

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 543.2, 579.68

О.Н. ЧАЙКОВСКАЯ,**, Е.А. КАРЕТНИКОВА***, И.В. СОКОЛОВА*, Г.В. МАЙЕР****ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА РАЗЛОЖЕНИЕ
4-ХЛОР-2-МЕТИЛФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ¹**

Изучено влияние длины волны УФ-излучения на кинетику исчезновения 4-хлор-2-метилфеноксиуксусной (МСРА) кислоты в присутствии активного ила и гуминовых кислот. По результатам накопления углекислого газа было зафиксировано изменение хода кинетической кривой убыли МСРА в присутствии гуминовых кислот. Спектрально-люминесцентные и хромато-масс-спектрометрические данные показали наличие в среде продукта биотрансформации – 2-метил-4-хлорфенола, который утилизируется через 14 сут. Добавление гуминовых кислот, с одной стороны, снижало темпы последующего биоразложения МСРА. С другой стороны, в процессе трансформации гербицида в присутствии гуминовых кислот был обнаружен фотобиопродукт, не содержащий хлора – 2-метилфеноксиуксусная кислота.

Ключевые слова: фотолит, 4-хлор-2-метилфеноксиуксусная кислота, гуминовые кислоты.

Введение

Данная работа является продолжением цикла исследований механизма взаимодействия гуминовых кислот с гербицидами и фототрансформации этих молекул при возбуждении УФ-излучением для создания природоохранных технологий очистки сточных вод от устойчивых токсичных соединений [1–4]. Используемые спектрально-люминесцентные и хроматографические методы стали главными при решении этих проблем и позволили успешно проводить мониторинг интенсивности минерализации процессов органического вещества в воде. Известно, что основные негативные последствия применения гербицидов в сельском хозяйстве проявляются в угнетении дыхательной активности микроорганизмов. Степень и продолжительность нарушений функционального состояния последних отражают уровень антропогенной нагрузки на окружающую среду.

В лабораторных условиях при моделировании процессов, происходящих в природе, особенно в водных средах, должно обязательно учитываться наличие гуминовых веществ (ГВ). Они практически всегда присутствуют в природных водах и являются защитниками биологических компонентов среды от негативного химического воздействия. Для ГВ характерно большое разнообразие состава и свойств, в связи с чем растворы ГВ даже одинакового состава по своим технологическим свойствам могут существенно отличаться [5]. Гидрофобно-гидрофильные свойства ГВ обуславливают их растворимость, реакционную способность и многие физико-химические свойства (поверхностно-активные, сорбционные, ионообменные и др.), определяющие их практическую ценность в различных областях промышленности. Наиболее ценным сырьем ГВ являются гуминовые кислоты (ГК), которые характеризуются высоким содержанием ароматических и алифатических фрагментов, а также разнообразием имеющихся в составе функциональных групп. Наличие в структуре ГК насыщенных углеводородных цепей позволяет применять ГК для получения препаратов, активных в отношении неполярных органических загрязнителей, например пестицидов, конденсированных ароматических веществ и др. [6, 7].

Исследованию влияния излучения оптического диапазона на водные растворы, содержащие ГК и органические экотоксиканты, посвящены работы [8–16]. При изучении влияния ГК на биодеградацию отдельных токсикантов было отмечено, что в концентрации 100 мкг/мл ГК стимулировали деградацию фенантрена [8]. В то же время при исследовании влияния ГК на деградацию мезозамещенных фенола в мезокосмах было отмечено, что предварительная адаптация микроорганизмов к ГК (100 и 1000 мкг/л) приводила к снижению темпов деградации исследованных токсикантов [16]. При этом краткосрочная адаптация практически не влияла на темпы утилизации

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (НШ-512.2012.2) и при поддержке центров коллективного пользования Национального исследовательского Томского государственного университета: «Сорбционные и каталитические исследования» и «Квантовая химия, спектроскопия и фотоника наноматериалов».

m-крезола, а долгосрочная приводила к их снижению. Такой эффект связан с уменьшением числа бактерий-деструкторов в ходе адаптации к ГК. Обнаружено различие в протекании процессов фотодегradации гербицидов в дистиллированной воде по сравнению с речной [17]. Предложенный авторами механизм деградации гербицидов в речной воде включал как прямой фотолиз под действием УФ-излучения, так и фотосенсибилизированный с помощью синглетного кислорода и различных металлокомплексов.

