

Влияние света, трансформированного фотолюминесцентными пленками, на деструктивную активность микроорганизмов нефтезагрязненных почв

Л.К. Алтунина, Л.И. Сваровская, Д.А. Филатов*

*Институт химии нефти СО РАН
634021, г. Томск, пр. Академический, 4*

Поступила в редакцию 14.05.2012 г.

Изучено стимулирующее влияние солнечного света, трансформированного фотолюминесцентными полимерными пленками, на динамику численности и ферментативную активность микроорганизмов нефтезагрязненных почв. Биодеструкция углеводородов нефти на опытных участках почвы за 60 сут составила 60–70% от исходного загрязнения, с применением обычной полиэтиленовой пленки – 26%. Анализ остаточных углеводородов, экстрагированных из опытных образцов загрязненной почвы, методом ИК-спектроскопии показал появление дополнительных полос поглощения в области 3350, 1600 и 1710 см⁻¹, что указывает на образование продуктов метаболизма при ферментативном окислении нефти. Хроматографический анализ подтвердил интенсивность окислительных процессов в нефтезагрязненной почве с применением фотолюминесцентных пленок.

Ключевые слова: фотолюминесцентные полимерные пленки, нефтезагрязненная почва, углеводородоокисляющие микроорганизмы, оксигеназная активность, биодеструкция углеводородов нефти; photoluminescent polymer films, oil-contaminated soils, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, oxygenase activity, biodegradation of petroleum hydrocarbons.

Введение

Широкое вовлечение солнечной энергии в энергетический баланс клетки – актуальная и сложная проблема, которая привлекает все большее внимание исследователей. Важная роль в ее решении отводится фотолюминесцентным полимерным материалам. Введение в состав пленки люминофоров на основе органических и минеральных соединений приводит к уменьшению пропускания УФ-излучения и увеличению интенсивности света в красной области спектра с пиком 615 нм [1]. Полимерные пленки, обладающие фотолюминесцентными (светокорректирующими) свойствами за счет введения в их состав фотолюминофоров, находят все большее применение в сельском хозяйстве для ограждения закрытого грунта [2].

Опыты с полимерными люминесцентными преобразователями света показали, что усиление плотности светового потока в области 580–700 нм оказывает стимулирующее действие на процессы фотосинтеза у высших растений [3]. Существование фототрегуляторных систем у высших растений позво-

ляет сделать вывод о том, что такого рода системы и механизмы должны существовать и у микроорганизмов, более древних в эволюционном отношении [4].

Исследование действия света на жизнедеятельность гетеротрофных микроорганизмов при их освещении в течение 60 с монохроматическим светом с длиной волны 440 нм и интенсивностью $4 \cdot 10^4$ эрг/(см² · с) показало увеличение оптической плотности микробной суспензии и общего содержания белка на 40–50%. Спектр действия биологического эффекта обнаружил ряд максимумов в диапазонах 400–440, 500, 540, 580 и 640 нм [5]. Фотостимуляция роста и активности микроорганизмов при кратковременном и длительном освещении указывает на высокую квантовую эффективность первичной фотореакции.

В работах Л.Б. Рубина с соавт., исследующих влияние фотостимуляции на процессы дыхания микроорганизмов, показано, что эффект стимуляции дыхания является вторичным, обусловленным фотоиндуцированным синтезом белка и ускорением клеточного деления. Прямое фотохимическое действие света на почвенную микрофлору ограничивается верхним слоем почвенного покрова. Но это не исключает косвенного влияния на более глубокие слои, благодаря постоянно протекающему обмену веществ между генетическими горизонтами.

* Любовь Константиновна Алтунина (alk@ipc.tsc.ru); Лидия Ивановна Сваровская (sli@ipc.tsc.ru); Дмитрий Александрович Филатов (filatov@ipc.tsc.ru).

Фотолюминесцентные (светокорректирующие) пленки привлекают внимание как селективные светофильтры электромагнитного излучения Солнца [6]. В спектре солнечного излучения после пропускания сквозь фотолюминесцентную пленку наблюдаются уменьшение интенсивности света в УФ-области (280–380 нм) и увеличение в красной области (500–780 нм) с пиком 615 нм (рис. 1).

