

УДК 631.417.2

УЧАСТИЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ И АМИНОКИСЛОТ В ГУМУСООБРАЗОВАНИИ

Я. В. КУЗЯКОВ, А. Д. ФОКИН, Д. А. КНЯЗЕВ

(Кафедра неорганической и аналитической химии и
и кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Рассмотрены результаты исследований процессов минерализации и гумификации нуклеиновых оснований и аминокислот (на примере урацила, глицина и аланина), поступающих в почву из разлагающихся растительных остатков. Скорость разложения аминокислот выше, чем скорость разложения урацила: через 1 неделю после поступления в почву аланина и урацила разлагалось соответственно 90 и 50 % внесенного их количества. Включение в гумус метильной группы аминокислот в среднем в 10 раз больше, чем карбоксильной. При разложении в условиях дерново-подзолистой почвы урацил включается преимущественно в фульвокислоты, а аминокислоты — в гуминовые кислоты. Рассчитаны коэффициенты ежегодного обновления углерода отдельных фракций гумуса за счет гумификации исследуемых соединений.

В образовании гумусовых веществ почвы большую роль играют органические азотсодержащие соединения. Об этом, в частности, говорят более высокое содержание азота в гумусе, чем в ежегодно поступающих растительных остатках, и обязательное наличие в молекуле гумусовых веществ аминного и гетероциклического азота. В средней полосе ежегодное поступление в дерново-подзолистую почву азота из разлагающихся растительных остатков составляет 20—60 кг/га [1, 2, 5, 6]. Установлено, что соотношение минеральных и органических форм азота в растительных остатках в среднем равно 1 : 10, органические соединения азота на 98—99 % представлены белками и нуклеиновыми кислотами в соотношении от 1 : 1 до 1 : 2 [5, 6]. Однако до сих пор остается неясной количественная сторона участия аминокислот и нуклеиновых оснований в обновлении структурных фрагментов и различных фракций гумуса, а также роль этих соединений в поддержании уровня запасного и обменного фондов минерального азота почвы.

Цель данной работы — изучить включение аминокислот (на примере глицина и аланина) и нуклеиновых оснований (на примере урацила) в различные фракции гумуса.

Методика

Опыты проводили на пахотной дерново-подзолистой почве (опытная станция ВИУА, г. Барыбино Московской области), содержащей 1,5 % гумуса.

В мае 1987 г. был заложен полевой микроделяночный опыт (размер делянок $0,2 \times 0,2 \times 0,2$ м). При его закладке была сделана попытка воспроизвести условия поступления, минерализации и гумификации растительных остатков клевера в посевах ячменя, идущего по пласту многолетних трав. В почву вместе с измельченными корнями клевера вносили препараты урацила, глицина и аланина соответственно из расчета 11,6, 0,027 и 7,2 мг на 100 г. Масса урацила и аланина примерно была равна ежегодному поступлению аминокислот и нуклеиновых оснований в почву в составе растительных остатков. Глицин вносили в заведомо меньших количествах. В данном случае предполагалось, что аминокислота, предварительно внесенная в измельченную сырую массу растительных остатков клевера, благодаря изотопному разбавлению пометит аминокислоты, входящие в состав растительных остатков.

В эксперименте применяли следующие препараты: $2\text{-}^{14}\text{C}$ -урацил (меченный по углероду пиримидинового кольца) с носителем, удельная радиоактивность 26,5 МБк/г; $2\text{-}^{14}\text{C}$ -глицин (меченный по метильной группе), удельная радиоактивность 5775 МБк/г; $1\text{-}^{14}\text{C}$ -аланин (меченный по карбоксильной группе) с носителем, удельная радиоактивность 21,3 МБк/г. Растительные остатки с мечеными азотсодержащими соединениями тщательно перемешивали с почвой, отобранной с микроделянок, затем ее укладывали на место; вертикальные стенки выстилали полиэтиленовой пленкой. Каждая делянка с мечеными растительными остатками находилась в центре площадки размером 1 м², которые все вместе составляли единый массив площадью 4 м², занятый посевом ячменя.

Пробы почвы отбирали через 1 нед, 1, 2,5, 4,5 и 12 мес со дня закладки опыта. Из них извлекался гумус, делился на фракции и в каждой фракции определялось количество включенного меченого углерода. Первым этапом разделения органического вещества почвы было выделение меченых веществ, введенных в нее в начале опыта и не изменившихся к данному сроку. Это позволяет снизить возможные примеси к гумусовым веществам свободных урацила, глицина и аланина, оставшихся неминерализованными и имеющих большую удельную активность, т. е. уменьшить вероятность простого загрязнения гумусовых фракций мечеными веществами, которое может быть

принято за включение меченых веществ в состав гумуса.

