

© Т.Н. ГУБЕРНАТОРОВА<sup>1</sup>, М.И. ДИНУ<sup>2</sup>

Институт водных проблем Российской академии наук (Москва)  
Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского  
Российской академии наук (Москва)  
fulva@rambler.ru, tatiana.ivp.ran@gmail.com

УДК 574.64

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
БИОДЕСТРУКЦИИ ГУМУСОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ  
ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ГРИБОВ**

**EXPERIMENTAL STUDIES OF HUMIC COMPOUNDS BIODEGRADATION  
INDUCED BY FUNGAL ENZYMATIC OXIDIZING COMPLEX**

*АННОТАЦИЯ.* Деструкция гумусовых соединений в водной среде под действием ферментного окислительного комплекса грибов является естественным биохимическим процессом, который протекает в водных экосистемах. Гумусовые вещества относятся к стойким органическим соединениям, трудно поддаются деструкции, склонны к процессам полимеризации. Процессы биоразложения гумусовых веществ под действием грибов являются повсеместными и занимают весьма важное место в окружающей среде, но их изучение все еще находится на начальной стадии. Данная работа посвящена экспериментальным исследованиям процессов биодеструкции гумусовых веществ под действием ферментного окислительного комплекса грибов. Для исследований были выбраны марганецпероксидаза из *Phanerochaete chrysosporium* и пероксидаза из *Bjerkandera adusta*, в качестве типичных окислительных ферментов лигнолитического комплекса грибов-деструкторов. В ходе эксперимента исследовалось непосредственное влияние ферментов на гумусовые соединения при прямом внесении. Полученные пробы исследовали спектрометрически на изменение оптической плотности, изменения ИК-спектра, а также фиксировали изменения средневесовой молекулярной массы гумусовых кислот и величины ХПК, с последующим анализом данных и сравнением полученных результатов.

*SUMMARY.* Degradation of humic substances in water environment induced by fungal enzymatic oxidizing complex is a natural biochemical process, occurring in water ecosystems. Humic substances are persistent organic compounds which are slowly decomposed and inclined to polymerization processes. Biodegradation of humic substances induced by fungi is a very common process and plays an important role in the environment. Unfortunately, these processes are poorly investigated. In the present work we studied the biodegradation processes of humic substances induced by the fungal enzymatic oxidizing complex. The manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* and peroxidase from *Bjerkandera adusta* was chosen as a typical oxidizing enzyme of the ligninolytic complex of fungi-decomposers. During the experiment we

*studied the impact of the enzymes on humic substances, when placed directly. Absorbance variations and infrared spectrum changes were estimated in the prepared samples by spectrometric analysis techniques. We also measured changes of the weight-average molecular weight of humic acid and COD values, followed by the data analysis and comparison of obtained results.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Гумусовые вещества, биодеструкция, грибы, марганецпероксидаза, пероксидаза.

**KEY WORDS.** Humic substances, biodegradation, fungi, manganese peroxidase, peroxidase.

Проблема деструкции органического вещества (ОВ) в водной среде непосредственно связана с ролью этого процесса в геохимическом цикле углерода на планете, с загрязнением вод ОВ, с необходимостью оценки потенциала самоочищения загрязненной водной среды. Решение этой проблемы связано с изучением механизмов деструкции под действием ферментов, выделяемых микроорганизмами, с необходимостью учитывать влияние на этот процесс структуры органических молекул, их реакционной способности. Механизмы ферментативной деструкции низкомолекулярных соединений к настоящему времени достаточно хорошо изучены. Однако этого нельзя сказать о высокомолекулярных соединениях с хаотической структурой макромолекул, таких как лигнин или широкий спектр гумусовых веществ (ГВ). В последние годы появляется все больше свидетельств того, что кинетика деструкции сложного ОВ в водной среде оказывается нелинейной, соответственно меняется и закон распада: экспоненциальная зависимость деформируется в степенную [1-7].

Большое значение при изучении механизмов и кинетики биодеструкции ГВ имеют экспериментальные исследования, позволяющие наблюдать изучаемый процесс в контролируемых лабораторных условиях.

ГВ почв являются основным резервуаром органического углерода современных экосистем. ГВ — непреходящие и наиболее реакционно-активные компоненты почвенного профиля, которые в результате выщелачивания почвенного гумуса и окисления терригенного ОВ попадают в водные объекты и влияют на широкий спектр природных и антропогенных процессов. По своей химической природе это высокомолекулярные биополимеры с хаотической структурой макромолекул, в основу которых входят остатки ароматических оксиполикарбонных кислот. Типовой фрагмент ГК приводится в [8].

