

**«ВОЗМОЖНОСТЬ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОКОВ,
СОДЕРЖАЩИХ БЕЛЫЙ ФОСФОР, МИКРОФЛОРОЙ ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД»**

*Миндубаев А.З. *, Алимова Ф.К. **, Ахоссийенагбе С.К. **,
Болормаа Ч. **, Минзанова С.Т. *, Миронова Л.Г. *, Яхваров Д.Г. **

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической
и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ*

***ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,*

Белый фосфор Р₄ является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды.[1] Хроническое отравление приводит к глубокой инвалидности.[2-3] Тем не менее, Р₄ широко применяется в промышленности, являясь одним из наиболее востребованных соединений при производстве фосфорных удобрений, лекарств, полимеров и ряда других практически значимых веществ и материалов. Поэтому, не исключается попадание белого фосфора в окружающую среду. Конвенцией, датированной 1980 годом, официально запрещено использование Р₄ в военных целях. Тем не менее, положения этого документа постоянно нарушаются, что влечет за собой человеческие жертвы и сильные загрязнения окружающей среды. Из анализа описанных на настоящий момент в литературе методов детоксикации белого фосфора в природных условиях, можно заключить, что эффективные методы очистки природных сред от данного вещества до сих пор не созданы. Таким образом, разработка методов детоксикации и деградации Р₄ в окружающей среде, применимых крупномасштабно, является актуальной задачей современной науки. У элемента фосфора есть уникальное качество – будучи сильнейшим ядом в виде простого вещества, в окисленном состоянии он абсолютно необходим для всех форм жизни. Таким образом, возможна его полная детоксикация.[4-8] Целью настоящего исследования являлась переработка белого фосфора при помощи микроорганизмов, населяющих осадки канализационных стоков и получение экспериментальных данных, подтверждающих путь биологической деградации Р₄.

При проведении экспериментов использовали смесь уплотненного и обезвоженного осадка сточных вод (ОСВ) Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани. Применялся уплотненный ОСВ, собранный из колодца, а также обезвоженный ОСВ, произведенный фильтрованием на фильтр-прессе. При проведении каждого эксперимента использовали ОСВ одной партии, с идентичными показателями.

В качестве дополнительного субстрата, позволяющего сокращать лаг-фазу роста микрофлоры активного ила, в контроль и опыт добавлялась растительная биомасса – зеленая масса растения амарант (*Amaranthus cruentus* L), который является эффективным стимулятором метанового брожения.[9] Амарант багряный (*A. cruentus* L.), урожая 2008 года, был выращен на опытном поле в Пестречинском районе Республики Татарстан и собран в фазе цветения. Фитомасса смешивалась с ОСВ в соотношении 1:1 на сухой вес. В одном из экспериментов фитомасса амаранта перед внесением в субстрат была измельчена до состояния порошка на ручном блендере Philips HR 1370.

Белый фосфор перед внесением в субстрат был диспергирован в воде при помощи ультразвукового диспергатора “Сапфир” (рабочая частота 35 кГц, 30 мин) при температуре 50°C в инертной атмосфере (азот) до образования однородной эмульсии со средним диаметром сферических частиц менее 0.1 мм. Далее эмульсия Р₄ вносилась в субстраты пипеткой при перемешивании: ее объем соответствовал рассчитанной конечной концентрации белого фосфора в субстрате.

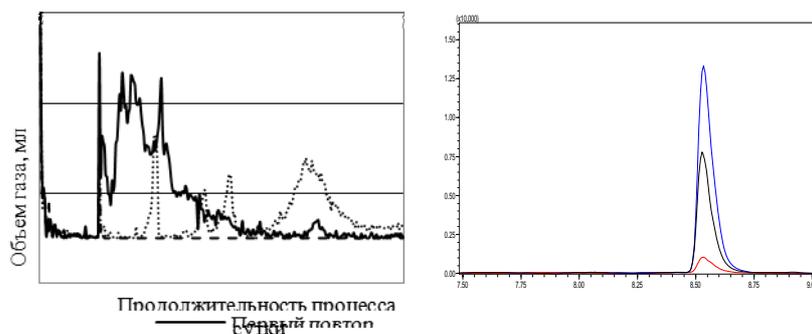
Анаэробная переработка сырья осуществлялась в реакторах лабораторного масштаба, непрерывно термостатированных при 38°C. Загрузка реактора составляла 150–300 г субстрата, в зависимости от объема реактора (200–400 мл). В эксперименте с измельченной фитомассой на 48 сутки во все повторы было добавлено по 60 г инокулята, после чего объемы субстратов достигли 360 мл, а концентрация Р₄ в сериях опытов снизилась с 1 : 10000 и 1 : 100000 до 1 : 8333 и 1 : 83333, соответственно.

