

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО
БИОРАЗЛОЖЕНИЯ ИЗОМЕРОВ КРЕЗОЛА**О. Н. Чайковская^{а,б*}, И. В. Соколова^{а,б}, Е. А. Каретникова^в, Г. В. Майер^а

УДК 535.37;57.083

^а Томский государственный университет, Россия^б Сибирский физико-технический институт им. акад. В. Д. Кузнецова, Россия, 634050, Томск, Новособорная пл., 1; e-mail: tchon@phys.tsu.ru^в Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской АН, Хабаровск

(Поступила 4 июля 2007)

Методом флуоресцентной спектроскопии изучено фотоиндуцированное биоразложение орто-крезола, пара-крезола и их смеси в воде при возбуждении различными источниками УФ излучения. Показано, что эффективность фотоллиза как индивидуальных изомеров, так и смеси крезолов выше при возбуждении излучением $\lambda \sim 222$ нм. Предоблучение водных растворов крезола приводит к замедлению последующего биоразложения. Применение комбинации УФ облучения и штамма *Penicillium tardum* H-2 для утилизации смеси крезолов привело к полному разложению пара-крезола и частичному — орто-крезола. Изучение качественного состава метаболитов, образующихся в ходе биоразложения пара-крезола, с использованием спектральных и хроматографических методов показало, что подготовительный метаболизм таких соединений происходит как через окисление метильной группы с образованием 4-гидроксибензойной кислоты, так и через гидроксильрование с образованием 4-метилкатехола.

Ключевые слова: УФ облучение, биоразложение, пара-крезол, орто-крезол.

*The photoinduced biodegradation of ortho-cresol, para-cresol, and their mixture in water under exposure to UV-radiation from different sources is studied by fluorescence spectroscopy method. The photolysis efficiency of both individual cresols and cresol mixtures is shown to be higher on irradiation at $\lambda \sim 222$ nm. UV pre-irradiation of cresol-water solutions slows down their subsequent biodegradation rate. The use of UV-irradiation combined with strain *Penicillium tardum* H-2 application to utilize cresol mixtures results in the total and partial degradation of para- and ortho-cresol respectively. The spectral and chromatographic studies into qualitative composition of metabolites produced in the course of para-cresol biodegradation show that preparative metabolism of such compounds takes place via methyl group oxidation and hydroxylation process to give 4-hydroxybenzoic acid and 4-methylcatechol respectively.*

Keywords: UV-irradiation, biodegradation, para-cresol, ortho-cresol.

Введение. Крезолы, относящиеся к группе летучих фенолов, характеризуются высокой токсичностью для гидробионтов. Поступление изомеров крезола в водные экосистемы связано с деятельностью химических, фармацевтических и деревообрабатывающих предприятий [1]. Крезолы также образуются в процессе микробиологического превращения толуола [2, 3]. Трансформация и разрушение крезолов в водной среде происходят в результате биологических и физико-химических процессов, среди которых именно фотоллиз играет значительную роль. Это обуславливает еще большее применение оптического излучения для решения связанных с охраной окружающей среды проблем, в том числе разложения органических молекул, особенно с низкой биоразлагаемостью [4—6]. Исследования фототрансформации отдельных токсикантов ограничиваются в основном анализом состава фотопродуктов хроматографическими методами [7—10]. Данные об устойчивости продуктов фототрансформации токсикантов к дальнейшему биоразложению немногочисленны [11—14]. В настоящее время разрабатываются комбинированные фотохимические и биологические методы разложения полиароматических соединений, извлекаемых из загрязненных почв с помощью органических растворителей с использованием двухфазных реакторов [15]. Однако исследование фотохимических и микробиологических процессов разрушения конкретных загрязняющих

FLUORESCENT ANALYSIS OF PHOTOINDUCED BIODEGRADATION OF CRESOL ISOMERSO. N. Tchaikovskaya^{а,б*}, I. V. Sokolova^{а,б}, E. A. Karetnikova^в, and G. V. Mayer^а (^а Tomsk State University, Russia;^б V. D. Kuznetsov Siberian Physical Technical Institute, 1 Novosobornaya Sq., Tomsk, 634050, Russia; e-mail: tchon@phys.tsu.ru;^в Institute of Water and Ecological Problems, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Khabarovsk)

веществ в водной среде при использовании источников искусственного УФ излучения остается актуальной задачей. Цель работы — изучение эффективности последовательного фото- и биоразложения смеси изомеров крезоло спектрально-флуоресцентными методами.