ГВ относятся к стойким ОС, трудно поддаются деструкции, склонны к процессам полимеризации. Подвергаются деструкции под действием сапротрофных грибов, к которым относятся главным образом аскомицеты и базидиомицеты. Из-за крупного размера макромолекулы ГВ не могут проникать внутрь клеток микроорганизмов, поэтому процесс их биоразложения протекает под действием внеклеточных ферментов, которые выделяют грибы [9]. Таким образом, механизм деградации связан с вовлечением в процесс широкого спектра неспецифично-окислительных ферментов. В процессах деструкции участвуют и являются наиболее эффективными группа лигнинразрушающих ферментов, таких как марганецпероксидаза (MnP), лигнинпероксидаза (LiP), лакказы [10]. Механизм, по которому протекает ферментативный процесс деструкции, зависит не только от вовлекаемых ферментов и субстратов, но и от условий среды: рН, влажности, содержания кислорода, электропроводности, а также от наличия других соеди-

нений [11]. Под действием ферментов протекают определенные химические изменения, но на данный момент четкая биохимическая картина того, каким образом протекает деструкция ГВ, отсутствует. Структурная сложность ГВ делает аналитическое определение происходящих изменений весьма сложным. Процессы трансформации и биодеструкции ГВ под действием грибов являются повсеместными и занимают весьма важное место в окружающей среде, но их изучение, к сожалению, все еще находится на начальной стадии.

Для решения главной задачи — изучить механизмы деструкции ГВ под действием ферментов грибов — были проведены исследования по деструкции гумусовых кислот (ГК) под действием ферментного окислительного комплекса. В качестве основных ферментов данного комплекса были выбраны марганец-пероксидаза (MnP) из *Phanerochaete chrysosporium* и пероксидаза (VP) из *Bjerkandera adusta*. В ходе эксперимента исследовалось непосредственное влияние ферментов на ГК при прямом внесении.

В результате эксперимента удалось подобрать оптимальное сочетание концентрации ГК/ активность фермента (зависящая от концентрации) и проследить происходящие изменения — изменение цветности, ХПК и средневесовой молекулярной массы, характеризующие темпы химической деструкции ГВ. Проведенные исследования позволили подобрать условия для дальнейших экспериментов по биодеструкции ГВ под действием живой грибной культуры методом погруженного культивирования.

*Исследование деструкции ГК под воздействием MnP и VP.*

*Подготовка проб ГК из образца почвы с маркировкой «чернозем».* Подготовка проб ГК осуществлялась в соответствии с методикой, описанной в [8]. Образец почвы с маркировкой «чернозем» был выбран как оптимальный. Отбор осуществлялся по результатам физико-химического анализа и всесторонних исследований ГК, выделенных из образцов: «глееподзолистые почвы», «дерновоподзолистые почвы», «чернозем». Выбор был сделан с учетом проведенных исследований по определению молекулярных масс, качественного и количественного состава, молекулярно-массового распределения.

*Подготовка ферментативного препарата MnP и VP.* В экспериментах использовали MnP из *Phanerochaete chrysosporium* (powder, Sigma, США) и VP из *Bjerkandera adusta* (powder, Sigma, США). Энзиматическая активность MnP — 22,7 U/G; VP — 3,5 U/G (22,7 и 3,5 единиц активности на 1 гр. фермента соответственно). Оптимальные условия «работы» ферментов: pH в пределах 4,5-5,5 и температуре 23-27°C; средняя ферментативная активность составляет 100 U/л, что соответствует ферментативной активности выделяемых ферментов культурой *Pleurotus ostreatus* в период роста биомассы на 15-25-й день культивирования.

С учетом того, что в растворе ферменты быстро инактивируются, было принято решение вносить MnP и VP в реакционную смесь в виде порошка с последующим тщательным перемешиванием. В колбы Эрленмейера объемом 150 мл с 50 мл подготовленного образца ГК (концентрация ГК 2 мг/л, pH=5) вносили соответствующие количества MnP и VP (по отдельности) для обеспечения средней ферментной активности (100 U/л) в каждой реакционной смеси. Далее колбы со смесью перемешивали на качалке (шейкер) при 140-160 об/мин и 23-25°C. Отбор проб производили через каждые 10 мин. в течение часа, затем колбы со смесью оставляли до полного обесцвечивания исходного образца ГК

(около 60-120 мин.). Для инактивации ферментов в пробах использовали раствор щелочи, который по каплям добавляли в каждую отобранную пробу. Далее проводили исследования спектрометрическими методами анализа на изменение оптической плотности и изменения ИК-спектра, а также фиксировали изменения средневесовой молекулярной массы ГК и величины ХПК.

*Результаты исследований деструкции ГК под действием MnP и VP.* Согласно полученным результатам спектрометрического анализа, выявлено значительное снижение величины цветности с течением времени, как в случае с MnP, так и с VP (рис. 1).

