

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

<sup>1</sup>Институт водных проблем РАН,

<sup>2</sup>Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН

<sup>1</sup>tatiana.i.vp.ran@gmail.com, <sup>2</sup>fulva@rambler.ru

УДК 574.64

**ДЕГРАДАЦИЯ СТОЙКОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА  
В ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ  
(ОБЗОР)**

**THE DEGRADATION OF RESISTANT ORGANIC SUBSTANCES IN  
AQUATIC ECOSYSTEMS AS AFFECTED BY MICROORGANISMS  
(A REVIEW)**

Деструкция органического вещества в водной среде — важная составляющая процессов самоочищения водных экосистем. Особую роль в процессах биоразложения играет стойкая фракция — водный и почвенный гумус, органическое вещество сточных вод, растительных остатков. Скорость окисления такого рода соединений и механизмы их деградации малоизучены. В современном мире особый интерес вызывают исследования, посвященные процессам биоразложения гумусовых веществ под действием микроорганизмов водной среды. Подобного рода исследования актуальны в целях выявления кинетических закономерностей и биохимических механизмов распада стойких природных биополимеров, определяющие потенциал темпов самоочищения природных водных объектов, антропогенную нагрузку на водные объекты по органическому веществу, круговорот углерода на глобальном уровне. Несмотря на интенсивные исследования в данной области до сих пор остаются нерешенные вопросы, открытые для дальнейшего изучения. Это обусловлено тем, что природные гумусовые вещества являются полиморфной смесью органических соединений неоднородного состава и сложного строения, что влечет целый ряд трудностей в процессе экспериментального изучения их биодеструкции, а применение упрощенных методов с использованием меченных синтетических «аналогов» ограничено и имеет ряд существенных недостатков.

One of the important components of the self-purification of aquatic ecosystems is the degradation of organic matter in the aquatic environment. The resistant fraction (water and soil humus, organic matter of waste waters, and plant residues) plays a particularly significant role in the processes of biodegradation. However, the oxidation rate of such compounds and the mechanisms of their degradation have been poorly investigated so far. The research of the biodegradation of humic substances as affected by microorganisms in the aquatic environment seems to be of particular interest in the present-day world. Studies of that kind are conducted in order to identify the relevant kinetic laws and biochemical mechanisms of the decay of resistant natural biopolymers. The latter determine the rate of the self-purification capacity of natural

*water bodies as well as the human-induced pressure on water bodies for organic matter and the global carbon cycle. Despite the intensive research in this area, these issues are still unresolved and open for further research due to the fact that natural humic substances are the polymorph inhomogeneous mixture of organic compounds of a complex composition and structure, which entails a number of difficulties in the pilot study of their biodegradability. Moreover, the current simplified methods implying the use of labeled synthetic "analogs" have some significant drawbacks and are limited in application.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Органическое вещество, гумусовые кислоты, биодеструкция, грибы, водные экосистемы.

**KEY WORDS.** Organic matter, humic acid, biodegradation, fungi, aquatic ecosystems.

Органическое вещество (ОВ) водных экосистем, как известно, разделяют на две основные фракции — лабильное ОВ и стойкое ОВ. Несмотря на биохимические различия, обе фракции активно участвуют в биотическом круговороте, процессах жизнедеятельности водных микроорганизмов, биологического самоочищения, формировании качества вод и биологической продуктивности водоемов, являясь важным структурным и функциональным звеном водных экосистем.

Пути деградации ОВ лабильной фракции хорошо изучены и общеизвестны, низкомолекулярные соединения легко и быстро перерабатываются водными микроорганизмами и служат основным и легкодоступным источником питания. В состав стойкой фракции ОВ входит целый спектр различных соединений — это ОВ сточных вод, водный гумус планктонного происхождения, почвенный гумус, поступающий с поверхностным стоком, ОВ растительных остатков и древесины (лигнин). Стойкая фракция ОВ окисляется со значительно меньшей скоростью, а кинетические закономерности их окисления и механизмы деструкции еще не достаточно изучены.

Огромное количество современных исследований посвящены актуальной проблеме изучения кинетических особенностей и механизмов биотрансформации гумусовых веществ (ГВ), которые являются основным компонентом водного и почвенного гумуса, входят в состав донных отложений, торфа, бурых углей, компоста, канализационных стоков и ряда других источников. Кроме того, ГВ являются важным резервуаром органического углерода в биосфере [1].