Методика эксперимента. Источники УФ-облучения. В качестве источников УФ излучения для фотохимических исследований использовались: 1) коммерческая ртутная лампа высокого давления ОКН-11М, которая представляет собой широкополосный источник, имеющий несколько максимумов излучения в области 240—600 нм; 2) новые современные источники — импульсные эксилампы [16] барьерного разряда U-типа на рабочих молекулах KrCl ($\lambda_{\text{изл}} \sim 222$ нм) и XeCl ($\lambda_{\text{изл}} \sim 308$ нм) с параметрами $\Delta\lambda = 5$ —10 нм, $W_{\text{пик}} = 18$ мВт/см², $f = 200$ кГц, длительность импульса 1 мкс. Выбор источников излучения связан с тем, что УФ излучение с $\lambda_{\text{изл}} \sim 222$ нм поглощается высоколежащими электронно-возбужденными состояниями крезолов (для отдельных изомеров крезоло зафиксированы наиболее эффективные фотопревращения). Излучение $\lambda_{\text{изл}} \sim 308$ нм позволяет не затрагивать высоколежащие состояния молекул. Растворы исследуемых соединений для облучения помещались в стеклянные стаканы. Для предотвращения нагревания растворов при облучении и стабильной работы ламп осуществлялось воздушное охлаждение установки. Облучение проводилось при периодическом перемешивании растворов. Время предварительного облучения 30 мин.

Микроорганизмы и условия культивирования. Использован штамм *Penicillium tardum* Н-2 (*P. tardum* Н-2), который утилизировал *para*-крезол как единственный источник углерода [17]. Для получения посевного материала микроицет культивировали на среде № 2 состава (г/л): пептон — 12, дрожжевой экстракт — 5, глюкоза — 30.5, NaCl — 5. В качестве инокулята использовали суспензию конидий гриба в количестве 2 мл (10^7 клеток/мл), полученную смывом со скошенного агара. Культивирование микроицета осуществляли в стационарных условиях при 20—24 °С в колбах объемом 250 мл, содержащих минеральную среду состава (г/л): KNO₃ — 1, MgSO₄ · 7 H₂O — 0.2, NaCl — 1, K₂HPO₄ — 1. В качестве источника углерода использовали *para*-крезол, *ortho*-крезол и смесь данных изомеров при концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} моль/л (фирма Aldrich). Водные растворы токсикантов с концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л предварительно облучали в течение 30 мин. Затем 50 мл облученных растворов вносили в стерильные колбы, содержащие 50 мл минеральной среды с двойной концентрацией солей. Отсутствие бактериального заражения сред контролировали путем пассажей на рыбо-пептонном агаре. Мицелий *P. tardum* Н-2 отделяли от культуральной жидкости фильтрованием с помощью ручного вакуумного насоса.

Физико-химический анализ. Спектры исследуемых растворов до и после УФ облучения и микробиологического воздействия получены на спектрофотометре Spexord M40 и спектрофлуориметре CM2203 ($\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 280$ и 330 нм). При $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 280$ нм регистрировались спектры флуоресценции непосредственно крезолов и соединений, образующихся в ходе подготовительного метаболизма *para*-крезола, а при $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 330$ нм — спектры флуоресценции предполагаемых продуктов фотолиза и фотоиндуцированного биоразложения крезолов. Спектроскопический метод определения квантового выхода фотолиза и биоразложения, основанный на измерении интенсивности поглощения (до и после утилизации) в максимумах полос поглощения, в данном случае непригоден, поскольку образующиеся фотопродукты и продукты биоразложения поглощают в той же области, что и исходные соединения. Поэтому эффективность фото- и биопревращений крезолов и их смеси оценивалась по падению интенсивности флуоресценции в максимальной полосе в области 308 нм до и после воздействия. Для определения состава крезолов после биоразложения смеси изомеров пробы предварительно подкисляли HCl и экстрагировали диэтиловым эфиром. Содержание крезолов в экстрактах определяли на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010: газ-носитель — азот, колонка Rtx-5 0.25 мм × 0.25 мкм × 70 м; температура испарителя 200 °С; температура колонки 80 °С (4 мин); нагрев 15 °С/мин до 160 °С (3 мин); температура пламенно-ионизационного детектора 250 °С.