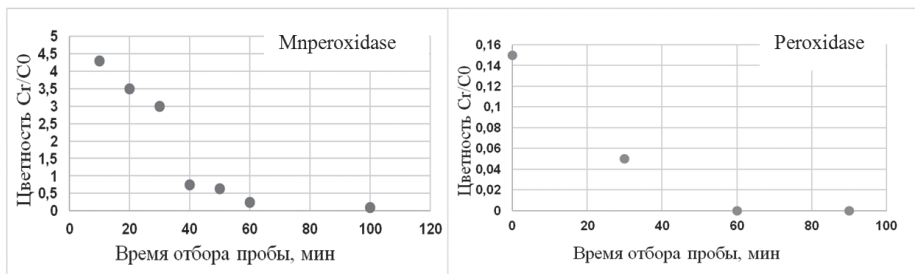


Рис. 1. Изменение величины цветности (Cr/Co) с течением времени (n=10 P=0.95)

Наиболее резкое изменение показателя цветности проявляется на 30-40 мин. процесса, что связано с отщеплением кислородсодержащих фрагментов. Так, результаты ИК-спектрометрического анализа выявили в образцах с цветностью 3 °CoI соответственно, существенные различия в количествах следующих кислородсодержащих фрагментов: карбоксильные, карбонильные и спиртовые связи. В том числе в образце с цветностью 3 °CoI проявляются отдельные фенольные фрагменты низкомолекулярных спиртовых спектров. Наименьшее отличие в цветности наблюдается в начале эксперимента. При практически полном обесцвечивании раствора (120 мин и 60 мин соответственно) ИК-спектры зафиксировали увеличение свободных аминокислотсодержащих низкомолекулярных веществ, что указывает на последовательность деструкции ГК: на первой стадии прослеживается отщепление преимущественно кислородсодержащих фрагментов с более низкой энергией связи, а на второй стадии — отщепление азотсодержащих фрагментов (более глубокая деструкция).

На изменение состава ОВ косвенно указывают и результаты анализа ХПК (рис. 2).

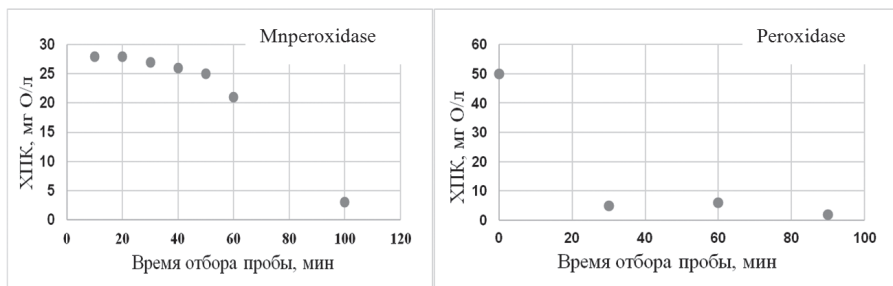


Рис. 2. Изменения величины ХПК, мгО/л (n=10, P=0,97)

Наибольшие значения этого показателя приходится на первые минуты эксперимента, когда деструкция ГК сопровождается наибольшим выделением кислорода. В заключительной стадии эксперимента значительная доля ОВ уже расщепилась до низкомолекулярных осколков (рис. 3).

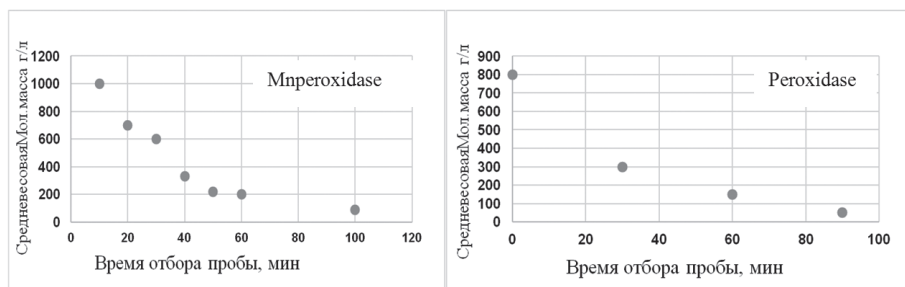


Рис. 3. Распределение средневесовых молекулярных масс гуминовых кислот ( $n=15$ ,  $P=0,97$ )

Изменение молекулярной массы с течением времени исследовали методом ультрацентрифугирования по методике [8]. Данный метод позволил выявить изменения в молекулярно-массовом распределении фрагментов в гумусовых веществах. Достаточно плавное снижение величин молекулярных масс отражает изменения в составе гуминовых кислот вне зависимости от типа выделяющихся фрагментов — кислородсодержащие, азотсодержащие и т.д.

