



УДК 631.417.2

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ФРАКЦИЙ ПРИРОДНЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ – КЛЮЧ К РАЗГАДКЕ ИХ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

© 2024 г. О. Е. Трубецкая*, #, О. М. Селиванова**,
В. В. Рогачевский***, О. А. Трубецкой****

* Филиал ФГБУН “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

** ФГБУН “Институт белка” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 4

*** ФГБУН “Институт биофизики клетки” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 3

**** ФГБУН “Институт фундаментальных проблем биологии” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 2

Поступила в редакцию 22.11.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием препаратов раствором уранилацетата была использована для изучения морфологических различий между почвенными гуминовыми кислотами (ГК) и их фракциями А, В и С + D, полученными сочетанием препаративной эксклюзивной хроматографии низкого давления и аналитического электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофоретическая подвижность фракций изменялась в порядке $C + D > B > A$. Анализ распределения различных морфологических элементов между фракциями показал, что крупные структуры типа везикулоподобных образований длиной 70–150 нм и шириной 30–80 нм с четкими краями были обнаружены исключительно во фракции А и занимали ~55% площади ПЭМ-изображений. С другой стороны, длинные фибриллы длиной 60–100 нм, шириной 4–6 нм и толщиной 2–3 нм, а также их пучки длиной >150 нм и диаметром 30–70 нм были идентифицированы только во фракции С + D и занимали ~59% площади ПЭМ-изображений. Более мелкие морфологические элементы, такие как точечные частицы диаметром 2–3 нм, кольцевые частицы диаметром 4–6 нм, червеподобные короткие частицы длиной 20–30 нм и сфериды диаметром 10–30 нм, наблюдали во всех образцах, но в различном количестве. Значительные морфологические различия между фракциями могут быть объяснены их составом, установленным ранее с помощью комплекса физико-химических методов. Отношение $S_{аром}(165–108 \text{ м.д.})/S_{алиф}(10–0 \text{ м.д.})$, или индекс ароматичности, рассчитанный на основании ^{13}C -ЯМР, является одним из вероятных показателей формирования различных морфологических структур. Полученные результаты дают визуальное представление о морфологических особенностях почвенных ГК и фракций, доказывая их супрамолекулярную организацию.

Ключевые слова: почвенные гуминовые кислоты, электрофорез в полиакриламидном геле, эксклюзивная хроматография, просвечивающая электронная микроскопия, физико-химические характеристики, супрамолекулярная организация

DOI: 10.31857/S0132342324030118, EDN: NYSDGM

ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой сложный, устойчивый к разложению комплекс разнообразных органических соединений, формирующийся в почвах и природных водах в результате деструкции отмерших растительных,

животных и микробных остатков [1–3]. Одно из важнейших свойств природных ГВ – высокое содержание функциональных кислородных групп, главным образом карбоксильных и фенольных. Экстрагируемые из природных образцов ГВ разделяются на гуминовые кислоты (ГК) и фульвокислоты (ФК), различающиеся по их растворимости

Сокращения: ГВ – гуминовые вещества; ГК – гуминовые кислоты; ИА – индекс ароматичности; пиролиз/ГХ/МС – пиролиз, сопряженный с газовой хроматографией и масс-спектрометрией; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; ФК – фульвокислоты; ЭП – электрофоретическая подвижность; ЭПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле; ЭХ – эксклюзивная хроматография низкого давления; V_e – объем элюции.

Автор для связи: (эл. почта: olegi03@yahoo.com).

в щелочных и кислых водных растворах (ФК растворимы при любых значениях pH, а ГК растворимы в щелочных растворах и полностью выпадают в осадок при $\text{pH} < 2$) [1, 4]. Запасы углерода в составе почвенных ГВ в 3 раза превышают его суммарное количество в виде атмосферного CO_2 и всей растительности, покрывающей планету [5]. Являясь обязательным и стабильным компонентом почв и природных вод, ГВ в значительной мере влияют на основные физико-химические свойства экосистем, обеспечивая большинство токсикопротекторных функций, связывая и инактивируя пестициды, тяжелые металлы, полициклические углеводороды и другие загрязнения [4]. Сравнительно недавно была обнаружена важнейшая функция ГВ – деградация или трансформация органических загрязняющих веществ с использованием энергии солнечного света, т.е. сенсibilизированный фотолиз загрязнений [6]. Убедительно продемонстрировано влияние ГВ на рост и ассимиляцию растениями минеральных питательных макро- и микроэлементов, что создает фундаментальную основу для разработки гуминовых удобрений [7–9]. В отличие от подавляющего большинства индивидуальных органических соединений, поглощение солнечной энергии гуминовыми веществами увеличивается экспоненциально с уменьшением длины волны облучающего света, обеспечивая защиту живых организмов от воздействия ультрафиолетовой радиации в атмосфере и на суше [10, 11]. В последнее время доказано, что ГВ, будучи самым большим природным резервуаром углерода на Земле, являются одним из определяющих источников парниковых газов (углекислого газа и метана) и связанного с ними глобального потепления климата планеты [3, 12, 13]. В какой-то степени парадоксально, что несмотря на столь многочисленные экологически значимые функции, до сих пор не существует единого мнения ни о механизмах образования, ни о принципах строения ГВ. Все предложенные модели ГВ имеют гипотетический характер, отражая в той или иной мере экспериментальные данные и уровень развития техники на момент исследования.

До 1980-х гг. доминировала макромолекулярная концепция, подразумевающая строение ГВ в виде гетерополимера, основной структурной и функциональной частью которого считали устойчивое к разложению уникальное ароматическое полимерное ядро, к которому с помощью ковалентных связей присоединены белковые и углеводные фрагменты [1, 4, 14–17]. В последней четверти прошлого столетия в связи с широким использованием различных вариантов ЯМР и пиролизической газовой хроматографии/масс-

спектроскопии было сделано одно из наиболее выдающихся открытий в области химии гумуса, а именно обнаружение в составе ГВ наряду с ароматическими, углеводными и белковыми компонентами значительного количества алифатических длинноцепочечных углеводородных фрагментов, содержание которых в некоторых образцах достигало 30–40% общего веса ГВ [18–21].