Для анализа эфирных экстрактов культуральной жидкости на наличие метаболитов *para*-крезола использован метод тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol. Система растворителей: толуол—1,4-диоксан—уксусная кислота (90:20:4), проявители: реактив Фолина—Чиокалтеу, раствор FeCl₃ (2 % в 96 %-ном этаноле), для проявления 4-гидроксibenзальдегида использован 2,4-динитрофенилгидразин (0.1 % раствор в 1М HCl) [18].

Обсуждение результатов. Для того чтобы понять изменения спектрально-люминесцентных характеристик водных растворов смеси изомеров крезоло после воздействия УФ излучением и микроорганизмами проведены исследования отдельных изомеров.

Необлученный раствор *para*-крезола полностью утилизировался штаммом *P. tardum* Н-2 в течение 20 ч [19]. По данным флуоресцентного анализа в культуральной жидкости содержались соединения, излучающие в областях 325, 340 и 435 нм (табл. 1). При снижении температуры культивирования микроицета на 6 °С и, соответственно, уменьшении скорости утилизации *para*-крезола и промежуточных метаболитов через 68 ч в культуральной жидкости зарегистрирована полоса флуоресценции с $\lambda = 310$ нм. Известно

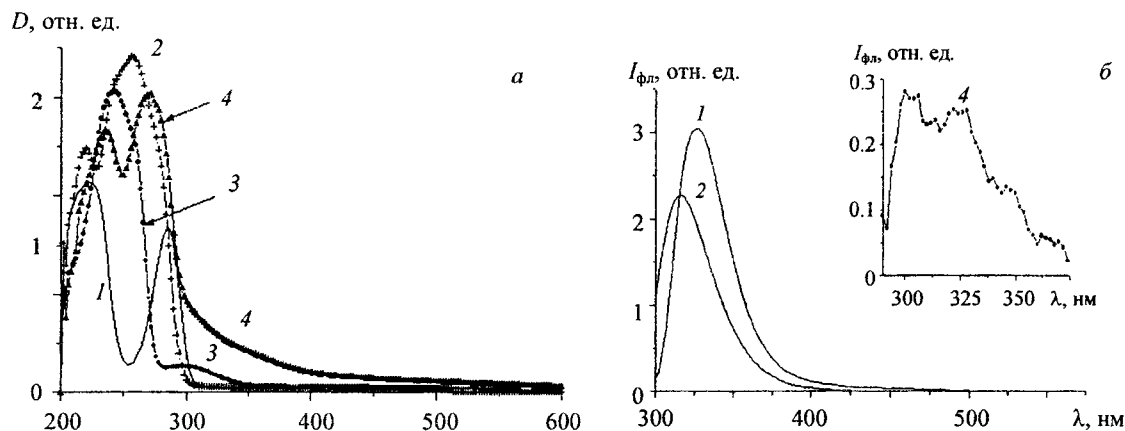


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) предполагаемых продуктов фотолитиза и бактериальной деструкции *para*-крезола в воде при концентрации 10^{-4} М: 1 — 4-метилкатехол; 2 — 4-гидроксибензойная кислота; 3 — 1,4-бензохинон; 4 — водный раствор *para*-крезола (10^{-3} М) после микробиологического разложения *P. tardum* Н-2 (240 ч)

[18], что реакции подготовительного метаболизма при микробиологическом разложении *para*-крезола могут затрагивать гидроксильную группу и сопровождаться образованием 4-гидроксибензойного альдегида и, далее, 4-гидроксибензойной кислоты или проходят через образование 4-метилкатехола. Спектры поглощения и флуоресценции этих соединений приведены на рис. 1. Поэтому зарегистрированное нами испускание с $\lambda_{\text{исп}}^{\text{макс}} = 325$ нм может принадлежать как 4-гидроксибензойной кислоте, так и 4-метилкатехолу.