*Краткая характеристика и особенности природного биополимера — ГВ.* ГВ разделяют на три основных фракции: гуминовые кислоты (ГК), фульвокислоты (ФК) и гумины. Точные свойства и структура каждого конкретного экстракта ГВ и фракций зависят от типа почв, специфики используемого субстрата, условий экстракции [2]. Тем не менее, осредненные свойства ГК, ФК и гуминов практически единообразны. Элементный анализ образцов ГК, ФК и гуминов различных типов почв в основном постоянен и приблизительно одинаков. Более детально этот вопрос рассмотрен в [2]. Молекулярный вес макромолекул ГК колеблется в пределах 5000 — 100 000 Да (дальтон), а для ФК — 10 000 Да.

По строению ГК представляют собой ароматические конденсированные системы с боковыми цепями и гетероциклами. Макромолекулы содержат широкий спектр О- и N-содержащих функциональных групп, имеют включения моно-, ди-, полисахаридных цепей, пептидов и минеральных компонентов. Структура почвенных ГК приводится в [2], которая базируется на обобщении большого количества публикаций.

3D-структура ГК зависит от их базовой структуры, а также от физико-химических свойств окружающей среды, таких как кислотность, ионная сила раствора и влажность. 3D-структура сильно влияет на биодоступность ГК и, следовательно, на их способность к биодеструкции.

*Процессы деструкции и трансформации ГВ в водной среде.* Почвенные и водные микроорганизмы являются движущей силой процессов формирования, трансформации и минерализации ГВ. Основным и наиболее эффективным деструктором ГВ являются грибы, а на этапах разрушения низкомолекулярных соединений — метаболитов ГК и ФК включаются в процесс и бактерии [3].

В ряде обзоров установлено, что основные виды дереворазрушающих грибов способны перерабатывать различные классы стойких ОВ [4-5]. Они относятся к двум основным группам — это базидиомицеты (*Basidiomycetes*) и сумчатые (*Ascomycetes*). Наиболее важные группы грибов, принимающие активное участие в процессах биодеструкции, рассмотрены в [6].

Механизм биоразложения высокомолекулярных субстратов — многоступенчатый полиферментный процесс, осуществляемый под действием грибов. Индукторами ферментов могут быть соответствующие субстраты или мономерные продукты производимых ими реакций. Ферментные системы грибов весьма подвижны, способны подстраиваться к условиям среды и составу ОВ, обеспечивая, с одной стороны, высокую адаптивность грибов к изменяющимся внешним условиям, а с другой, — непрерывающуюся переработку стойкого ОВ в самых разных условиях [6]. Во внешней среде ферменты проявляют каталитическую активность в течение длительного времени. Есть свидетельства, что они могут долго сохраняться в морской воде и донных осадках. В водной среде ферменты способны диффундировать в мезопоры взвеси, где они защищены от бактериальной атаки. Другой механизм защиты связан с инкапсуляцией биомолекул путем создания оболочки из ассоциированных органических молекул. Еще несколько механизмов защиты описаны в [7].

С учетом того, что размеры макромолекул стойкого ОВ во много раз превышают поры клеток микроорганизмов и не могут проникать внутрь, то процесс их биоразложения протекает на поверхности макромолекул под действием внеклеточных ферментов, которые выделяют грибы. Установлено, что в процессы деградации стойкого ОВ вовлекаются и являются наиболее эффективными группы лигнинразрушающих ферментов — лакказы, группа пероксидаз (лигнинпероксидаза (LiP), марганецпероксидаза (MnP), гибридная пероксидаза (VP), метаноксидаза и др.), тирозиназы, целлюбиозодегидрогеназы, а также подсистема гидролаз, обеспечивающая разложение полисахаридов. Биохимическая характеристика наиболее важных ферментов лигнолитического комплекса (LiP, MnP, VP, лакказа), их каталитические циклы, предполагаемые механизмы и основные принципы действия на различные субстраты подробно проанализировано в [6].