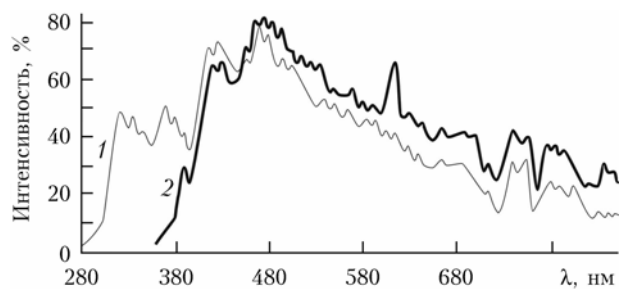


Рис. 1. Спектр солнечного излучения до (1) и после (2) трансформации

Цель работы — исследование стимулирующего эффекта фотолюминесцентных полимерных пленок, трансформирующих солнечную энергию, на оксигеназную активность естественной микрофлоры нефтезагрязненных почв.

Методы

Фотостимулирующий эффект увеличения численности и оксигеназной активности почвенной микрофлоры исследовали на примере углеводородокисляющей группы микроорганизмов, участвующих в процессах деструкции углеводородов, загрязняющих почву. Полевые эксперименты проводили в летний период с 1 июля по 1 сентября. Участки почвы размером 72 × 40 см на глубину 30 см искусственно загрязняли нефтью Лас-Еганского месторождения, с вязкостью 14 мПа · с и плотностью 0,864 г/см³ при 20 °С. Почва дерново-подзолистая, лесная. В качестве укрывного материала на опытных участках применяли фотолюминесцентные пленки ФЕ и Л-50, на контрольных — обычную полиэтиленовую пленку высокого давления (ПЭВД). На протяжении всего эксперимента в почве поддерживали постоянную влажность 27–30%.

Численность углеводородокисляющей группы микроорганизмов определяли классическим методом посева на среду Раймонда для бактерий, окисляющих жидкие и твердые углеводороды [7]. Количество клеток пересчитывали на 1 г сухой почвы с учетом влажности. Интенсивность дыхания почвы анализировали на хроматографе марки ГХ ЛХМ-80 и выражали в мл СО₂, выделившегося из 100 г почвы за 1 ч.

Ферментативную каталазную активность определяли газометрическим методом по объему О₂, выделившегося на 1 г почвы за 1 мин. Дегидрогеназную активность почвы рассчитывали с применением фотоколориметрического метода, используя в качестве субстрата 2,3,5-трифенилтетразолий-хлорид (ТТХ), который, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан (ТФФ), имеющий красную окраску [8].

Биодеградацию нефти оценивали по изменению ее концентрации в почве после 30 сут культивирования. Для количественной и качественной оценки деструкции углеводородов нефть из контрольных и опытных образцов загрязненной почвы в конце эксперимента экстрагировали хлороформом на аппарате Сокслета. Извлеченную нефть освобождали от хлороформа на роторном испарителе, взвешивали и определяли процент общей биодеградации.

Изменения в составе функциональных групп нефти исследовали методом ИК-спектроскопии на приборе марки Фурье «Nikolet 5700» (США) [9]. Концентрацию насыщенных ациклических углеводородов (*n*-алканов) анализировали методами газожидкостной хроматографии на хроматографе-3700 (Россия). Индивидуальные углеводороды идентифицировали, учитывая известные порядки элюирования и величины индексов удерживания [10]. По данным хроматографического анализа строили гистограммы молекулярно-массового распределения насыщенных углеводородов до и после биодеградации.

Результаты и их обсуждение

Для проведения эксперимента отобраны два типа фотолюминесцентных пленок ФЕ и Л-50 с разными люминофорами и разной интенсивностью флуоресценции, характеристика которых представлена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Состав и оптические свойства люминофоров фотолюминесцентных пленок

Марка пленки	Класс люминофоров	Основные максимумы в спектре люминесценции, нм	Средний размер частиц, мкм	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	Светопропускание в области 380–710 нм, %
ПЭВД	—	—	—	—	91
ФЕ	Органический комплекс нитрата европия с 1, 10-фенантролином	590, 615*, 680	30	48,6	90,5
Л-50	Фосфат-ваннадат иттрия, активированный европием	594, 609, 615, 619*, 698, 704	5	13,5	90,5

* Основные полосы в спектре.