Для увеличения выхода продуктов микробиологического разложения крезолов мы увеличили начальную концентрацию соединений в растворе до 10^{-3} моль/л. После этого в спектрах поглощения культуральной жидкости четко регистрировалась полоса, характерная для поглощения 4-гидроксибензойной кислоты (рис. 1, кривая 4). 4-Метилкатехол поглощает в области, близкой к поглощению 4-гидроксибензойной кислоты, поэтому с помощью спектров поглощения оценить момент образования данного метаболита затруднительно. Известно, что для многих микроорганизмов характерно наличие не одного, а двух путей подготовительного метаболизма фенольных соединений. Так, при исследовании метаболизма *para*-крезола микромицетом *Aspergillus fumigatus* было отмечено [18], что утилизация токсиканта происходит через образование как 4-гидроксибензойной кислоты, так и 4-метилкатехола. Поскольку спектральные методы не позволяют четко идентифицировать образующиеся при утилизации *para*-крезола метаболиты, проведен анализ культуральной жидкости методом тонкослойной хроматографии. Это позволило выявить наличие в культуральной жидкости 4-метилкатехола, т. е. для *P. tardum* Н-2 характерно наличие двух путей подготовительного метаболизма *para*-крезола. Изучение способности *P. tardum* Н-2 утилизировать основные метаболиты *para*-крезола в качестве единственного источника углерода показало, что 4-гидроксибензойный альдегид и 4-гидроксибензойная кислота в концентрации 100 мг/л полностью утилизируются микромицетом в течение 48 ч, в то время как 4-метилкатехол сохраняется в среде более длительное время и подвергается физико-химическому окислению.

Фоторазложение *para*-крезола наиболее эффективно протекает при возбуждении УФ излучением КгСl-эксилампы, на что указывает образование двух флуоресцирующих фотопродуктов (табл. 1). После микробиологической дегградации *para*-крезола, предварительно облученного КгСl-эксилампой, спустя 68 ч в спектрах поглощения и флуоресценции сохранялись полосы, характерные для *para*-крезола. Полное разложение *para*-крезола, согласно данным флуоресцентного анализа, зафиксировано только через 116 ч. Применение комбинированного воздействия приводит к образованию продуктов, излучающих с $\lambda_{\text{макс}} = 310, 325, 410$ и 435 нм. Анализ флуоресцентных характеристик раствора *para*-крезола, предварительно облученного с помощью ХеСl-эксилампы, после полного биоразложения (116 ч) показывает наличие в спектре культуральной жидкости полос флуоресценции с максимумами 325 и 410 нм, а также в области 340 нм (табл. 1).

Фотоиндуцированное полным светом ртутной лампы микробиологическое разложение *para*-крезола в течение 68 ч приводит к его утилизации. В результате в культуральной жидкости также обнаружены соединения, флуоресцирующие в областях 325 и 410 нм (табл. 1). Независимо от типа УФ источника предоблучение вызывало ингибирование процесса последующего микробиологического разложения *para*-крезола.

Т а б л и ц а 1. Положение максимумов (λ , нм) полос флуоресценции смеси *пара*-крезола и *орто*-крезола после фотоиндуцированного микробиологического разложения при комнатной температуре

Микробиологическое воздействие	Воздействие УФ излучением			
	без предоблучения	ртутная лампа	KrCl-эксилампа	XeCl-эксилампа
<i>Пара</i> -крезол				
без воздействия <i>P. tardum</i> Н-2	—	425	425, 410	410
<i>P. tardum</i> Н-2	310, 325, 340, 435	325, 410	310, 325, 410, 435	325, 340, 410
<i>Орто</i> -крезол				
без воздействия <i>P. tardum</i> Н-2	—	—	410	—
<i>P. tardum</i> Н-2	410	410	410, 440	—
Смесь <i>пара</i> -крезола и <i>орто</i> -крезола				
без воздействия <i>P. tardum</i> Н-2	—	410	405	410
<i>P. tardum</i> Н-2	410	410	325, 410	410

В отличие от *пара*-крезола *орто*-изомер практически не используется штаммом *P. tardum* Н-2 в качестве единственного источника углерода. В спектрах флуоресценции необлученного раствора *орто*-крезола после инкубации с *P. tardum* Н-2 отмечаются слабые изменения интенсивности испускания. Флуоресцирующие продукты метаболизма даже после 164 ч культивирования *P. tardum* Н-2 не зарегистрированы. Фотохимические превращения *орто*-крезола так же, как и в случае *пара*-изомера, наиболее эффективны при использовании излучения KrCl-эксилампы. Предварительное УФ облучение водного раствора *орто*-крезола приводило к последующему биоразложению. Анализ флуоресцентных данных показывает, что уже после 68 ч культивирования *P. tardum* Н-2 интенсивность полосы испускания, соответствующей *орто*-крезолу, минимальна для образца, предварительно облученного с помощью KrCl-эксилампы или ртутной лампы (рис. 2). В отличие от *пара*-изомера после биоразложения *орто*-крезола появляется полоса флуоресценции с максимумом 440 нм (табл. 1).

