

Утилизация и биodeградация отходов

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

**АНАЭРОБНАЯ ДЕТОКСИКАЦИЯ БЕЛОГО ФОСФОРА
МИКРООРГАНИЗМАМИ В ОСАДКАХ СТОЧНЫХ ВОД**

*А. З. Миндубаев**, *А. Д. Волошина*, *Н. В. Кулик*, *К. А. Сапармырадов¹*,
Х. Р. Хаяров¹, *С. Т. Минзанова*, *Л. Г. Миронова*, *Д. Г. Яхваров*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского Научного Центра Российской академии наук, Казань, *e-mail: mindubaev@iopc.ru

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Поступила в редакцию 15.03.2017 г.

Представлены результаты исследования биodeградации опасного токсиканта белого фосфора, введенного в осадки сточных вод водоочистных сооружений при концентрации от 0,001 до 0,1%. Показано, что в анаэробных условиях белый фосфор окисляется до нетоксичных водорастворимых соединений. Получены культуры актиномицетов, растущих при концентрации белого фосфора до 0,1%. Скорость снижения концентрации P_4 в осадках сточных вод обратно пропорциональна продолжительности лаг-фазы роста микрофлоры. Обсуждается предполагаемый путь метаболизма белого фосфора.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, осадки сточных вод, анаэробные условия, кинетика выделения газа, газовая хроматомасс-спектрометрия, метаболический путь, ядерный магнитный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что белый фосфор P_4 – это один из самых опасных загрязнителей окружающей среды [1]. Хроническое отравление белым фосфором поражает все системы органов и тканей и приводит к инвалидности [2, 3]. Вместе с тем, белый фосфор широко применяется в промышленности и является ключевым соединением при производстве фосфорных удобрений, лекарств, полимеров и ряда других практически значимых веществ и материалов. Поэтому существует возможность попадания белого фосфора в окружающую среду. Протокол III к «Конвенции о конкретных видах обычного оружия» 1980 г. официально запрещает использование P_4 в военных целях. Однако положения этого документа до сих пор постоянно нарушаются, что влечет за собой сильные загрязнения окружающей среды и человеческие жертвы. Например, недавно произошла железнодорожная авария в Украине, которая привела к серьезной экологической катастрофе в результате воспламенения цистерн с техническим фосфором [4].

Анализ известных на настоящий момент в научной литературе методов детоксикации белого фосфора в природных условиях позволяет заключить, что эффективные методы очистки природных сред от этого загрязнителя до сих пор не созданы [1]. Таким образом, актуальной задачей современной науки является разработка методов детоксикации и деградации белого фосфора в окружающей среде, применимых в крупном масштабе.

В работе [5] описана естественная детоксикация белого фосфора в почве, однако авторы предполагают абиотическое окисление. Еще до 1985 г. велись исследования биodeградации белого фосфора микроорганизмами в анаэробных условиях. Однако авторы исследования [6] пришли к заключению об отсутствии роста микробной биомассы в присутствии P_4 и трансформации последнего в менее токсичные соединения. Хотя авторы постулируют абиогенную деградацию белого фосфора, они не исключают участие микрофлоры в процессе детоксикации. Известны попытки применения элементного (белого и красного) фосфора в качестве фосфорного удобрения [7, 8], но без большого успеха. В то же время, 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, представляется целесообразным использовать это свойство для полной детоксикации исходного фосфора [9-13].

Следует отметить, что биodeградация – это один из наиболее популярных и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных, бытовых и сельскохозяйственных стоков, утилизации отходов уничтожения химического оружия и взрывчатых веществ [14-17]. Однако в литературных источниках нами не найдено сведений о доказанных примерах биологической деградации белого фосфора, а также не прослежен его метаболический путь.

Целью настоящего исследования являлось изучение переработки белого фосфора при помощи микроорганизмов, населяющих осадки канализационных стоков, и получение экспериментальных данных, подтверждающих путь биологической деградации белого фосфора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При проведении экспериментов использовали смесь уплотненного и обезвоженного осадка сточных вод (ОСВ) Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани. Применялась смесь 1 : 1 из уплотненного ОСВ с влажностью 98%, собранного из колодца, и обезвоженного ОСВ с влажностью 78%, произведенного фильтрованием на фильтр-прессе. При проведении каждого эксперимента использовали ОСВ одной партии, с идентичными показателями.

В качестве дополнительного источника питательных веществ, 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 [18]. Амарант багряный (*A. cruentus* L.) 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 осадок была измельчена до состояния порошка на ручном блендере Philips HR 1370.

Белый фосфор перед внесением в ОСВ был эмульгирован в воде при помощи ультразвуковой ванны “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 белого фосфора вносилась в ОСВ пипеткой при перемешивании: ее объем соответствовал рассчитанной конечной концентрации белого фосфора в субстрате.

Анаэробная переработка сырья осуществлялась в реакторах лабораторного масштаба, непрерывно термостатированных в мезофильном (38°C) и термофильном (50°C) режимах, при которых P_4 представляет собой твердое вещество и жидкость, соответственно (температура плавления белого фосфора 44,1°C). Загрузка реактора составляла 150–300 г ОСВ, 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 белого фосфора в сериях опытов снизилась с 1 : 10000 и 1 : 100000 до 1 : 8333 и 1 : 83333, соответственно. Объем выделяющегося газа измерялся ежедневно волюмометрическим методом. Качественный и количественный состав газа определялся еженедельно с помощью метода газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) на колонке Porapak Q длиной 2,4 м, детектор по теплопроводности, газ носитель гелий. Температурный режим: колонка $85 \pm 5^\circ\text{C}$, испаритель $130 \pm 10^\circ\text{C}$, детектор $130 \pm 10^\circ\text{C}$. Каждая проба газа отбиралась дважды, полученные значения – средние.

Для контроля процессов трансформации P_4 были использованы ЯМР спектрометр высокого разрешения Avance 400 (Bruker) и газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010Ultra (Япония). Поиск сигналов белого фосфора в спектрах ^{31}P ЯМР проводили в пробах экстрактов ОСВ в органическом растворителе (диэтиловый эфир), сигналов предполагаемых метаболитов – в пробах отфильтрованной водной фазы ОСВ.

Микробиологический посев из ОСВ с исходным содержанием белого фосфора 0,1% производился в виварии ИОФХ после окончания анаэробной переработки. Посевы производили на плотную питательную среду МПА в чашке Петри. Инкубация продолжалась 48 часов (температура 37°C). Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путем изучения морфологии бактерий и их колоний. Кроме того, из того же самого субстрата был произведен посев анаэробных бактерий в следующих условиях: пробирки, герметично закрытые резиновыми пробками; среда Ван-Дель-Дена для сульфатредукторов с цитратом железа III; рост в термостате при 37°C в течение пяти суток. Рост культур сопровождался выпадением черного осадка сульфида железа – маркера интенсивности роста сульфатредукторов.