Обнаружение существенной весовой доли индивидуальных амфифильных насыщенных или ненасыщенных монокарбоновых жирных кислот привело к возникновению супрамолекулярной концепции структурной организации ГВ. Термин супрамолекулярная (надмолекулярная) химия введен лауреатом Нобелевской премии по химии 1987 г. Жаном-Мари Леном и определен как “химия, описывающая сложные образования, являющиеся результатом ассоциации двух (или более) химических частиц, связанных вместе межмолекулярными нековалентными связями” [22]. Одну из первых моделей строения природных ГВ, которую можно отнести к супрамолекулярной, предложил R.L. Wershaw [23], назвав ее мембрано-мицеллярной. Согласно этой модели, ГВ представляют собой не макромолекулу (гетерополимер), а мембраноподобную (на поверхности минералов) или мицеллоподобную (в водном растворе) структуру, состоящую как из реально существующих амфифильных молекул – длинных монокарбоновых жирных кислот, так и “универсальных амфифилов”, которые образуются в процессе деполимеризации и окисления природных растительных и животных биополимеров – белков, полисахаридов, лигнинов, восков и др. Эта концепция не была принята научным сообществом в связи с отсутствием прямых экспериментальных данных о формировании таких “универсальных амфифилов”. Развитие супрамолекулярной теории строения ГВ получило в работах А. Piccolo [24], предположившего, что крупные гуминовые агрегаты формируются за счет случайных гидрофобных, водородных и других нековалентных связей между небольшими органическими молекулами, образующимися в результате деградации отмерших растительных и животных остатков. Однако его экспериментальные работы вызвали ряд обоснованных вопросов и замечаний, т.к. могли быть объяснены как с точки зрения макромолекулярного, так и супрамолекулярного подходов. В работах A.J. Simpson et al. [25, 26] с помощью многомерных ЯМР-экспериментов для нескольких почвенных ГВ было показано существование независимых полисахаридных, полипептидных, лигниновых и углеводородных цепочек, объединенных, так же как и у А. Piccolo,

случайным образом в супрамолекулярный комплекс, но с помощью металлических мостиков.

Однако для подтверждения супрамолекулярной концепции в настоящий момент все еще недостаточно убедительных экспериментальных данных. Учитывая тот факт, что ГВ – “природный монстр”, включающий множество органических соединений различной природы [27], логично было бы исследовать более простые, но стабильные составляющие ГВ (т.е. фракции), различающиеся по одному или нескольким четко определенным физико-химическим параметрам.

Ранее нами был разработан эффективный метод фракционирования природных ГВ различного происхождения, основанный на сочетании препаративной эксклюзивной хроматографии низкого давления на колонке с сефадексом G-75 (ЭХ) и аналитического электрофореза в 10%-ном ПААГ (ЭПААГ) [28]. Электрофорез применяли для анализа хроматографического профиля с целью отбора индивидуальных фракций, различающихся электрофоретической подвижностью (ЭП). Оригинальность и преимущество сочетания ЭХ–ЭПААГ состоит в том, что подвижная фаза ЭХ и буфер полиакриламидного геля (ПААГ) содержали 7 М мочевины, разрывающую водородные связи, предотвращая взаимодействие ГВ как с сефадексом, так и с ПААГ. Одновременно должна происходить дезагрегация ассоциатов ГВ, состоящих из объединенных водородными связями отдельных органических компонентов. Использование сочетания методов ЭХ–ЭПААГ впервые позволило получить из ГВ различного происхождения препаративные количества стабильных электрофоретических фракций, которые в течение последних 25 лет были исследованы нами с использованием как рутинных, так и современных аналитических методов, что подтвердило их контрастные физико-химические свойства и химический состав [29–34]. Между тем выявление морфологические отличий (если таковые существуют) между электрофоретическими фракциями могло бы стать переломным моментом в понимании структурной организации ГВ.

С середины прошлого века исследование морфологии коллоидных частиц ГВ проводили с помощью различных методов электронной микроскопии, среди которых наиболее информативной оказалась просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) [35–39]. Было обнаружено, что в зависимости от концентрации препаратов, ионной силы и рН растворов, ГВ склонны формировать разнообразные морфологические структуры, такие как сфероиды и их агрегаты, длинные фибриллы и их пучки, а также плоские листообразные образования. Однако взаимосвязь

между обнаруженными морфологическими структурами и физико-химическими характеристиками препаратов ГВ (молекулярный размер, индекс ароматичности, оптические и флуоресцентные характеристики, содержание функциональных групп и др.) обнаружено не было. Следует отметить, что электронно-микроскопические исследования ранее проводили исключительно на нефракционированных образцах почвенных и водных ГК и ФК.

Целью настоящего исследования было проведение сравнительного ПЭМ-исследования почвенных ГК и их стабильных электрофоретических фракций, полученных сочетанием ЭХ–ЭПААГ. При подготовке ГК и фракций для ПЭМ-анализа был впервые применен метод негативного контрастирования препаратов водным раствором уранилацетата, широко применяемого в биохимии для изучения морфологии разнообразных биологических объектов, слабо поглощающих электроны [40–43].

Принимая во внимание широкий набор морфологических структур, наблюдавшихся ранее другими исследователями в нефракционированных препаратах ГК и ФК различного происхождения, можно допустить две возможности: 1) каждая фракция содержит полный набор структурных элементов или 2) отдельные структуры доминируют в конкретных электрофоретических фракциях. Если ПЭМ-изображения фракций покажут существенные морфологические различия, то логично было бы связать эти различия с обнаруженными нами ранее физико-химическими характеристиками ГК и фракций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение из ГК чернозема стабильных электрофоретических фракций, их физико-химические характеристики и химический состав. В качестве объекта исследования использовали препарат ГК, выделенный из чернозема, представляющего наиболее плодородную почву, занимающую обширную территорию европейской и азиатской частей России. На рис. 1а представлены электрофореграммы природно окрашенных препаратов ГК чернозема и его трех электрофоретических фракций А, В и С + D, полученных с помощью ранее разработанного сочетания методов ЭХ–ЭПААГ [28]. Фракции различаются как электрофоретической подвижностью (ЭП), так и объемом элюции (V_e) с хроматографической колонки (рис. 1а, 1б). Фракция А ($V_e = 47–56$ мл) была обнаружена в свободном объеме колонки и представляла собой стартовую зону, частично проникающую в поры 10%-ного ПААГ, фракция В ($V_e = 57–80$ мл)