По результатам экспериментов с добавлением VP процесс деструкции ГК происходит немного более быстрыми темпами по сравнению с экспериментами с добавкой MnP, что объясняется различиями в механизмах действия ферментов на ГК. В процессе деструкции под действием VP выделяются перекисные соединения, которые являются необходимыми интермедиатами каталитического цикла VP, и увеличение концентрации пероксосоединений стимулирует «работу» фермента. Данные эксперименты послужили рекогносцировочными для дальнейших исследований по биодеструкции ГК под действием живой грибной культуры в условиях погруженного культивирования и дали возможность произвести оценку происходящих изменений в структуре ГК под действием ферментов окислительного комплекса при непосредственном влиянии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Middelburg, J.J. A simple rate model for organic matter decomposition in marine sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1989. V. 53. Pp. 1577-1581.
2. Boudreau, B.P., Ruddick, B.R. On a reactive continuum representation of organic matter diagenesis. // *Amer. J. Sci.* 1991.V. 291. Pp. 507-538.
3. Долгоносов Б.М., Губернаторова Т.Н. Механизмы и кинетика деструкции органического вещества в водной среде. М.: КРАСАНД/URSS. 2011. 208 с.
4. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 1. Methodology // *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 311-319.
5. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 2. Analysis of the Structural Organization of Lignin // *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 320-331.

6. Gubernatorova, T.N., Dolgonosov, B.M. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 3. Analysis of Lignin Degradation Mechanisms // *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 332-346.
7. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 4. Degradation Kinetics Model // *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 347-360.
8. Дину М.И. Влияние функциональных особенностей гумусовых веществ на формы нахождения металлов в природных водах. Тюмень: ТюмГУ. 2012. 168 с.
9. Kastner, M., Hofrichter, M. Biodegradation of humic substances / In: Hofrichter, M., Steinbuchel, A (eds), *Biopolymers Lignin, Humic Substances and Coal*. 2001. V. 1. Wiley-VCH. Weinheim. Pp. 349-378.
10. Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected whiterot Fungi — production and role in lignin degradation // *FEMS Microbiology Reviews*. 1994. V. 13. Pp. 125-135.
11. Hofrichter, M., Ullrich, R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. V. 71. Pp. 276-288.

## REFERENCES

1. Middelburg, J.J. A simple rate model for organic matter decomposition in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1989. V. 53. Pp. 1577-1581.
2. Boudreau, B.P., Ruddick, B.R. On a reactive continuum representation of organic matter diagenesis. *Amer. J. Sci.* 1991. V. 291. Pp. 507-538.
3. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. *Mekhanizmy i kinetika destruktssii organicheskogo veshchestva v vodnoi srede* [Degradation Mechanisms and Kinetics of Organic Matter in an Aquatic Environment]. Moscow, 2011. 208 p. (in Russian).
4. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 1. Methodology. *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 311-319.
5. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 2. Analysis of the Structural Organization of Lignin. *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 320-331.
6. Gubernatorova, T.N., Dolgonosov, B.M. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 3. Analysis of Lignin Degradation Mechanisms. *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 332-346.
7. Dolgonosov, B.M., Gubernatorova, T.N. Modeling the Biodegradation of Multicomponent Organic Matter in an Aquatic Environment: 4. Degradation Kinetics Model. *Water Resources*. 2010. Vol. 37. № 3. Pp. 347-360.
8. Dinu, M.I. *Vliianie funktsional'nykh osobennostei gumusovykh veshchestv na formy nakhozhdeniia metallov v prirodnykh vodakh* [The influence of humic substances functional characteristics on the department of metals in natural water]. Tyumen, 2012. 168 p. (in Russian).
9. Kastner, M., Hofrichter, M. Biodegradation of humic substances // In: Hofrichter, M., Steinbuchel, A. (eds), *Biopolymers Lignin, Humic Substances and Coal*. 2001. V. 1. Wiley-VCH. Weinheim. Germany. Pp. 349-378.
10. Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected whiterot Fungi — production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994. V. 13. Pp. 125-135.
11. Hofrichter, M., Ullrich, R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. V. 71. Pp. 276-288.



**Авторы публикации**

**Губернаторова Татьяна Николаевна** — старший научный сотрудник Института водных проблем Российской академии наук (Москва), кандидат технических наук

**Дину Марина Ивановна** — научный сотрудник Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук (Москва), кандидат химических наук

**Authors of the publication**

**Tatiana N. Gubernatorova** — Cand. Sci. (Techn.), Senior Researcher, Institute of Water Problems, Russian Academy of Sciences (Moscow)

**Marina I. Dinu** — Cand. Sci. (Chem.), Researcher, Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences (Moscow)