Посев из ОСВ с исходным содержанием белого фосфора 0,01% проводился параллельно в виварии ИОФХ им. А.Е. Арбузова и на кафедре биохимии К(П)ФУ. В ИОФХ велась работа с образцами ОСВ, в которых микрофлора необратимо угнеталась белым фосфором. Для выделения чистых культур актиномицетов использовали крахмало–аммиачный агар. Фрагменты колоний из исследуемых проб с помощью иглы переносили на пластинки агара в чашках Петри. Через 2–3 суток при 25°C на поверхности среды вырастали колонии актиномицетов. Для микроскопирования использовался световой микроскоп МБС-10 (Россия), оснащенный цифровой видеокамерой Moticam 350 (Китай) с программным обеспечением Motic Images (увеличение в 60 раз).

На кафедре биохимии Казанского университета велась работа с образцами ОСВ, в которых микрофлора восстанавливала активность после угнетения белым фосфором. Микробиологический анализ осадков проводился методом предельных разведений на среде Гаузе 1 с минеральным азотом. Для сохранения музейных штаммов использовали овсяный агар. Культуры выращивали 14 суток при 28°C. Проводили дифференцированный подсчет количества колониобразующих единиц (КОЕ) стрептомицетов.

Эксперимент по исследованию влияния фитомассы амаранта описан в работе [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние белого фосфора на микроорганизмы ОСВ

Процесс анаэробной деградации белого фосфора в пробах ОСВ с различным содержанием белого фосфора отслеживали, наблюдая за выделением газа. В состав выделяющегося газа в разных точках эксперимента могли входить углекислый газ, сероводород, метан и другие продукты в зависимости от концентрации внесенного P_4 и продолжительности эксперимента.

В образцах, содержащих белый фосфор в иле в количестве 0,001% по массе (минимальная из трех введенных концентраций), наблюдалось незначительное угнетение жизнедеятельности микрофлоры. При этом не было перерыва в выделении газа, что указывает на устойчивость природных популяций микроорганизмов активного ила к P_4 при разбавлении до указанной концентрации (рис. 1). Термофильный режим оказался несколько менее продуктивным по удельному выходу газа, однако зависимость количества выделившегося газа от концентрации P_4 сохранялась. После окончания периода угнетения, жизнедеятельность микрофлоры, определяемая по выделению и составу газообразных продуктов метаболизма, начинала восстанавливаться.

При содержании белого фосфора в осадке порядка 0,1% по массе (максимальная из трех введенных концентраций) наблюдалось существенное угнетение жизнедеятельности микрофлоры по сравнению с контролем, что выражалось в снижении выделения газообразных продуктов жизнедеятельности, вплоть до временного прекращения выделения газа [9] (рис. 1).

Тем не менее, даже при такой концентрации токсичного вещества не было зафиксировано полной гибели микроорганизмов. При содержании белого фосфора 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. Удельный выход газа снижался вдвое по сравнению с контролем.

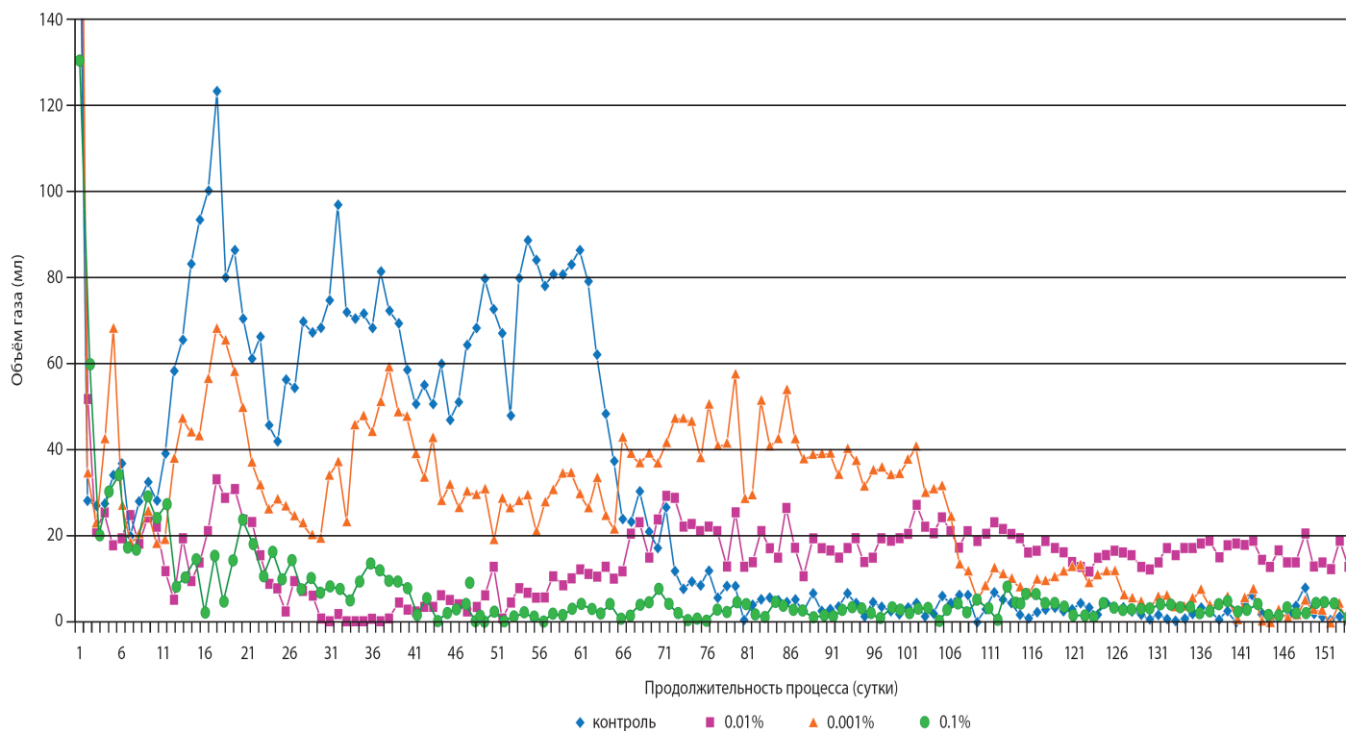


Рис. 1. Кинетика выделения газа пробами ОСВ в зависимости от концентрации белого фосфора. Удельный выход газа (концентрация P_4): 28,3 (0,001%), 16,0 (0,01%), 5,8 (0,1%) и 30,5 (контроль) мл газа/мл ОСВ. Все точки на диаграммах усреднены из трех повторов. Продолжительность эксперимента 148 суток.