Так как необлученный водный раствор *орто*-крезола плохо утилизировался штаммом *P. tardum* Н-2 (рис. 2), предпринята попытка увеличить эффективность биоразложения с использованием смеси двух изомеров. Последовательное воздействие УФ-облучения KrCl-эксилампой и *P. tardum* Н-2 в течение 20 ч приводит к снижению содержания крезолов в культуральной жидкости (рис. 3). Микробиологическое разложение в течение 116 ч смеси двух изомеров в воде сопровождалось сдвигом максимума полосы и уменьшением интенсивности флуоресценции.

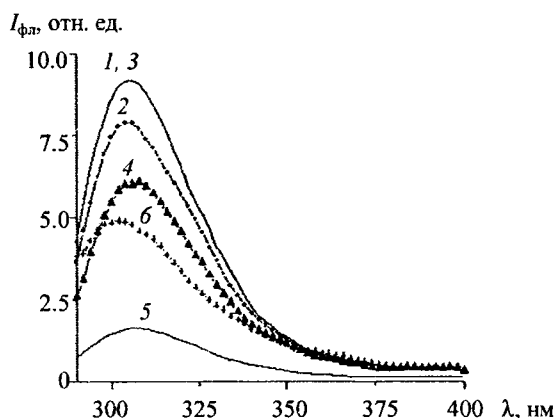
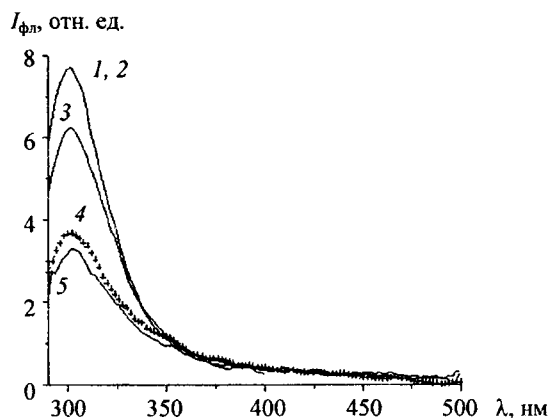


Рис. 2. Спектры флуоресценции *орто*-крезола в водном растворе до (1) и после биоразложения в течение 68 ч: 2 — без предварительного УФ облучения, 3 — предоблучение XeCl-эксилампой, 4 — предоблучение KrCl-эксилампой, 5 — предоблучение ртутной лампой; $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 280$ нм

Рис. 3. Спектры флуоресценции смеси *орто*-крезола и *пара*-крезола в водном растворе до (1) и после фотоиндуцированного биоразложения в течение 20 ч: 2 — без предварительного УФ облучения, 3 — XeCl-эксилампа, 4 — ртутная лампа, 5 — KrCl-эксилампа, 6 — биоразложение в течение 116 ч без предоблучения; $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 280$ нм

Эффективность предварительного фотооблучения так же, как и в случае фотолиза отдельных изомеров, выше при использовании КгСл-эксилампы. Последовательное фото- и биоразложение (68 ч) смеси крезолов с помощью КгСл-эксилампы сопровождается значительным увеличением интенсивности поглощения в области 240 нм по сравнению с фоторазложением. Это указывает на то, что в процессе утилизации эффективно образуются продукты совместного разложения *para*- и *ortho*-изомеров хиноновой структуры. Однако через 240 ч культивирования *P. tardum* Н-2 полоса флуоресценции в области испускания крезолов еще оставалась в спектре культуральной жидкости.

При использовании ХеСл-эксилампы наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции в области 300—310 нм через 68 ч культивирования микромицета. В дальнейшем интенсивность флуоресценции в данной области не изменялась. При использовании ртутной лампы, как и в случае предоблучения КгСл-эксилампой, через 116 ч биоразложения отмечено максимальное снижение интенсивности флуоресценции крезолов и появление в культуральной жидкости метаболита, флуоресцирующего в области 410 нм (табл. 1).