Целью работы является изучение влияния гуминовых кислот на фотоиндуцированную биодegradацию гербицида 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты.

Экспериментальная часть

В работе использована 4-chloro-2-tolyloxyacetic acid (МСПА), химическая чистота 95 % (фирмы «ALDRICH», Code: 261866-56 01429АО). Водные растворы исследуемого соединения приготовлены путем растворения сухой навески в заданном объеме растворителя. Для полного растворения МСПА до концентрации $C = 2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹ использовали ультразвуковую мешалку при 40 °С в течение 15 мин.

Для изучения биодegradации растворов МСПА был использован активный ил (АИ), отобранный в весенний период на очистных сооружениях Томского нефтехимического комбината. АИ содержит колонии бактерий и простейших организмов, которые участвуют в биологической очистке сточных вод с целью удаления из них органических веществ. Биодegradацию МСПА оценивали по дыхательной активности сообщества микроорганизмов АИ. Методом газовой хроматографии регистрировали эмиссию CO₂ на хроматографе «Кристалл-5000», детектор – катарометр, колонка длиной 3 м, сорбент марки Carbosieve. Пробоподготовка образцов описана в работе [18]. Для исследования биоразложения предварительно облученные растворы МСПА переносили в стерильные флаконы вместительностью 250 мл (для изучения дыхательной активности) и колбы вместительностью 500 мл (для определения концентрации МСПА после биодegradации) и оставляли до полного удаления растворителя под током воздуха. Затем во флаконы и колбы вносили 50 мл раствора минеральных солей следующего состава (г/л): KNO₃ – 1, MgSO₄·7H₂O – 0,2, NaCl – 1, K₂HPO₄ – 1 и добавляли 50 мл АИ. Для контроля использовали пробы, содержащие 50 мл АИ и 50 мл минерального фона. Культивирование проводили в стационарных условиях при температуре 24–26 °С.

Для оценки влияния добавок гуминовых кислот в работе использовали Humic acids фирмы «Fluka» марки Code: 1307944 30907051. Для приготовления матричного раствора навеску ГК массой 10 мг растворили в 10 мл 0,1 н NaOH. Для полного растворения ГК использовали ультразвуковую мешалку в течение 15 мин при температуре 40 °С и механическую в течение 30 мин. Для набухания ГК раствор оставили на сутки в темной колбе при комнатной температуре. Концентрация матричного раствора составляет $C = 1$ мг·мл⁻¹. Разбавлением матричного раствора дистиллированной водой получали растворы ГК с концентрацией $C = 0,001, 0,005$ и $0,01$ г·л⁻¹. Затем в разбавленные растворы ГК добавляли МСПА в воде и полученную смесь облучали KrCl- и XeBr-эксиллампами [18, 19] при комнатной температуре до 60 мин при постоянном перемешивании с помощью механической мешалки. Расстояние от эксиллампы до облучаемого раствора составляло 9,5 см. За время облучения максимальная поглощенная исследуемым раствором энергия составляла 7,2 Дж/см³. Для того чтобы исследуемая система не перегревалась, осуществлялось воздушное охлаждение с помощью вентилятора.

Убыль МСПА контролировалась по спектрам поглощения и флуоресценции (ошибка измерения не превышала 10 %). Спектрально-люминесцентные характеристики раствора МСПА до и после облучения были зарегистрированы на спектрофотометре «UV-Vis Spectrometry UNICAM» (Thermo Evolution 600, США) и спектрофлуориметре «Cary Eclipse» (Varian, Австралия).