При этом белый фосфор оказывал гораздо более заметное угнетающее воздействие на содержание метана (рис. 2), по сравнению с его влиянием на содержание углекислого газа. Следовательно, можно заключить, что метаногенные архебактерии более чувствительны к отравлению этим веществом по сравнению с другими представителями микрофлоры активного ила – эубактериями, продуцирующими углекислый газ [9].

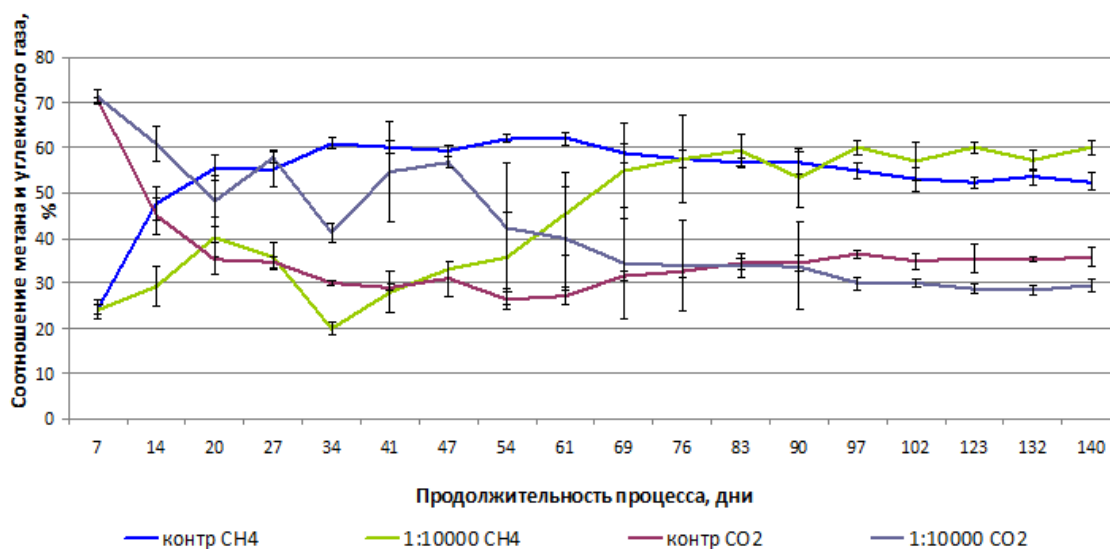


Рис. 2. Зависимость кинетики изменения состава газа от концентрации белого фосфора в осадках сточных вод (концентрация P_4 0,01%). В опытах содержание метана растет медленнее, чем в контроле, причем на содержание CO_2 присутствие белого фосфора почти не влияет.

Для определения характера трансформации белого фосфора в пробах ОСВ с концентрацией P_4 0,01% (масс.), первая проба для ^{31}P ЯМР анализа была взята на 35 день. Спектры образца в эфирном экстракте продемонстрировали наличие одного сигнала, соответствующего белому фосфору [9]. Значит, вне зависимости от режима термостатирования, срок в 35 дней недостаточен для переработки P_4 ОСВ. Вторая проба из ОСВ с концентрацией белого фосфора 0,01% (мезофильный режим) была отобрана на 63 день. Спектр показал отсутствие сигналов фосфорных соединений, в том числе сигналов белого фосфора. Таким образом, срок продолжительностью 63 суток оказался достаточным для переработки белого фосфора при его концентрации 0,01%.

Необходимо отметить, что характер кинетики газообразования различался от эксперимента к эксперименту. В некоторых случаях наблюдалось необратимое угнетение жизнедеятельности микрофлоры даже при концентрации белого фосфора 0,01% [10]. Вероятно, это вызвано различиями в свойствах ОСВ разных партий. Такие эксперименты можно было бы признать неудачными, однако они дают ценную информацию о скорости биотрансформации белого фосфора. Так, в спектре другого образца, снятом на 153 день эксперимента, присутствовал сигнал в области 523 ppm, свидетельствующий о наличии белого фосфора в субстрате. Одно из возможных объяснений состоит в том, что осадки отбирались в разное время года. Отобранный в зимние морозы осадок имеет значительно менее активный микробный метаболизм, поэтому и белый фосфор сохраняется в нем намного дольше. Методом масс-спектрометрии было показано, что белый фосфор в таких осадках сохранялся даже через 333 суток после начала эксперимента. Таким образом, установлена взаимосвязь между интенсивностью

метаболических процессов анаэробной микрофлоры и продолжительностью деструкции белого фосфора. Показано, что решающую роль в деструкции белого фосфора играют не ионы переходных металлов (их в осадке всегда много), а активность микробного метаболизма. Если бы дело было только в металлах, белый фосфор бы разлагался с одинаковой скоростью, независимо, отобран ли осадок зимой или в теплое время года.

Следует отметить, что на поверхности ОСВ с добавлением белого фосфора 0,01% наблюдался рост колоний микроорганизмов, которые по внешним признакам были идентифицированы как актиномицеты [10]. В контрольных образцах без белого фосфора рост микроорганизмов не наблюдался. 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*. Таким образом, во всех осадках с содержанием белого фосфора 0,01%, вне зависимости от характера влияния данного ксенобиотика, наблюдается интенсивный рост стрептомицетов.

При одинаковом разведении из опытного (с белым фосфором) осадка с содержанием белого фосфора 0,1%, на мясо-пептонном агаре (МПА) выросло больше колоний бактерий, чем из контроля. Плотность клеточной суспензии в контроле составляла $2,5 \cdot 10^8$ клеток/мл осадка, а в опыте – $1,5 \cdot 10^{10}$ клеток/мл осадка, т.е. на два порядка больше. Выращенные бактерии имеют форму палочек и окрашиваются по Граму. Микроорганизмы были идентифицированы по морфологическим признакам как представители рода *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. subtilis* var. *mesentericus*, *B. cereus* и *B. macerans*) (рис. 3, слева). Представители данной группы часто выступают в роли деструкторов неприродных соединений, однако устойчивость к белому фосфору наблюдается для них впервые.