Влияние света, трансформированного фотолюминесцентными пленками...

В качестве контрольной служила полиэтиленовая пленка высокого давления. Все пленки получены из одной базовой марки полиэтилена высокого давления толщиной 0,12 мм. Как следует из данных табл. 1, фотолюминесцентные пленки ФЕ и Л-50 отличаются составом люминофоров, размером частиц и интенсивностью флуоресценции. Пленки с неорганическими люминофорами на основе иттрия, активированного европием, проявляют интенсивность флуоресценции в 3,6 раза меньше, чем пленки с добавками органического люминофора.

Результаты опытов, проведенных в полевых условиях в течение 2 мес, показали, что солнечный свет, трансформированный полимерным фотолюминесцентным материалом, стимулирует скорость деления бактериальных клеток, в результате чего численность микроорганизмов с применением пленок ФЕ и Л-50 увеличивается от 1,25 до 270 и 145 млн клет./г соответственно, что стимулирует активность ферментов и процессы дыхания или катаболизма. Максимальная численность бактериальных клеток в нефтезагрязненной почве с применением обычной пленки ПЭВД не превышала 7,0 млн клет./г почвы.

Биологическую активность почвы принято оценивать по интенсивности ее дыхания, которая является показателем скорости разложения органического вещества. Дыхание — это окислительно-восстановительный процесс, при котором освобождаются CO_2 и свободная энергия, которая аккумулируется в форме энергии фосфатных связей аденозинтрифосфата. Для углеводородокисляющей микрофлоры дыхательный процесс — аэробный, при котором конечным акцептором электронов является молекулярный кислород. Исследование интенсивности дыхания по количеству образовавшегося CO_2 показало, что с применением пленок ФЕ и Л-50 максимальные значения CO_2 в 2,5 и 1,7 раза соответственно превышают контрольные показатели.

Основными ферментами, влияющими на процессы деструкции в почве, являются каталаза и дегидрогеназа. Уровень их активности является динамичным показателем самоочищающейся способности почв от нефтяных загрязнений. Дегидрогеназа принимает непосредственное участие в разложении углеводов, каталаза стимулирует реакцию разложения перекиси с образованием высокоактивного кислорода, используемого микроорганизмами в процессах деструкции нефти.

На рис. 2, а представлена динамика образования кислорода, отражающая активность каталазы с двумя пиками подъема на 12-е и 30-е сут. Максимальная концентрация кислорода 7,9–8,2 $\text{см}^3/\text{г}$ отмечена в пробах почвы, где в качестве укрывного материала применяли светокорректирующие пленки Л-50 и ФЕ. Для контрольных образцов почвы эта величина не превышала 4 $\text{см}^3/\text{г}$.

На рис. 2, б представлена динамика образования ТФФ, отражающая активность дегидрогеназы в нефтезагрязненной почве, содержание которого в опытных образцах почвы с применением фотолюминесцентных пленок в 2,4 раза превышает контрольные данные.