Для контроля переработки P_4 были использованы ЯМР спектрометр высокого разрешения Avance 400 (Bruker) и газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010Ultra (Япония). Для поиска белого фосфора спектры ^{31}P ЯМР снимались с экстрактов ОСВ в органическом растворителе (диэтиловый эфир), для поиска метаболитов – с отфильтрованной водной фазы ОСВ.

Микробиологический посев из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 0.1% производился после окончания анаэробной переработки. Разведение образцов производилось в серии из 10 пробирок. Посев производился из концентраций 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} в 3-х повторах. Посевы «газоном» производили под плотную питательную среду МПА в чашке Петри. Инкубация продолжалась 72 часа (температура 35°C). Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путем изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков. Посев из субстратов с исходным содержанием P_4 0.01% проводился на крахмало-аммиачный агар (КАА). Для микроскопирования использовался световой микроскоп МБС-10 (Россия), оснащенный цифровой видеокамерой Moticam 350 (Китай) с программным обеспечением Motic Images (увеличение в 56 раз).

При содержании белого фосфора в субстрате 0.1% по массе, наблюдалось значительное угнетение жизнедеятельности микрофлоры по сравнению с контролем, выражающееся в снижении выделения газообразных продуктов жизнедеятельности, вплоть до временного прекращения выделения газа. Тем не менее, даже при такой концентрации токсичного вещества не наблюдалась полная гибель микроорганизмов. При содержании P_4 в иле 0.01% по массе, наблюдалось значительное угнетение, вплоть до полного прекращения выделения газа, в течение приблизительно 2–3 недель, причем угнетение наблюдалось не вначале эксперимента, а спустя приблизительно месяц. Показано, что концентрация белого фосфора 0.001% приводит к очень незначительному снижению данного показателя, то есть наблюдается полная адаптация микрофлоры. При концентрации 0.01% удельный выход газа снижался вдвое по сравнению с контролем, а при 0.1% – еще значительнее. После периода угнетения, жизнедеятельность микрофлоры, выраженная через выделение и состав газообразных продуктов метаболизма, начинала восстанавливаться. Из субстратов с концентрацией P_4 0.01% (масс) первая проба для ^{31}P ЯМР анализа была взята на 35 день. Спектры продемонстрировали наличие одного сигнала, соответствующего белому фосфору. Значит, срок в 35 дней недостаточен для переработки P_4 ОСВ. Вторая проба была отобрана на 63 день. Спектр показал отсутствие сигналов фосфорных соединений, в том числе P_4 . Таким образом, срок продолжительностью 63 суток оказался достаточным для переработки белого фосфора в концентрации 0.01%.

Следует отметить, что на поверхности субстратов с добавлением P_4 0.01% наблюдался рост колоний микроорганизмов. В контрольных образцах без белого фосфора рост микроорганизмов не наблюдался. Выделенные микроорганизмы идентифицировали как представителей рода *Streptomyces*. Впоследствии, таксономическая принадлежность была уточнена до секции *Cinereus*: 65.4% колоний отнесены к *Achromogenes*, 26.9% – к *Aureus*, оставшиеся 7.7% – к *Chromogenes*. При одинаковом разведении из опытного (с P_4) субстрата с содержанием белого фосфора 0.1%, на МПА выросло больше колоний бактерий, чем из контрольного. Плотность клеточной суспензии в контроле составляла 2.5×10^8 клеток/мл субстрата, а в опыте – 1.5×10^{10} клеток/мл субстрата, т.е. на два порядка больше. Выращенные бактерии имеют форму палочек с двумя спорами на концах и образуют капсулу. Итак, во всех случаях мы наблюдаем сходное явление – отсутствие или ослабление роста микроорганизмов в контрольных субстратах после прекращения выделения газа, которое кажется парадоксальным, – получается, что в присутствии токсичного ксенобиотика микроорганизмы лучше растут по сравнению с контролем. Вероятно, это различие вызвано тем, что микроорганизмы, растущие на КАА, лучше адаптируются к присутствию белого фосфора. В контрольных субстратах они угнетены присутствием других групп микроорганизмов.