Для определения концентрации МСПА после фото- и биодegradации пробы предварительно подкисляли HCl до pH = 1, экстрагировали диэтиловым эфиром. Затем экстракты выпаривали в токе воздуха до объема 0,5 мл. Хромато-масс-спектрометрический анализ образцов проводили на приборе «Finnigan», модель Trace DSQ (Thermo Electron Chromatography and Mass Spectrometry Division, США). Условия анализа: колонка Trace TR-5MS, температура 100 °С (5 мин), нагрев 10 град·мин⁻¹ до 180° (5 мин), нагрев 100 град·мин⁻¹ до 300° (1 мин), детектор MS, газ-носитель гелий. Температура испарителя 275°, разделение потока 1 : 10.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведены спектры поглощения МСРА и показаны области излучения эксиламп. Из рисунка видно, что длина волны излучения эксиламп влияет на состав фотопродуктов после последовательной биодеградации МСРА в присутствии ГК. Попробуем разобраться в механизме взаимодействия МСРА и ГК. Спектр поглощения МСРА в воде меняется при добавлении ГК (рис. 2). Интенсивность флуоресценции МСРА в водном растворе падает при увеличении концентрации ГК в интервале 10^{-3} – 10^{-2} г·л⁻¹ (рис. 2). Процесс тушения флуоресценции подчиняется уравнению Штерна – Фольмера [20]. Наблюдаемая зависимость изменения интенсивности флуоресценции МСРА в системе МСРА + вода + ГК является линейной. Из наклона графика Штерна – Фольмера получили константу тушения флуоресценции МСРА в воде $K = 204 \text{ М}^{-1}$ с коэффициентом корреляции 2,3. Если время жизни флуоресценции МСРА взять за 1 нс, то тушение флуоресценции МСРА осуществляется с константой $k_q = 1 \cdot 10^{11} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ в воде и превышает на 2 порядка скорость взаимодействия диффузионно-контролируемой реакции. Изменения в спектрах поглощения МСРА при увеличении концентрации ГК указывают на то, что взаимодействие МСРА с ГК происходит за счет образования комплексов.

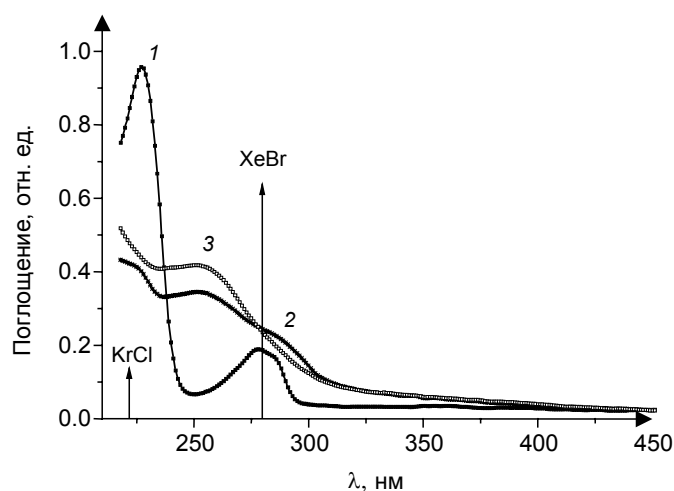


Рис. 1. Спектр поглощения МСРА ($2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) в воде (кр. 1) и с добавлением ГК ($5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) после фотоиндуцированной биодеградации в течение 14 сут: кр. 1 – без облучения; кр. 2 – предоблученный раствор КrCl эксилампой; кр. 3 – предоблученный раствор ХеBr-эксилампой. Для кр. 2 и 3 интенсивность поглощения на порядок ниже, чем для кр. 1

Дыхательная активность АИ в присутствии МСРА превышала контроль только на 7–10-е сут культивирования. Добавление ГК ($10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) в водный раствор МСРА приводило к снижению активности АИ по сравнению с контрольным вариантом. Однако хромато-масс-спектрометрический анализ показал снижение концентрации гербицида независимо от концентрации ГК на 35 % в течение 17 сут культивирования. То есть полного подавления активности микроорганизмов – деструкторов МСРА не происходило. При культивировании АИ в условиях периодического перемешивания интенсивность биодеградации увеличивалась и через 5 сут культивирования АИ концентрация МСРА снижалась на 60 %, а через 14 сут – на 87 %. В присутствии ГК в концентрациях 1, 5 и $10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ было отмечено замедление биодеградации МСРА [18].