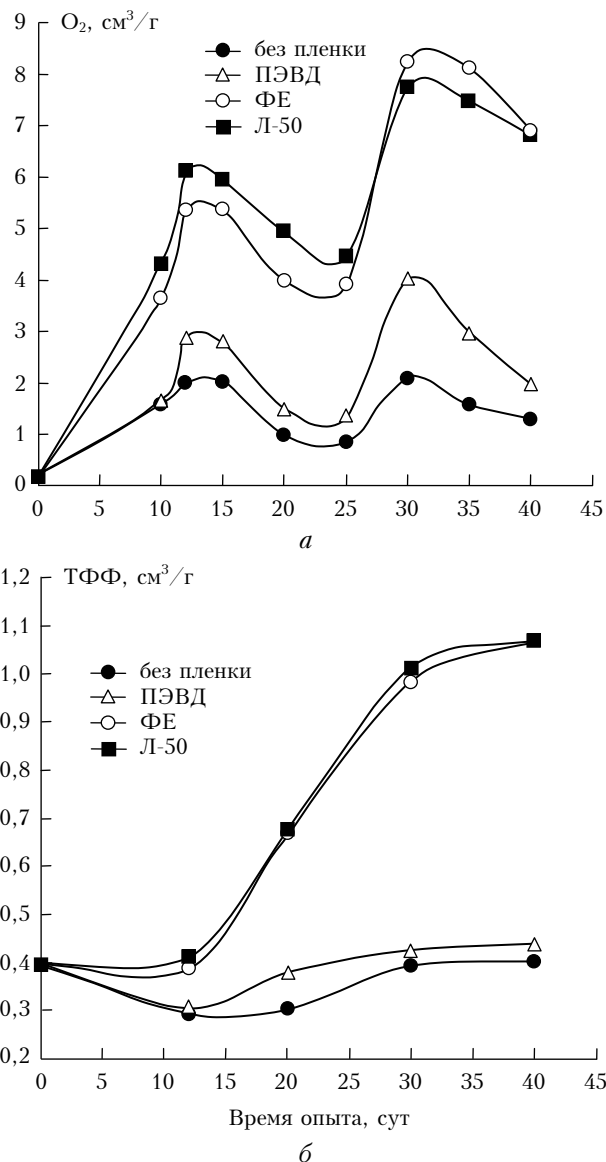


Рис. 2. Влияние светового излучения, трансформированного фотолюминесцентными пленками, на каталазную (а) и дегидрогеназную (б) активность нефтезагрязненных почв

Повышение активности изучаемых ферментов с применением светокорректирующих пленок стимулирует процессы биодеструкции углеводов, обеспечивая восстановление почвы от нефтяных загрязнений. В опытных вариантах утилизация нефти за 60 сут составила 30–35 г/кг почвы, в контрольных — 7–13 г/кг (рис. 3).

ИК-спектрометрический анализ остаточной нефти, экстрагированной через 60 сут из почвы опытных и контрольных участков, подтвердил биологический эффект фотостимуляции. Дополнительные полосы поглощения в области 3360 и 1710 см^{-1} указывают на снижение концентрации *n*-алканов (C_nH_{2n}) и увеличение концентрации кислородсодержащих группировок как продуктов метаболизма. Наиболее характерными показателями процессов биодegradации углеводов нефти являются относительные величины

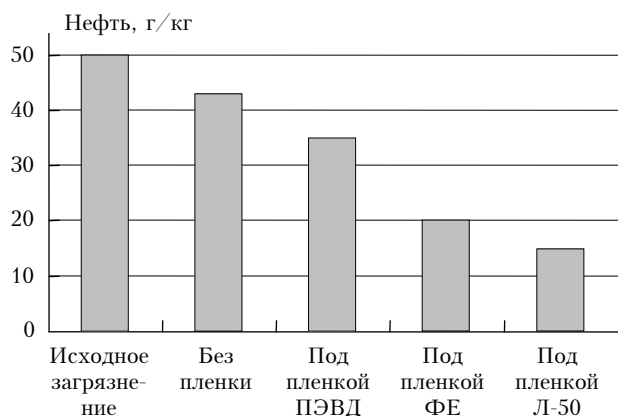


Рис. 3. Остаточное содержание нефти в почве после биодеградации с применением фотолуминесцентных пленок

оптических плотностей основных полос поглощения, так называемые спектральные коэффициенты (табл. 2).