а. Кинетика выделения газа в опыте с содержанием P_4 0.01% (три повтора). Удельная продуктивность первого, второго и третьего повторов 27.3, 17.2 и 2.4 мл газа/мл субстрата за 288 суток, соответственно

б. Спектр ГХМС для трех повторов, ятый на 223 сутки эксперимента

Рисунок 1. Различия интенсивности сигнала ГХМС белого фосфора для повторов опыта (наименее интенсивный сигнал – первого повтора, средний по интенсивности – второго, наиболее интенсивный – третьего). Для большей наглядности нужно сравнить с диаграммами (а)

Отличие последнего эксперимента состоит в том, что вносимая в субстраты фитомасса амаранта была измельчена до состояния порошка. Это резко активировало метаболические процессы на первые сутки эксперимента, как в контроле, так и в опытах. При этом интенсивно выделялся сероводород, образующийся при анаэробном разложении белковых веществ амаранта. Накопление сероводорода привело к постепенному прекращению выделения газообразных продуктов во всех образцах. Следует особо подчеркнуть, что токсичное влияние P_4 в опытах в этот период не наблюдалось: характер затухания метаболических процессов в контролях и опытах был одинаковым. По этой причине на 48 день эксперимента во все субстраты был добавлен инокулят. После его внесения микрофлора субстратов активировалась, но не одновременно в разных повторах. В одном из трех повторов, включая контроль, жизнедеятельность микрофлоры восстановилась сразу после внесения инокулята (рис. 1 а). Кинетика второго повтора носит выраженный колебательный характер – чередование подъемов и спадов активности жизнедеятельности микрофлоры. По всей видимости, белый фосфор в субстрате подвергался метаболизму «по частям»: по мере накопления токсичных метаболитов активность микрофлоры шла на спад, затем метаболиты подвергались вторичной деструкции. Третий повтор не активировался и спустя 240 дней после внесения инокулята (рис. 1 а). Результат эксперимента однозначно свидетельствует о биологической деградации P_4 : разложение ксенобиотика начинается только после преодоления микрофлорой интоксикации сероводородом. На 223 сутки после внесения инокулята, из трех повторов опыта были отобраны пробы для хроматомасс-спектрометрического анализа. Анализ показал, что концентрация метаболитов в субстратах трех повторов заметно различается. Интенсивность сигнала белого фосфора обратно пропорциональна активности микробного метаболизма в них (рис. 1 б). Концентрация P_4 в растворе во втором повторе в 8 раз больше по сравнению с первым, а в третьем она в 13 раз больше, чем в первом. Это означает четкую зависимость между скоростью исчезновения белого фосфора в субстрате и интенсивностью микробного метаболизма в нем. Если бы P_4 подвергался абиогенной деструкции, скорость его разложения и интенсивность сигнала ГХМС во всех трех повторах была бы одинаковой.

Метаболизм белого фосфора до сих пор не раскрыт.[1] Наши предыдущие исследования показали, что анаэробная микрофлора угнетается P_4 не сразу, а спустя продолжительный промежуток времени. Из этого наблюдения можно сделать вывод, что белый фосфор нетоксичен для микрофлоры, а угнетение осуществляется полупродуктами его метаболизма. Вполне вероятно, что подавление жизнедеятельности микрофлоры в наших опытах было обусловлено накоплением гипофосфита. Показано угнетающее действие гипофосфита на метаболизм метаногенной анаэробной микрофлоры, описанное в [10]. Тем не менее, данное подавление было обратимым, заканчивалось восстановлением метаболической активности. Значит, микрофлора смогла нейтрализовать предполагаемое воздействие гипофосфита. В статье [11] как раз описано микробное окисление гипофосфита и фосфита до фосфата в анаэробных условиях.