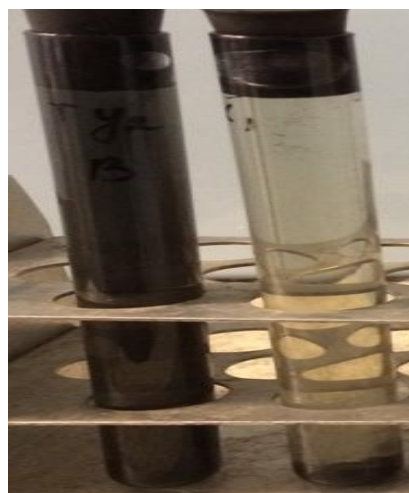
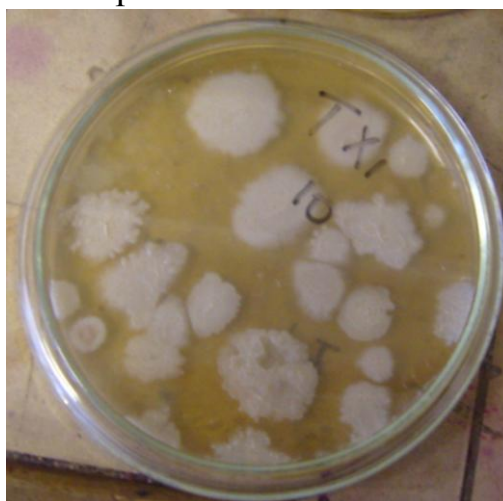


Рис. 3. Слева: колонии бацилл, устойчивых к белому фосфору при его концентрации 0,1% по массе). Справа: культуры сульфатредукторов (левая пробирка – контроль, среда в ней содержит заметно больше осадка, правая – опыт).

Итак, во всех случаях мы наблюдаем сходное явление – отсутствие или ослабление роста микроорганизмов в контрольных субстратах после прекращения выделения газа, что кажется парадоксальным, – получается, что в присутствии токсичного ксенобиотика микроорганизмы лучше растут по сравнению с контролем. Вероятно, это различие вызвано тем, что микроорганизмы, наблюдаемые в опытных субстратах, лучше адаптируются к присутствию белого фосфора. В контрольных субстратах они угнетены присутствием других групп микроорганизмов. Косвенно эта гипотеза подтверждается и отсутствием в контрольном ОСВ таких метаболитов, как *пара*-крезол и скатол, содержание которых в опыте достаточно велико (по данным ГХМС) – здесь эти соединения не были использованы микроорганизмами. Напротив, наиболее активный рост сульфатредукторов (отслеживаемый по интенсивности выпадения черного осадка), наблюдался в посевах из контроля, где белого фосфора не было (рис. 3, справа). Значит, белый фосфор угнетает сульфатредукторы – облигатные анаэробы. Этот результат хорошо коррелирует с полученными нами ранее данными в отношении метаногенов – тоже строгих анаэробов. В предыдущих исследованиях нами было показано, что присутствие белого фосфора подавляет метаногенез [9]. Этот результат служит еще одним подтверждением того, что строгие анаэробы не принимают участия в биодegradации белого фосфора.

Следует отметить еще один интересный факт. Контрольные ОСВ имеют значительно меньшую вязкость (они практически жидкие) по сравнению с опытными, которые являются вязкими, малотекучими и содержат газовые полости. Это означает, что в контроле активно развивавшаяся микрофлора употребила и превратила в газообразные продукты жизнедеятельности большую часть органических веществ. В опыте этому воспрепятствовала интоксикация белым фосфором.

Отличие последнего эксперимента от предыдущих, описанных нами ранее [9, 10], состоит в том, что вносимая в ОСВ подкормка – фитомасса амаранта, была измельчена до состояния порошка. Это резко активировало метаболические процессы в первые сутки эксперимента, как в контроле, так и в опытах. При этом интенсивно выделялся сероводород, образующийся при анаэробном разложении белковых веществ амаранта. Известно, что сероводород оказывает токсическое действие на микроорганизмы [19]. Накопление сероводорода привело к постепенному прекращению выделения газообразных продуктов во всех образцах. Следует особо подчеркнуть, что токсичное влияние белого фосфора 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 осадки был добавлен инокулят. После его внесения микрофлора активировалась, но не одновременно в разных повторах. В одном из трех повторов, включая контроль, жизнедеятельность микрофлоры восстановилась сразу после внесения инокулята (рис. 4а). Кинетика второго повтора носит чрезвычайно интересный колебательный характер – чередование подъемов и спадов активности жизнедеятельности микрофлоры (рис. 4, верху). По всей видимости, белый

фосфор в осадке 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. 4, сверху) [11].

