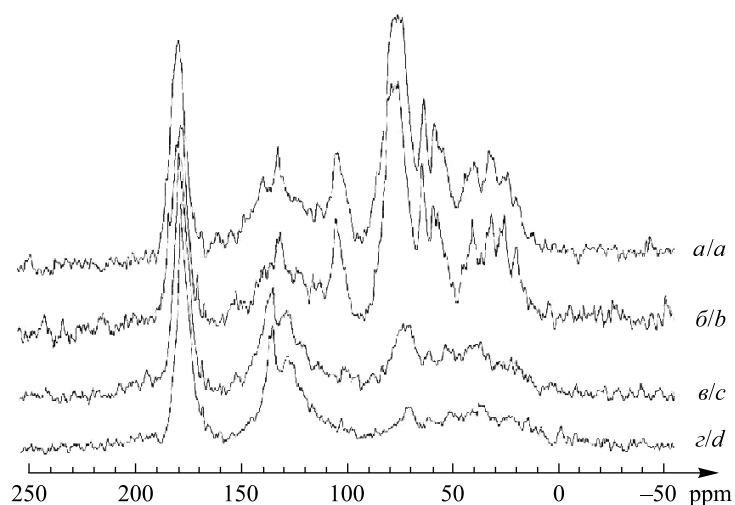


Рис. 5. ^{13}C -ЯМР-спектры препаратов гуминовых кислот
светло-серых оглеенных почв (Коломенское ополье):
a – глубокооглеенная почва (на микроповышении); *б* – глееватая почва (в микропонижении);
в – орштейны глееватой почвы; *г* – орштейны глееватой осушенной почвы
Fig. 5. ^{13}C NMR spectra of humic acids of light gray gleyed soils (Kolomenskoe opolye):
a – deeply gley (on microelevation); *b* – gleyic (in microdepressions);
c – nodules of gleyic soil; *d* – nodules of gleyic drained soil

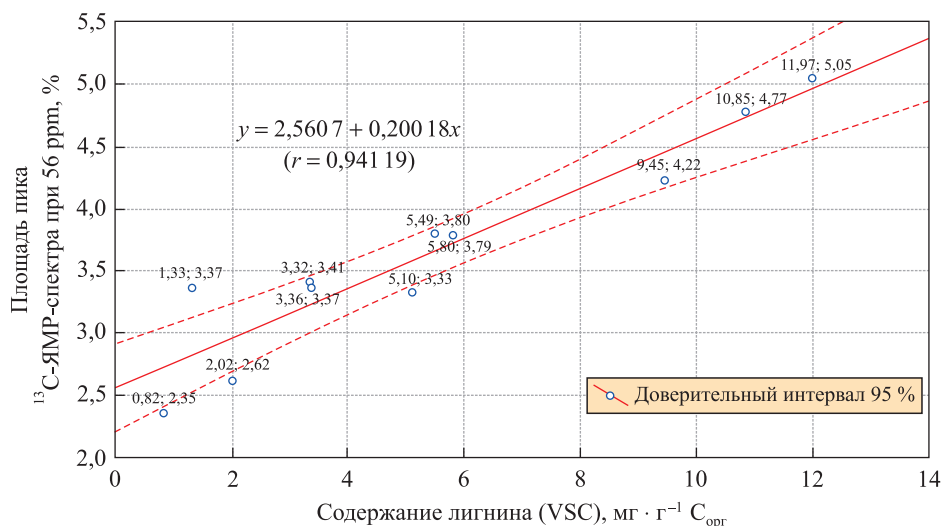


Рис. 6. Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC)
и площадью пика ^{13}C -ЯМР-спектра при 56 ppm
Fig. 6. Correlation coefficient between lignin content (VSC)
and peak area of ^{13}C NMR spectrum at 56 ppm

Наличие пиков фенольных структур на ^{13}C -ЯМР-спектрах препаратов гуминовых кислот лесных почв

Table 6

The peaks of phenolic structures in the ^{13}C NMR spectra of preparations of humic acids of forest soils