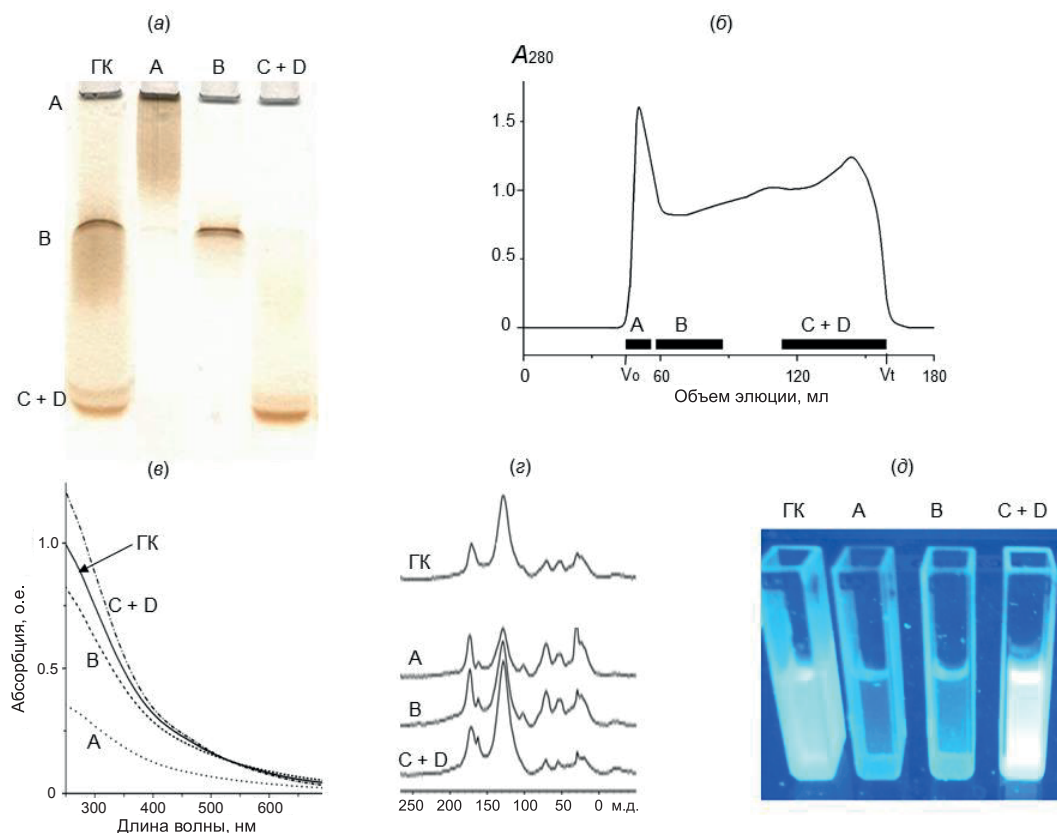


Рис. 1. Электрофорез ГК чернозема и фракций А, В, С + D в 10%-ном ПААГ (а); фракционирование ГК на колонке с сефадексом G-75 (б); спектры поглощения ГК и фракций при концентрации препаратов 20 мг/л (в); ^{13}C -ЯМР-спектры (г) и распределение интенсивности флуоресценции препаратов при освещении УФ-светом длиной волны 312 нм (д).

образовала узкую полосу в средней части ПААГ, а фракция С+D ($V_e = 111\text{--}160$ мл) формировала две зоны разной интенсивности, имеющие близкие ЭП в нижней части геля. Часть ГК, выходящую с хроматографической колонки в виде смеси фракций В и С + D ($V_e = 81\text{--}110$ мл), для дальнейших анализов не использовали. Весовая доля фракции А составляла 21%, фракции В – 19%, фракции С + D – 37%, смеси фракций В и С + D – 23%. Препараты существенно различаются не только по V_e и ЭП, но и по целому ряду других физико-химических характеристик. На рис. 1в представлены спектры поглощения ГК чернозема и фракций в УФ- и видимой областях света, измеренные при одинаковой концентрации образцов. Спектры поглощения фракций не имели характерных максимумов, как и спектр исходного препарата ГК, однако существенно различались между собой по оптической плотности в УФ- и видимой областях света (табл. 1). На длине волны 270 нм оптические плотности фракций А ($A_{270} = 0.32$) и С + D ($A_{270} = 1.1$) различались более чем в 3 раза, что, вероятнее всего, связано с различным содер-

жанием ароматических компонентов, поглощающих свет в УФ-области света [44]. Преимущественное содержание ароматических компонентов во фракции С + D по сравнению с фракциями А и В было продемонстрировано нами с помощью твердофазной ^{13}C -ЯМР-спектроскопии (рис. 1г, табл. 1) [32]. Методом пиролиза метилированных препаратов ГК и фракций, сопряженного с газовой хроматографией и масс-спектрометрией (пиролиз/ГХ/МС), были идентифицированы линейные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, алканы и алкены – алифатические компоненты с длиной цепи 12–30 углеродных атомов. Среди обнаруженных ароматических компонентов преобладали бензолполикарбоновые кислоты, а также незначительное количество монофенолов и мономеров окисленных лигнинов [30]. С помощью двумерного и трехмерного флуоресцентных анализов [31, 34] было показано, что во фракции С + D сконцентрирована значительная доля флуоресцирующих групп с длинами волн испускания в видимом диапазоне 450–550 нм (рис. 1д, табл. 1), а фрак-

Таблица 1. Некоторые физико-химические характеристики ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D

Образцы	ОФ-ВЭЖХ [33]	Кислотный гидролиз [29]	Твердофазный ¹³ C-ЯМР [32]		Пиролиз/ГХ/МС [30]	Интенсивность испускания флуоресценции [31, 34]		Оптические свойства (C _{препаратов} = 20 мг/л)	
			индекс ароматичности C _{аром} (165–108 м.д.)/C _{алиф} (108–0 м.д.)	аномерный углерод (100 м.д.)		УФ-флуоресценция (λ = 320–350 нм)	видимая флуоресценция (λ = 450–550 нм)	A ₂₇₀	A ₄₆₅
ГК чернозема	29	6.1 ± 0.3	1.87	+	C12–C30	+	++	0.91	0.21
Фракция А	73	13.2 ± 1.0	0.64	+++	C12–C30	+++	+	0.32	0.08
Фракция В	33	7.9 ± 0.5	1.28	++	C12–C22	++	+	0.75	0.19
Фракция С + D	0	2.3 ± 0.2	3.26	–	C12–C22	–	+++++	1.1	0.22

ции А и В обогащены протеиноподобными флуоресцирующими группами с длинами волн испускания в УФ-диапазоне 320–350 нм (табл. 1). Обогащение фракций А и В аминокислотами было подтверждено с помощью кислотного гидролиза препаратов (табл. 1) [29]. Препараты различались по степени гидрофобности [33], а также по биологической [45] и фотохимической активности [31].