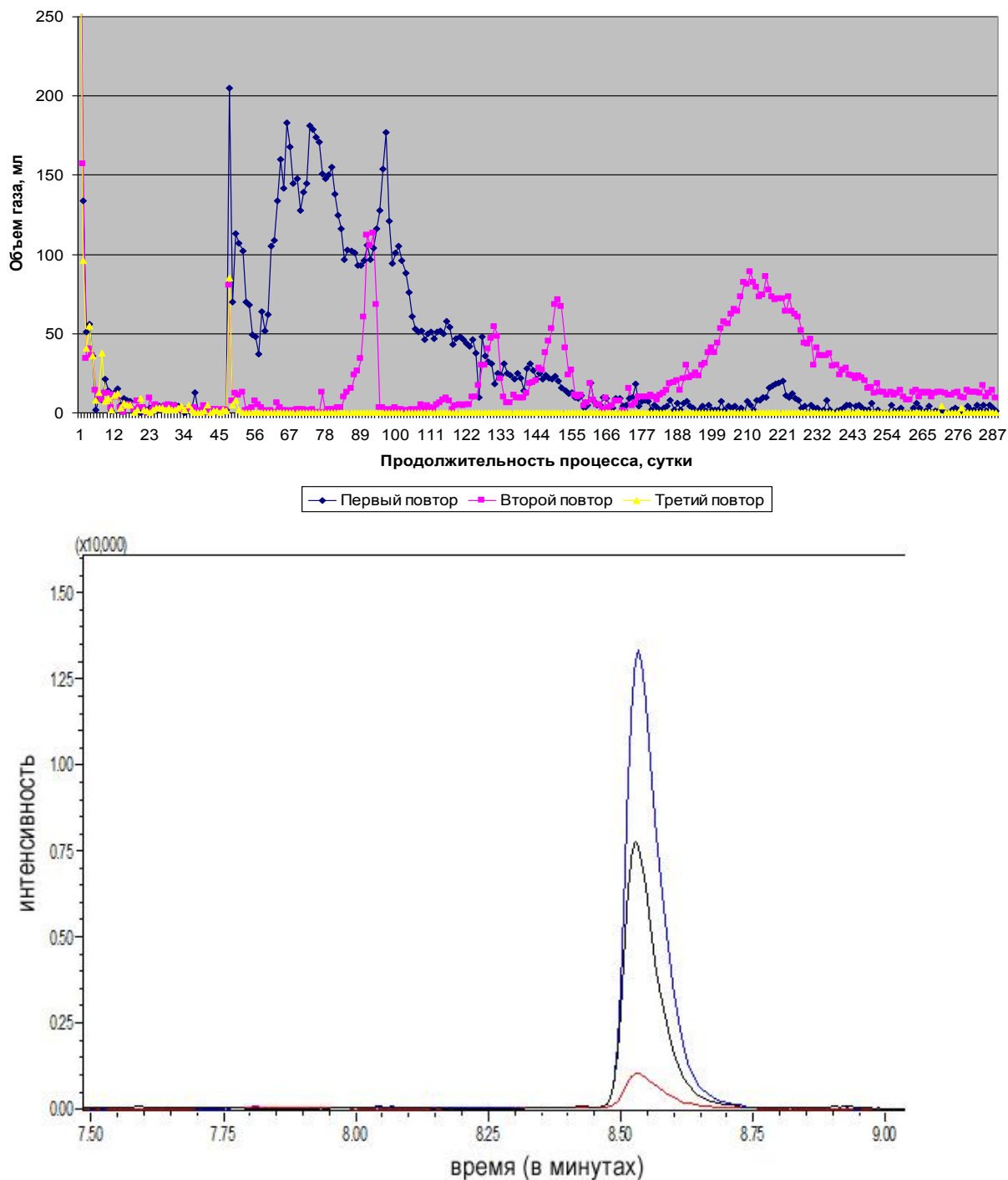


Рис. 4. Вверху. Кинетика выделения газа в опыте с содержанием P_4 0,01% (три повтора). Удельная продуктивность первого, второго и третьего повторов 27.3, 17.2 и 2.4 мл газа/ мл ОСВ за 288 суток, соответственно. Внизу. Спектр ГХМС для трех повторов, снятый на 223 сутки эксперимента.

Результат эксперимента однозначно свидетельствует о биологической деградации белого фосфора: 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. Интенсивность сигнала белого фосфора в трех повторах оказалась обратно пропорциональна активности микробного метаболизма в них. Концентрация белого фосфора в растворе во втором повторе была в 7,8 раз интенсивнее по сравнению с первым, а в третьем – в 13,3 раза интенсивнее, чем в первом [11] (рис. 4, внизу). Это свидетельствует об определенной зависимости между скоростью исчезновения белого фосфора в осадке и интенсивностью микробного метаболизма в нем. Если бы белый фосфор подвергался абиогенной деструкции (теоретически также возможной), скорость его разложения и интенсивность сигнала ГХМС во всех трех повторах была бы одинаковой.

Метаболизм белого фосфора

Хотя химия белого фосфора достаточно хорошо известна [20], однако его метаболизм до сих пор не раскрыт, и в литературе имеются о нем только фрагментарные сведения [1]. Наши предыдущие исследования показали, что анаэробная микрофлора угнетается белым фосфором не сразу, а спустя продолжительный период времени. При этом активность жизнедеятельности снижается плавно. Из этого наблюдения можно сделать вывод, что сам белый фосфор не токсичен для микрофлоры, а угнетение осуществляется полупродуктами его метаболизма.

Известно, что гипофосфиты проявляют бактерицидные свойства [21]. Таким образом, вполне вероятно, что подавление жизнедеятельности микрофлоры в наших опытах было обусловлено накоплением гипофосфита. Тем не менее, данное подавление было обратимым и заканчивалось восстановлением метаболической активности. Значит, микрофлора смогла нейтрализовать предполагаемое воздействие гипофосфит-анионов. В статье [22] как раз описано микробное окисление гипофосфита и фосфита до фосфата в анаэробных условиях. Продуктом окисления гипофосфита является фосфористая кислота, которую бактерии сравнительно легко метаболизируют в фосфат – наиболее естественную форму фосфора в живом организме.

В опытном спектре ^{31}P ЯМР водной фазы пробы ОСВ с содержанием P_4 0,1%. (рис. 5), проявились сигналы в области 0,3, 3,8 и 6,2 м.д., соответствующие фосфиту и гипофосфиту (153 сутки эксперимента).

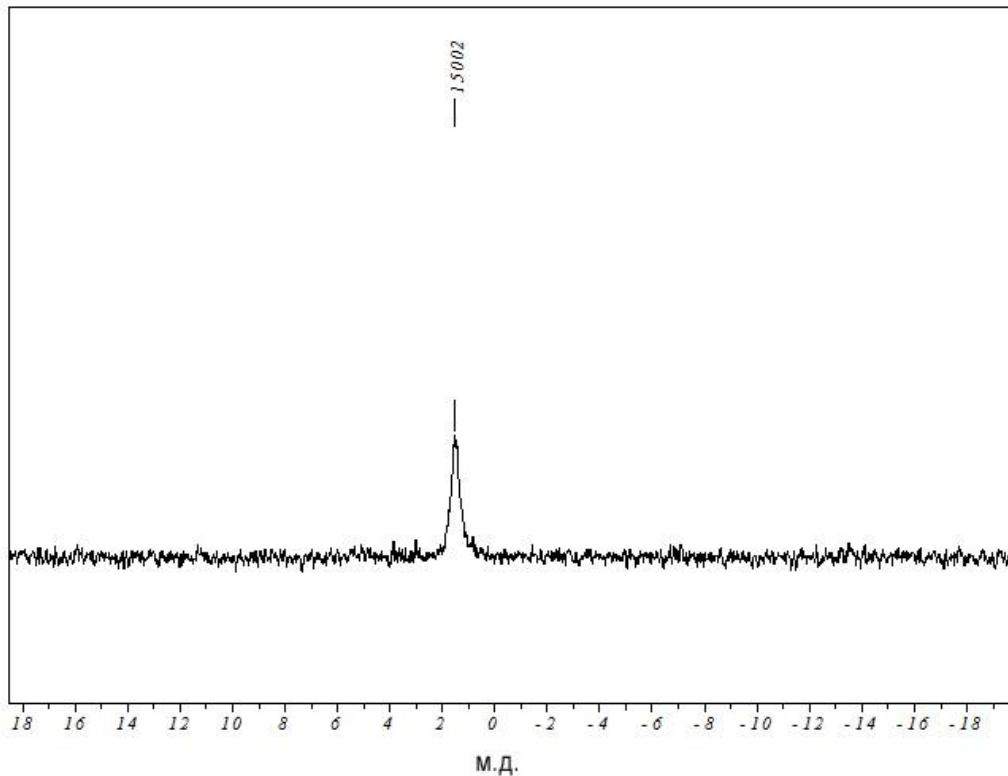
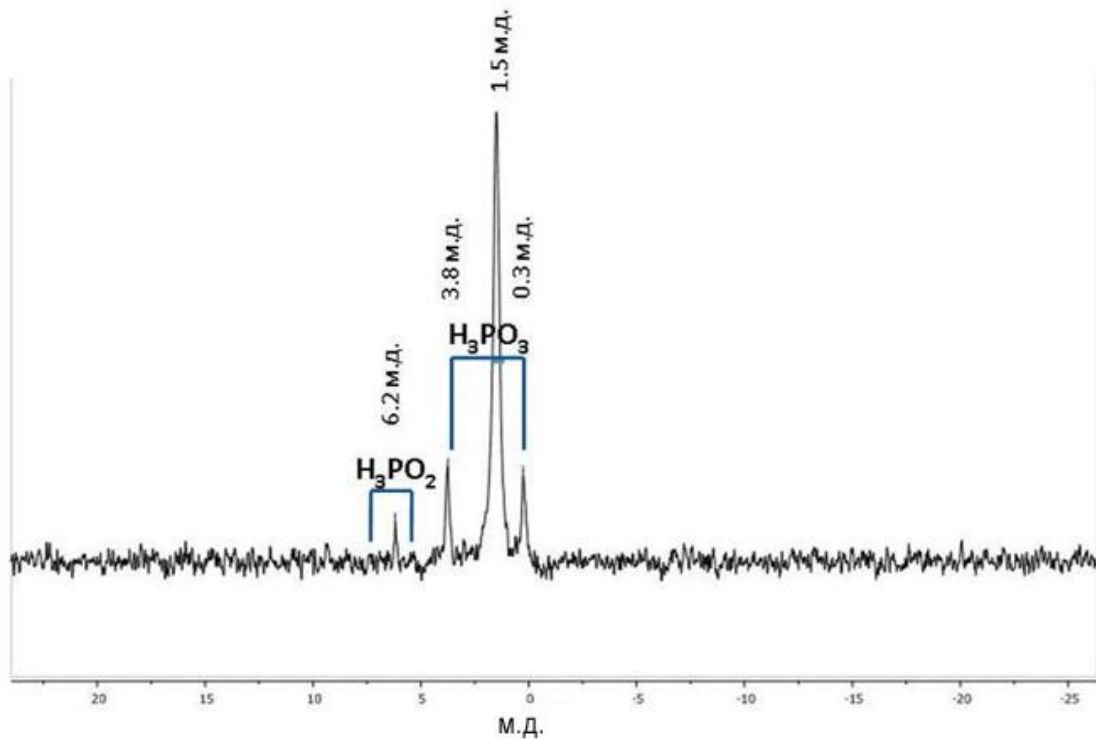