В варианте с урацилом свободные нуклеиновые основания извлекали 3-кратной вытяжкой дистиллированной водой при 70 °С. Этот метод основан на результатах предварительной отработки методики извлечения внесенного в почву меченого тимина экстракциями его различными растворителями. Однократная водная вытяжка дистиллированной водой при 70 °С извлекает из дерново-подзолистой почвы 70 % внесенного меченого тимина. В вариантах с аминокислотами свободные почвенные аминокислоты экстрагировали 3-кратной вытяжкой 20 % этиловым спиртом [8].

Дальнейшее разделение органического вещества почвы было одинаковым для всех трех вариантов опыта и проводилось по следующей методике: гумусовые вещества извлекали путем многократной экстракции 0,1 н. раствором NaOH с последующим центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин. Гумусовые кислоты извлекали до тех пор, пока оптическая плотность щелочной вытяжки не составила 0,1 при 400 нм. Центрифугаты объединяли, концентрировали упариванием, очищали от почвенных органов-минеральных коллоидов центрифугированием при 6000 об/мин в течение 1 ч. В остатке почвы с неэкстрагируемым органическим веществом (гумином) и в органо-минеральных коллоидах определяли содержание общего и меченого углерода. Очищенный центрифугат пропускали через колонку с катионитом Dowex-50-8 в H⁺-форме для очистки от щелочи и перевода гумусовых веществ в кислотную форму. Сорбированную катионитом фракцию (преимущественно гуминовые кислоты) смывали избытком 2 н. раствора аммиака. Фракцию, прошедшую через катионит (фульвокислоты), последовательно разделяли по молекулярным массам на гелях G-10 и G-50 (сефадекса) с пределами разделения 0—700 и 500—10000 соответственно, используя в качестве элюэнта дистиллированную воду.

Общий углерод во всех фракциях определяли по методу Тюрина с фотометрическим окончанием, активность изотопа углерода ^{14}C растворов гумусовых веществ — жидкостно-сцинтилляционным методом на бета-спектрометре «1219 Rackbeta» фирмы «LKB Wallac» в сцинтилляторе марки ЖС-8 с предварительным эталонированием меченого углерода почвы, почвенных коллоидов и проэкстрагированной части почвы — по специально разработанной методике в гелевом сцинтилляторе «Luma Gel» фирмы «Lumas».

Результаты

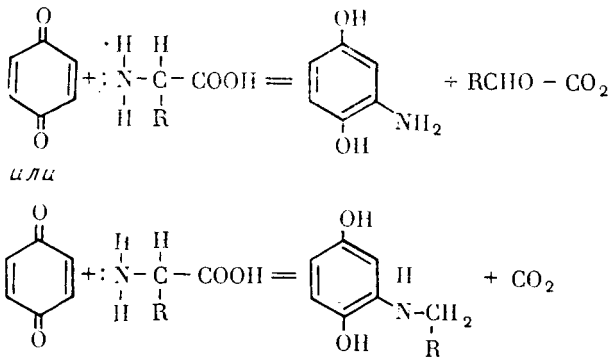
Данные табл. 1 показывают, что при внесении в почву урацила и аминокислот происходит очень быстрое разложение этих соединений, причем для аминокислот результат существенно зависит от положения метки.

Разложение урацила, глицина и аланина в почве (% от внесенного)

Срок	2- ¹⁴ С-урацил	2- ¹⁴ С-глицин	1- ¹⁴ С-аланин
1 нед	50	45	12
1 мес	11	41	11
2,5 мес	8,5	37	8,8
4,5 мес	7,3	31	6,3
1 год	7,3	31	6,3

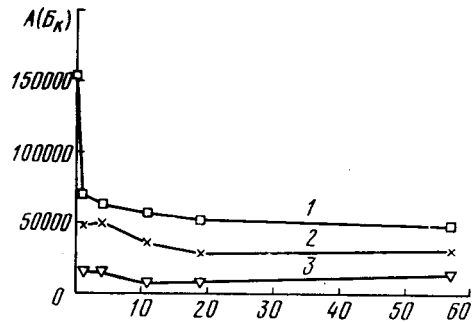
Скорость потери углерода карбоксильной группы аминокислоты (в нашем случае — аланина) может служить характеристикой скорости разложения соединения. В указанном процессе образуется декарбоксилированный метаболит аминокислоты, разложение которого, судя по потере ¹⁴С метильной группы глицина, происходит медленнее. Разложение аминокислот на первом этапе вызвано преимущественно чисто химическими процессами аминирования хинонных группировок молекул гумуса, затем распадом присоединившейся молекулы аминокислоты по уравнению, описанному многими авторами [11—13].