Следует отметить, что лигнинразрушающие ферменты продуцируются грибами вне зависимости от наличия конкретного субстрата — лигнина или ГВ (в отличие от ферментов целлюлазного комплекса). Среди других особенностей лигнолитической системы следует отметить ее неспецифичность по субстрату (в отличие от целлюлаз), а также то, что деградация осуществляется через окислительные процессы, тогда как для других биополимеров (белки, целлюлоза) деградация идет посредством гидролиза [8].

Таким образом, можно констатировать, что грибы изначально нацелены на переработку стойких субстратов и вырабатывают для этого соответствующую неспецифическую ферментную систему широкого спектра действия.

*Актуальные проблемы современных исследований биодеструкции ГВ.* В последние десятилетия в нашей стране, но особенно за рубежом, интенсивно развиваются исследования, посвященные изучению способности различных штаммов грибов деструктировать широкий спектр ОВ как природного, так и антропогенного происхождения. Примерами таких соединений являются: ГВ, природный лигнин, лигносульфонаты и отходы деревоперерабатывающих предприятий, промышленные отходы, отходы сельского хозяйства, пестициды, ксенобиотики, лекарственные препараты, красители [4-5; 9].

Анализ зарубежной литературы свидетельствует о том, что в исследованиях, посвященных изучению биодеструкции различных классов природных ОВ, промышленных отходов и прочих опасных токсикантов, наиболее часто используются несколько основных грибных культур, относящиеся к трем семействам из отдела базидиальных грибов. Самыми эффективными грибами-деструкторами являются следующие: семейство фанерохетовых *Phanerochaetaceae*; семейство трутовых грибов *Polyporaceae*; семейство устричных *Pleurotaceae* [10].

Наиболее ценное качество, которым обладают данные виды, — это способность вырабатывать основные наиболее важные ферменты лигнолитического комплекса — LiP, MnP, VP, лакказу, но их соотношение между собой для каждого вида и даже штамма индивидуально. Преобладание того или иного фермента влечет за собой подбор оптимальных условий «работы» фермента, т. к. их активность зависит от узких пределов температуры и pH среды. Кроме того, перечисленные виды грибов отличаются различными условиями получения мицелиальной культуры, темпами роста и массонакопления, оптимальными условиями культивирования (pH, температурный и кислородный режимы), устойчивостью к воздействию болезнетворных микроорганизмов и бактерий. Поэтому, зачастую для исследования биодеструкции каждого конкретного субстрата ОВ и в том числе ГК, требуется адаптация современных методик глубинного культивирования, более детальный подбор питательных сред в зависимости от используемой культуры грибов, подбор климатических условий оптимальных для роста культуры и продуцирования ферментов.

Под действием ферментов протекают определенные физические и химические изменения, но на данный момент нет четкого представления о том, каким образом протекает биодеструкция ГК, не известен биохимический механизм этого процесса, образующиеся интермедиаты и т. д. Структурная сложность природной ГК делает аналитическое определение происходящих изменений весьма сложным. Также очень сложно установить и интерпретировать реальную исходную структуру природной ГК и структуру тех макромолекул, которые образуются в процессе распада на промежуточных этапах. Это весьма трудоемкий процесс, требующий как высокой квалификации, так и наличия современного физико-аналитического оборудования.

В наши дни используются совершенно разные методы и подходы при исследовании биодеструкции ГВ. В силу того, что природные ГВ являются полиморфной смесью взаимосвязанного ОВ, то первый подход в исследованиях заключается в сосредоточении на каждой из фракций в отдельности (ГК, ФК);

второй подход — использование меченного синтетического материала, например  $^{14}\text{C}$ -макромолекулы ( $^{14}\text{C}$ -ГК), синтезированные из пирокатехина. Использование простых синтетических «аналогов» имеет ряд существенных преимуществ — в первую очередь известна исходная структура вещества, его строение и свойства, что дает возможность заведомо смоделировать биохимический механизм процесса деструкции; их молекулярный вес мал по сравнению с природными ГК, а 3D-структура проста, что облегчает доступ ферментов к молекулам вещества, и процесс деструкции протекает в течение периода времени от нескольких часов до нескольких суток, тогда как деструкция природных ГК может длиться от нескольких месяцев до нескольких лет в зависимости от размера, состава и строения макромолекул ГК. Также введенный меченый углерод ( $^{14}\text{C}$ ) облегчает процесс выявления кинетических закономерностей процесса биодеструкции, т. к. в данном случае общепринято оценивать скорость деграции  $^{14}\text{C}$ -ГК по темпам образования  $^{14}\text{CO}_2$ , при этом промежуточные продукты, как правило, не фиксируются [11].