Рис. 5. Вверху. ^{31}P ЯМР спектр водной фазы опыта с содержанием P_4 в ОСВ 0,1%. Продолжительность эксперимента 153 сут. Сигналы в области 0.3 и 3.8 м.д. соответствуют фосфиту. Сигнал в области 6.2 м.д. относится к гипофосфиту. Оба вещества рассматривались как возможные метаболиты белого фосфора. Сигнал в области 1.5 м.д. относится к фосфату. Внизу.

^{31}P ЯМР спектр контрольной пробы (без ОСВ) содержит только сигнал фосфата при 1.50 м.д.

Наблюдаемые сигналы относятся к соединениям, которые, предположительно, являются метаболитами белого фосфора, что является подтверждением предполагаемого нами метаболического пути. Спектр, снятый с контрольного образца одновременно с опытным, на том же приборе и в тех же условиях, не содержал аналогичных сигналов. Это служит доказательством того, что обнаруженные соединения действительно являются метаболитами белого фосфора.

Итак, если объединить информацию, полученную из экспериментальных данных и из рассмотренных литературных источников, посвященных метаболическому восстановлению и окислению фосфора, то схему предполагаемого метаболизма белого фосфора можно представить так, как показано на рис. 6 [12]. Разумеется, представленная схема достаточно упрощена. Нам еще ничего не известно о задействованных в метаболизме элементарного фосфора ферментных системах, поэтому они не указаны. В дальнейшем, без сомнения, схема будет дополняться.

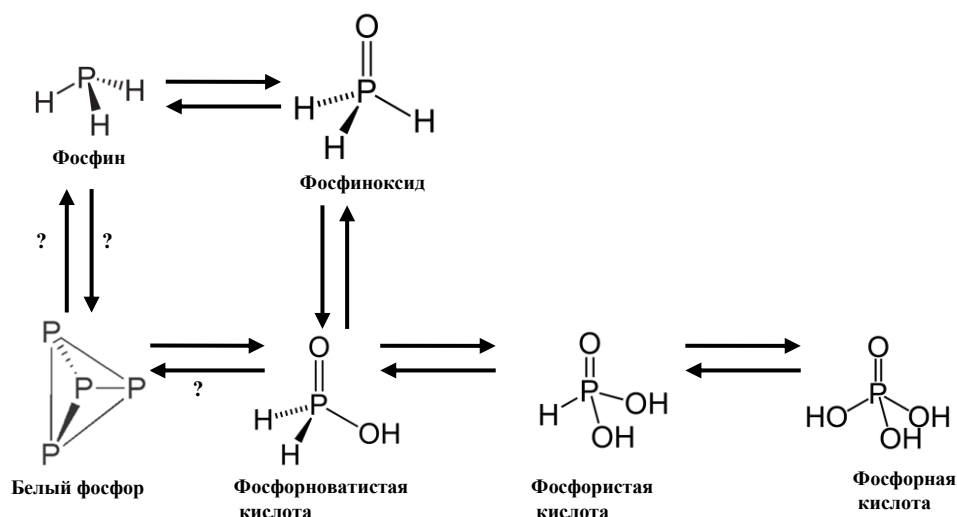


Рис. 6. Предполагаемый метаболический путь белого фосфора (знаками вопроса обозначены еще не обнаруженные превращения).

Поскольку в литературе до начала наших исследований отсутствовали сведения о микроорганизмах, устойчивых к P_4 , представленная работа имеет бесспорную новизну. Следующим важнейшим этапом исследований станет поиск ферментных систем, способных принимать активное участие в разложении белого фосфора.

Окислительными эквивалентами для окисления белого фосфора, по-видимому, служит ряд веществ. В первые сутки сбраживания это, безусловно, молекулярный кислород воздуха. Специально мы не создавали анаэробную среду, она возникала в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. В

первые сутки осадок всегда очень активно выделял газ (практически состоящий из одного углекислого газа), поскольку аэробный метаболизм значительно более интенсивный процесс. На вторые сутки выход газа снижается, и он насыщается сероводородом. Таким образом, теперь в качестве окислителей выступают сульфаты и нитраты, содержащиеся в осадке. В течение первой недели анаэробного сбраживания осадок резко меняет свойства. Если, будучи свежим, он имеет коричневый цвет и слабый запах, то в анаэробных условиях становится угольно-черным и чрезвычайно зловонным. Это – признаки выделения сероводорода и накопления сульфидов, то есть, сульфатредукции. Вероятно, эти процессы восстановления сопровождалось окислением белого фосфора. Еще через две – три недели запах сероводорода ослабевал, иногда до полного исчезновения, а выделяющийся газ насыщался метаном. То есть, происходило восстановление соединений углерода. Однако вопрос об истинной химической природе источников окислительных эквивалентов при микробиологическом окислении белого фосфора в ОСВ требует дальнейших исследований.