В опытном спектре ^{31}P ЯМР, проявился сигнал в области 3.86 ppm, соответствующий фосфиту или гипофосфиту. Спектр был снят без расщепления, поэтому точнее идентифицировать этот сигнал мы не смогли. Тем не менее, он соответствует соединениям, которые, предположительно, являются метаболитами белого фосфора, т.е., является подтверждением предполагаемого нами метаболического пути. Спектр, снятый с контрольного образца одновременно с опытным, на том же приборе и в тех же условиях, не содержит аналогичный сигнал. Это служит доказательством того, что обнаруженные соединения действительно являются метаболитами P_4 .

Ниже мы приводим предполагаемую схему метаболизма белого фосфора (рис. 2). Разумеется, она достаточно упрощена. Нам еще ничего не известно о задействованных в метаболизме элементарного фосфора ферментных системах, поэтому они не указаны. Со временем, без сомнения, схема будет дополняться.

Поскольку в литературе отсутствуют сведения о микроорганизмах, устойчивых к P_4 , представленная работа имеет бесспорную новизну.

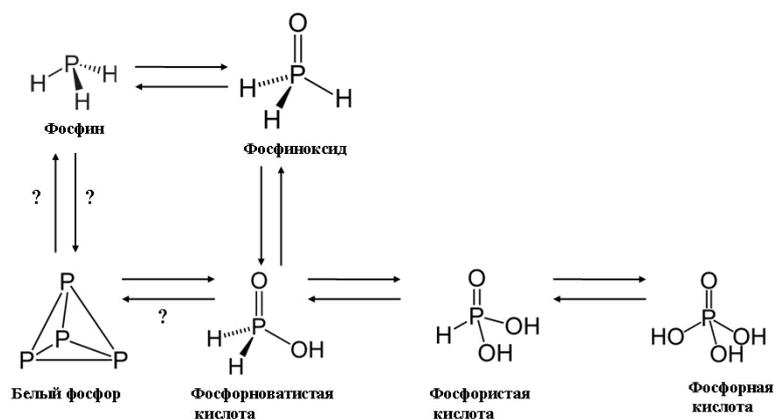


Рисунок 2. Предполагаемый метаболический путь белого фосфора (знаком вопроса обозначены еще не обнаруженные превращения)

ЛИТЕРАТУРА

1. Toxicological profil for white phosphorus / U.S. Department of health and human services. USA. 1997. 248 p.
2. Вербовой А.Ф. Состояние костной ткани и кальций-фосфорного обмена у рабочих фосфорного производства // Казанский медицинский журнал. 2002. Т. 83. № 5. С. 147–150.
3. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Яхваров Д.Г. Биологическая деградация белого фосфора: осуществимость и перспективы // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 2. С. 1–17.
4. Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордоаньи Д.М., Болормаа Ч., Кагиров Р.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. О разложении белого фосфора осадком сточных вод // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т.153. Кн.2. С.110-119.
5. Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Болормаа Ч., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Возможность анаэробной детоксикации белого фосфора // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.33. №1. С.22-34.
6. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Ч. Болормаа. Возможность анаэробной биodeградации белого фосфора // Экологический вестник Северного Кавказа. 2013. Т.9. №2. С.4-15.
7. Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Болормаа Ч., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Микробный метаболизм белого фосфора // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.36. №12. С. 34-52.
8. Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Новое подтверждение биodeградации белого фосфора // Бутлеровские сообщения. 2013.Т.36. №10. С. 1-12.
9. Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Скворцов Е.В., Миронов В.Ф., Зобов В.В., Ахмадуллина Ф.Ю., Миронова Л.Г., Белостоцкий Д.Е., Коновалов А.И. Стимулирующее влияние сухой фитомассы амаранта *Amaranthus cruentus* на биометаногенез в трудноферментируемых субстратах // Вестник Казанского технологического университета. 2009. № 4. С. 220–226.

10. Sieber J.R., Le H.M., McInerney M.J. The importance of hydrogen and formate transfer for syntrophic fatty, aromatic and alicyclic metabolism // *Environmental Microbiology*. 2014. V. 16. № 1. P. 177–188.

11. Foster T.L., Winans L., Helms J.R., Helms S.J.S. Anaerobic Utilization of Phosphite and Hypophosphite by *Bacillus* sp. // *Applied and environmental microbiology*. 1978. V. 35. № 5. P. 937–944.