Таким образом, многолетний комплексный анализ препаратов ГК чернозема и электрофоретических фракций выявил принципиальные различия в их физико-химических свойствах, химическом составе и экологических функциях. Морфологический анализ, несомненно, дополнил бы их “характеристический паспорт” и возможно, в сочетании с другими ранее выявленными параметрами, дал бы ключ к пониманию структурной организации природного органического вещества. Исходя из этого предположения, мы проанализировали ГК чернозема и электрофоретические фракции с помощью ПЭМ.

ПЭМ-анализ препаратов ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D. В настоящей работе был впервые применен метод пробоподготовки почвенных ГК с использованием негативного контрастирования препаратов водным раствором уранилацетата. Сравнительный ПЭМ-анализ ГК и фракций был проведен через 10 сут после приготовления растворов одинаковой концентрации. ПЭМ-изображения ГК чернозема и фракций А, В, С + D приведены на рис. 2. Обнаруженные структурные элементы различной морфологии сведены в табл. 2 (п. 1–7). Все исследованные образцы содержали точечные частицы диаметром 2–3 нм (п. 1), кольцевые частицы (п. 2, диаметр 4–6 нм) с отверстием в центре диаметром ~2 нм и червеподобные короткие частицы (п. 3, длина 20–30 нм, ширина 4–6 нм). Кроме того, в ГК и фракциях присутствовали сфериды (п. 4) различного диаметра (10–30 нм). Крупные морфологические элементы – капельные везикулоподобные образования с неровными четко выраженными краями (п. 5, длина 70–150 нм, ширина 30–80 нм) обнаружены только во фракции А, занимая ~55% площади ПЭМ-изображений. Другие крупные морфологические элементы – длинные цепочкообразные или линейные фибриллы (п. 6, длина 60–100 нм, ширина 4–6 и 2–3 нм соответственно) и их пучки (п. 7, длина >150 нм, диаметр 30–70 нм), обнаружены только во фракции С + D и занимали ~59% площади ПЭМ-изображений. Длинные цепочкообразные и линейные фибриллы предположительно представляют собой два разных ПЭМ-изображения одних и тех же морфологических структур длиной 60–100 нм,

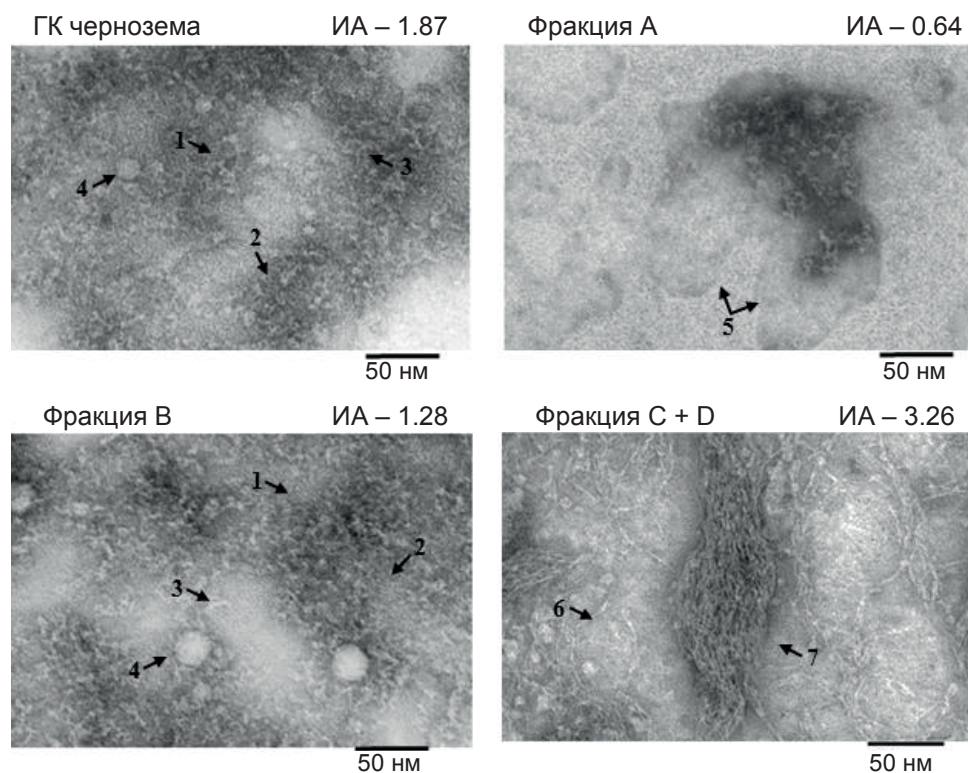


Рис. 2. ПЭМ-изображения препаратов ГК чернозема и фракций А, В, С + D. Номера 1–7 соответствуют порядковым номерам морфологических форм, представленных в табл. 2: точечные частицы (1), кольцевые частицы (2), червеподобные частицы (3), сфероиды (4), капельные везикулоподобные образования (5), длинные фибриллы (6), пучки длинных фибрилл (7). Индекс ароматичности (ИА), т.е. $S_{\text{аром}}/S_{\text{алиф}}$, рассчитан на основании ^{13}C -ЯМР-спектров по соотношению площадей над областями химических сдвигов ароматического (165–108 м.д.) и алифатического (108–0 м.д.) углерода согласно нашим ранее опубликованным данным [32].

