

На правах рукописи
ОК Мухоморова

ЗАВГОРОДНЯЯ Юлия Анатольевна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ И ГРИБНЫХ МЕЛАНИНОВ**

Специальность 04.00.03 - биогеохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА

2000

Работа выполнена на кафедре химии почв факультета Почвоведения Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: профессор, доктор биологических наук
Орлов Д.С.

Официальные оппоненты: профессор, доктор биологических наук
Карпухин А.И.
доцент, кандидат биологических наук
Богатырев Л.Г.

Ведущая организация: Почвенный институт им. В.В. Докучаева

Защита диссертации состоится 25 февраля 2000 г. в 15 час. 30 мин.
в аудитории М-2 на заседании диссертационного совета по биогеохимии Д.053.05.57
МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119899, г. Москва, Воробьевы горы, МГУ,
факультет почвоведения, Ученый совет.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании диссертационного совета, отзывы на автореферат в 2-х экземплярах, заверенные печатью, просим присылать по указанному выше адресу.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке факультета Почвоведения МГУ.

Автореферат разослан 24 января 2000 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Агапкина Г.И.

11032.35.0

17032.505.4.0

Актуальность работы. В образовании гуминовых кислот принимают участие различные органические соединения растительного, животного и микробного происхождения, поступающие в почву. Особое место среди них занимают меланины - высокомолекулярные темноокрашенные пигменты, продуцируемые многими почвенными грибами, отдельные представители которых встречаются в почвах всех зон.

По данным R.A.Nicolaus [1968], К.М.Запрометовой и др. [1971], А.А.Маламы [1975], Z.Filip et al. [1976], L.F.Linhares and J.P.Martin [1978], С.П.Лях [1981], S.Paim et al. [1990] и других авторов, некоторые грибные меланины сходны с гуминовыми кислотами по элементному составу, содержанию функциональных групп, ИК- спектрам, УФ- и видимым спектрам, ЯМР-спектрам, содержанию ароматических фрагментов, аминокислот и полисахаридов. Количество пигментов, попадающих с мицелием в почву, составляет сотые и тысячные доли миллиграмма на 1 грамм почвы и, с учетом неоднократного поступление мицелия в течении года, меланины могут составить значительную долю от органического вещества почвы. Это позволяет некоторым исследователям [Kang, Felbeck, 1964; Запрометова, Мирчинк, 1979; Звягинцев, Мирчинк, 1986] утверждать, что грибные пигменты могут в неизмененном виде не только включаться в стабильные фракции органического вещества почвы, известные как гуминовые кислоты и гумин, но и доминировать в их составе.

Сама по себе близость химического состава и свойств грибных меланинов и почвенных гуминовых кислот еще не говорит о структурном сходстве молекул этих групп веществ и не позволяет однозначно оценить роль пигментов в формировании гумуса. Вклад меланинов в гумусообразование, вероятно, во многом будет определяться их биохимической устойчивостью, способностью длительное время сохраняться в неизменном виде в почвенных условиях.

Цель работы: Дать сравнительную характеристику гуминовых кислот и грибных меланинов по их химическим свойствам и устойчивости к биодеградации.

Задачи: 1. Получить сравнительную характеристику химических свойств меланиновых пигментов и гуминовых кислот из дерново-подзолистой почвы, чернозема, бурого угля и торфа.

2. Определить скорость минерализации почвенными микроорганизмами грибных меланинов и гуминовых кислот.

3. Изучить изменения в химическом составе и молекулярно-массовых распределениях меланинов и гуминовых кислот в процессе их деградации почвенными микроорганизмами.

4. Определить степень устойчивости меланинов и гуминовых кислот к биотическому и абиотическому разрушению.

Научная новизна работы. Впервые исследованы свойства гуминовых кислот из дерново-подзолистой почвы (ГКД), чернозема (ГКЧ), торфа (ГКТ) и угля (ГКУ) и меланинов из мицелия грибов *Aspergillus niger* (МА) и *Cladosporium cladosporioides* (МК). Показано, что грибные меланины отличаются от гуминовых кислот более высокой молекулярной массой, повышенным содержанием кислых функциональных групп и низкой степенью окисленности.

Определена скорость минерализация гуминовых кислот и меланинов в условиях модельного эксперимента. Установлено, что при биodeградации гуминовых кислот снижается степень их полидисперсности и увеличивается их растворимость в воде. Получено, что при биodeградации грибных меланинов происходит сближение их элементного состава, молекулярных масс и оптических свойств со свойствами гуминовых веществ.

Показано, что скорость ферментного гидролиза протеазой близка для выделенных из почвы гуминовых кислот, и резко различается для исследованных меланинов. Установлено, что меланин *Cladosporium cladosporioides* более устойчив к воздействию молекулярного кислорода по сравнению с ГК дерново-подзолистой почвы

Практическая значимость работы. Результаты работы могут быть использованы при изучении химического строения почвенных гуминовых кислот, для оценки устойчивости гумусовых веществ к разложению и прогнозирования изменения запасов органического вещества почв.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены на международных конференциях студентов и аспирантов «Ломоносов-97» (1997 г.), «Ломоносов-98» (1998 г.), «Ломоносов-99» (1999 г.), на международном научном семинаре «Трансформация и гумификация органических материалов в почвах» (1997 г.), на заседании кафедры химии почв факультета почвоведения МГУ (1999 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 108 страницах машинописного текста, включает 12 таблиц и 25 рисунков. Список литературы включает 175 работ, в том числе 83 - на иностранных языках.

Работа выполнена при поддержке грантов ФЦНТП «Глобальные изменения природной среды и климата» проект 4.3.1. и РФФИ № 99-04-48007.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были взяты следующие препараты ГК:

- гуминовая кислота из горизонта А1 дерновой среднеподзолистой почвы на моренном суглинке, взятой с Лесной опытной дачи МСХА им. К.А.Тимирязева;
- гуминовая кислота из горизонта А1 чернозема обыкновенного, взятого с 200-летней некосимой залежи Каменной степи, Таловский р-н, Воронежская обл.;
- гуминовая кислота из торфа (препарат фирмы Merck);
- гуминовая кислота из сильновыветрелого бурого угля Канско-Ачинского угольного бассейна (промышленный препарат гумата натрия ТУ 211-06-18-94).

Выделение препаратов гуминовых кислот. Препараты гуминовых кислот из дерново-подзолистой почвы и чернозема обыкновенного были выделены по стандартной методике [Орлов, Гришина, 1981]. Полученные препараты почвенных ГК, а также промышленные препараты гуминовых кислот из торфа и бурого угля очищали от органо-минеральных примесей высаливанием и переосаждением.

Выделение препаратов грибных меланинов. Мицелий грибов наращивали в течение 2-3 недель на жидкой питательной среде [Linhares, Martin, 1978] при температуре 20-25°C. Затем мицелий извлекали из сосудов, промывали дистиллированной водой и высушивали при температуре 40°C. Мицелий обрабатывали 0,1 н. NaOH и в полученном экстракте осаждали меланин HCl (pH~1-2). Для очистки от низкомолекулярных примесей меланины несколько раз переосаждали и промывали дистиллированной водой.

Химические свойства гуминовых кислот и меланинов. Элементный состав препаратов был определен на CHNS-анализаторе «Carlo Erba» 1106 (T=1000°C). Спектры поглощения растворов в УФ- и видимой области снимали при pH~11-12 на спектрофотометре UV-260 Shimadzu; ИК-спектры были сняты на спектрофотометре ИКС-29 с применением KBr-техники [Орлов, Осипова, 1988]. Содержание углеводных компонентов в препаратах определяли по методу Дюбуа [Орлов, Гришина, 1981].

Общее содержание кислых функциональных групп рассчитывали по данным потенциометрического титрования, которое проводилось на pH-метре Horiba при $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ в атмосфере N_2 при концентрации препаратов 0,5 мг/мл и ионной силе 0,1.

Молекулярно-массовые распределения препаратов были получены методом гель-фильтрации на геле Sephadex G-100. В качестве элюента использовали 0,025M Tris-HCl буфер (pH 8,2) с добавлением 0,1% додецилсульфата натрия, 0,05M NaCl и 0,02% NaN_3 . Все образцы предварительно пропускали через колонку с гелем Sephadex G-10 для очистки от низкомолекулярных примесей и перевода в Tris-HCl буфер.

Гидрофильно-гидрофобные свойства препаратов определяли методом гидрофобной хроматографии на октил-сефарозе CL-4B в 0,05M Tris-HCl буфере при ступенчатом градиенте 0,3% додецилсульфата натрия.

Схема эксперимента по биодеградации гуминовых кислот и меланинов. 70-100 мг препарата смешивали с 20 г кварцевого песка, в полученную смесь вносили 200мг глюкозы, меченной ^{14}C , в виде концентрированной глюкозо-минеральной смеси [Паников и др., 1982], и почвенный инокулят. Влажность полученной смеси доводили до 60% от ПВ и инкубировали 3 месяца в сосудах объемом 100 мл с герметичной крышкой при $T=25^\circ\text{C}$. Модельный эксперимент с некоторой степенью условности воспроизводит ежегодное поступление с растительным опадом в почву легкоминерализуемого органического вещества и его деструкцию в присутствии стабильных фракций гумуса.

Скорость минерализации ГК и меланинов рассчитывали по разности между суммарным количеством выделившейся из инкубационных сосудов CO_2 и количеством выделившегося $^{14}\text{CO}_2$, источником которого являлась ^{14}C -глюкоза или продукты метаболизма и лизиса выросшей на ней микробной биомассы, равномерно меченной ^{14}C . Разложение ГК торфа, к которой была добавлена немеченая глюкоза, определяли по разности между эмиссией CO_2 из сосудов с ГК и эмиссией из контрольных сосудов. Контролем являлась смесь почвенного инокулята и глюкозы, внесенная в чистый песок.

После 2, 6 и 9 недель эксперимента инкубационные сосуды снимали и их содержимое последовательно обрабатывали водой (в отношении 1:5) и 0,1н. NaOH (в отношении 1:10). Щелочной экстракт подкисляли HCl, полученный осадок, который представлял собой собственно гуминовую кислоту или меланин, переосаждали и промывали водой. Количество углерода ГК или меланина, переходящее в экстракты определяли по разности между общим содержанием в них C и содержанием ^{14}C , присутствие которого объясняется образованием при инкубации водо- и щелочерастворимых продуктов

микробного синтеза. Опыт проводили в 3-5-кратной повторности, доверительный интервал рассчитывали для $P=0,95$.

Количество выделившегося CO_2 при минерализации гуминовых кислот и меланинов определяли абсорбционным методом с титриметрическим окончанием [Шарков, 1983, 1984, 1987; Иванникова, 1992]. В качестве поглотителя использовали 0,5н. КОН, избыток которого, не связавшийся с CO_2 , оттитровывали 1,0н. H_2SO_4 .

Измерение радиоактивности. Для определения активности ^{14}C в растворах аликвоту раствора помещали в гелиевый сцинтиллятор и определяли радиоактивность смеси на жидкостном сцинтилляционном счетчике LKB RackBeta 1217 с учетом поправок на гашение.

Ферментативная деструкция гуминовых кислот и меланинов. Деструкцию препаратов трипсином проводили в 0,05М Tris-HCl буфере с добавлением 0,03% тритона X-100 при pH 8,2. Смесь, содержащую в 20мл буфера 8 мг трипсина и 40 мг исследуемого препарата, инкубировали 7 часов при $T=37\pm 0,1^\circ\text{C}$. Через каждый час отбирали 1 мл смеси, добавляли 1мл 10% ТХУ для остановки реакции, смесь оставляли на 10 мин для коагуляции, осадок центрифугировали 10 мин. при 2000g и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 280nm на спектрофотометре СФ-41. По изменению оптической плотности раствора, возникающей в результате отщепления от препарата низкомолекулярных кислоторастворимых продуктов, определяли динамику деструкции.

Облучение препаратов светом. Растворы гуминовой кислоты и меланина облучали светом с длиной волны 360-660 нм при pH-10. Облучение проводили в течении 1 часа в закрытой кювете с предварительной продувкой Ag и в открытой кювете в атмосфере кислорода. Оптическую плотность растворов ГК и меланина снимали на спектрофотометре СФ-46, ММ-распределения получали на геле Sephadex G-50F (элюент - 0.025М Tris-HCl буфер (pH 8.2)+0,1% ДСН+0,05М NaCl). Фракции ГК получали на геле Sephadex G-50F в 0,05М NaOH.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЛАНИНОВ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ

Известно, что грибные меланины широко варьируют по своим свойствам. Для выбора меланина, который мог быть использован в последующих опытах, был проведен сравнительный анализ 15 темноокрашенных пигментов, образуемых почвенными

грибами (табл.1). Экстракцию пигментов проводили описанным выше методом с продувкой щелочных экстрактов N_2 .

Таблица 1. Содержание и свойства грибных меланинов

| Вид гриба | Содержание меланина (%) | $E_{465}^{0,001\%}$ | $E_{540}^{0,001\%}$ E_{660} | Содержание фракций (%) с ММ | | |
|--|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------|------------|
| | | | | >150000 | ~70000 | 6000-12000 |
| <i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman 72 | 0,3 | 0,033 | 6,9 | 23 | 63 | 14 |
| <i>Aspergillus candidus</i> Link.7 | 0,4 | 0,018 | 5,4 | 15 | 74 | 11 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> de Vries 2 | 0,2 | 0,011 | 3,8 | 20 | 40 | 40 |
| <i>Cladosporium</i> sp. 86 | 0,4 | 0,015 | 3,9 | 18 | 62 | 20 |
| <i>C. cladosporioides</i> 90 | 0,6 | 0,026 | 4,0 | 36 | 56 | 8 |
| <i>Alternaria</i> sp. 80 | 0,4 | 0,033 | 4,9 | 21 | 43 | 36 |
| <i>A. alternata</i> Keiss 38 | 0,5 | 0,033 | 5,0 | 11 | 67 | 22 |
| <i>Alternaria</i> sp. 53 | 1,2 | 0,019 | 3,6 | 11 | 70 | 19 |
| <i>Ulocladium</i> sp. 98 | 0,7 | 0,015 | 3,6 | 18 | 51 | 31 |
| <i>Ulocladium botrytis</i> Preuss.42 | 1,2 | 0,018 | 3,2 | 30 | 60 | 10 |
| <i>Drechlera dematiaceae</i> Bubuk. 20 | 1,5 | 0,049 | 4,8 | 27 | 47 | 26 |
| <i>Verticillium lateritium</i> Berkely 95 | 1,9 | 0,056 | 9,8 | 28 | 32 | 40 |
| <i>Penicillium</i> sp. 79 | 2,3 | 0,038 | 7,9 | 31 | 55 | 14 |
| <i>Acremonium</i> sp. AB | 7,4 | 0,032 | 8,9 | 23 | 62 | 15 |
| <i>Stachybotrys atra</i> Corda 1 | 9,2 | 0,041 | 6,5 | 2 | 84 | 14 |

Выход меланинового пигмента в исследованных грибах варьировал от 0,3 до 9,2%. По данным гель-фильтрации все полученные меланины состоят из трех фракций со среднесовесными молекулярными массами >150000, ~70000 и 6000-12000 и имеют относительно низкую оптическую плотность по сравнению с почвенными ГК ($E_{465}^{0,001\%}$ составляли 0.01-0.05). Для молекулярного состава большинства меланинов характерно преобладание фракции с ММ~70000 и относительно невысокое содержание фракции с ММ~6000-12000 (<40%), что отличает их от почвенных гуминовых кислот, в составе которых низкомолекулярная фракция преобладает.

Использование при экстракции меланинов N_2 в качестве газовой фазы позволяет избежать окисления пигментов кислородом воздуха. При выделении пигментов без продувки азотом наблюдались изменения в их оптических свойствах и ММ-распределениях (табл.2). Увеличение оптической плотности растворов меланинов можно объяснить появлением в ходе реакции с кислородом новых хромофорных группировок в молекулах пигментов. В ряде случаев такие реакции окисления могут сопровождаться разрушением макромолекул, что повышает долю низкомолекулярных фракций в составе

меланина. Полученные результаты указывают на зависимость свойств меланинов от процедуры их выделения из грибного мицелия.

Таблица 2. Содержание и свойства меланинов, экстрагированных из мицелия 0,1 н. NaOH с продувкой $N_2(1)$ и без продувки $N_2(2)$

| Вид гриба | | Меланин (%) | $E_{465}^{0,001\% \text{ в } C}$ | E_4/E_6 | Содержание фракций (%) с ММ | | | |
|--|---|-------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------|--------|--------|------------|
| | | | | | >150000 | ~70000 | ~40000 | 6000-12000 |
| <i>Alternaria</i> | 1 | 0,5 | 0,033 | 5,0 | 11 | 67 | - | 22 |
| <i>alternata</i> Keiss 38 | 2 | 1,7 | 0,043 | 4,9 | 29 | - | 16 | 55 |
| <i>Ulocladium</i> sp. 98 | 1 | 0,7 | 0,015 | 3,6 | 18 | 51 | - | 31 |
| | 2 | 3,3 | 0,052 | 3,8 | 4 | 13 | - | 83 |
| <i>Drechlera dematiadeae</i> Bubuk. 20 | 1 | 1,5 | 0,049 | 4,8 | 27 | 47 | - | 26 |
| | 2 | 2,6 | 0,056 | 3,8 | 21 | - | 19 | 60 |
| <i>Cladosporium</i> | 1 | 0,6 | 0,026 | 4,0 | 36 | 56 | - | 8 |
| <i>cladosporiodes</i> 90 | 2 | 1,0 | 0,030 | 3,6 | 40 | 42 | - | 18 |

На основании полученных результатов для дальнейших исследований был отобран меланин *Cladosporium cladosporiodes*, молекулярные параметры и оптические свойства которого наиболее контрастно отличались от свойств гуминовых кислот и незначительно изменялись при экстракции в присутствии кислорода. Также был взят меланин гриба *Aspergillus niger*, хорошо изученный и описанный в литературе [Kang, Felbeck, 1965; Barbetta et al., 1967; Nicolaus, 1968 и др.]. Оба гриба являются космополитными и встречаются во всех зональных почвах, но для почв умеренной зоны *Aspergillus niger* встречается чаще в минеральных горизонтах, а *Cladosporium cladosporiodes* - в подстилках и органогенных горизонтах.

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБНЫХ МЕЛАНИНОВ И ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

По элементному составу (табл.3) исследованные гуминовые кислоты и меланины в целом сходны между собой. Невысокие значения отношения Н:С (0,8-1,1) указывают на преобладание в составе ГК ароматических структур. ГК из торфа и угля отличаются от почвенных низким содержанием азота, а ГК угля и высокой степенью окисленности. Меланин *Cladosporium cladosporiodes* отличается от препаратов гуминовых кислот и меланина *Aspergillus niger* более высоким содержанием азота (7,2%) и низкой степенью окисленности, а широкое отношение Н:С указывает на значительное содержание алифатических компонентов в составе меланина.

Таблица 3. Элементный состав гуминовых кислот и меланинов (над чертой - масс.%, под чертой - ат.%)

| Препарат | Зола, % | C | H | N | O | H:C | O:C | C:N | Степень окисленности, ω |
|----------|---------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|------|------|-------|--------------------------------|
| ГКД | 3,2 | <u>54,2</u> 37,3 | <u>5,0</u> 41,3 | <u>4,6</u> 2,7 | <u>36,2</u> 18,7 | 1,11 | 0,50 | 13,81 | -0,10 |
| ГКЧ | 6,2 | <u>55,9</u> 41,8 | <u>3,9</u> 35,3 | <u>5,1</u> 3,2 | <u>35,1</u> 19,7 | 0,84 | 0,47 | 13,06 | +0,10 |
| ГКТ | 1,9 | <u>51,2</u> 35,9 | <u>4,8</u> 40,7 | <u>2,8</u> 1,7 | <u>41,2</u> 21,7 | 1,13 | 0,60 | 21,12 | +0,08 |
| ГКУ | 6,7 | <u>45,5</u> 37,2 | <u>3,2</u> 31,4 | <u>0,9</u> 0,6 | <u>50,4</u> 30,9 | 0,84 | 0,83 | 62,00 | +0,82 |
| МА | 1,7 | <u>54,5</u> 37,3 | <u>5,1</u> 41,6 | <u>5,4</u> 3,1 | <u>35,0</u> 18,0 | 1,12 | 0,48 | 12,03 | -0,15 |
| МК | 1,9 | <u>52,3</u> 33,9 | <u>5,8</u> 45,2 | <u>7,2</u> 4,0 | <u>34,7</u> 16,9 | 1,33 | 0,50 | 8,48 | -0,34 |

Спектр поглощения меланина *Cladosporium cladosporioides* в УФ- и видимой области (рис.1) так же, как и спектры поглощения всех ГК, имеет вид пологой кривой. Однако на спектре меланина *Aspergillus niger* видны два четких максимума при длине волны 300 нм и 420 нм. Коэффициент экстинкции (табл.6) меланина *Aspergillus niger* значительно выше, чем у всех гуминовых кислот (0,176), что, вероятно, можно объяснить наличием в молекуле пигмента большого количества сопряженных двойных связей. $E_{465}^{0,001\%}$ меланина *Cladosporium cladosporioides* значительно ниже, чем у всех ГК (0,03).

Рисунок 1. Спектры поглощения гуминовых кислот и меланинов в ультрафиолетовой и видимой области (концентрация растворов - 0,1 мг/мл, концентрация меланина *Aspergillus niger* - 0,05 мг/мл)

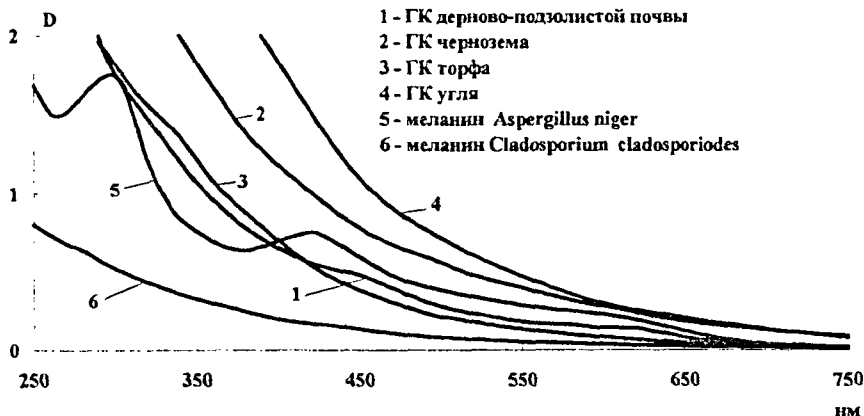
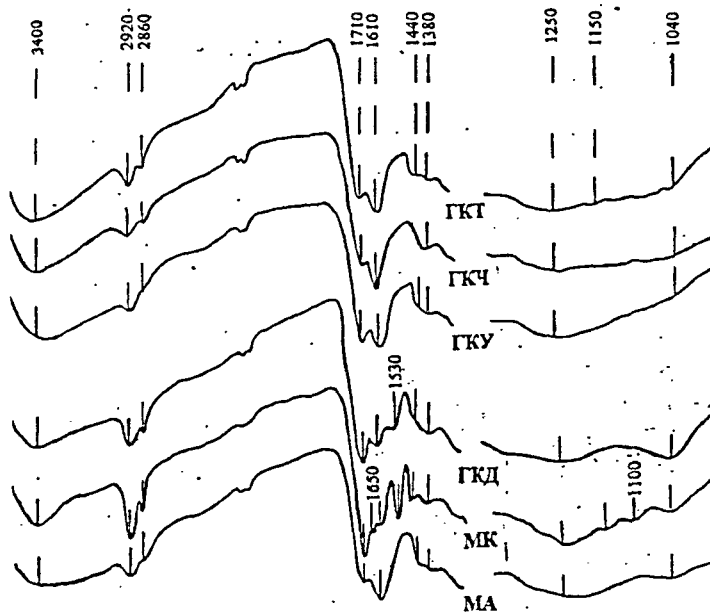


Рисунок 2. Инфракрасные спектры гуминовых кислот и меланинов (см^{-1})

ИК-спектры всех препаратов имеют сходную форму (рис.2). Спектры ГК дерново-подзолистой почвы и меланина *Cladosporium cladosporioides* несколько отличаются от остальных невысокой интенсивностью полосы при 1610 см^{-1} , вызываемой колебаниями ароматических $\text{C}=\text{C}$ связей, что при высокой интенсивности полос 2920 и 2860 см^{-1} (валентные колебания CH_2 -, CH_3 -групп) указывает на значительную долю алифатических компонентов в составе препаратов. Спектры этих препаратов характеризуются также наличием полосы поглощения при 1530 см^{-1} , обусловленной присутствием амидных группировок. Наибольшую интенсивность имеет эта полоса на спектре меланина *Cladosporium cladosporioides*, что, вместе с высоким содержанием азота, свидетельствует о наличии большого числа пептидных фрагментов в составе пигмента.

По данным потенциометрического титрования количество кислых функциональных групп в меланинах выше, чем в гуминовых кислотах (табл.4). Причем меланины содержат вдвое больше кислых групп, титрующихся в диапазоне $\text{pH } 8.0\text{--}10.5$, в котором диссоциируют слабокислые фенольные группы. Для всех изученных препаратов титрование необратимо - наблюдается гистерезис. Соответственно, величины

общего содержания функциональных групп, определенные методом обратного титрования выше величин, определенных при прямом.

Таблица 4. Содержание функциональных групп в гуминовых кислотах и меланинах (по данным потенциометрического титрования)

| Препарат | Обратное титрование (ммоль(-)/г) | | | | | Прямое титрование (ммоль(-)/г) | | |
|----------|----------------------------------|-------------|---------|---------|----------|--------------------------------|-------------|----------|
| | общее | интервал pH | | | | общее | интервал pH | |
| | | 4,0-5,0 | 5,0-7,0 | 7,0-8,0 | 8,0-10,5 | | 4,0-7,5 | 7,5-10,0 |
| ГКД | 5,90 | 2,31 | | 1,94 | 1,65 | 3,76 | 2,86 | 0,90 |
| ГКЧ | 6,04 | 2,34 | | 2,06 | 1,64 | 3,95 | 2,87 | 1,08 |
| ГКТ | 5,80 | 2,42 | | 1,69 | 1,69 | 3,92 | 2,40 | 1,52 |
| ГКУ | 5,60 | 2,40 | | 1,60 | 1,60 | 3,98 | 2,79 | 1,19 |
| МА | 9,00 | 0,96 | 4,48 | | 4,16 | 3,41 | 1,55 | 1,86 |
| МК | 10,56 | 0,64 | 3,20 | 1,92 | 4,80 | 2,50 | 1,25 | 1,25 |

Константы диссоциации ГК и меланинов в целом сходны между собой и находятся в пределах 4,4-4,7; 7,5-8,1; 9,6-9,9, но для меланина *Cladosporium cladosporioides* установлено наличие четвертого типа функциональных групп с рК 6,3, который титруется в диапазоне pH 5,0-7,0 (табл.5).

Таблица 5. Константы диссоциации гуминовых кислот и меланинов

| Препарат | Обратное титрование | | | | Прямое титрование | |
|----------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | рК ₁ | рК ₂ | рК ₃ | рК ₄ | рК ₁ | рК ₂ |
| ГКД | 4,6 | - | 7,7 | 9,8 | 5,1 | 9,5 |
| ГКЧ | 4,7 | - | 8,1 | 9,9 | 4,9 | 9,6 |
| ГКТ | 4,7 | - | 7,9 | 9,8 | 4,8 | 9,4 |
| ГКУ | 4,7 | - | 7,8 | 9,6 | 4,9 | 9,4 |
| МА | 4,4 | - | 7,5 | 9,9 | 5,1 | 9,4 |
| МК | 4,5 | 6,3 | 7,6 | 9,8 | 5,3 | 9,4 |

От гуминовых кислот меланины отличает более высокое относительное содержание в их составе высокомолекулярных фракций, причем наиболее высокомолекулярным является меланин *Cladosporium cladosporioides* (табл.6).

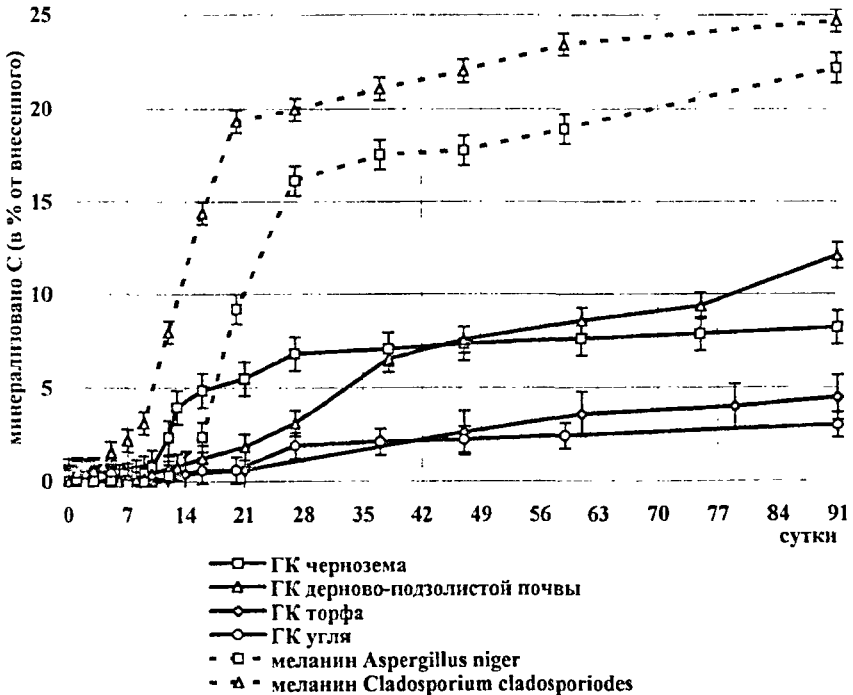
Таблица 6. Физико-химические свойства гуминовых кислот и меланинов.

| Препарат | $E_{465}^{0,001\%}$ | E_4/E_6 | Содержание фракций (%) с ММ | | | Содержание углеводов, % | Содержание гидрофильной фракции, % |
|----------|---------------------|-----------|--------------------------------|--------|--------|-------------------------------|--|
| | | | >150000 | ~70000 | ~10000 | | |
| ГКД | 0,075 | 4,6 | 7 | 21 | 72 | 3,6 | 53 |
| ГКЧ | 0,115 | 4,0 | 3 | 13 | 84 | 4,6 | 56 |
| ГКТ | 0,081 | 5,2 | 4 | 14 | 82 | 3,1 | 42 |
| ГКУ | 0,144 | 5,8 | 2 | 4 | 94 | 2,3 | 49 |
| МА | 0,176 | 2,9 | 8 | 30 | 62 | 5,0 | - |
| МК | 0,030 | 3,6 | 40 | 42 | 18 | 3,4 | 14 |

БИОДЕГРАДАЦИЯ ГРИБНЫХ МЕЛАНИНОВ И ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Скорость минерализации грибных меланинов и гуминовых кислот. Потребление внесенной глюкозы и рост микроорганизмов при инкубации начался на сутки раньше по сравнению с контрольным для вариантов с ГК чернозема, ГК угля, ГК торфа и меланином *Cladosporium cladosporioides*, что может быть связано со стимулирующим эффектом этих препаратов, обладающих по нашим данным [Орлов и др., 1997] биологической активностью. После 2-х недель инкубации, в течении которых вся глюкоза была минерализована или включена в микробную биомассу, в виде CO_2 выделилось около 70% внесенного ^{14}C . После этого в выделяющемся CO_2 начинала нарастать доля нерадиоактивного С, источником которого являлись разлагающиеся препараты. За последующие 10 недель только около 10% внесенной радиоактивной метки выделилось в виде CO_2 вследствие эндогенного метаболизма меченной микробной биомассы и ее реутилизации.

Рисунок 3. Минерализация гуминовых кислот и меланинов



По результатам эксперимента было установлено, что за три месяца было минерализовано и выделилось в виде CO_2 8.2% углерода ГК чернозема и 12.1% углерода ГК дерново-подзолистого почв. Степень минерализации меланинов оказалась в два раза выше и составила 22.2 и 24.7% для меланина *Aspergillus niger* и меланина *Cladosporium cladosporioides*, соответственно. Причем скорость разложения меланинов была особенно высокой в первые 4 недели. Наиболее устойчивыми к биодegradации оказались препараты ГК из торфа и угля - за 3 месяца было минерализовано всего 3-4% углерода (рис.3).

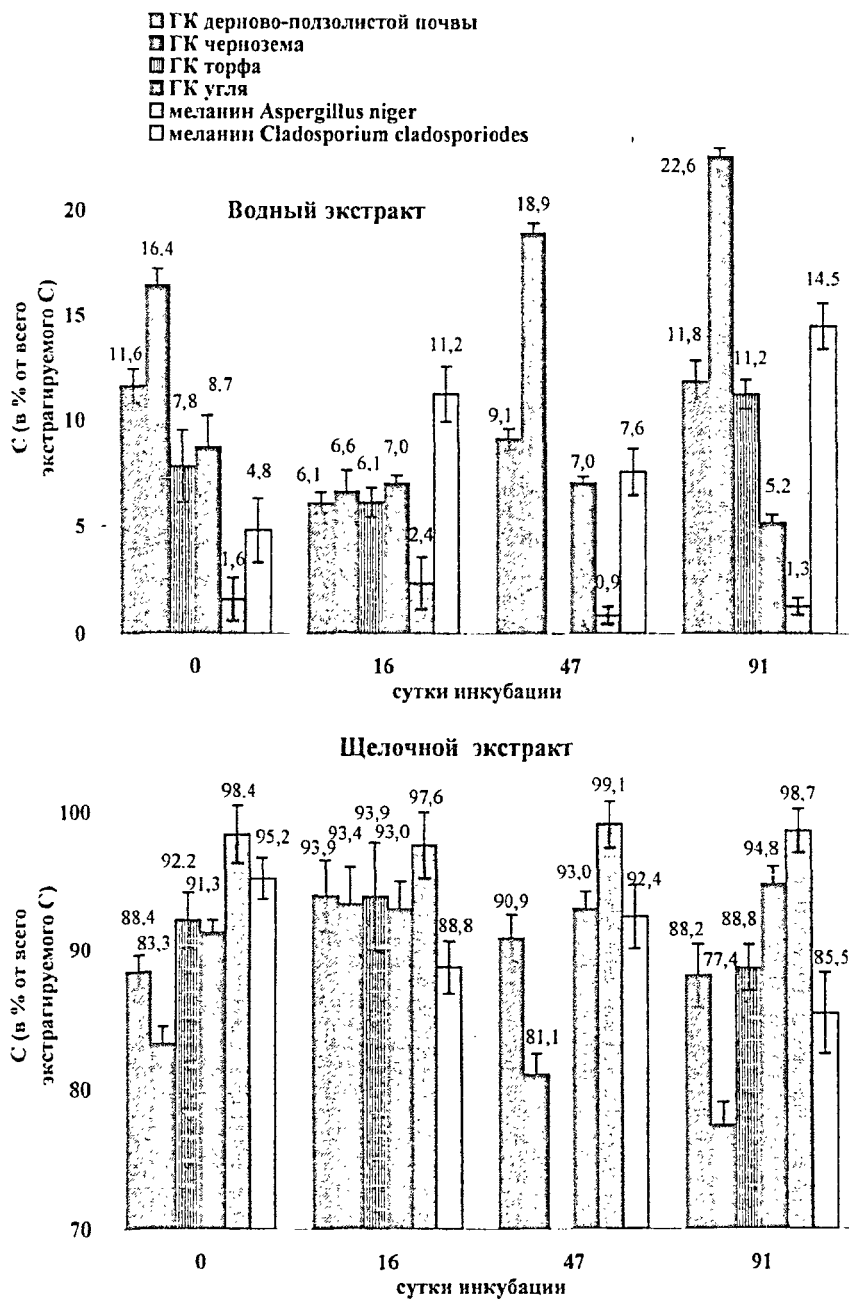
Изменение во фракционном составе грибных меланинов и гуминовых кислот при биодegradации. При разложении почвенных гуминовых кислот и ГК торфа после 2-х недель опыта происходит уменьшение содержания углерода гуминовых кислот в водном экстракте (рис.4), затем количество углерода водорастворимой фракции нарастает, причем наиболее интенсивно для ГК чернозема. Вероятно, за первые 2 недели в процессе кометаболизма происходит частичная минерализация компонентов водорастворимой фракции ГК, как наиболее доступных для действия микроорганизмов. В дальнейшем, при более глубокой деструкции молекул ГК от них отщепляются новые низкомолекулярные водорастворимые фрагменты (по данным гель-фильтрации на геле Sephadex G-100 их молекулярная масса не превышала 5 000). Содержание углерода в щелочных экстрактах ГК при этом снижается.

Для ГК угля изменения во фракционном составе в ходе инкубации были незначительны. Наблюдалось лишь небольшое снижение содержания углерода ГК в водном экстракте (рис.4).

Содержание водорастворимой фракции меланина *Cladosporium cladosporioides* при инкубации увеличивается. Результаты хроматографии на геле Sephadex G-10, полученные для водного экстракта (рис.6), показывают, что водорастворимая часть меланина становится более низкомолекулярной и представляет собой, по-видимому, осколки, отщепленные от крупных молекул.

Наименее гидрофильный меланин *Aspergillus niger* в водную вытяжку практически не переходил.

Рисунок 4. Изменение содержания углерода гуминовых кислот и меланинов в экстрактах при инкубации



Изменение свойств грибных меланинов и гуминовых кислот при биодегградации. По данным элементного анализа, во всех инкубированных препаратах практически не изменяется содержание азота, в гуминовых кислот несколько повышается содержание водорода (табл.7).

Таблица 7. Изменение элементного состава гуминовых кислот и меланинов (в ат.%) после инкубации (над чертой - до инкубации, под чертой - после инкубации)

| Препарат | C | H | N | O | H:C | O:C | C:N | Степень окисленности, ω |
|----------|------|------|-----|------|------|------|-------|--------------------------------|
| ГКД | 37,3 | 41,3 | 2,7 | 18,7 | 1,11 | 0,50 | 13,81 | -0,10 |
| | 36,5 | 41,7 | 2,5 | 19,3 | 1,14 | 0,53 | 14,41 | -0,08 |
| ГКЧ | 41,8 | 35,3 | 3,2 | 19,7 | 0,84 | 0,47 | 13,06 | +0,10 |
| | 39,0 | 36,9 | 3,2 | 20,9 | 0,95 | 0,54 | 12,08 | +0,13 |
| ГКТ | 35,9 | 40,7 | 1,7 | 21,7 | 1,13 | 0,60 | 21,12 | +0,08 |
| | 35,4 | 42,2 | 1,9 | 20,5 | 1,19 | 0,58 | 18,85 | -0,03 |
| ГКУ | 37,2 | 31,4 | 0,6 | 30,9 | 0,84 | 0,83 | 62,00 | +0,82 |
| | 39,2 | 35,2 | 0,7 | 24,9 | 0,90 | 0,64 | 60,08 | +0,37 |
| МА | 37,3 | 41,6 | 3,1 | 18,0 | 1,12 | 0,48 | 12,03 | -0,15 |
| | 38,2 | 39,5 | 2,9 | 19,4 | 1,03 | 0,51 | 13,12 | -0,02 |
| МК | 33,9 | 45,2 | 4,0 | 16,9 | 1,33 | 0,50 | 8,48 | -0,34 |
| | 35,9 | 39,7 | 4,5 | 20,0 | 1,11 | 0,58 | 8,05 | 0,01 |

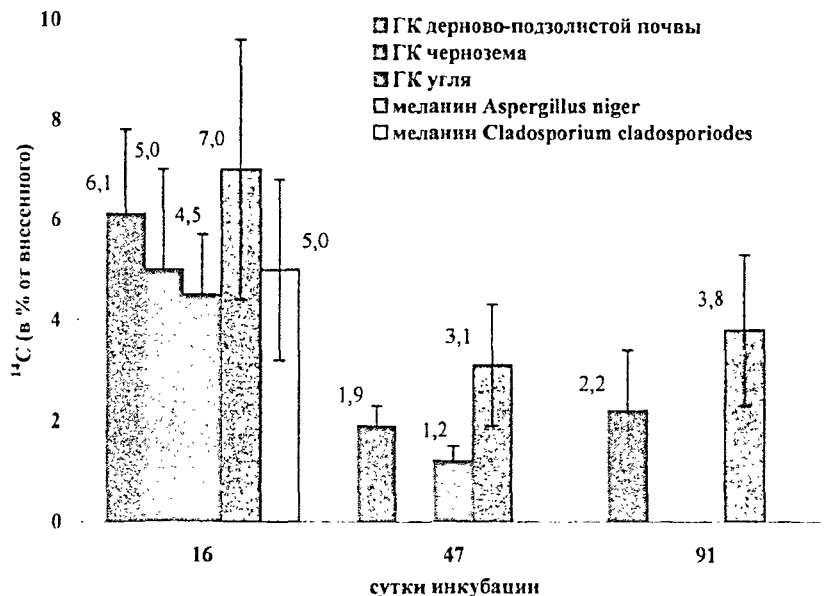
Для ГК угля после инкубации заметно снижается степень окисленности, что сопровождается некоторым снижением значения $E_{465}^{0,001\%}$ препарата (табл.8). Оптические свойства остальных гуминовых кислот существенно не изменяются. Наблюдается лишь небольшое понижение оптической плотности после двух недель инкубации (табл.8).

Для меланина *Cladosporium cladosporioides* увеличивается содержание углерода и кислорода и снижается - водорода (табл.7). Увеличение степени окисленности меланина при инкубации сопровождается резким (более чем в 3 раза) повышением оптической плотности (табл.8), которая может быть вызвана появлением дополнительного количества хромофорных группировок в молекулах пигмента. Оптическая плотность меланина *Aspergillus niger* в ходе минерализации становится ниже, при этом отношение H:C сужается. По-видимому при минерализации меланина *Aspergillus niger* разрушаются алифатические мостики, связывающие ароматические фрагменты молекулы, что вызывает укорачивание цепи сопряженных связей и снижение оптической плотности пигмента.

Во время эксперимента поступление ^{14}C в осаждаемые кислотой фракции ГК и меланинов наблюдалось только на 16 сутки инкубации (рис.5). После 3 месяцев

инкубации небольшое количество ^{14}C (2-3% от внесенного) было обнаружено только в осадках ГК дерново-подзолистой почвы и меланина *Aspergillus niger*.

Рисунок 5. Поступление ^{14}C в гуминовые кислоты и меланины во время инкубации.



После двух недель инкубации происходит незначительное повышение содержания высокомолекулярной фракции с $\text{MM} > 150000$ в составе ГК и меланинов (табл.8), что коррелирует с наличием в препаратах радиоактивной метки. Увеличение доли высокомолекулярных фракций может быть вызвано с одной стороны - включением в молекулы ГК и меланинов крупных фрагментов белка микробного происхождения (так называемое «фрагментарное обновление ГК»), с другой стороны - механическим соосаждением вместе с ГК или меланинами тех же фрагментов, которые при более длительных сроках инкубации минерализуются микроорганизмами.

В дальнейшем наблюдается снижение доли высокомолекулярных фракций и повышение содержания низкомолекулярной в составе всех препаратов (табл.8), что может свидетельствовать о меньшей устойчивости высокомолекулярных фракций к биodeградации. Особенно интенсивно разрушаются высокомолекулярные фракции меланина *Cladosporium cladosporioides* - за время эксперимента их содержание

уменьшается в 2 раза, что, наряду с повышением оптической плотности, вызывает сближение свойств пигмента со свойствами гуминовых кислот.

Таблица 8. Изменение оптических свойств и молекулярных масс гуминовых кислот и меланинов в ходе инкубации.

| Препарат | Время инкубации, сутки | $E_{465}^{0,001\%}$ | E_4/E_6 | Содержание фракций (%) с ММ | | |
|----------|------------------------|---------------------|-----------|-----------------------------|--------|--------|
| | | | | >150000 | ~70000 | ~10000 |
| ГКД | 0 | 0,076 | 4,7 | 7 | 21 | 72 |
| | 16 | 0,070 | 4,5 | 10 | 18 | 72 |
| | 47 | 0,074 | 4,7 | 7 | 16 | 77 |
| | 91 | 0,077 | 4,6 | 4 | 13 | 81 |
| ГКЧ | 0 | 0,117 | 4,0 | 3 | 13 | 84 |
| | 16 | 0,101 | 4,0 | 5 | 12 | 83 |
| | 47 | 0,115 | 4,1 | 2 | 9 | 89 |
| | 91 | 0,117 | 4,0 | 1 | 5 | 94 |
| ГКТ | 0 | 0,082 | 5,2 | 4 | 14 | 82 |
| | 16 | 0,071 | 5,0 | 8 | 11 | 81 |
| | 79 | 0,080 | 5,0 | 3 | 9 | 88 |
| ГКУ | 0 | 0,145 | 5,8 | 2 | 4 | 94 |
| | 16 | 0,125 | 4,2 | 5 | 4 | 91 |
| | 47 | 0,128 | 4,8 | 4 | 4 | 92 |
| | 91 | 0,134 | 5,2 | 2 | 3 | 95 |
| МА | 0 | 0,179 | 3,0 | (8)* | (30) | (62) |
| | 16 | 0,141 | 2,9 | (10) | (32) | (58) |
| | 47 | 0,153 | 2,9 | (8) | (27) | (65) |
| | 91 | 0,157 | 3,1 | (6) | (26) | (68) |
| МК | 0 | 0,030 | 3,8 | 40 | 40 | 20 |
| | 16 | 0,041 | 3,6 | 42 | 44 | 14 |
| | 47 | 0,080 | 3,7 | 29 | 24 | 47 |
| | 91 | 0,096 | 3,7 | 22 | 28 | 50 |

* - в скобках приведены данные о молекулярно-массовом составе фракции меланина, не сорбирующей на Сефадексах (~25% от общего веса)

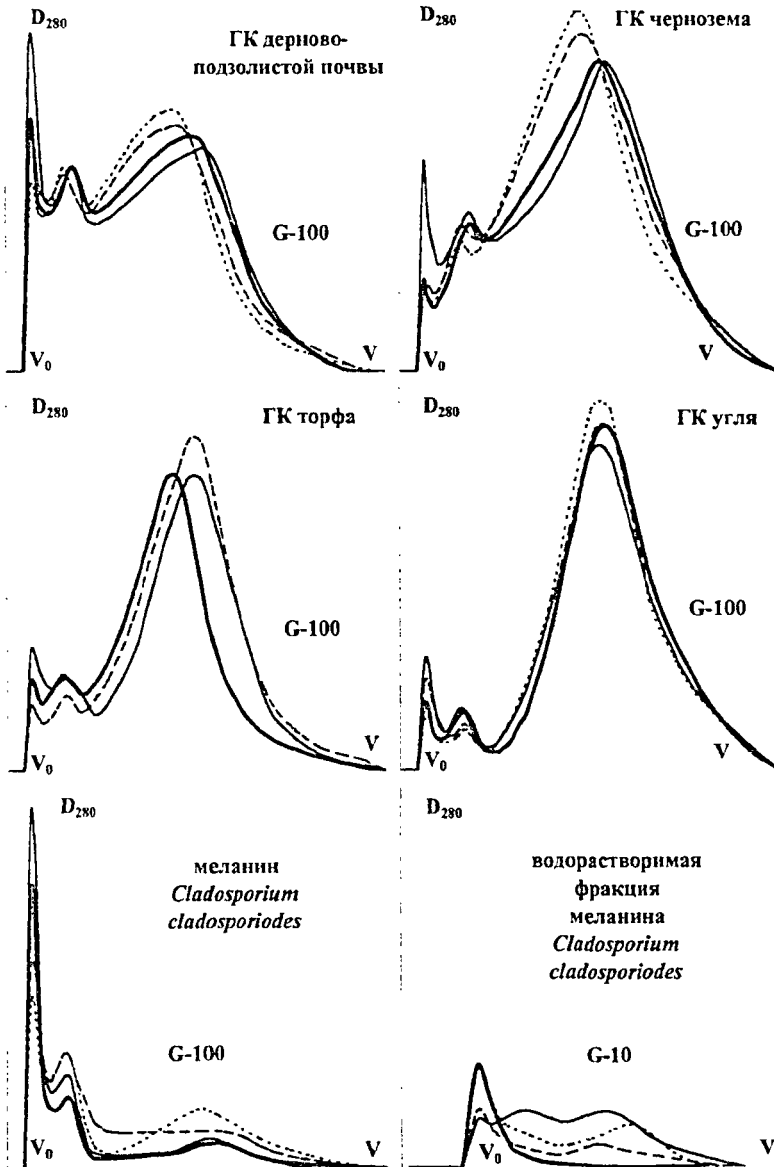
На гель-хроматограммах почвенных ГК (рис.6) видно, что максимум пика низкомолекулярной фракции сдвигается в область более высоких молекулярных масс, при этом сам пик становится уже и симметричнее, то есть при минерализации понижается полидисперсность гуминовых кислот.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ГРИБНЫХ МЕЛАНИНОВ И ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Многие почвенные грибы, бактерии и актиномицеты способны выделять в окружающую среду протеолитические и целлюлолитические ферменты, сохраняющие

Рисунок 6. Изменение ММ-распределений ГК и меланина при инкубации

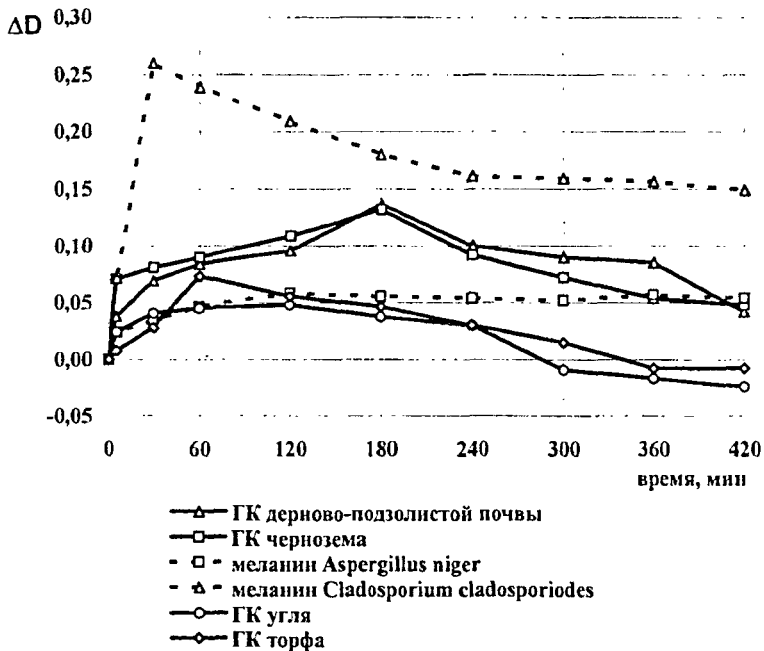
— до инкубации — после 16 суток инкубации
 - - - после 47 суток инкубации - - - после 91 суток инкубации



свою активность в почвенных условиях. За счет действия ферментов осуществляется биотическая деструкция гуминовых веществ и меланиновых пигментов в почвах [Мишустин, Никитин, 1961; Mathur, 1971]. Было исследовано разложение гуминовых кислот и меланинов под действием протеолитического фермента трипсина.

Ферментализ почвенных ГК протекал практически одинаково: выход кислоторастворимых продуктов постепенно нарастал и достигал максимума через 3 часа экспозиции, величина деструкции была одинакова для ГК чернозема и ГК дерново-подзолистой почвы (рис.7). Менее гидрофильные препараты ГК торфа и угля оказались заметно устойчивей к действию ферментов (примерно в 1.5 раза), что вместе с низким содержанием азота в их составе указывает на невысокое содержание пептидных компонентов.

Рисунок 7. Деструкция гуминовых кислот и меланинов трипсином (по выходу кислоторастворимых продуктов)



Наименее устойчивым к действию трипсина оказался меланин *Cladosporium cladosporioides*, что, возможно, связано с высоким содержанием пептидных компонентов в

его составе, причем максимальный выход аминокислот наблюдался уже через 30 минут после начала реакции.

Меланин *Aspergillus niger* оказался весьма устойчив к воздействию трипсина, величина его деструкции сходна с полученной для ГК угля и торфа. Это может быть связано не только с низким содержанием пептидных компонентов в молекуле меланина, но и с особенностями его аминокислотного состава, так как трипсин предпочтительно расщепляет связи между остатками лизина и аргинина. Можно также предположить, что пептидные цепочки в молекуле меланина слишком короткие и не подвергаются атаке фермента.

В реакционной смеси ГК-фермент происходит не только протеолиз гуминовой кислоты, но и автолиз самого фермента, в результате чего в раствор поступает дополнительное количество отщепленных аминокислот. При ингибировании фермента гуминовой кислотой прекращается и его автолиз, и дополнительного увеличения оптической плотности за счет поступления продуктов расщепления трипсина не происходит. В контрольной же смеси автолиз трипсина идет в течение всего времени эксперимента, следовательно, оптическая плотность надосадочной жидкости продолжает нарастать, и измеряемая разность между оптической плотностью анализируемого и контрольного образца при этом будет уменьшаться.

Если оценивать степень ингибирования фермента по изменению разности оптических плотностей, то наиболее сильным ингибитором трипсина является ГК дерново-подзолистой почвы, затем идет ГК чернозема, ГК торфа и ГК угля. Степень ингибирования обратно коррелирует с содержанием низкомолекулярной фракции в составе ГК. Сильнее всего ингибирует фермент наиболее полидисперсная и высокомолекулярная гуминовая кислота.

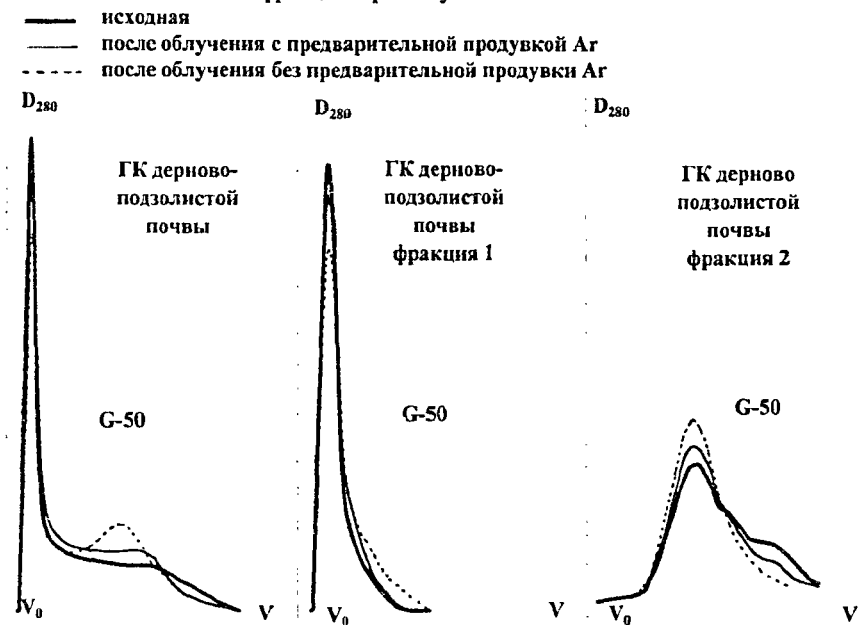
При реакции меланина *Aspergillus niger* с трипсином через 2 часа выход кислоторастворимых продуктов достиг максимума, и оптическая плотность далее не изменялась, что указывает на отсутствие ингибирования фермента в растворе меланина.

УСТОЙЧИВОСТЬ МЕЛАНИНА И ГУМИНОВОЙ КИСЛОТЫ К ДЕЙСТВИЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА

Абиотическим фактором, вызывающим деструкцию гуминовых кислот, может являться молекулярный кислород. В основном состоянии молекулярный кислород малоактивен, но может быть активирован различными агентами, одним из которых

является излучение в УФ-области спектра. В отличие от УФ-света, энергии которого достаточно для возбуждения O_2 или разрыва связей в молекулах ГК [Tichy, 1971; Ильин, Орлов, 1973], излучение в видимой области спектра не обладает достаточной энергией для инициирования этих процессов. Однако, поглощение квантов видимого света приводит молекулы ГК в возбужденное состояние, возбуждение может сниматься за счет передачи энергии на молекулы O_2 , которые в свою очередь переходят в активное состояние (фотосенсибилизация).

Рисунок 8. Изменение молекулярно-массовых распределений ГК дерново-подзолистой почвы и ее фракций при облучении светом



Воздействие молекулярного кислорода воздуха, активированного в результате реакций фотосенсибилизации, вызывает снижение оптической плотности ГК дерново-подзолистой почвы на 10% (табл.9) и изменение ее ММ-распределения (рис.8). Причем, как показали опыты по облучению двух ее фракций с ММ>30000 и ММ~5000, в растворе ГК одновременно может происходить разрушение высокомолекулярных молекул и полимеризация низкомолекулярных, что на гель-хроматограммах проявляется в снижении высоты высокомолекулярного пика и сужении низкомолекулярного.

Таблица 9. Изменение оптических свойств гуминовой кислоты и меланина при облучении видимым светом.

(условия облучения: 1 - исходный образец; 2 - в закрытой кювете с предварительной продувкой Ar; 3 - в открытой кювете без продувки Ar)

| Препарат | | pH раствора | $E_{465}^{0,025\%}$ |
|---------------------------------|---|-------------|---------------------|
| ГКД | 1 | 9,99 | 0,825 |
| | 2 | 9,71 | 0,773 |
| | 3 | 9,40 | 0,748 |
| ГКД фракция 1 (ММ>30 000) | 1 | 9,99 | 0,827 |
| | 2 | 9,84 | 0,821 |
| | 3 | 9,82 | 0,792 |
| ГКД фракция 2 (ММ~5 000) | 1 | 9,97 | 0,349 |
| | 2 | 9,86 | 0,315 |
| | 3 | 9,82 | 0,289 |
| МК | 1 | 10,00 | 0,113 |
| | 2 | 9,96 | 0,112 |
| | 3 | 9,92 | 0,110 |

Изменений оптических свойств и молекулярных параметров меланина *Cladosporium cladosporioides* под воздействием O_2 при облучении раствора светом не обнаружено. Это может объясняться тем фактом, что в клетках микроорганизмов меланины выполняют защитную функцию, предохраняя живые организмы от вредного воздействия повышенной радиации и инсоляции, и, следовательно, не должны разрушаться при интенсивном облучении.

ВЫВОДЫ

1. Темноцветные пигменты, выделенные из мицелия 15 различных штаммов почвенных грибов сильно варьируют по оптическим свойствам и молекулярным массам. Общим для всех проанализированных пигментов является преобладание в их составе фракций с молекулярной массой больше 12 000.
2. Препараты меланинов грибов *Aspergillus niger* и *Cladosporium cladosporioides* близки к препаратам гуминовых кислот из дерново-подзолистой почвы, чернозема, торфа и угля по элементному составу, содержанию углеводных компонентов и кислотно-основным свойствам, но отличаются от изученных ГК оптической плотностью, более высокой молекулярной массой и повышенным содержанием кислых функциональных групп.
3. За три месяца в условиях модельного эксперимента в результате микробной деятельности было минерализовано (по углероду) 12,1% ГК дерново-подзолистой почвы, 8,2% ГК чернозема, 4,5% ГК торфа, 3,0% ГК угля. Скорость минерализации

меланинов в тех же условиях была в 2 раза выше, чем у почвенных ГК; было минерализовано 22,2% меланина *Aspergillus niger* и 24,7% меланина *Cladosporium cladosporioides*.

4. Высокомолекулярные фракции гуминовых кислот менее устойчивы к микробному разложению по сравнению с низкомолекулярной фракцией. При биodeградации происходит отщепление от молекул ГК водорастворимых компонентов, и снижается степень полидисперсности гуминовых кислот.
5. В ходе инкубации меланины претерпевают разнонаправленные изменения в своем строении. Минерализация меланина *Aspergillus niger* сопровождается снижением его оптической плотности, что может быть связано с сокращением цепи сопряженных связей в молекуле пигмента. При минерализации меланина *Cladosporium cladosporioides* происходит разрушение его высокомолекулярных фракций, сопровождающееся появлением дополнительного количества кислородсодержащих хромофорных группировок, что ведет к резкому увеличению оптической плотности пигмента.
6. Глубина и скорость ферментативного гидролиза трипсином близки для почвенных гуминовых кислот, и резко различаются для меланинов. Наиболее устойчивым к действию трипсина оказался меланин *Aspergillus niger*, степень его устойчивости сходна с полученной для препаратов ГК из торфа и угля.
7. Являясь менее устойчивым, по сравнению с почвенными ГК, к микробному разложению, меланин *Cladosporium cladosporioides* в то же время обладает высокой устойчивостью к абиотической деструкции под воздействием молекулярного кислорода.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Д.С.Орлов, В.В.Демин, Ю.А.Завгородняя «Влияние молекулярных параметров гуминовых кислот на их физиологическую активность», Доклады Академии наук, 1997, том 354, №6, с. 843-845
2. Ю.А.Завгородняя «Влияние молекулярных параметров гуминовых кислот на их биологическую активность», IV Всероссийская студенческая конференция «Экология и проблемы защиты окружающей среды». Тезисы докладов, Красноярск, 1997, с. 82

3. Ю.А.Завгородняя «Влияние молекулярных параметров гуминовых кислот на их биологическую активность», Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов - 97». Тезисы докладов. Почвоведение. В печати.
4. Ю.А.Завгородняя «Сравнительная характеристика физико-химических свойств грибных меланинов», Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов - 98». Тезисы докладов. Почвоведение, Москва, 1998, с. 24
5. Ю.А.Завгородняя «Минерализация гуминовых кислот из чернозема и дерново-подзолистой почвы», Докучаевские молодежные чтения «Почва. Экология. Общество.». Тезисы докладов. Почвоведение, Санкт-Петербург, 1999, с. 203
6. Ю.А.Завгородняя «Ферментативная деструкция гуминовых кислот и грибных меланинов», Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов - 99». Тезисы докладов. Почвоведение, Москва, 1999, с. 38