Реальность этой схемы подтверждается также результатами нашего опыта: газообразные потери углекислого газа, образованного из углерода карбоксильной группы, значительно больше, чем из метильной.



Для исследуемых соединений скорость минерализации углерода, находящегося в различных положениях, различна: через 1 нед после закладки опыта урацил теряет 50 % второго углерода кольца, что, возможно, характеризует скорость минерализации вещества в целом. Аминокислоты, меченные по карбоксильной группе, теряют за тот же срок почти 90 % углерода. Вероятно, эта высокая скорость декарбоксилирования последних связана с их большой химической реакционной способностью и с лучшей биологической усвояемостью по сравнению с урацилом. Быстрая стадия трансформации аминокислот заканчивается менее чем через 1 нед после поступления вещества в почву, а для урацила — через 1 мес. После этого наблюдается относительная стабилизация процессов минерализации, так как первоначальные соединения почти полностью разложились, а их метаболиты, как показано выше, включились в инертные молекулы почвенного гумуса.

По включение углерода метильной группы глицина в органическое вещество почвы можно оценить включение органического азота из этой молекулы. При отборе 2-й временной пробы через 1 мес после закладки опыта был



Разложение меченого углерода метильной группы глицина в почве и включение его в NaOH-вытяжку и гумин.

1 — общее содержание меченого углерода метильной группы глицина в почве к данному сроку; 2 — включение углерода метильной группы глицина в NaOH-вытяжку; 3 — включение углерода метильной группы глицина в гумин; ось X — недели со дня закладки опыта; ось Y — активность А (Бк) на 100 г почвы.

Включение и разложение урацила, глицина и аланина во фракции гумуса во времени
(в числителе — удельная активность фракции, Бк/мг;
в знаменателе — % от введенной активности ^{14}C)

Срок	2- ^{14}C -урацил			2- ^{14}C -глицин			1- ^{14}C -аланин		
	Гк	Фк	Гумин	Гк	Фк	Гумин	Гк	Фк	Гумин
1 нед	8,5	131	5	270	103	39	76	27	16
	0,05	11	0,63	11,4	17,5	10	1,3	4,7	3,8
1 мес	4,1	57	5	260	94	37	103	25	15
	0,03	4,7	0,65	11,0	16,0	9,6	1,8	4,4	3,6
2,5 мес	2,8	47	4	240	79	19	76	20	18
	0,02	3,9	0,48	10,1	13,4	4,9	1,3	3,5	2,9
4,5 мес	1,8	43	2	163	75	21	81	17	14
	0,01	3,6	0,28	6,9	12,8	5,5	1,4	3,0	3,4
1 год	1,5	27	1	150	71	34	44	8	3
	0,01	2,2	0,13	6,3	12,1	8,8	0,8	1,4	0,7

зарегистрирован максимум включения углерода метильной группы глицина в NaOH-вытяжку (рисунок), хотя в данном случае нельзя с достаточной достоверностью судить о точном временном положении этого максимума, поскольку он мог приходиться на период от 1 нед до 2,5 мес со времени поступления аминокислоты в почву. Из рисунка следует, что максимум включения органического азота не может быть больше максимума включения углерода из той же молекулы. Весь остальной включенный азот предварительно был минерализован до ионов, смешался с уже имеющимся в почве неорганическим азотом, и процессы его включения не отражают путь включения органического азота аминокислот в гумус.

Разделение органического вещества почвы на фракции по выбранной методике показало, что для аминокислот характерно более равномерное распределение углерода по фракциям, чем для урацила (табл. 2).

Включение во фракции гумуса углерода метильной группы глицина в 2—10 раз больше, чем включение углерода карбоксильной группы аланина. Вероятно, это связано с гумификацией химических и микробиологических метаболитов альдегида $\text{R}-\text{CHO}$, образовавшегося при дезаминировании аминокислоты на первом этапе. Карбоксильные группы аминокислот практически полностью отщепляются в виде CO_2 , а неминерализованные карбоксильные группы, вероятно, участвуют в обновлении карбоксильных групп гумусовых кислот наряду с другими возможными источниками.