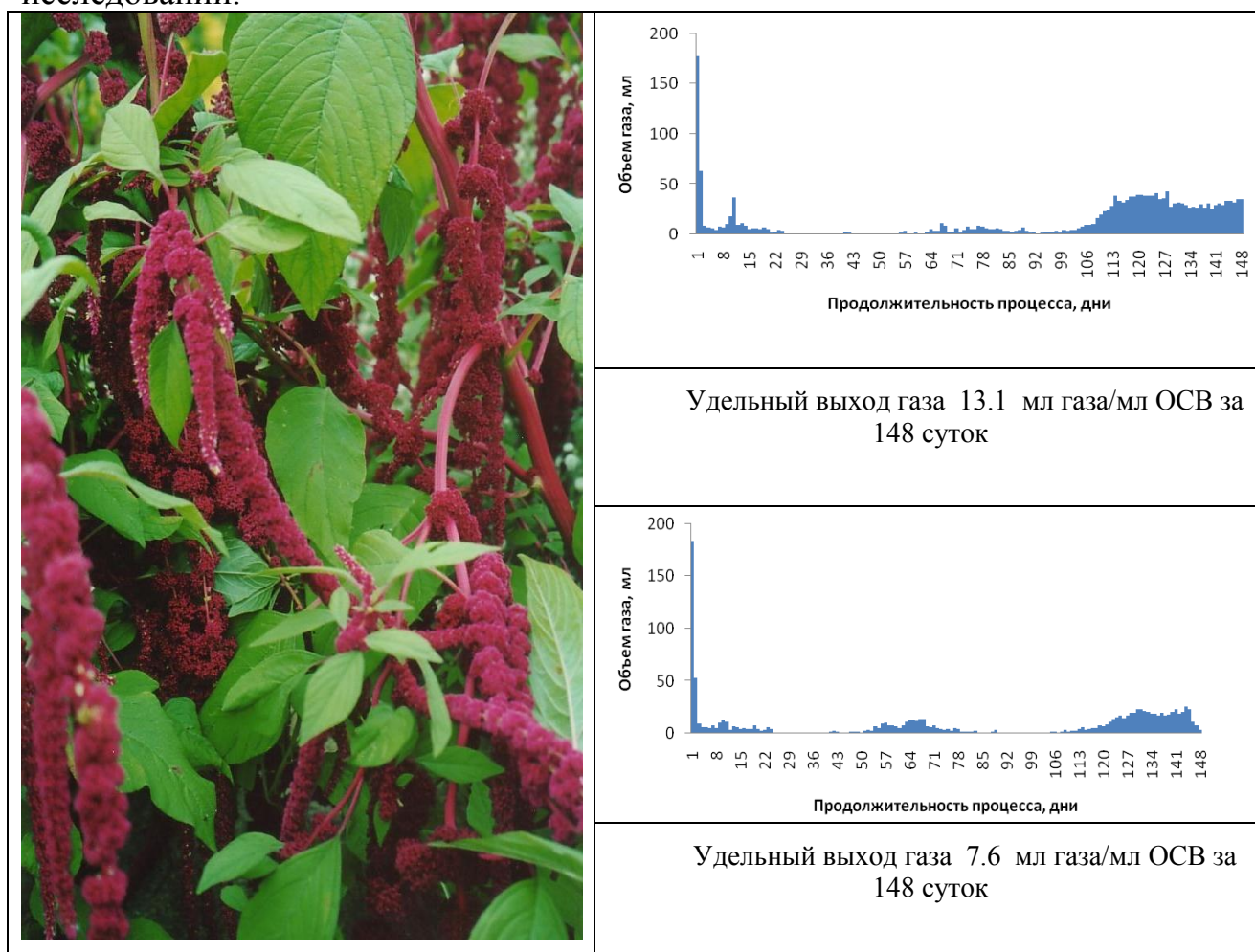


Рис. 7. Слева: растение из рода амарант (*Amaranthus L.*). Изображение с сайта <http://animalsfoto.com> . Справа: кинетика выделения газа в опыте с добавлением (вверху) и без добавления (внизу) фитомассы амаранта.

Сельскохозяйственные растения рода *Amaranthus* L. являются богатым источником белка, сбалансированного по аминокислотному составу. Было изучено влияние фитомассы амаранта на переработку белого фосфора ОСВ. Для сокращения лаг-фазы роста микрофлоры ОСВ, в контроль и опыт была добавлена биомасса растения амарант (*A. cruentus* L.), который является эффективным стимулятором метанового брожения. В одном из экспериментов фитомасса амаранта не добавлялась. Присутствие в осадке фитомассы амаранта заметно ускоряет процесс адаптации микрофлоры к белому фосфору, что связано, в первую очередь, с его питательными свойствами (рис. 7). В опыте без добавления в ОСВ фитомассы амаранта присутствовала длительная лаг-фаза - активация газообразования наблюдалась только после 100 дней эксперимента [13].

Таким образом, добавляя богатый источник питательных веществ в осадок, можно сокращать непродуктивную лаг-фазу и ускорять детоксикацию сточных вод, в том числе и содержащих белый фосфор.

Известно, что белый фосфор нестабилен и легко диспропорционирует в щелочных условиях. Однако рН образцов ОСВ на протяжении выдерживания в анаэробных условиях снижается. Сходные процессы закисления сброживаемого в анаэробных условиях ОСВ описаны нами в работе [18]. Показатель рН среды измерялся в непрерывном режиме портативным рН-метром. Свежий ОСВ обычно имеет среду, близкую к нейтральной (рН 7 или чуть выше), а после сброживания в течение более двух месяцев значения рН падают до 6 и даже ниже, за счет процессов брожения и накопления органических кислот (рис. 8).