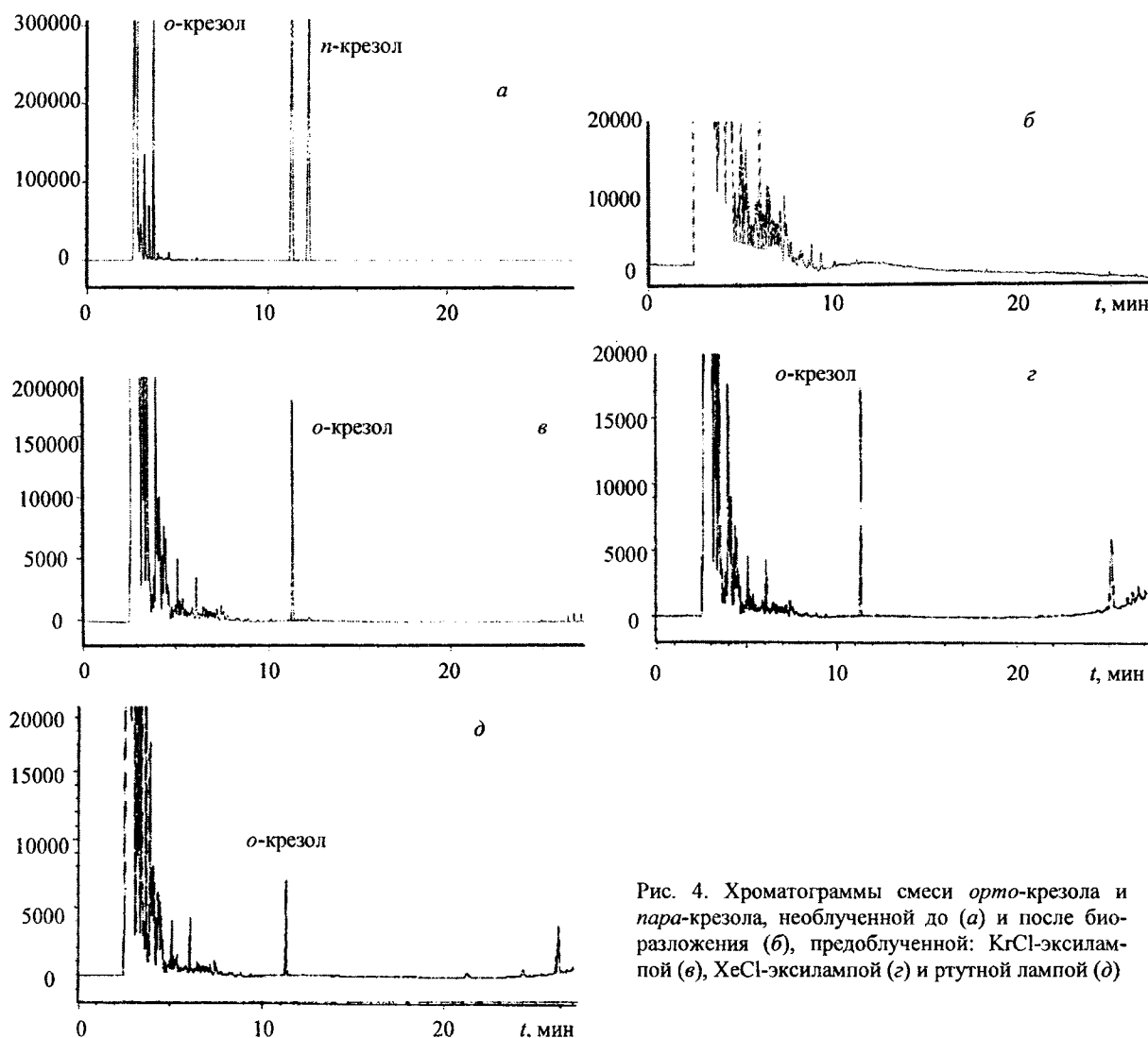


Рис. 4. Хроматограммы смеси *ortho*-крезола и *para*-крезола, необлученной до (а) и после биоразложения (б), предоблученной: КгСл-эксилампой (в), ХеСл-эксилампой (г) и ртутной лампой (д)

После 336 ч культивирования микромицета в необлученном и облученных растворах смеси изомеров крезолов проведен газохроматографический анализ культуральной жидкости (рис. 4). В результате показано отсутствие крезолов в необлученном растворе (рис. 4, б) и наличие *ortho*-крезола в растворах, подвергавшихся предварительному облучению УФ излучением и последующему биоразложению (рис. 4, в—д). Утилизация *ortho*-крезола при росте *P. tardum* Н-2 на необлученном растворе, содержащем смесь изомеров, связана с процессами кометаболизма. Ранее эффективная утилизация *ortho*-крезола была отмечена при росте данного микромицета в средах, содержащих продукты пиролиза лигнина, в число которых вхо-

дят *para*-крезол и другие фенольные соединения [17]. Снижение темпов деградации *ortho*-изомера в результате предварительного УФ облучения может быть связано с образованием в ходе фотолиза соединений, являющихся конкурентными ингибиторами ферментов, участвующих в метаболизме крезолов.