Коэффициенты C_1 , C_2 и C_3 отражают соотношение ароматических углеводородов и n -алканов,

которые поглощаются в области 1610 и 720 см^{-1} соответственно. Увеличение коэффициентов C_1 и C_2 в 2,5–3 раза указывает на активное окисление n -парафинов. Уменьшение содержания n -алканов в нефти снижает значение коэффициента C_3 , что также свидетельствует о деструкции метильных групп (n -алканов) как результат окислительных процессов. Некоторые изменения происходят и в соотношении интенсивности полос поглощения ароматического ряда. Увеличение коэффициентов A_1 и A_2 в 2–3 раза и уменьшение A_3 в 1,6 раза указывает на возрастание степени ароматичности нефти и подтверждает стимуляцию деструктивных процессов в нефтезагрязненной почве с применением пленки ФЕ. Повышение коэффициентов окисленности ($C=O/C=C$) и разветвленности (CH_3/CH_2) также свидетельствует о фотостимуляции биодеструктивных процессов (см. табл. 2).

Для определения степени деструкции углеводородов остаточной нефти, экстрагированной из почвы, проводили хроматографический анализ и рассчитывали концентрацию нормальных алканов nC_8-nC_{30} . Данные представлены в виде гистограммы (рис. 4).

Таблица 2

Спектральные коэффициенты исходного нефтезагрязнения и после биодеградации почвенной микрофлорой с применением полимерных пленок

Спектральные коэффициенты нефти	Исходное нефтезагрязнение	ПЭВД (контроль)	Пленка ФЕ (опыт)
$C_1 = D_{1610}/D_{720}$ (коэффициент ароматичности)	0,38	0,6	2
$C_2 = D_{750}/D_{720}$ (интенсивность поглощения полициклических аренов и n -алканов)	0,67	0,85	1,89
$C_3 = D_{720}/D_{1380}$ (интенсивность поглощения метиленовых и метильных групп)	0,42	0,35	0,19
$A_1 = D_{815}/D_{750}$ (относительное содержание три- и полициклических аренов)	0,87	0,95	1,77
$A_2 = D_{875}/D_{720}$ (относительное содержание полициклических аренов и n -алканов)	0,48	0,67	1,31
$A_3 = D_{815}/D_{875}$ (относительная интенсивность поглощения три- и бициклических аренов)	1,8	1,4	1,1
$CH_3/CH_2 = D_{1380}/D_{720}$ (разветвленность)	2,4	2,8	5,2
$C=O (D_{1710}/C=C)$ (окисленность)	0	0,07	0,419

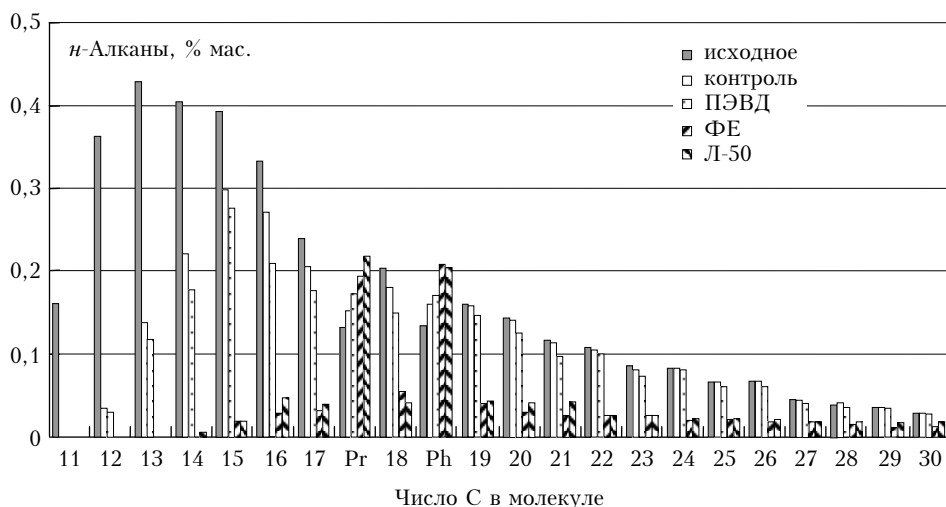


Рис. 4. Хроматографический анализ содержания n -алканов нефти после биодеградации почвенной микрофлорой с применением фотолуминесцентных пленок

В опытных пробах нефти полностью элиминировали *n*-алканы с длиной цепи C₉–C₁₄, на 70–80% уменьшилось содержание углеводородов с молекулярной массой C₁₅–C₂₈. Коэффициент биodeградации для исходного загрязнения составляет 0,6, в образце остаточной нефти без пленки – 0,8, при использовании пленки ПЭВД – 1,08, с применением фотолюминесцентных пленок ФЕ и Л-50 – 4,8 и 5,2 соответственно, что указывает на активную фотостимуляцию.