Следует отметить наиболее важный недостаток использования в экспериментах  $^{14}\text{C}$ -ГК — эти образцы по своим свойствам и структуре совершенно отличны от природных ГК, и полученная информация при исследовании синтетических «аналогов» заведомо отличается от полученных результатов исследований, в которых используются природные ГК.

Существуют лишь немногочисленные исследования, где используется природная ГК. Это связано со структурной сложностью и специфичностью макромолекул ГК, целым комплексом трудностей, обусловленных детектированием и определением промежуточных продуктов, невозможностью заведомо предположить или установить механизм процесса и механизм действия того или иного фермента или их комплекса, влиянием условий эксперимента, наличием или отсутствием ко-субстратов и т. д. Кроме того, процесс биодеструкции природных ГК протекает длительное время, и экспериментальные исследования могут длиться от нескольких месяцев до нескольких лет. Как правило, скорость процесса биодеструкции в экспериментах с природными ГК оценивается наиболее простым способом — по темпам накопления низкомолекулярных продуктов, скорости обесцвечивания растворов ГК, косвенно по изменению активности ферментов или по темпам сорбции вещества на грибном мицелии [12]. Структурные изменения исходных ГК, их массово-молекулярное распределение, структура и состав макроосколков, как правило, не исследуются.

Таким образом, наиболее важные вопросы, возникающие при изучении деграции ГВ и которые до сих пор малоизучены и открыты для дальнейших исследований, следующие: каков биохимический механизм распада макромолекул ГК, как он пространственно организован; как влияют особенности структуры макромолекул и ее поверхности на взаимодействие с ферментом; какие фрагменты образуются в элементарных актах распада и какова их дальнейшая судьба. Понимание механизмов процесса ферментативной деструкции ГК и влияния на процесс распада молекулярной организации макромолекул ГК позволит выявить и оценить кинетические закономерности процессов биодеграции стойкого ОВ в водной среде и в дальнейшем развить полученные ранее в [6] представления о кинетике распада природных стойких биополимеров.

**Заключение.** На лабораторной базе ФГБУН ГЕОХИ РАН, авторский коллектив проводит экспериментальные исследования по изучению процессов трансформации стойкого ОБ в водной среде — на примере природных ГВ под действием ферментных систем грибной культуры (*Pleurotus ostreatus* (штамм НК-35)) в условиях погруженного культивирования. На текущий момент проведена серия рекогносцировочных экспериментов, посвященных выявлению непосредственного влияния ферментов лигнолитического комплекса на ГК при прямом внесении с целью оценить происходящие изменения в структуре ГК. Результаты изложены в [13]. Кроме того, методически спланирован эксперимент; создана экспериментальная установка, отработана методика культивирования и поддержания инокулята грибной культуры (*Pleurotus ostreatus*). На базе современных методик, с внесением оригинальных авторских доработок, разработана схема выделения ГВ и фракций, по которой осуществлялось их выделение для дальнейших исследований.

Следует отметить, что для экспериментального изучения биодеструкции ГВ под действием микроорганизмов в водной среде, авторский коллектив использует именно природные ГВ, что является непростой задачей в плане выявления структурных и функциональных изменений в ходе биотрансформации ГВ. Но, с другой стороны, это позволит смоделировать в лабораторных условиях процессы деструкции ГВ под воздействием ферментных систем грибов, максимально приблизив модельный эксперимент к естественным условиям природной водной среды, и на основе полученных данных впоследствии проверить и уточнить выдвинутые ранее в [6] теоретические положения по деструкции ОБ в водной среде.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grinhut T., Nadar Y., Chen Y. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms (Review) // Fungal Biology Reviews. 2007. Vol. 21. Pp. 179-189.
2. Дину М. И. Влияние функциональных особенностей гумусовых веществ на формы нахождения металлов в природных водах. Тюмень: Изд-во ТюмГУ, 2012. 168 с.
3. Filip Z., Tesarova M. Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils // International Biodeterioration & Biodegradation. 2004. Vol. 54. Pp. 225-231.
4. Рабинович М. Л. и др. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 1. С. 5-23.
5. Куликова Н. А. и др. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 6. С. 619-634.
6. Долгонос Б. М., Губернаторова Т. Н. Механизмы и кинетика деструкции органического вещества в водной среде. М.: КРАСАНД/URSS, 2011. 208 с.
7. Ogaawa H., Tanoue E. Dissolved Organic Matter in Oceanic Waters // J. Oceanography. 2003. Vol. 59. Pp. 129-147.
8. Kirk T. K., Farrell R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. // Ann. Rev. Microbiol. 1987. Vol. 41. Pp. 465-505.