Таблица 2. Распределение структурных элементов различной морфологии (1–7) между исходным препаратом ГК чернозема и электрофоретическими фракциями А, В и С + D

№	Морфологические структурные элементы	ГК чернозема	Фракция А	Фракция В	Фракция С + D
1	Точечные частицы	d (2–3 нм)	d (2–3 нм)	d (2–3 нм)	d (2–3 нм)
2	Кольцевые частицы	d (4–6 нм)	d (4–6 нм)	d (4–6 нм)	d (4–6 нм)
3	Червеподобные частицы	l (20–30 нм) w (4–6 нм)	l (20–30 нм) w (4–6 нм)	l (20–30 нм) w (4–6 нм)	l (20–30 нм) w (4–6 нм)
4	Сфероиды	d (10–20 нм)	d (10–20 нм)	d (20–30 нм)	d (10–15 нм)
5	Капельные везикулоподобные образования	–	l (70–150 нм) w (30–80 нм)	–	–
6	Длинные фибриллы	–	–	–	l (60–100 нм) w (2–3 нм) w (4–6 нм)
7	Пучки длинных фибрилл	–	–	–	l (>150 нм) d (30–70 нм)

Примечание: d – диаметр, l – длина, w – ширина.

шириной 4–6 нм и толщиной 2–3 нм, расположенных на поверхности пленки формвара под разными углами (рис. 2 и 3, п. 6 и 7). Следует отметить, что если в ГК чернозема и фракции В обнаружены только небольшие морфологические элементы (точечные, кольцевые, червеподобные частицы и сфероиды), то во фракциях А и С+D мелкие элементы покрывали <50% площади ПЭМ-изображений.

Взаимосвязь морфологических структур и физико-химических свойств препаратов ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D. Существенные морфологические различия между ГК чернозема и электрофоретическими фракциями связаны с их химическим составом и контрастными физико-химическими характеристиками (табл. 1, рис. 1). По данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии отношение $S_{\text{аром}}(165-108 \text{ м.д.})/S_{\text{алиф}}(108-0 \text{ м.д.})$, названное индексом ароматичности (ИА), увеличивается в 5 раз от фракции А (ИА – 0.64) к фракции С+D (ИА – 3.26), фракция В имеет среднюю ароматичность (ИА – 1.28) между фракциями А и С + D и сопоставима с ароматичностью ГК чернозема (ИА – 1.87) [32]. В первом приближении ароматичность (т.е. соотношение алифатических и ароматических компонентов в образцах ГК) может служить базовым показателем формирования различных морфологических структур во фракциях (рис. 2).

Неравномерное распределение ароматических и алифатических компонентов между фракциями было подтверждено несколькими аналитическими методами [29–32]. Существенное обогащение фракции С + D ароматическими компонентами – преимущественно низкомолекулярными конденсированными полиароматическими соединениями, содержащими значительное число кислородных функциональных групп – было

подтверждено с помощью ион-циклотронной масс-спектрометрии высокого разрешения с преобразованиями Фурье (неопубликованные данные). Наличие в ^{13}C -ЯМР-спектрах ГК чернозема сигнала с химическим сдвигом 100 м.д. отражает присутствие в препаратах аномального углерода сахаров [32]. Различная интенсивность этого сигнала указывает на максимальное содержание сахаров во фракциях А и В и его отсутствие во фракции С + D (рис. 1г, табл. 1). Наибольшее весовое содержание гидролизуемых аминокислот обнаружено во фракции А (13.2%), а наименьшее – во фракции С + D (2.3%) [29]. Пиролиз/ГХ/МС показал, что во фракции А содержится существенно больше линейных длинноцепочечных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, алканов и алкенов, чем во фракциях В и С + D. Интересно, что во фракциях В и С + D были идентифицированы только гомологи жирных кислот с длиной цепи 12–22 углеродных атомов, а во фракции А – с длиной цепи 12–30 углеродных атомов. Наиболее примечательно превышение на порядок во всех препаратах содержания амфифильных линейных жирных кислот по сравнению с содержанием алканов и алкенов [30]. Преимущественное содержание во фракции А амфифильных жирных кислот, подтвержденное различными аналитическими методами, хорошо согласуется с формированием везикулярных образований, наблюдаемых в этой фракции методом ПЭМ. С другой стороны, значительное преобладание ароматических соединений во фракции С+D свидетельствует о том, что именно ароматические структуры – основной структурный компонент для формирования длинных фибрилл и их пучков, наблюдаемых на ПЭМ-изображениях этой фракции.

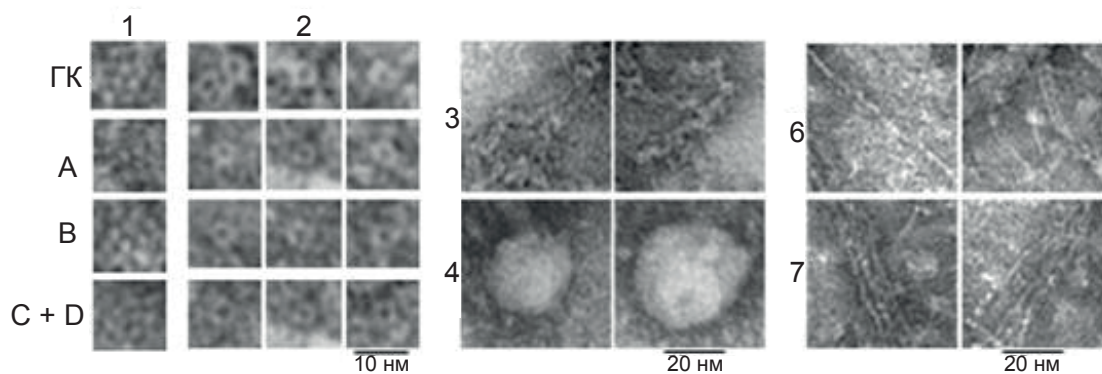


Рис. 3. ПЭМ-изображения точечных (1) и кольцевых (2) частиц на различных микрофотографиях препаратов ГК чернозема и фракций А, В, С + D; примеры червеподобных частиц (3), сфероидов (4), длинных фибрилл в двух разных проекциях (6), а также пучков длинных фибрилл (7).

Результаты ПЭМ как существенный визуальный аргумент в пользу супрамолекулярной организации почвенных ГК. В настоящей работе использован инновационный подход, заключающийся в разделении препарата ГК чернозема на стабильные электрофоретические фракции, различающиеся по ряду физико-химических параметров и химическому составу, с последующим морфологическим анализом образцов методом ПЭМ. Подготовку препаратов для ПЭМ почвенных ГК проводили методом негативного контрастирования раствором уранилацетата. Ранее I.L. Stevenson и M. Schnitzer [36, 37], используя для контрастирования образцов метод реплик в сочетании с ПЭМ, наблюдали на изображениях почвенных препаратов ГК канадского чернозема сфероиды диаметром 9–50 нм и их агрегаты диаметром 100–200 нм, а также линейные, цепочкообразные фибриллы. Основываясь на полученных результатах, M. Schnitzer [21] предположил, что агрегаты сфероидов – строительные блоки для сборки более крупных морфологических структур, таких как длинные волокна. Используя методику негативного контрастирования уранилацетом, мы подтвердили предположение M. Schnitzer о сборке крупных морфологических структур из более мелких и впервые выявили новые структурообразующие морфологические элементы почвенных ГК, названные точечными и кольцевыми частицами (рис. 3, табл. 2, п. 1 и 2). Обнаружение новых морфологических элементов меньшего размера стало возможным благодаря методике негативного контрастирования образцов ГК и фракций 1%-ным раствором уранилацета, легко проникающим внутрь сложно организованных частиц.

Согласно нашим результатам, базовыми строительными блоками для сборки ряда более крупных морфологических структур, таких как сфероиды, червеподобные короткие частицы, длинные фибриллы и пучки длинных фибрилл (рис. 3, табл. 2, п. 3, 4, 6, 7), являются не агрегаты сфероидов, как у I.L. Stevenson и M. Schnitzer [36, 37], а более мелкие кольцевые частицы с отверстием в центре (рис. 3, табл. 2, п. 2, диаметр частиц 4–6 нм, диаметр отверстия 2 нм), взаимодействующие между собой за счет разнообразных нековалентных связей (водородных и стэкинг-взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и др.). Исходя из сравнительного анализа формы и размеров точечных и кольцевых частиц (рис. 3, табл. 2, п. 1 и 2), можно также предположить супрамолекулярную организацию кольцевых частиц из нескольких точечных частиц, однако для подтверждения этого вопроса необходимо использовать электронно-

микроскопические методы более высокого разрешения. С другой стороны, наблюдаемые во фракции А крупные везикулярные образования (рис. 2, табл. 2, п. 5) можно объяснить наличием избытка амфифильных линейных жирных кислот, способных самоорганизоваться в растворе в мицеллы или везикулы. Полученные результаты впервые дают визуальное представление о механизмах формирования супрамолекулярных агрегатов почвенных ГК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Почвенный образец и выделение гуминовых кислот. В качестве почвенного образца была выбрана хорошо известная в мире наиболее плодородная черноземная почва, занимающая значительную территорию европейской и азиатской частей России. Образец почвы был отобран из верхнего горизонта А (10–20 см) чернозема на территории государственного почвенного заповедника, расположенного в Курской области.

После высушивания на воздухе, тщательного удаления растительных остатков, измельчения с помощью фарфоровой ступки и просеивания через сито с размером пор 2 мм образец почвы пересыпали в плотно закрывающуюся стеклянную колбу и хранили в темноте при комнатной температуре для дальнейших исследований.

Гуминовые кислоты (ГК) выделяли из почвы щелочной экстракцией с последующим осаждением соляной кислотой по методу Кононовой–Бельчиковой [1]. Лиофильный препарат ГК чернозема хранили в плотно закрытой стеклянной колбе в темноте при комнатной температуре. Содержание воды (8.5%) и золы (2.3%) измеряли на термоанализаторе (Perkin Elmer, США). Элементный состав сухого беззольного препарата ГК (С 62.6%, Н 4.3%, N 4.2%) проводили на анализаторе CHN Analyzer, series II 2400 (Perkin Elmer, США).

Фракционирование ГК чернозема сочетанием методов ЭХ–ЭПААГ. Фракционирование препарата ГК проводили с помощью ЭХ, а отбор нужных фракций осуществляли на основании анализа хроматографического профиля с помощью аналитического ЭПААГ. Методика ЭХ–ЭПААГ подробно описана нами ранее [28]. ГК (10 мг) растворяли в 1 мл 7 М мочевины и наносили на колонку с сефадексом G-75 (Pharmacia, Швеция) (1.5 × 100 см), уравновешенную тем же раствором. Скорость потока составляла 15 мл/ч. С помощью коллектора фракций (ISCO, США) вещество с колонки собирали в виде аликвот объемом 2 мл. Из каждой третьей аликвоты отбирали 0.1 мл элюата для ЭПААГ-анализа на приборе для вертикального электрофореза

(LKB 2001 Vertical Electrophoresis, Швеция) с пластинками геля размером 20 × 20 см. Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ в течение 1 ч при комнатной температуре (сила тока – 25 мА). В качестве буфера для приготовления геля использовали 89 мМ Tris-борат (pH 8.3), 7 М мочевины, 1 мМ ЭДТА. Электродный буфер содержал 89 мМ раствор Tris-бората (pH 8.3) и 1 мМ ЭДТА. Перед ЭПААГ к каждому образцу (0.1 мл элюата) добавляли 0.01 мл раствора, содержащего 890 мМ Tris-бората (pH 8.3), 10 мМ ЭДТА и 10% додецилсульфата натрия. В результате ЭПААГ-анализа из хроматографического профиля были выделены три области, каждая из которых содержала индивидуальную электрофоретическую зону коричневого цвета. Фракции, названные А, В и С + D, различались как объемами элюции (V_e) с колонки, так и электрофоретической подвижностью (ЭП). Фракции диализовали в течение 7 сут против дистиллированной воды на диализной мембране с размером пор 10–12 кДа, высушивали лиофилизацией и хранили в плотно закрытых стеклянных ампулах в темноте при комнатной температуре. Процедуру фракционирования повторяли несколько раз для получения достаточного количества вещества для дальнейших исследований. Массовый баланс (%) сухих электрофоретических фракций рассчитывали по соотношению $W_i/\Sigma W_k$, где W_i – масса фракции, а ΣW_k – масса всех фракций, полученных после фракционирования, очистки диализом и лиофилизацией.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Образцы исходного препарата ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D взвешивали и растворяли в 10 мМ NaOH до концентрации 0.1 мг/мл, pH растворов составлял ~8–9. Образцы для ПЭМ-исследований готовили методом негативного контрастирования. Медные сеточки (400 mesh, Electron Microscopy Sciences, США), покрытые формваровой пленкой (0.2%-ный раствор формвара в хлороформе), помещали на каплю препарата (8–10 мкл). После 5 мин адсорбции сеточки с препаратом переносили на каплю (40 мкл) 1%-ного (w/v) уранилацетата. Время контрастирования составляло 1–2 мин. Избыток жидкости (при перенесении препарата на контрастер и после контрастирования) убирали, касаясь краем сеточки кусочка фильтровальной бумаги. Препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1200EX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения фиксировали на электронную фотопленку Kodak (SO-163, Kodak Electron Image Film, США) при номинальном увеличении 40 000×. ПЭМ-анализ проводили для каждого образца через

10 сут после приготовления растворов в трех повторностях.

Спектры поглощения и флуоресценция. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях света были получены на спектрофотометре Cary 3 (Varian, США) в кварцевой кювете длиной 1 см. Препараты ГК и фракций растворяли в растворе 10 мМ NaOH до концентрации 20 мг/л. Оптические плотности (A_{270} и A_{465}) на длинах волн 270 и 465 нм для ГК и фракций приведены в табл. 1. Распределение между образцами флуоресценции в видимой области света демонстрировали с помощью трансиллюминатора на длине волны возбуждения 312 нм в кварцевых кюветах. Для минимизации эффекта внутреннего фильтра растворы ГК и фракций разбавляли до оптической плотности 0.05 на длине волны 270 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПЭМ большого увеличения (40 000×) с контрастным окрашиванием раствором уранилацетата впервые была использована для характеристики почвенных ГК и их электрофоретических фракций А, В и С + D, полученных сочетанием методов ЭХ–ЭПААГ. Мелкие морфологические элементы, такие как точечные и кольцевые частицы, червеподобные короткие частицы и сфероиды, наблюдали во всех образцах, но в разных количествах. Крупные морфологические структуры в виде размазанных капель с четкими краями формировались только во фракции А, а длинные волокна или их пучки – исключительно во фракции С + D. Была обнаружена корреляция между морфологическими формами и физико-химическими характеристиками образцов ГК и фракций. Результаты ПЭМ дают новую информацию о размере и форме кольцевых частиц с отверстием в центре, являющихся потенциальными строительными блоками для формирования более крупных супрамолекулярных морфологических структур, таких как сфероиды, червеподобные короткие частицы или удлиненные волокна. Супрамолекулярная концепция строения природных ГК может быть успешно использована для объяснения природных процессов, происходящих с участием ГК, и более точного определения их экологических функций в биосфере.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания на базе Центра электронной микроскопии Пущинского центра биологических исследований (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием

людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононова М.М. // Органическое вещество почв. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 314 с.
2. Wershaw R.L. Evaluation of Conceptual Models of Natural Organic Matter (Humus) From a Consideration of the Chemical and Biochemical Processes of Humification, U.S. Geological Survey, Reston, VA. 2004. Scientific Investigations Report No. 2004-5121.
3. Kleber M., Johnson M.G. // Adv. Agron. 2010. V. 106. P. 77–142.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)06003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)06003-7)
4. Stevenson F.J. // Humus chemistry – Genesis, Composition, Reactions (2nd ed.). New York, John Wiley. 1994. 496 p.
5. Schmidt M.W.I., Torn M.S., Abiven S., Dittmar T., Guggenberger G., Janssens I.A., Kleber M., Kögel-Knabner I., Lehmann J., Manning D.A.C., Nannipieri P., Rasse D.P., Weiner S., Trumbore S.E. // Nature. 2011. V. 478. P. 49–56.
<https://doi.org/10.1038/nature10386>
6. Zepp R.G., Schlotzhauer P.F., Sink R.M. // Environ. Sci. Technol. 1985. V. 19. P. 74–81.
7. Христева Л.А., Пиеничный А.Е., Пивоваров Л.П. // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Изд-во Харьковского ун-та, 1957. С. 109–126.
8. Canellas L.P., Piccolo A., Dobbss L.B., Spaccini R., Olivares F.L., Zandonadi D.B., Façanha A.R. // Chemosphere. 2010. V. 78. P. 457–466.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>
9. Martinez-Balmon D., Spassini R., Aguiar N.O., Novotny E.H., Olivares F.L., Canellas L.P. // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 11412–11419.
<https://doi.org/10.1021/jf504629c>
10. Boyle E.S., Guerriero N., Thiallet A., Vecchio, R.D., Blough N.V. // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. P. 2262–2268.
<https://doi.org/10.1021/es803264g>
11. Alberts J.J., Takacs M. // Org. Geochem. 2004. V. 35. P. 243–256.
<https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2003.11.007>
12. Lehmann J., Kleber M. // Nature. 2015. V. 528. P. 60–68.
<https://doi.org/10.1038/nature16069>
13. Kleber M., Lehmann J. // J. Environ. Qual. 2019. V. 48. P. 207–216.
<https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0036>
14. Haworth R.D. // Soil Sci. 1971. V. 111. P. 71–79.
<https://doi.org/10.1097/00010694-197101000-00009>
15. Schulten H.R., Schnitzer M. // Soil Science. 1997. V. 162. P. 115–130.
16. MacCarthy P. // Soil Sci. 2001. V. 166. P. 738–751.
<https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00003>
17. Kleinhempel D. // Archives of Agronomy and Soil Science. 1970. V. 14. P. 3–14.
18. Farmer V.C., Pisaniello D.L. // Nature. 1985. V. 313. P. 474–475.
<https://doi.org/10.1038/313474a0>
19. Shnitzer M., Neyroud A. // Fuel. 1975. V. 54. P. 17–19.
20. Saiz-Jimenez C. // Environ. Sci. Technol. 1994. V. 28. P. 197–200.
21. Schnitzer M. // Soil Sci. 1991. V. 151. P. 41–58.
22. Студ Д.В., Эввуд Д.Л. // Супрамолекулярная химия (в 2 т.). М.: Академкнига, 2007.
23. Wershaw R.L. // J. Contam. Hydrol. 1986. V. 1. P. 29–45.
[https://doi.org/10.1016/0169-7722\(86\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0169-7722(86)90005-7)
24. Piccolo A. // Soil Sci. 2001. V. 166. P. 810–832.
25. Kingery W.L., Simpson A.J., Hayes M.H.B., Hayes M.A., Locke M.A., Hicks R.P. // Soil Sci. 2000. V. 165. P. 483–494.
26. Simpson A.J., Kingery W.L., Hayes M.H., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Kerssebaum R., Hofmann M. // Naturwissenschaften. 2002. V. 89. P. 84–88.
27. Piccolo A., Conte P., Trivellone E., Van Lagen B. // Environ. Sci. Tech. 2002. V. 36 P. 76–84.
<https://doi.org/10.1021/es010981v>
28. Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E., Afanas'eva G.V., Reznikova O.I., Saiz-Jimenez C. // J. Chromatogr. A. 1997. V. 767. P. 285–292.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00019-8)
29. Trubetskaya O.E., Trubetskoy O.A., Afanas'eva G.V., Reznikova O.I., Markova L.F., Muranova T.A. // Environ. Int. 1998. V. 24. P. 573–581.
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00036-1)
30. Saiz-Jimenez C., Hermosin B., Trubetskaya O., Reznikova O., Afanas'eva G., Trubetskoy O. // Geoderma. 2006. V. 131. P. 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.03.001>
31. Richard C., Trubetskaya O.E., Trubetskoy O.A., Reznikova O.I., Afanas'eva G.V., Aguer J.-P., Guyot G. // Environ. Sci. Technol. 2004. V. 38. P. 2052–2057.
<https://doi.org/10.1021/es030049f>
32. Trubetskoy O.A., Hatcher P.G., Trubetskaya O.E. // Chem. Ecol. 2010. V. 26. P. 315–325.
<https://doi.org/10.1080/02757541003785825>
33. Trubetskoy O.A., Richard C., Guyot G., Voyard G., Trubetskaya O.E. // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1243. P. 62–68.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.043>
34. Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е. // Почвоведение. 2017. № 9. С. 1057–1064.
<https://doi.org/10.7868/S0032180X17090088>

35. Orlov D.S., Ammosova Ya.M., Glebova G.I. // *Geoderma*. 1975. V. 13. P. 211–229.
[https://doi.org/10.1016/0016-7061\(75\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0016-7061(75)90019-1)
36. Stevenson I.L., Schnitzer M. // *Soil Sci.* 1982. V. 133. P. 179–185.
<https://doi.org/10.1097/00010694-198203000-00007>
37. Stevenson I.L., Schnitzer M. // *Soil Sci.* 1984. V. 138. P. 123–126.
38. Kerner M., Hohenberg H., Ertl S., Reckermann M., Spitz A. // *Nature*. 2003. V. 422. P. 150–154.
<https://doi.org/10.1038/nature01469>
39. Dong V., Wan L., Cai J., Fang Q., Chi V., Chen G. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 10037.
<https://doi.org/10.1038/srep10037>
40. Vasiliev V.D., Selivanova O.M., Baranov V.I., Spirin A.S. // *FEBS Lett.* 1983. V. 155. P. 167–172.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80232-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80232-4)
41. Peschek J., Braun N., Franzmann T.M., Georgalis Y., Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. // *PNAS*. 2009. V. 106. P. 13272–13277.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902651106>
42. Selivanova O.M., Surin A.K., Marchenkov V.V., Dzhus U.F., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y., Glyakina A.V., Dovidchenko N.V., Galzitskaya O.V. // *J. Alzheimers Dis.* 2016. V. 54. P. 821–830.
<https://doi.org/10.3233/JAD-160405>
43. Galzitskaya O.V., Selivanova O.M. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 59. P. 785–795.
<https://doi.org/10.3233/JAD-170230>
44. Traina S.J., Novak J., Smeck N.E. // *J. Environ. Qual.* 1990. V. 19. P. 151–153.
<https://doi.org/10.2134/jeq1990.00472425001900010023x>
45. Трубецкая О.Е., Трубецкой О.А. // *Почвоведение*. 2021. № 7. С. 862–870.
<https://doi.org/10.31857/S0032180X21060150>

Electron Microscopy of Stable Electrophoretic Fractions of Natural Humic Acids – the Key to the Understanding of Their Structural Organization

O. E. Trubetskaya*, #, O. M. Selivanova**, V. V. Rogachevsky***, and O. A. Trubetskoj****

E-mail: olegi03@yahoo.com

* Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, prosp. Nauki, 6, Pushchino, 142290 Russia

** Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 4, Pushchino, 142290 Russia

*** Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 3, Pushchino, 142290 Russia

**** Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 2, Pushchino, 142290 Russia

Transmission electron microscopy (TEM) with contrast staining by uranyl acetate solution was used to study morphological differences between soil humic acids (HAs) and their A, B and C + D fractions obtained using coupling preparative low-pressure size exclusion chromatography and analytical polyacrylamide gel electrophoresis. The electrophoretic mobility of fractions varied in order C + D > B > A. The distribution of various morphological elements between fractions showed that large structures such as vesicle-like formations 70–150 nm long and 30–80 nm wide with clear edges were found exclusively in fraction A and occupied ~55% of the TEM image area. On the other hand, long fibrils with a length of 60–100 nm, a width of 4–6 nm and a thickness of 2–3 nm, as well as their bundles with a length of >150 nm and a diameter of 30–70 nm were identified only in the C + D fraction and occupied ~59 % area of TEM images. Smaller morphological elements such as point particles with a diameter of 2–3 nm, ring particles with a diameter of 4–6 nm, worm-shaped short particles with a length of 20–30 nm, and spheroids with a diameter of 10–30 nm were observed in all samples, but in varying quantities. Significant morphological differences between the fractions can be explained by their composition, previously established by using a few physico-chemical methods. The ratio $C_{ar}(165-108 \text{ ppm})/C_{alk}(108-0 \text{ ppm})$, or aromaticity index, calculated from $^{13}\text{C-NMR}$, could be one of the indicators of the various morphological structures formation. The obtained TEM results clearly confirm the supramolecular organization of soil HAs.

Keywords: soil humic acids, electrophoresis by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), size exclusion chromatography (SEC), transmission electron microscopy (TEM), physico-chemical characteristics, supramolecular structure