Почва	Горизонт, глубина, см	53,5–53,8 ppm (кумарилы, пинорезинолы)	55,7 ppm (гваяцилы)	55,9 ppm (сирингилы)	102–104 ppm (сирингилы, C2, C6)	115,5 ppm (C2, C5)	119,1 ppm (гваяцилы, C6)	131,4–131,5 ppm (C2, C6, п-кумарилы)	151,0–152,0 ppm (C3, C5—OCH ₃)	160,1 ppm (C4-эфир)	166,7 ppm (C β -кумарилы)
Березовые колки лесостепи (Брянское ополье)											
Серая лесная	A, 0–30	Следы	Следы	+	+	+	+	+	–	–	–
Темно-серая лесная	A, 0–30	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
	G, 60–70	+	+	+	+	+	+	Следы	–	–	–
Южнотаежные леса из березы и осины (Коломенское ополье, пашня на месте сведенного леса)											
Светло-серая лесная глееватая	A, 0–10	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
Светло-серая лесная	A, 0–10	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–
Северо-Западный Кавказ											
Чернозем	A, 8–27	+	+	+	+	+	+	+	+	Следы	+
Субальпийская горно-луговая почва	A, 10–25	+	+	+	+	+	+	+	–	Следы	–
Северный Тянь-Шань											
Чернозем	A, 12–38	+	+	+	+	–	+	+	+	+	Следы
	A, 38–44	+	+	+	+	–	+	+	+	+	Следы
Черноземовидная (сосновый лес)	A, 15–25	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
	[A], 37–50	+	++	+	+	–	–	+	–	–	+
Коричневая (можжевеловый лес)	A, 0–23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	AB, 37–50	Следы	Следы	Следы	+	–	–	–	–	–	–

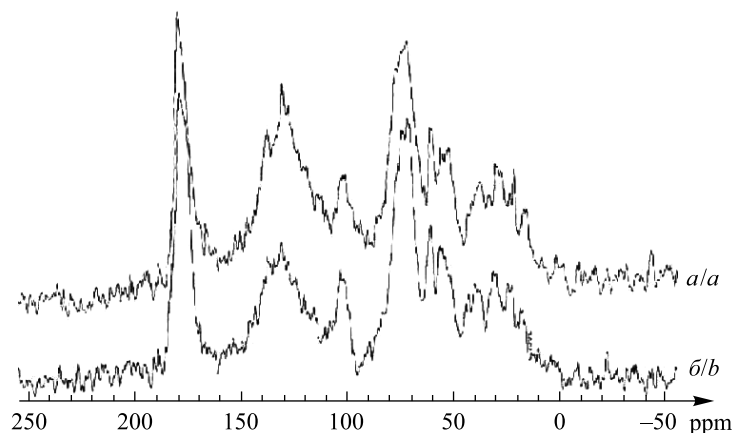


Рис. 7. ^{13}C -ЯМР-спектры препаратов гуминовых кислот почв Северного Кавказа: *a* – чернозем (А, 8–27 см); *б* – субальпийская луговая почва (А, 10–25 см)

Fig. 7. ^{13}C NMR spectra of humic acids of soils of the North Caucasus: *a* – chernozem (A, 8–27 cm); *b* – subalpine meadow soil (A, 10–25 cm)

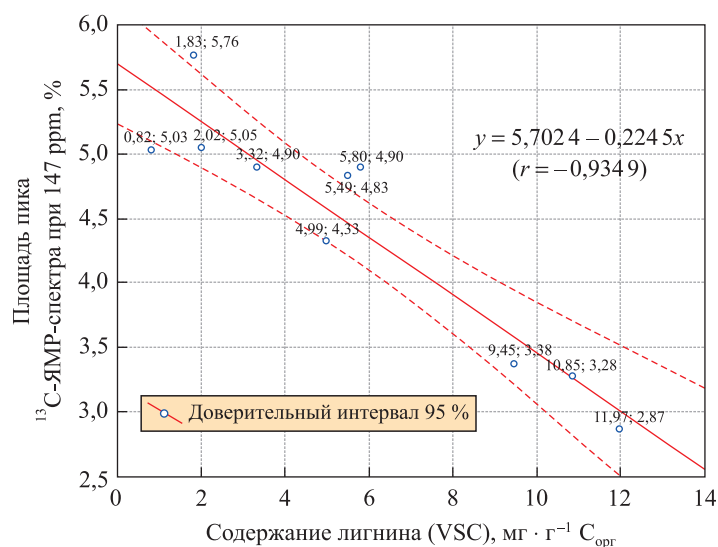


Рис. 8. Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC) и площадью пика ^{13}C -ЯМР-спектра при 147 ppm

Fig. 8. Correlation coefficient between lignin content (VSC) and peak area of the ^{13}C NMR spectrum at 147 ppm

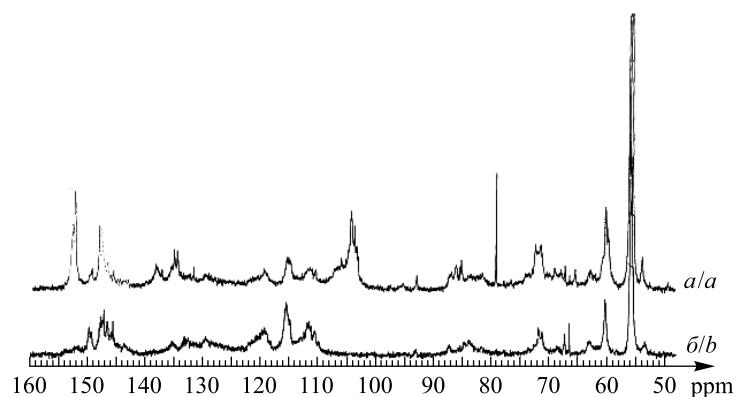


Рис. 9. ^{13}C -ЯМР-спектры нативных препаратов лигнина древесных культур: *a* – акация; *б* – лиственница. Источник: [14]

Fig. 9. ^{13}C NMR spectra of lignin preparations from tree tissue: *a* – acacia; *b* – larch. Source: [14]

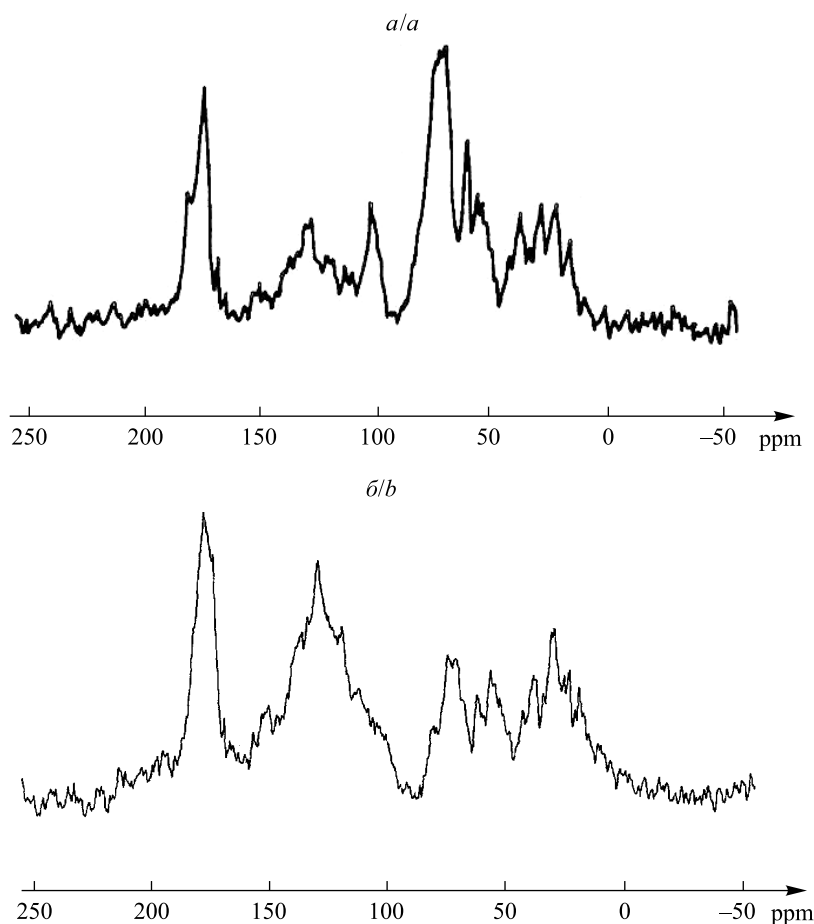


Рис. 10. ^{13}C -ЯМР-спектры препаратов гуминовых кислот:
 а – светло-серая лесная почва (Ap, 0–20 см);
 б – черноземовидная почва (сосновый лес) (A, 8–27 см)
 Fig. 10. ^{13}C NMR spectra of humic acids: а – light gray forest soil (Ap, 0–20 cm);
 б – chernozem-like soil (pine forest) (A, 8–27 cm)

И наконец, лигнин древесных растений южной тайги становится источником более развитых пространственно вытянутых с развитой алифатической частью молекул гуминовой кислоты (мощные хорошо вытянутые пики) (см. рис. 10, а), а феруловые и кумаровые фенолы травянистых растений формируют пространственно компактные структуры гуминовых кислот (см. рис. 10, б).

Заключение

Результаты исследований оригинальны и могут быть использованы в следующих областях.

1. *Производство гуминовых препаратов, их идентификация и сертификация.* Впервые стало возможным идентифицировать генезис гуминовых препаратов. Допускается, что именно благодаря лигнину в почве образуются гуминовые вещества, придающие почвенному органическому веществу и его стабильной части – гумусу – особые свойства и функции. Разработка новых продуктов, от сорбентов до препаратов гуминовых веществ на основе биополимера лигнина, отвечает современным тенденциям науки.

2. *Разработка технологий применения органических удобрений.* В зависимости от содержания и композиционного состава лигнина растений в органическом удобрении корректируется его норма внесения в почву.

3. *Биоконверсия и консервация отходов гидролизной, деревообрабатывающей и иной промышленности, имеющей сырьевым источником лигнинсодержащие соединения.* Показаны возможные механизмы и скорость трансформации лигниновых фенолов в зависимости от композиционного состава лигнина древесных и травянистых растений в разных почвенно-географических условиях, и на этой основе продемонстрирован выбор оптимальной технологии утилизации лигноцеллюлозы. Гидролизный лигнин превратился из отхода производства в ценное сырье для сельского хозяйства (биопрепараты и удобрения).

4. *Оценка современных приемов обработки почвы и приемов биологизации земледелия.* Проявление аллелопатических свойств лигниновых фенолов при длительном использовании приемов биологического земледелия требует систематических исследований биохимии лигнина в почвах. Так, в практике применения технологии *no-till* в первые годы можно рассчитывать на получение высоких урожаев, а уже на 3–4-й годы наблюдается резкое снижение урожайности сельскохозяйственных культур.



Библиографические ссылки

1. Chukov SN. Problems of biotesting of humic substances ecological functions. In: *Fourth international conference of CIS IHSS on humic innovative technologies «From molecular analysis of humic substances – to nature-like technologies»*; 2017 October 15–21; Moscow, Russia. Moscow: Klub pechati; 2017. p. 30–31.
2. Комаров АА. Физиологическая активность продуктов трансформации лигнина. В: Шевелуха ВС, редактор. *Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях. Тезисы докладов Шестой международной конференции*; 26–28 июня 2001 г.; Москва, Россия. Москва: Издательство МСХА; 2001. с. 101.
3. Попов АИ, Чертов ОГ. Биогенотическая роль органического вещества почв. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*. 1996;2:88–97.
4. Ertel JR, Hedges JJ. The lignin component of humic substances: distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1984;48(10):2065–2074. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90387-9.
5. Ковалев ИВ, Ковалева НО. Биохимия лигнина в почвах периодического переувлажнения (на примере агросерых почв ополей Русской равнины). *Почвоведение*. 2008;10:1205–1216.
6. Amelung W. *Zum Klimaeinfluß auf die organische Substanz nordamerikanischer Prärieböden*. Bayreuth: Universität Bayreuth; 1997. 131 S.
7. Ковалева НО, Ковалев ИВ. Лигниновые фенолы в почвах как биомаркеры палеорастительности. *Почвоведение*. 2015;9:1073–1086.
8. Ковалев ИВ, Ковалева НО. Пул лигниновых фенолов в почвах лесных экосистем. *Лесоведение*. 2016;2:148–160.
9. Ковалева НО, Ковалев ИВ. Биотрансформация лигнина в дневных и погребенных почвах горных ландшафтов. *Почвоведение*. 2009;11:1362–1373.
10. Kovalev IV, Kovaleva NO. The role of lignin phenols in organic-mineral interactions in soils. In: Filcheva E, editor. *19th International conference of humic substances and their contribution to the climate change mitigation*; 2018 September 16–21; Albena Resort, Bulgaria. Sofia: Bulgarian Humic Substances Society; 2018. p. 120–121.
11. Манская СМ, Кодина ЛА. *Геохимия лигнина*. Виноградов АП, редактор. Москва: Наука; 1975. 232 с.
12. Заварзин ГА. *Лекции по природоведческой микробиологии*. Москва: Наука; 2004. 348 с.
13. Kögel I. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry*. 1986;18(6):589–594. DOI: 10.1016/0038-0717(86)90080-5.
14. Karmanov AP, Kocheva LS, Marchenko TA, Belayev VYu. Topological structure of lignin macromolecules. In: *Proceedings of the 11th International symposium on wood and pulping chemistry*; 2001 June 11–14; Nice, France. Volume 2. Paris: L'Association technique de l'industrie papetière; 2001. p. 7–10.

References

1. Chukov SN. Problems of biotesting of humic substances ecological functions. In: *Fourth international conference of CIS IHSS on humic innovative technologies «From molecular analysis of humic substances – to nature-like technologies»*; 2017 October 15–21; Moscow, Russia. Moscow: Klub pechati; 2017. p. 30–31.
2. Komarov AA. [Physiological activity of lignin transformation products]. In: Shevelukha VS, editor. *Regulatory rosta i razvitiya rastenii v biotekhnologiyakh. Tezisy dokladov Shestoi mezhdunarodnoi konferentsii*; 26–28 iyunya 2001 g.; Moskva, Rossiya [Regulators of plant growth and development in biotechnology. Abstracts of the 6th International conference; 2001 June 26–28; Moscow, Russia]. Moscow: Publishing House of the Moscow Timiryazev Agricultural Academy; 2001. p. 101. Russian.
3. Popov AI, Chertov OG. [Biogeocenotic role of soil organic matter]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3. Biologiya*. 1996;2:88–97. Russian.
4. Ertel JR, Hedges JJ. The lignin component of humic substances: distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1984;48(10):2065–2074. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90387-9.
5. Kovalev IV, Kovaleva NO. Biochemistry of lignin in soils of periodic excessive moistening (with agrogray soils in opolie landscapes of the Russian Plain as an example). *Pochvovedenie*. 2008;10:1205–1216. Russian.
6. Amelung W. *Zum Klimaeinfluß auf die organische Substanz nordamerikanischer Prärieböden*. Bayreuth: Universität Bayreuth; 1997. 131 S.
7. Kovaleva NO, Kovalev IV. [Lignin phenols in soils as biomarkers of paleovegetation]. *Pochvovedenie*. 2015;9:1073–1086. Russian.
8. Kovalev IV, Kovaleva NO. Pool of lignin phenols in soils of forest ecosystems. *Lesovedenie*. 2016;2:148–160. Russian.
9. Kovaleva NO, Kovalev IV. [Transformation of lignin in surface and buried soils of mountainous landscapes]. *Pochvovedenie*. 2009;11:1362–1373. Russian.
10. Kovalev IV, Kovaleva NO. The role of lignin phenols in organic-mineral interactions in soils. In: Filcheva E, editor. *19th International conference of humic substances and their contribution to the climate change mitigation*; 2018 September 16–21; Albena Resort, Bulgaria. Sofia: Bulgarian Humic Substances Society; 2018. p. 120–121.
11. Manskaya SM, Kodina LA. *Geokhimiya lignina* [Geochemistry of lignin]. Vinogradov AP, editor. Moscow: Nauka; 1975. 232 p. Russian.
12. Zavarzin GA. *Lektsii po prirovedcheskoi mikrobiologii* [Lectures on natural history microbiology]. Moscow: Nauka; 2004. 348 p. Russian.
13. Kögel I. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry*. 1986;18(6):589–594. DOI: 10.1016/0038-0717(86)90080-5.
14. Karmanov AP, Kocheva LS, Marchenko TA, Belayev VYu. Topological structure of lignin macromolecules. In: *Proceedings of the 11th International symposium on wood and pulping chemistry*; 2001 June 11–14; Nice, France. Volume 2. Paris: L'Association technique de l'industrie papetière; 2001. p. 7–10.

Получена 28.11.2020 / исправлена 15.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 28.11.2020 / revised 15.02.2021 / accepted 03.05.2021.