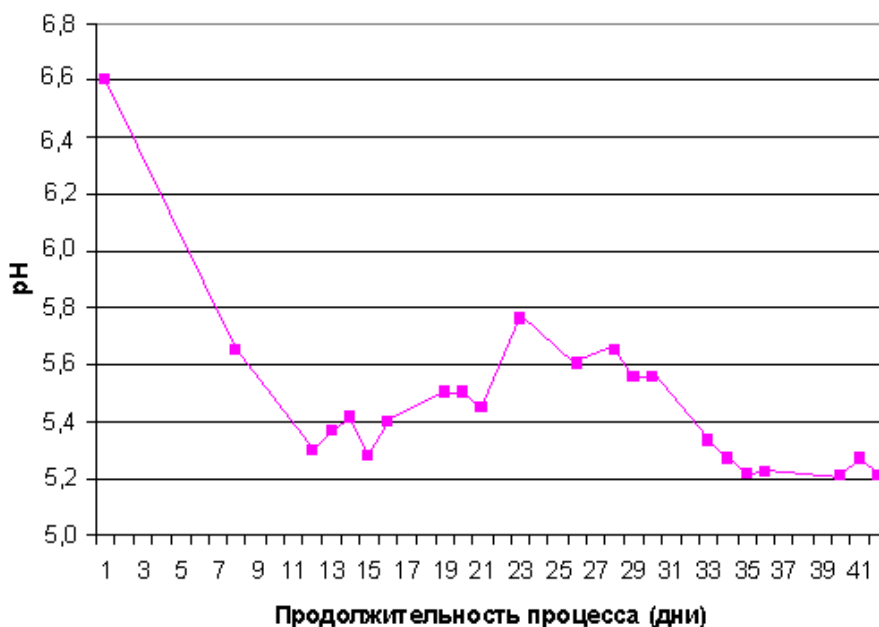


Рис. 8. Динамика изменения рН в процессе метаногенеза, по [18].

Кислая среда способствует росту устойчивости белого фосфора [20]; следовательно, его распад легче объяснить влиянием ферментативных систем микрофлоры, чем абиотической деструкцией. Это можно считать еще одним аргументом в пользу гипотезы биodeградации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторами впервые показана возможность деградации белого фосфора (P₄) под действием осадка сточных вод (ОСВ) водоочистных сооружений. Показано, что белый фосфор угнетает рост микроорганизмов за счет образования токсичных промежуточных продуктов его деградации. Выявлено, что эубактерии обладают большей устойчивостью к белому фосфору и продуктам его распада, чем метаногены. Получены культуры микроорганизмов, растущих в ОСВ с содержанием белого фосфора 0,01–0,1% масс. Установлено, что снижение концентрации P₄ обратно пропорционально продолжительности лаг-фазы роста и прямо пропорционально активности метаболических процессов микрофлоры. Проведен поиск метаболитов белого фосфора и предложен путь его метаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 14-08-31091 мол_а.

Список литературы:

1. Toxicological profile for white phosphorus // U.S. Department of Health and Human Services. USA. 1997. 248 p.
2. *Вербовой А.Ф.* // Казанский медицинский журнал. 2002. Т. 83. № 5. С. 147.
3. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 2. С. 1.
4. *Бадюгин И.С.* // Военно-медицинский журнал. 2009. Т. 330. № 9. С. 20.
5. *Bohn H.L., Johnson G.V., Cliff J.H.* // J. Agr. Food Chem. 1970. V. 18. No. 6. P.1172.
6. *Spanggard R.J., Renwick R., Chou T.-W., Wilson R., Podoll R.T., Mill T., Parnas R., Platz R., Roberts D.* // Final Report – SRI International, Menlo Park, CA. Contract № DAMD17-82-C-2320. AD176922. Prepared by SRI International, Menlo Park, Calif., for U.S. Army Medical Research and Development Command. 1985. 48 p.
7. *Rodriguez A., Bohn H.L., Johnson G.V.* // Soil Sci. Soc. Am. Proc. 1972. V. 36. No 2. P. 364.
8. *Jackman R.H., Lambert J.P., Rothbaum H.P.* // N.Z.J. Agric. Res. 1970. V. 13. No 2. P. 232.
9. *Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордоев Д.М., Болормаа Ч., Кагиров Р.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г.* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т. 153. Кн. 2. С. 110.
10. *Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахосийенагбе С.К., Болормаа Ч., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 1. С. 22.
11. *Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахосийенагбе С.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 36. № 10. С. 1.
12. *Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахосийенагбе С.К., Болормаа Ч., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 36. № 12. С. 34.
13. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Валидов Ш.З., Кулик Н.В., Алимова Ф.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Белостоцкий Д.Е., Сапармырадов К.А., Тухбатова Р.И., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 44. № 12. С.1.
14. *Neilson A.H., Allard A.-S.* Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007. 710 p.
15. *Наумова Р.П.* Микробный метаболизм неприродных соединений. Казань: Изд-во Казанского университета, 1985. 239 с.
16. *Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 3. С. 1.

17. Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 34. № 4. С. 1.
18. 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. // Вестник Казанского технологического университета. 2009. № 4. С. 220.
19. Karhadkar P.P., Audic J.-M., Faup G.M., Khanna P. // Water Research. 1987. V. 21. No 9. P. 1061.
20. Милюков В.А., Будникова Ю.Г., Суняшин О.Г. // Успехи химии. 2005. Т. 74. № 9. С. 859.
21. Sieber J.R., Le H.M., McInerney M.J. // Environmental Microbiology. 2014. V. 16. No 1. P. 177.
22. Foster T.L., Winans L., Helms J.R., Helms S.J.S. // Applied and Environmental Microbiology. 1978. V. 35. No 5. P. 937.

ANAEROBIC DETOXICATION OF WHITE PHOSPHORUS BY MICROORGANISMS IN SEWAGE SEDIMENTS

*A. Z. Mindubaev**, *A. D. Voloshina*, *N. V. Kulik*, *K. A. Saparmyradov*¹,
*Kh. R. Khayarov*¹, *S. T. Minzanova*, *L. G. Mironova*, and *D. G. Yakhvarov*

State Budgetary-Funded Institution of Science Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry
of Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan',

*e-mail: mindubaev@iopc.ru

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan'

Received March 15, 2017

Abstract – The results of studying biodegradation of a hazardous toxicant – white phosphorus are presented, after the latter has been introduced into sewage sludge samples obtained from wastewater treatment facilities, at a concentration level ranging from 0.001 to 0.1%. It is shown that, under anaerobic conditions, white phosphorus is oxidized yielding non-toxic water-soluble compounds. Cultures of actinomycetes grown at a white phosphorus concentration of up to 0.1% have been obtained. The rate of P₄ concentration decrease in wastewater sediments is inversely proportional to the duration of the microflora lag-growth phase. A hypothetical metabolic pathway of white phosphorus is discussed.

Keywords: detoxication, white phosphorus, sewage sludge, anaerobic conditions, gas evolution kinetics, gas chromatography–mass spectrometry, metabolic pathway, nuclear magnetic resonance.