9. Sebnem K. et al. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes // *Biore-source Technology*. 2010. Vol. 101. Pp. 3164-3169.
10. Dinis M. J. et al. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. // *J. Bioresource Technology*. 2009. 100. Pp. 4829-4835.
11. Šnajdr J., Steffen K. T. et al. Transformation of <sup>14</sup>C-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *Gymnopus erythropus* and *Hypholoma fasciculare* // *Soil Biology & Biochemistry*. 2010. Vol. 42. Pp. 1541-1548.
12. Badis A., Ferradji F. Z. et al. Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification // *Desalination*. 2010. Vol. 259. Pp. 216-222.
13. Губернаторова Т. Н., Дину М. И. Экспериментальные исследования биодеструкции гумусовых соединений под действием ферментативного окислительного комплекса грибов // *Вестник Тюменского государственного университета*. 2014. № 12. С. 72-78.

## REFERENCES

1. Grinhut, T., Hadar, Y., Chen, Y. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms (Review) // *Fungal Biology Reviews*. 2007. Vol. 21. Pp. 179-189.
2. Dinu, M. I. The influence of functional characteristics of humic substances on the deportment of metals in natural waters. Tyumen. Tyumen State University Publ. 2012. 168 p.
3. Filip, Z., Tesarova, M. Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2004. Vol. 54. Pp. 225-231.
4. Rabinovich, M. L. et al. Degradation of natural aromatic structures and xenobiotics by mushrooms (A review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004. Vol. 40. № 1. Pp. 5-23.
5. Kulikova, N. A. et al. Use of basidiomycetes in the technology of processing and utilization of man-made waste: fundamental and applied aspects (A review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. Vol. 47. № 6. Pp. 619-634.
6. Dolgonosov, B. M., Gubernatorova, T. N. *Organic Matter Mechanisms and Degradation Kinetics in an Aquatic Environment*. Moscow: KRASAND/URSS, 2011. 208 p.
7. Ogawa, H., Tanoue, E. Dissolved Organic Matter in Oceanic Waters // *Journal of Oceanography*. 2003. Vol. 59. Pp. 129-147.
8. Kirk, T. K., Farrell, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. // *Annual Review of Microbiology*. 1987. Vol. 41. Pp. 465-505.
9. Sebnem, K. et al. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes // *Journal of Biore-source Technology*. 2010. Vol. 101. Pp. 3164-3169.
10. Dinis, M. J. et al. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. // *Journal of Bioresource Technology*. 2009. 100. Pp. 4829-4835.
11. Šnajdr, J., Steffen, K. T. et al. Transformation of <sup>14</sup>C-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *Gymnopus erythropus* and *Hypholoma fasciculare* // *Soil Biology & Biochemistry*. 2010. Vol. 42. Pp. 1541-1548.
12. Badis, A., Ferradji, F. Z. et al. Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification // *Desalination*. 2010. Vol. 259. Pp. 216-222.

13. Gubernatorova, T. N., Dinu, M. I. Experimental studies of humic compounds biodegradation under the action of fungal enzymatic oxidizing complex // Herald of Tyumen State University. 2014. № 12. Pp. 72-78.

#### **Авторы публикации**

**Татьяна Николаевна Губернаторова** — старший научный сотрудник ФГБУН Института водных проблем РАН, г. Москва, кандидат технических наук

**Марина Ивановна Дину** — научный сотрудник ФГБУН Института геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН, г. Москва, доцент, кандидат химических наук

#### **Authors of the publication**

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

**Marina I. Dinu** — Cand. Chem. Sci., Research Assistant, Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry