

ROLE OF HUMIC SUBSTANCES ON DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS
BY OXIDOREDUCTIVE ENZYMES

Mrs. Apaporn Siripornprasarn

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Environmental Management

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

บทบาทของสารชีวมิติต่อการย่อยสลายสารอะโรมาติกโดยเอนไซม์ออกซิโดรีดักทีฟ



นางอาภาภรณ์ ศิริพรประสาร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

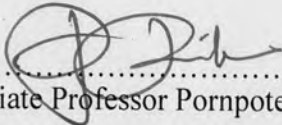
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

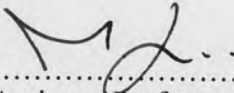
510610

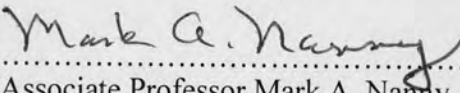
Thesis Title ROLE OF HUMIC SUBSTANCES ON DEGRADATION
OF AROMATIC COMPOUNDS BY OXIDOREDUCTIVE
ENZYMES
By Mrs. Apaporn Siripornprasarn
Field of Study Environmental Management
Thesis Advisor Associate Professor Mark A. Nanny, Ph.D.
Thesis Co-advisor Ekawan Luepromchai, Ph.D.

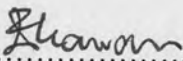
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Doctoral Degree

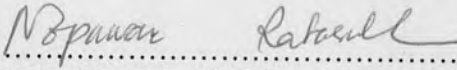

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

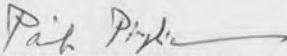
THESIS COMMITTEE

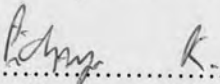

..... Chairman
(Assistant Professor Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)

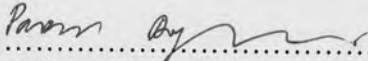

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Mark A. Nanny, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Ekawan Luepromchai, Ph.D.)


..... External Member
(Nopawan Ratasuk, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor, Pichaya Rachdawong, Ph.D.)


..... Member
(Panan Rerngsamrarn, Ph.D.)

อาการณ์ ศิริพรประสาร : บทบาทของสารฮิวมิกต่อการย่อยสลายสารอะโรมาติกโดยเอนไซม์ออกซิโดรีดักทีฟ. (ROLE OF HUMIC SUBSTANCES ON DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS BY OXIDOREDUCTIVE ENZYMES) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. มาร์ค เอ. แนนนี, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, 157 หน้า.

เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของการบำบัดทางชีวภาพ จำเป็นต้องเข้าใจบทบาทของสารฮิวมิกต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อน บทบาทที่เป็นไปได้ของกรดฮิวมิกและกรดฟุลวิก ได้แก่ 1) สามารถทำลายคุณสมบัติการย่อยสลายของเอนไซม์ที่มีหน้าที่บำบัดทางชีวภาพ 2) สามารถประพุดตัวเป็นสับสเตรทและแข่งขันกับสารปนเปื้อนในการย่อยสลายโดยเอนไซม์ หรือ 3) ไม่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แต่ดูดซับและปกป้องสารปนเปื้อนจากการย่อยสลาย การทดลองช่วงที่ 1 มีการศึกษาการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล (PCP) โดยแลคเคสบริสุทธิ์ซึ่งแยกจาก *Trametes versicolor* ร่วมกับสารฮิวมิกอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ Aldrich humic acid (AHA), Leonardite humic acid (LHA), Suwannee River fulvic acid (SRFA), และ Waskish peat fulvic acid (WFA) ที่ 28°C และ pH 5.0 การทดลองช่วงที่ 2 การย่อยสลายสารพีแนทรีน โดยเอนไซม์ลิกนิน โนโลดิกจากเชื้อ *Agrocybe* sp. CU 43 ร่วมกับสารฮิวมิกและสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำ (DOM) จากดินนาถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบสมมติฐานทั้งสามข้อ การทดลองทั้งสองช่วงแสดงว่าสารฮิวมิกและ DOM มีผลการยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารปนเปื้อน อัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยเอนไซม์มีอัตราที่น้อยลงเมื่อสารฮิวมิกและ DOM มีความเข้มข้นสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม สารฮิวมิกและ DOM ไม่สามารถทำลายคุณสมบัติการย่อยสลายของเอนไซม์ สารฮิวมิกและ DOM แสดงความสามารถในการดูดซับ PCP และพีแนทรีนและปกป้องสารนั้นจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ ดังนั้นความสามารถในการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารปนเปื้อนจึงลดลง ความสามารถในการยับยั้งของสารฮิวมิกและ DOM แบบแข่งขันหรือแบบผสมต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนชี้ให้เห็นว่าสารฮิวมิกและ DOM สามารถเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ได้ ค่าคงที่ของอัตราการย่อยสลาย (k') ที่ลดลงถูกพบในสารฮิวมิกที่มีค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์ (K_i) และค่าคงที่การดูดซับ (K_{dom}) ที่สูงกว่า กรดฮิวมิกที่มีต้นกำเนิดจากดินซึ่งมีเปอร์เซ็นต์อะโรมาติกและน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าแสดงค่า K_i และ K_{dom} มากกว่าสารฟุลวิกที่มีต้นกำเนิดจากแหล่งน้ำ รายงานนี้เป็นรายงานแรก que แสดงกลไกของสารฮิวมิกและ DOM ซึ่งเปลี่ยนแปลงอัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่ถูกใช้ให้เป็นแบบจำลองโดยเอนไซม์ รายงานนี้ได้เสนอแบบจำลองที่ว่าเมื่อสารปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อมซึ่งมีสารฮิวมิกและ DOM เป็นองค์ประกอบ ชั้นแรก สารปนเปื้อนจะถูกดูดซับโดยสารฮิวมิกและ DOM และลดอัตราการย่อยสลายลง จากนั้น สารปนเปื้อนที่ไม่ถูกดูดซับจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ ในขณะที่สารฮิวมิกและ DOM สามารถเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ ปริมาณและคุณลักษณะของสารฮิวมิกและ DOM เป็นปัจจัยสำคัญในการดูดซับและการยับยั้งเอนไซม์ สารฮิวมิกที่มีค่าอะโรมาติกและน้ำหนักโมเลกุลสูงมีแนวโน้มในการถูกดูดซับและการยับยั้งเอนไซม์ที่สูงกว่า ส่งผลให้การบำบัดทางชีวภาพใช้เวลานานขึ้น

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนิสิต..... *Apapun*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Mark A. Nanny*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *Shanon*

4789715620 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

KEY WORD : AROMATIC POLLUTANTS / LIGNINOLYTIC ENZYMES / HUMIC SUBSTANCES / BIOREMEDIATION

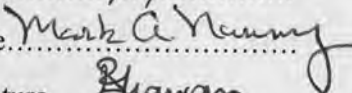
APAPORN SIRIPORNPRASARN : ROLE OF HUMIC SUBSTANCES ON DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS BY OXIDOREDUCTIVE ENZYMES THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARK A. NANNY, Ph.D., THESIS COADVISOR : EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 157 PP.

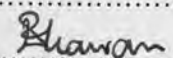
To improve the efficiency of bioremediation strategies, we must understand the effects of humic substances (HS) on pollutant biodegradation. The possible roles of humic acid (HA) and fulvic acid (FA) are that they: 1) can deactivate enzyme responsible for biodegradation, 2) can act as competitive enzymatic substrates or 3) are enzymatically inert but sequester the pollutant substrate and protect it from enzymatic degradation. In part 1 experiment, degradation of pentachlorophenol (PCP) by purified laccase isolated from *Trametes versicolor* in combination with one of these HS, Aldrich humic acid (AHA), Leonardite humic acid (LHA), Suwannee River fulvic acid (SRFA), and Waskish peat fulvic acid (WFA) at 28°C and pH 5.0 was studied. In part 2, degradation of phenanthrene by crude fungal ligninolytic enzymes from *Agrocybe* sp. CU 43 in addition of HS and dissolved organic matter (DOM) from rice paddy field soil were used to test those three hypotheses. Both experiments showed that HS and DOM exhibited inhibitory effects for enzymatic degradation of the pollutants. The enzymatic degradation rate of the pollutants was slower with the increase concentration of HS and DOM. However, HS and DOM could not deactivate enzymes. HS and DOM showed the capabilities to associate with PCP and phenanthrene, protecting the pollutants from enzymatic degradation; consequently the pollutants' bioavailability was decreased. The inhibitory effect of HS and DOM by competitive or linear mixed types for the pollutant degradation suggest that HS and DOM could, moreover, be substrates for the enzymes. Lower degradation rate constants (k') were found in HS with higher inhibitor binding constants (K_i) and binding constant (K_{dom}). Terrestrial HA which occupied higher % aromaticity and molecular weight exhibited stronger K_i and K_{dom} than aquatic FA. This is the first time to clarify the mechanisms by which HS and DOM alter enzymatic degradation rate of the model pollutants. We proposed the model of which once aromatic pollutants enter the environment containing HS and DOM, they could firstly be sorbed to HS and DOM, decreasing biodegradation rate. Then, unbound pollutants would be degraded by enzyme, while HS and DOM could act as substrates for enzymes. Amount and nature of HS and DOM could be important factors in the sorption phenomena and inhibitory effect. Higher aromaticity and molecular weight HS showed the higher propensity in sorption and stronger inhibitor, providing longer time for bioremediation.

Field of study Environmental Management

Student's signature.....

Academic year 2008

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to the following people, who have offered me great support and encouragement during my Ph.D. study and research work. Firstly, I would like to express my deep gratitude and respect to Assoc. Prof. Dr. Mark Nanny for the opportunity to be his Ph.D. student and to work under his guidance. I also would like to thank to Dr. Ekawan Luepromchai for her kind supervision, helping to make the difficult period, refreshing and encouragement throughout the course of this research work.

I am sincerely grateful acknowledgement to my appreciation to Assist. Prof. Dr. Manakorn Rachkornkij, Chairman of the thesis committee, Dr. Nopawan Ratasuk from Department of Environment Science, Faculty of Science, Silpakorn University and Assoc. Prof. Dr. Pairoh Pinphanichakarn, Assist. Prof. Dr. Pichaya Rachdawong, Dr. Panan Remngsamram, member of thesis committee for valuable suggestions. Without the essential contributions of the chairman and the committee members, this dissertation would have never been completed.

I would like to express my sincere thanks to laboratory staff of Environmental Research Institute of Chulalongkorn University, especially Mrs. Areeya Rattanawanachai, and to my laboratory friends, Miss Siraprapa Romyen and Miss Oramas Suttinun for their support and assistance.

Finally, I especially want to dedicate my dissertation to my family members, my husband and my sons, to give me encouragement unconditionally. Their love and understanding has allowed me to have success in today.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	xiii
LIST OF TABLES.....	xvi
LIST OF ABBEVIATIONS.....	xvii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Problem Identification.....	1
1.2 The purpose of the study.....	4
1.3 Hypotheses.....	4
1.4 Scope of studies.....	6
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS.....	7
2.1 Humic substances.....	7
2.2 Aromatic pollutants.....	9
2.3 Bioremediation potential of white rot fungi.....	11
2.4 Ligninolytic enzymes.....	13
2.4.1 Laccase.....	15
2.4.2 Peroxidases.....	16

2.5	Biodegradation of chlorophenol and PAHs using ligninolytic enzymes.....	16
2.5.1	Chlorophenols.....	17
2.5.2	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).....	20
2.6	Effect of humic substances on enzymes and enzyme kinetics	23
2.6.1	Effect of HS on enzymes.....	23
2.6.2	Effect of HS on enzyme kinetics.....	24
2.6.2.1	Fundamental of enzyme kinetics.....	25
2.6.2.2	Fundamental of enzyme inhibition.....	27
2.6.2.2.1	Competitive inhibition.....	27
2.6.2.2.2	Uncompetitive inhibition.....	30
2.6.2.2.3	Linear mixed inhibition.....	31
2.7	Sorption of PCP and PAHs to humic substances.....	32
2.8	HS and ligninolytic enzyme reaction studies.....	35
CHAPTER III ROLE OF HUMIC SUBSTANCES ON DEGRADATION OF PENTACHLOROPHENOL BY <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> LACCASE.....		36
3.1	Introduction.....	36
3.2	Material and Methods.....	40
3.2.1	Chemicals.....	40
3.2.2	Enzyme activities.....	41
3.2.3	PCP – HS sorption and desorption studies.....	42
3.2.4	Enzyme kinetics.....	43

	Page
3.2.4.1 PCP and laccase.....	43
3.2.4.2 HS and laccase.....	43
3.2.5 PCP determination.....	43
3.3 Result and discussion.....	44
3.3.1 PCP degradation rate.....	44
3.3.2 Enzyme activity.....	45
3.3.3 Enzyme kinetics for PCP.....	47
3.3.4 Inhibitory effect of HS on laccase.....	48
3.3.5 Relationship between K_i and physical properties of HS.....	49
3.3.6 Enzyme kinetics for HS.....	50
3.3.7 PCP – HS binding studies.....	52
3.3.8 Relationship of K_{dom} and physical properties of HS.....	53
3.3.9 PCP – HS desorption studies.....	55
3.3.10 The effect of HS on PCP enzymatic degradation rate.....	57
3.4 Acknowledgement.....	60

CHAPTER IV ROLE OF DISSOLVED HUMIC SUBSTANCES AND
DISSOLVED ORGANIC MATTER ON DEGRADATION OF
PHENANTHRENE BY CRUDE LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM

<i>AGROCYBE</i> SP. CU 43:.....	61
4.1 Introduction.....	61
4.2 Material and Methods.....	65
4.2.1 Materials.....	65

	Page
4.2.1.1 Humic substances.....	65
4.2.1.2 Dissolved organic matter.....	66
4.2.1.2.1 Soil sample collection and preparation.....	66
4.2.1.2.2 Determination of soil characterization.....	66
4.2.1.2.3 Preparation of dissolved organic matter.....	67
4.2.1.3 Ligninolytic enzymes.....	67
4.2.1.3.1 Fungal cultivation and enzyme induction.....	67
4.2.1.4 Chemicals.....	68
4.2.2 Methods.....	68
4.2.2.1 Enzyme activities.....	68
4.2.2.2 Sorption and desorption of phenanthrene to HS and DOM	69
4.2.2.3 Enzyme kinetics.....	70
4.2.2.3.1 Kinetics of phenanthrene and crude fungal ligninolytic enzyme.....	70
4.2.2.4 Reaction of HS and DOM with crude fungal ligninolytic enzyme.....	70
4.2.2.5 Phenanthrene determination.....	71
4.3 Results and discussion.....	71
4.3.1 Phenanthrene degradation rate.....	71
4.3.2 Enzyme activity for HS and DOM with crude fungal ligninolytic enzymes.....	74
4.3.3 Phenanthrene binding studies.....	76

	Page
4.3.4 Inhibitory effect of HS and DOM on phenanthrene degradation by crude fungal ligninolytic enzymes.....	78
4.3.5 Inhibitory effect of HS on crude fungal ligninolytic enzymes....	79
4.3.6 Relationship between K_i and physical properties of HS.....	82
4.3.7 HS and DOM degradation by crude fungal ligninolytic enzyme	83
4.3.8 Effects of HS and DOM on phenanthrene degradation rate.....	84
4.4 Conclusion.....	86
4.5 Acknowledgement.....	87
 CHAPTER V CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS.....	 88
REFERENCES.....	93
APPENDICES.....	111
APPENDIX A.....	112
APPENDIX B.....	125
APPENDIX C.....	126
APPENDIX D.....	127
APPENDIX E.....	128
APPENDIX F.....	129
APPENDIX G.....	130
APPENDIX H.....	134
APPENDIX I.....	138
APPENDIX J.....	139
APPENDIX K.....	140

APPENDIX L.....	143
APPENDIX M.....	146
BIOGRAPHY.....	157

LIST OF FIGURES

Figure	Page	
2.1	Structure model of an elemental building block of soil humic acid (Klavin and Serzane, 2000).....	8
2.2	Schematic mechanism of action of fungal laccases (Mougin et al., 2003).....	15
2.3	Proposed pathways for the degradation of PCP by <i>P. chrysosporium</i> . I, PCP; II, tetrachlorobenzoquinone; III, 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-dihydroxybenzene; IV, chlorodihydroxybenzene; V, 3,5,6-trichlorotrihydroxybenzene; VI, 2,5-dichlorodihydroxybenzene; VII, dichlorotrihydroxybenzene; VIII, 2-chloro-1,4-dihydroxybenzene; IX, chlorotrihydroxybenzene; X, <i>p</i> -hydroquinone; XI, trihydroxybenzene; LiP, lignin peroxidase; MnP, manganese peroxidase (Reproduced from Reddy and Gold, 2000).....	19
2.4	Metabolism of phenanthrene by ligninolytic enzymes (Hammel et al., 1992).....	21
2.5	Possible interactions of humic substances and enzymes.....	24
2.6	A typical Michaelis-Menten curve representing changes in velocity of an enzyme catalyzed reaction with respect to substrate concentration (Blaber, 2006).....	26
2.7	Lineweaver-Burke linear relationship (Blaber, 2006).....	26

Figure	Page	
2.8	A Michaelis-Menten curve representing changes in velocity of an enzyme catalyzed reaction with respect to substrate concentration in the presence and absence of competitive inhibitor (Blaber, 2006).....	29
2.9	Lineweaver-Burke linear relationships with and without competitive inhibitor (Blaber, 2006).....	29
3.1	Relationship between k' and HS concentration (mg/L). Symbols represent HS, \blacklozenge : AHA, \square : LHA, Δ : SRFA, \times : WFA.....	45
3.2	Percent enzyme activity for each HS. Activity of laccase in oxidation of catechol without HS is 100%. Symbols represent HS concentration, \square : 10 mg/L, Δ : 20 mg/L, \times : 25 mg/L, \circ : 30 mg/L, \bullet : 40 mg/L.....	46
3.3	Effect of HS concentration; \blacklozenge : AHA, \square : LHA, Δ : SRFA, \times : WFA, on (a) K_m and (b) V_{max} values of purified laccase from <i>Trametes versicolor</i> on PCP degradation. r^2 for AHA, LHA, SRFA, and WFA of K_m were 0.85, 0.93, 0.94, and 0.99, respectively and of V_{max} were 0.03, 0.09, 0.04, and 0.01, respectively.....	48
3.4	Relationship between K_i and (a) %aromaticity ($r^2 = 0.74$), (b) molecular weight ($r^2 = 0.46$)	50
3.5	Relationship between K_m of HS and (a) molecular weight ($r^2 = 0.50$), (b) % aromaticity ($r^2 = 0.90$).....	51

Figure	Page
3.6 Sorption isotherms for PCP and HS, ♦: AHA, □: LHA, Δ: SRFA, ×: WFA. Error bars represent one standard deviation. C_{dom} = amount of PCP per unit mass of each HS, C_w = concentration of free PCP.....	53
3.7 Linear relationship between K_{dom} and (a) % aromaticity ($r^2 = 0.97$), (b) molecular weight ($r^2 = 0.65$).....	55
3.8 Percent PCP desorbed from HS, ♦: AHA, □: LHA, Δ: SRFA, ×: WFA.....	57
4.1 Phenanthrene degradation rate when HS or DOM 10 and 15 mg/L were added. Symbols represent HS or DOM, ●: control (phenanthrene only), ♦: AHA, □: LHA, Δ: SRFA, ×: WFA, ▲: DOM.....	73
4.2 Percent enzyme activity for each HS and DOM. Activity of crude fungal ligninolytic enzyme in oxidation of catechol without HS and DOM is 100%. Symbols represent HS and DOM concentration, ■: 10 mg/L, Δ: 20 mg/L, ○: 30 mg/L, ●: 40 mg/L.....	75
4.3 Linear relationship between binding coefficient and (a) % aromaticity ($r^2 = 0.81$), (b) molecular weight ($r^2 = 0.28$).....	78
4.4 Lineweaver-Burke plot of ligninolytic enzyme for phenanthrene when HS and DOM were added as inhibitors.....	81
4.5 Relationship between K_i and (a) %aromaticity, (b) molecular weight.	82

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Chemical and physical properties of particular humic substances.....	9
2.2	Physical properties of the two selected compounds.....	11
3.1	Chemical and physical properties of particular humic substances.....	41
3.2	k' degradation rate constants (hr^{-1}).....	45
3.3	K_m and V_{\max} of laccase for PCP with and without HS added as inhibitors.....	47
3.4	K_i for each HS.....	49
3.5	K_m and V_{\max} of laccase for HS.....	51
3.6	Effects of PCP concentration on PCP binding by HS.....	53
3.7	Experimental and calculated PCP degradation rate constants.....	60
4.1	Chemical and physical properties of particular humic substances.....	66
4.2	k' degradation rate constants (hr^{-1}).....	72
4.3	Phenanthrene partition coefficients to HS and DOM.....	76
4.4	K_m and V_{\max} of ligninolytic enzyme for phenanthrene with and without HS and DOM addition.....	79
4.5	K_i for each HS.....	81
4.6	Absorbance at 465 nm of 40 mg/L of HS with laccase and crude fungal ligninolytic enzymes at 0 and 96 hours.....	83
4.7	Experimental and calculated phenanthrene degradation rate constants	85
5.1	Degradation rate constants and sorption of PCP and phenanthrene to 10 mg/L of HS.....	92

LIST OF ABBREVIATIONS

AHA	=	Aldrich humic acid
DOM	=	Dissolved organic matter
FA	=	Fulvic acid
FID	=	Flame ionization detector
HA	=	Humic acid
HS	=	Humic substances
k'	=	Degradation rate constant
K_{dom}	=	Dissolved organic matter binding constant
K_i	=	Inhibitor binding constant
K_m	=	Michaelis-Menten constant
K_{oc}	=	Soil organic carbon – water partition coefficient
K_{ow}	=	Octanol – water partition coefficient
LHA	=	Leonardite humic acid
M	=	Molar
mg/L	=	Milligram per liter
MW	=	Molecular weight
OC	=	Organic carbon
PCP	=	Pentachlorophenol
SRFA	=	Suwannee River fulvic acid
V_{max}	=	Maximum reaction rate
WFA	=	Waskish peat fulvic acid