Согласно некоторым данным [4], карбоксильные группы гумусовых кислот обязаны своим происхождением преимущественно молекулам разлагающегося лигнина, а не аминокислотам. Так, при изучении происхождения карбоксильных групп гумусовых кислот указанными авторами было установлено, что включение углерода карбоксильной группы глицина составляет доли процента от введенного глицина.

В варианте с урацилом в первых трех временных пробах большая часть введенного меченого урацила остается в водной вытяжке и является предположительно неизменным исходным соединением. Другая часть переходит преимущественно в NaOH-вытяжку, а в неэкстрагируемой фракции гумуса — гумине и в почвенных коллоидах находится менее 1% введенного вещества. Включение аминокислот в гумин также меньше, чем в экстрагируемую часть гумуса, и выражено значительно слабее, чем в варианте с урацилом. Это говорит о большей инертности в обновлении углеродного скелета гумина по сравнению с другими фракциями.

Во всех вариантах наибольшее обогащение метаболитами иссле-

Включение и перераспределение углерода урацила, глицина и аланина по фракциям фульвокислот (удельная активность фракций, Бк/мг)

Срок	2- ¹⁴ С-урацил				2- ¹⁴ С-глицин				1- ¹⁴ С-аланин			
	Фракции											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1 нед	334	101	83	79	120	68	53	96	36	27	21	21
1 мес	180	61	32	46	111	71	68	111	20	24	25	34
2,5 мес	193	35	25	18	102	59	61	72	26	17	22	22
4 мес	201	36	26	17	101	46	48	66	18	14	19	21
12 мес		36	13	15	102	44	48	43	21	13	17	16

Примечание. 1 — молекулярная масса < 500; 2 — 600; 3 — > 600, < 10000; 4 — > 10000.

двух веществ характерно для фракции с молекулярной массой < 500, отделяемой на геле G-10. В вариантах с аминокислотами, кроме того, значительное включение наблюдалось для фракции, сорбируемой катионитом в H⁺-форме и элюируемой 2 н. NH₄OH. Эта фракция является, по нашему предположению, гуминовыми кислотами, которые при изменении pH среды в катионите с 14 до 4 выпадают в осадок. Подобное преимущественное обогащение метаболитами аминокислот гуминовых кислот по сравнению с фульвокислотами, хотя и менее выраженное, было установлено ранее [7]. Большее обогащение данной фракции в нашем опыте может быть вызвано также выбранной методикой фракционирования, так как свободные аминокислоты, не полностью выделенные на первом этапе при экстрагировании 20 % спиртом, частично сорбируются катионитом в H⁺-форме и могут вместе с гуминовыми кислотами элюироваться 2 н. раствором аммиака.

Включение меченого углерода исследуемых соединений во фракции фульвокислот с различными молекулярными массами (разделение на гелях G-10 и G-50) примерно соответствует содержанию данных фракций в почве (табл. 3). Аналогичная картина, правда, при несколько иной схеме фракционирования гумуса, наблюдалась ранее [9]. Во время отбора первой временной пробы зафиксировано несколько большее включение ¹⁴C во фракции с меньшими молекулярными массами (исключение составляет фракция с молекулярной массой > 10000 в варианте с глицином).

В вариантах с аминокислотами наблюдался характерный максимум содержания ¹⁴C в гумусе, приходящийся на 1-й месяц со времени поступления их в почву. Это является результатом двух процессов: включения нововведенного вещества в молекулу гумуса и последующего его разложения уже в структуре этой молекулы. В варианте с урацилом такого максимума не зафиксировано, что говорит о значительно меньшем участии его углерода в гумусообразовании.

Наблюдения показали, что с увеличением молекулярной массы фракции снижается скорость ее углеродного обмена со средой. Это согласуется с существующими представлениями о большей инертности высокомолекулярных фракций гумусовых веществ.

На основе результатов фракционирования годовой пробы были рассчитаны коэффициенты годового

Таблица 4

Ежегодное обновление углерода отдельных фракций за счет продуктов трансформации урацила и аминокислот (в долях 10⁻⁶/год)

Фракции гумуса	2- ¹⁴ С-урацил	2- ¹⁴ С-глицин	1- ¹⁴ С-аланин
Гумин	4	300	20
Гк	10	1400	270
Фк-фракции:			
2	150	420	80
3	60	450	110
4	60	420	100

обновления гумуса (табл. 4). Они характеризуют участие исследуемых соединений в ежегодном обновлении фракций гумусовых кислот.

Из изучаемых в опыте соединений наибольшую роль в обновлении, а возможно, и в формировании углеродного скелета гумусовых веществ играет углерод метильной группы аминокислот. Скорость обновления гумуса из этой группы приблизительно соответствует времени пребывания углерода в составе гумусовых кислот дерново-подзолистых почв, рассчитанном методами радиоуглеродного датирования [3, 10]. Включение во фракции гумуса углерода урацила и углерода карбоксильной группы аминокислот выражено значительно слабее. Наиболее медленно обновляемой фракцией является гумин. Полученные результаты, но обновляемой фракцией является гумин.

Выводы

1. Поступающие в почву из разлагающихся растительных остатков нуклеиновые основания и аминокислоты подвергаются очень быстрой минерализации. Характеристикой скорости начальной фазы трансформации соединения служит максимальная скорость окисления одной из его групп. Для аминокислот такой группой является карбоксильная.

2. Включение углерода метильной группы аминокислот по фракции гумуса в среднем в 10 раз больше, чем включение углерода карбоксильной группы. Аминокислоты играют большую роль в обновлении углеродного скелета гумусовых кислот, чем урацил.

3. Включение аминокислот и урацила в различные по молекулярным массам фракции фульвокислот примерно соответствует содержанию данных фракций в почве, хотя в течение 1-го месяца ярко выражено преобладающее включение в низкомолекулярную фракцию ($MM < 500$).

4. Доли ежегодного обновления различных фракций гумуса для урацила колеблются в пределах от 4 до $150 \cdot 10^{-6}$, для метильной группы аминокислот — от 300 до $1500 \cdot 10^{-6}$, для карбоксильной группы — от 70 до $270 \cdot 10^{-6}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Л. Н. Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. — Л.: Наука, 1980. — 2. Баланс азота в дерново-подзолистых почвах. — М.: Наука, 1966. — 3. Герасимов И. П. Современные представления о возрасте почв. — Изв. АН СССР, 1970, № 3, с. 356—363. — 4. Кулеш Н. И., Красовская Н. П., Максимов О. Б. Генезис карбоксильных групп при гумификации лигнина. — Почвоведение, 1984, № 8, с. 34—40. — 5. Орлов Д. С., Овчинникова М. Ф. Различные формы соединений азота в сероземе, черноземе и дерново-подзолистой почве. — Агрохимия, 1966, № 1, с. 35—44. — 6. Родин Л. Е., Базилевич Н. И. Динамика органического вещества и биологический круговорот в основных типах растительности. — М.-Л.: Наука, 1965. — 7. Угрехелидзе Д. Ш., Долидзе В. К. Об участии глицина в гумусообразовании. — Агрохимия, 1987, № 3, с. 71. — 8. Умаров М. М., Асеева И. В. Свободные аминокислоты некоторых почв СССР. — Почвоведение, 1971, № 10, с. 108—111. — 9. Фокин А. Д., Карпунин А. И. Включение продуктов разложения растительных остатков (меченных ^{14}C) в гумусовые вещества. — Почвоведение, № 11, 1974, с. 72—78. — 10. Чичагова О. А. Радиоуглеродное датирование гумуса почв. — М.: Наука, 1987. — 11. Flaig W. — Landbauforschung Voelkenrode, 1969, Bd. 19, Heft 2, S. 53—66. — 12. Flaig W. — Landbauforschung Voelkenrode, 1976, Bd. 26, Heft 2, S. 117—121. — 13. Ziechmann W. — Tesla, 1986, Bd. 16. Hannover. 12, S. 245—248.

Статья поступила 18 января 1989 г.

SUMMARY

The results of investigating the processes of mineralization and humification of nucleic bases and amino acids (illustrated with uracil, glycine and alanine) coming into the soil from decomposing plant residues are discussed. The rate of amino acids decomposition is higher than that of uracil: 1 week after coming alanine and uracil into the soil, 90 % and 50 % respectively of the amount applied decomposed. Inclusion of methyl amino acid group into humus is on the average 10 times higher than that of carboxyl group. With decomposition in soddy-podzolic soil, uracil is mainly included into fulvic acids, while amino acids—into humic acids. Coefficients of yearly renewal of carbon in certain humus fractions due to humification of the compounds studied are calculated.