Заключение. Полученные с помощью флуоресцентного мониторинга результаты показали, что предварительное УФ облучение растворов крезолов в течение 30 мин приводит к снижению скорости последующего биоразложения как *para*-крезола, так и смеси изомеров. Разложение *ortho*-крезола с использованием отдельно *P. tardum* Н-2 или фотолиза неэффективно. Полная утилизация данного токсиканта отмечена при развитии микромицета на необлученной смеси изомеров, что связано с процессами кометаболизма. Использование предварительного УФ облучения смеси изомеров крезола привело к снижению скорости утилизации токсикантов *P. tardum* Н-2 и наличию в среде остаточных концентраций *ortho*-изомера. На основании анализа полученных в настоящей работе и литературных данных [12—14] можно сделать вывод, что применение комбинации фотохимических и микробиологических методов требует проведения оптимизации условий разложения конкретных токсикантов и их смесей, включая выбор источников и времени УФ-облучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 06-08-01380-а и 07-08-90800-моб-ст).

- [1] P.Kumaran, Y.L.Paruchuri. Water Res., 31 (1997) 1—22
- [2] R.V.Smith, J.P.Rosazza. Arch. Biochem. Biophys., 161 (1974) 551—558
- [3] I.García-Peña, S.Hernández, R.Auria, S.Revah. Appl. Envir. Microbiol., 71 (2005) 4280—4285
- [4] Л.Т.Бугаенко, М.Г.Кузьмин, Л.С.Полак. Химия высоких энергий, Москва, Химия (1988)
- [5] J.R.Bolton. EPA Europ. Photochem. Associat. Newslett., 43 (1991) 40—45
- [6] O.Legrini, E.Oliveros, A.M.Braun. Chem. Rev., 93 (1993) 671—698
- [7] M.G.Gonzalez, E.Oliveros, M.Woerner, A.M.Braun. J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev., 5 (2004) 225—246
- [8] И.В.Соколова, О.Н.Чайковская, В.А.Светличный, Р.Т.Кузнецова, Т.Н.Копылова, Г.В.Майер, Э.А.Соснин, Е.А.Липатов, В.Ф.Тарасенко. ХВЭ, 36 (2002) 311—315
- [9] V.Maurino, C.Minero, E.Pelizzetti, P.Piccinini, N.Serpone, H.Hidaka. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 109 (1997) 171—176
- [10] О.Н.Чайковская, Т.В.Соколова, И.В.Соколова. Журн. прикл. спектр., 72, № 2 (2005) 165—170
- [11] J.F.Rontani, F.Bosser-Joulak, E.Rambeloarison, J.C.Bertrand, C.Guisti. Chemosphere, 14 (1985) 1413—1422
- [12] O.Tchaikovskaya, I.Sokolova, L.Kondratieva, E.Karetnikova. Int. J. Photoenergy, 3 (2001) 177—180
- [13] P.Boule, L.Meunier, F.Vonnemoy, A.Boulkamh, A.Zertal, V.Lavedrine. Int. J. Photoenergy, 4 (2002) 69—78
- [14] Е.А.Саратовских, Н.Б.Козлова, В.Г.Папин, Е.В.Штамм. Прикл. биохим. и микробиол., 42 (2006) 44—51
- [15] B.Guieysse, G.Viklund. Chemosphere, 59 (2005) 369—376
- [16] V.F.Tarasenko, E.B.Chernov, M.V.Erofeev, M.I.Lomaev, A.N.Panchenko, V.S.Skakun, E.A.Sosnin, D.V.Shitz. Appl. Phys. A, 69 (1999) 327—329
- [17] Е.А.Каретникова. Прикл. биохим. и микробиол., 42 (2006) 55—58
- [18] K.H.Jones, P.W.Trudgill, D.J.Hopper. Appl. and Environm. Microbiol., 59 (1993) 1125—1130
- [19] O.Tchaikovskaya, I.Sokolova, V.Svetlichnyi, E.Karetnikova, E.Fedorova, N.Kudryasheva. Luminescence, 22 (2007) 29—34