Хромато-масс-спектрометрический анализ растворов МСРА без ГК через 5 сут показал наличие в среде 2-метил-4-хлорфенола, который исчезал через 14 сут. Внесение ГК приводило к тому, что в процессе биоутилизации МСРА наряду с 2-метил-4-хлорфенолом была обнаружена и 2-метилфеноксиуксусная кислота. То есть биотрансформация МСРА осуществлялась как микроорганизмами, способными к дегалогенированию самого гербицида, так и микроорганизмами, для которых первым этапом в трансформации МСРА является отрыв ацетильной группы. Данный метаболит был зафиксирован на 5-е сут культивирования АИ, которое через 14 сут не было обнаружено. По-видимому, добавление ГК приводило к активизации микроорганизмов, способных осуществлять дегалогенирование исходной молекулы МСРА. Известно, что для большого числа микроорганизмов, способных утилизировать МСРА, первым этапом в его трансформации является разрыв эфирной связи, катализируемый α -кетоглутарат диоксигеназой, с образованием метил-хлорфенола [19].

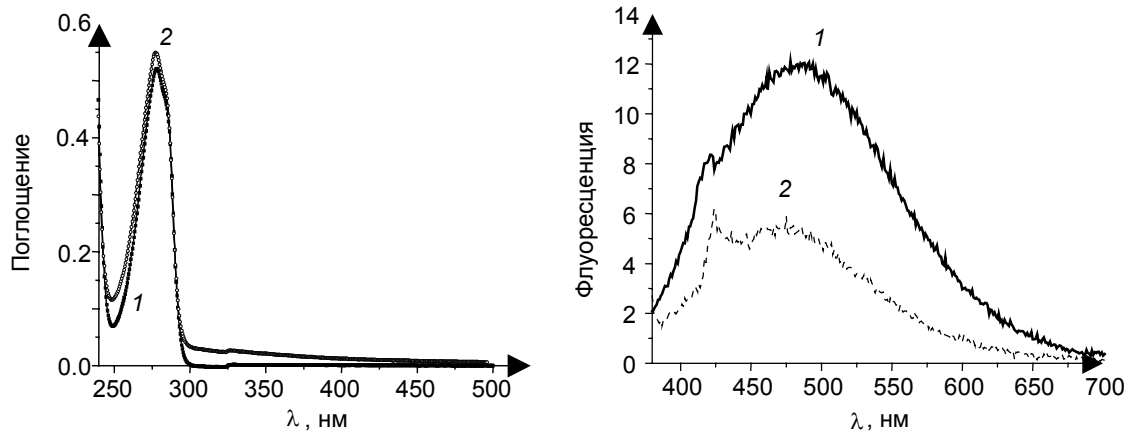


Рис. 2. Спектры поглощения и флуоресценции МРСА без (кр. 1) и в присутствии ГК ($5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) (кр. 2). Длина волны возбуждения флуоресценции 365 нм

На рис. 3 представлены кинетические кривые выделения диоксида углерода при разложении МРСА в присутствии активного ила с добавками гуминовых кислот без и после предоблучения.

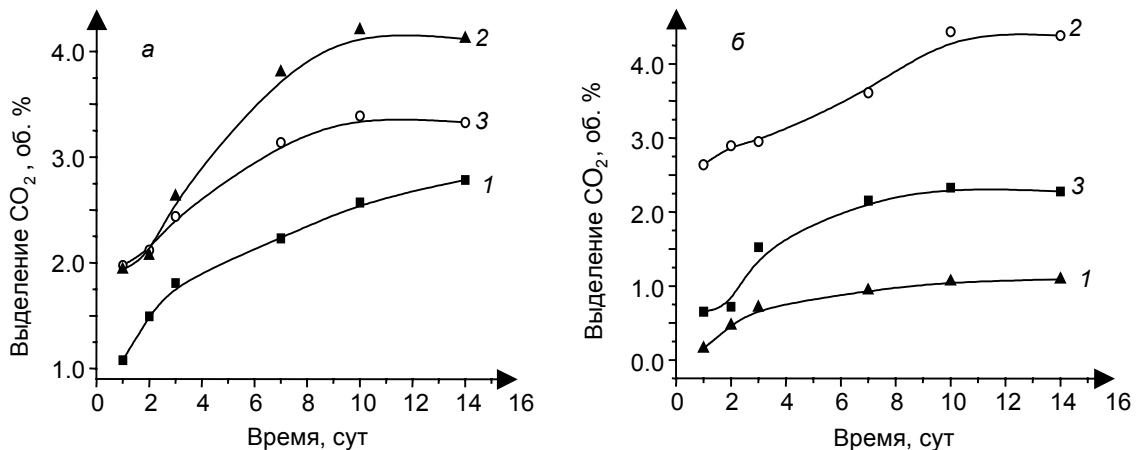


Рис. 3. Кинетические кривые выделения CO_2 в процессе фотоиндуцированного биоразложения МРСА в воде в отсутствие (а) и присутствии ГК (б): кр. 1 – без облучения; кр. 2 – предварительно облученный ХеВг-эксилампой; кр. 3 – предварительно облученный КгСl-эксилампой

По полученным кинетическим данным видно, что добавка ГК в реакционную смесь приводит к снижению скорости образования CO_2 (ср. с рис. 1). Предварительное облучение реакционной смеси повышает суммарное количество образующегося CO_2 , как и в предыдущем случае, однако более сложная кинетическая зависимость изменения количества образующегося продукта во времени требует дополнительного анализа. На рис. 4 представлены кривые изменения скорости выделения CO_2 во времени, полученные в присутствии ГК в реакционной смеси.

Видно, что добавка ГК изменяет кинетику реакции разложения МРСА по сравнению с результатами, представленными на рис. 3: на полученной кривой не наблюдается участок возрастания скорости выделения CO_2 , т.е. в начальный момент времени в присутствии ГК скорость выделения CO_2 максимальна, а затем плавно падает во времени (это обычная зависимость для кинетики в статической системе). Однако такая зависимость не характерна для последовательных реакций (уравнение (1)), поскольку отсутствует период накопления промежуточного соединения, разложение которого приводит к появлению CO_2 . Здесь, вероятно, проявляется участие добавки ГК, которое может быть связано с избирательной адсорбцией мало реакционно-способных ПС и выключением их из процесса разложения до CO_2 , поскольку общее количество образовавшегося продукта гораздо меньше при добавке ГК по сравнению с системой без добавки.

Весьма интересен характер полученных кривых зависимости скорости выделения CO_2 от времени под действием излучения. Максимальная скорость выделения CO_2 , как и в предыдущем случае (при исследовании системы без добавок ГК), наблюдается при воздействии ХеВг-излучения. Причем характер зависимости меняется. Если для ХеВг-излучения без добавок ГК максимальное значение скорости было получено в начальный период разложения (1–2 сут), то в присут-

ствии ГК происходит сдвиг максимальной скорости в область 3–4 сут ведения процесса деградации. Этот факт также можно связать с влиянием ГК, вероятно, с избирательной адсорбцией промежуточных соединений.

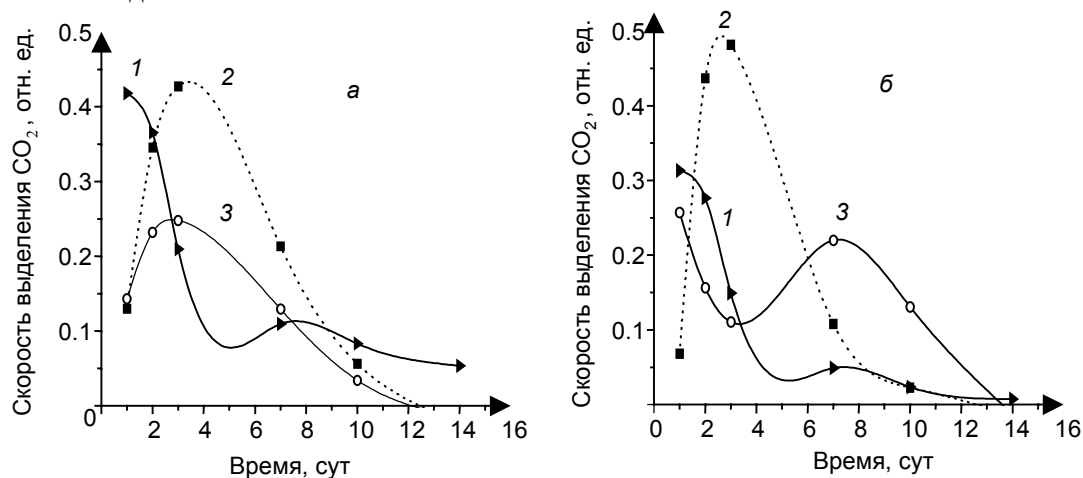
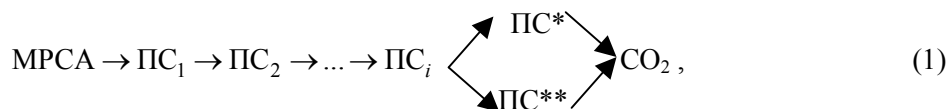


Рис. 4. Скорость выделения CO_2 в процессе фотоиндуцированного биоразложения МСРА в воде в отсутствие (а) и присутствии ГК (б): кр. 1 – без облучения; кр. 2 – предварительно облученный ХеВг-эксилампой; кр. 3 – предварительно облученный КтСл-эксилампой

Наибольшие изменения проявляются при исследовании процесса биodeградации после предоблучения КтСл-эксилампой. Полученная кривая изменения скорости свидетельствует о том, что образование CO_2 происходит в результате разложения как минимум двух активных промежуточных соединений, присутствующих в такой системе. То есть приведенная схема последовательных превращений (уравнение (1)) преобразуется в последовательно-параллельную. Наблюдаемая зависимость, содержащая два участка с высокой скоростью, говорит о наличии двух активных промежуточных соединений, образование которых (или стабилизация в адсорбированном состоянии) может происходить с участием гуминовых кислот.

На рис. 4 представлены кривые изменения скорости выделения CO_2 во времени, полученные в присутствии МСРА и ГК в АИ. При внесении МСРА в АИ выделение CO_2 увеличивается и максимум накопления CO_2 сдвигается по сравнению с контролем. По-видимому, растет константа скорости разложения промежуточного соединения PC_i с образованием диоксида углерода:



где PC – промежуточные соединения различного строения.

По полученным кинетическим данным видно, что добавка ГК в реакционную смесь с МСРА приводит к снижению скорости образования CO_2 в системе и изменению кинетики реакции разложения МСРА по сравнению с контролем (рис. 4, кривые 1 и 2). Анализ данных показал, что не наблюдается участок возрастания скорости выделения CO_2 в присутствии ГК, т.е. в начальный момент времени скорость выделения CO_2 максимальна, а затем плавно падает во времени. Это обычная зависимость для кинетики в статической системе. Характер кинетических кривых указывает на то, что добавление ГК ингибирует биodeградацию как МСРА, так и его продуктов трансформации.