Таким образом, солнечный свет, трансформированный фотолюминофорами, включенными в полимерную пленку, стимулирует жизнедеятельность аборигенной микрофлоры нефтезагрязненных почв. Фотостимуляция процессов роста и численности микрофлоры сопровождается повышением ферментативной и дыхательной активности микроорганизмов в 2,5 раза. Повышение окислительной активности приводит к ускорению процессов деструкции углеводородов нефти, загрязняющей почву, что следует из данных инфракрасной спектроскопии и газожидкостной хроматографии. При этом процессы биodeградации нефтяных загрязнений протекают в 5–6 раз быстрее по сравнению с контрольными вариантами, где применялась пленка ПЭВД.

Обнаруженный эффект фотолюминесцентной активации почвенной микрофлоры может быть использован при разработке экологически безопасных методов восстановления нефтезагрязненных почв на ограниченных площадях.

Работа выполнена при финансовой поддержке проектов V 39.2.6 и V 39.3.1, выполняемых в рамках программы фундаментальных научных исследо-

ваний государственных академий наук на 2008–2012 гг.

1. Шелоков Р.Н. Полисветаны и полисветановый эффект // Вестн. АН СССР. 1986. № 10. С. 50–55.
2. Райда И.С., Толстиков Г.А. Проблемы и перспективы производства и применения фотолюминесцентных полимерных пленок // Мир теплиц. 2001. № 7. С. 62–64.
3. Авакян А.Б., Венедиктов П.С., Добрецов Г.Е., Рубин А.Б. Взаимодействие флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8сульфоната с хлоропластами // Биофизика. 1982. Т. XXVII, вып. 3. С. 415–418.
4. Рубин Л.Б., Еремеева О.В., Фрайкин Г.Я., Швинка Ю.Э. О существовании у микроорганизмов фотокромной системы регуляции // Докл. АН СССР. 1973. Т. 210, № 4. С. 971–974.
5. Фрайкин Г.Я., Рубин Л.Б., Еремеева О.В., Хургес Г.М., Горюхова Н.М., Афанасьева В.П., Градова Н.В., Калуняц К.А., Вазанова М.С., Оситова В.Г., Фридман Я.С. Практическое использование метода фотостимуляции развития при культивировании промышленных штаммов микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиол. 1974. Т. 10, № 1. С. 5–9.
6. Кару Т.Й. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-*c*-оксидазы // Сб. трудов ИПЛИТ РАН «Современные лазерно-информационные и лазерные технологии». М.: Интерконтакт Наука, 2005. С. 131–143.
7. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов: Лабораторное руководство. Л.: Наука, 1974. С. 12–33.
8. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. М.: Наука, 1967. 180 с.
9. Большаков Г.Ф. Инфракрасные спектры насыщенных углеводородов. Часть 1. Алканы. Новосибирск: Наука, 1986. С. 3–32.
10. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам / Под ред. О. Микеша. М.: Мир, 1982. Ч. II. 381 с.

L.K. Altunina, L.I. Svarovskaya, D.A. Filatov. Effect of light, transformed by photoluminescent films, on the destructive activity of microorganisms in oil-polluted soils.

A stimulating effect of sunlight transformed by a photoluminescent polymer films on the abundance dynamics, fermentation and respiration of indigenous microflora in oil-contaminated soils was investigated. The extents of biodegradation of petroleum hydrocarbons within 60 days were up to 60–70% and 26% of the overall background pollution level for the experimental and control site, respectively. Residual hydrocarbons extracted from samples of the contaminated soils were analyzed by infrared spectroscopy to show the appearance of additional absorption bands at 3350, 1600, and 1710 cm⁻¹, thus indicating the formation of metabolites during enzymatic oxidation of oil. Chromatographic data corroborated the occurrence of intense oxidation.