Заключение

В данной работе проведено исследование влияния ГК на эффективность фотобиологического разложения гербицида МСРА с помощью газовой хроматографии. Проведен анализ спектров флуоресценции МСРА в водных растворах в отсутствие и присутствии ГК. Проведен качественный и количественный анализ состава продуктов биотрансформации МСРА. В работе установлено, что полного биоразложения гербицида микроорганизмами активного ила в течение 14 сут не происходило. Добавление ГК замедляло процесс биodeградации МСРА в начальный период времени и меняло кинетику выделения углекислого газа после предварительного облучения эксилам-

пами, но в конечном итоге приводило к снижению концентрации гербицида в системе на 87 % через 14 сут.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чайковская О.Н., Соколова И.В., Светличный В.А. и др. // Журн. прикл. спектр. – 2006. – Т. 73. – № 6. – С. 735–739.
2. Чайковская О.Н., Каретникова Е.А., Соколова И.В., Майер Г.В. // Журн. прикл. спектр. – 2008. – Т. 75. – № 2. – С. 250–255.
3. Соколова Т.В., Чайковская О.Н., Каретникова Е.А. и др. // Изв. вузов. Физика. – 2008. – Т. 51. – № 12. – С. 88–98.
4. Tchaikovskaya O., Sokolova I., Mayer G., et al. // Luminescence (Wiley InterScience). – 2011. – V. 26. – P. 156–161.
5. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Суханова Н.И. Химия почв. – М.: Высшая школа, 2005. – 558 с.
6. Горювая А.И., Орлов Д.С., Щербенко О.В. Гуминовые вещества. – Киев: Наукова думка, 1995. – 304 с.
7. Мальцева Е.В., Юдина Н.В., Чайковская О.Н., Нечаев Л.В. // ЖФХ. – 2011. – Т. 85. – № 9. – С. 1676–1679.
8. Ortega-Calvo J.-J. and Saiz-Jimenez C. // Appl. Envir. Microbiol. – 1998. – V. 64. – No. 8. – P. 3123–3126.
9. Zepp R.G., Schlotzhauer P.F., and Sink R. // Environment. Sci. Technol. – 1985. – V. 19. – P. 74–80.
10. Fischer A.V., Kliger D.S., Winterle J.S., and Mill T. // Chemosphere. – 1985. – V. 14. – No. 9. – P. 1299–1303.
11. Aguer J.-P. and Richard C. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 1996. – V. 93. – No. 2–3. – P. 193–198.
12. Carter C.W. and Suffet I.H. // Environment. Sci. Technol. – 1982. – V. 16. – No. 11. – P. 735–740.
13. Vialaton D., Richard C., Baglio D., and Paya-Perez A.-B. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 1998. – V. 119. – P. 121–128.
14. Aguer J.-P., Tetegan D., and Richard C. // Photochem. Photobiol. Sci. – 2005. – V. 4. – P. 451–453.
15. Benz M., Schink B., and Brune A. // Appl. Envir. Microbiol. – 1998. – V. 64. – No. 11. – P. 4507–4512.
16. Shimp R. and Pfaender F.K. // Appl. Envir. Microbiol. – 1985. – V. 49. – No. 2. – P. 402–407.
17. Burrows H.D., Canle M., Santaballa J.A., and Steenken S. // J. Photobiol. Photochem. B: Biology. – 2002. – V. 67. – P. 71–108.
18. Чайковская О.Н., Каретникова Е. А., Соколова И.В. и др. // Журн. прикл. химии. – 2010. – Т. 83. – Вып. 10. – С. 1718–1721.
19. Tchaikovskaya O., Karetnikova E., Sokolova I., et al. // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. – 2012. – V. 228. – No. 1. – P. 8–14.
20. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. – New York: Kluwer Academic Plenum Publisher, 1999. – 698 p.

*Сибирский физико-технический институт им. акад. В.Д. Кузнецова
Национального исследовательского Томского государственного университета,
г. Томск, Россия
**Национальный исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, Россия
***Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, г. Хабаровск, Россия
E-mail: tchon@phys.tsu.ru

Поступила в редакцию 11.03.13,
после доработки – 12.07.13.

Чайковская Ольга Николаевна, д.ф.-м.н., декан физического факультета;
Соколова Ирина Владимировна, д.ф.-м.н., гл. науч. сотр. СФТИ, профессор ТГУ;
Каретникова Елена Анатольевна, к.б.н., ст. науч. сотр.;
Майер Георгий Владимирович, д.ф.-м.н., профессор, ректор.