

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ДЕСТРУКЦИИ БЕЛОГО ФОСФОРА В ОСАДКЕ СТОЧНЫХ ВОД ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ МИКРОБНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Ахоссийенагбе С.К.¹, Миндубаев А.З.²

¹ ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18;

² ФГБУН Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Арбузова д.8.

e-mail: mindubaev@iopc.ru

поступила в редакцию 16 октября 2013 года

Аннотация

В предыдущих работах нами впервые была показана деградация белого фосфора (опасного промышленного загрязнителя) осадком сточных вод из очистных сооружений. Это открытие может стать основой создания новых, более эффективных методов предотвращения проникновения этого вещества в окружающую среду. Однако прямых свидетельств биодegradации не было – будучи химически активным, белый фосфор может трансформироваться и под влиянием абиотических факторов. В данной работе представлены результаты эксперимента, в трех параллельных повторах которого микрофлора активировалась неодновременно. Метод ГХМС показал, что скорость снижения концентрации P_4 в средах обратно пропорциональна продолжительности лаг-фазы роста микрофлоры. Это указывает на наличие биодegradации белого фосфора.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, осадки сточных вод, анаэробные условия, кинетика выделения газа, газовая хромато-масс-спектрометрия.

Введение. Биодegradация становится одним из наиболее популярных и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, зачастую очень токсичных [1-4]. Наиболее актуальный пример – биодegradация активным илом синтетического каучука тиокола, производимого Казанским заводом синтетического каучука. Биоминерализация тиокола сообществом сероокисляющих бактерий длится 18 суток при 28 °С [5].

Целью проведенного нами исследования являлась переработка при помощи микроорганизмов, населяющих осадки канализационных стоков, белого фосфора – одного из самых опасных веществ, применяемых в крупнотоннажном химическом производстве. В литературных источниках не найдено сведений о доказанных примерах биологической дegradации белого фосфора. Предыдущие работы нашего коллектива [6,7] позволили пролить свет на практически неизученный вопрос токсичности белого фосфора для прокариот. Однако главная цель работы – доказательство биологической дegradации белого фосфора, активное участие в процессе его обезвреживания микроорганизмов, до сих пор не была достигнута. Результаты представленного исследования служат аргументом в пользу биодegradации.

Экспериментальная часть.

Материалы и методы исследования. При проведении экспериментов использовали смесь уплотненного и обезвоженного осадка сточных вод Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани. При проведении экспериментов использовали ОСВ одной партии, с идентичными показателями. Эксперимент был начат на следующий день после доставки ОСВ с очистных сооружений. В качестве стимулятора, позволяющего сокращать лаг-фазу роста микрофлоры активного ила, в контроль и опыт была добавлена растительная биомасса – зеленая масса растения амарант (*Amaranthus cruentus* L), который является эффективным стимулятором метанового брожения [8]. Фитомасса амаранта перед внесением в субстрат была измельчена до состояния порошка на ручном блендере Philips HR 1370.

Анаэробный процесс осуществлялся в реакторах лабораторного масштаба объемом 500 мл, непрерывно термостатированных в мезофильном (38 °С) режиме. Загрузка реактора составляла 300 г субстрата. На 48 сутки эксперимента во все повторы эксперимента было добавлено по 60 г инокулята, после чего объемы субстратов достигли 360 мл, а концентрация белого фосфора в серии опытов упала с 1:10000 до 1:8333. При добавлении инокулята не был перемешан, и после его добавления кинетики повторов приобрели различный характер. После добавления инокулята повторы контроля и обоих опытов можно условно поделить на 1, 2 и 3 в зависимости от того, из какой части емкостей (верхней, средней или нижней) был отобран инокулят. Процесс переработки белого фосфора под действием активного ила исследовался на протяжении 288 дней. Объем выделяющегося газа измерялся ежедневно, волюмометрическим методом, по вытеснению газом жидкости из мерного цилиндра. Соотношение метана и CO₂ анализировалось еженедельно. Инокулят представлял собой ОСВ той же партии. Эксперимент был начат через 8 суток после доставки ОСВ с очистных сооружений (сырье хранилось в холодильнике), и продолжался 41 день. Анаэробная переработка ОСВ осуществлялась в мерных склянках объемом 200 мл с резиновыми крышками.

Метод хроматомасс-спектрометрии применялся для сравнения химического состава субстратов в контроле и опыте, для обнаружения белого фосфора и его предполагаемых метаболитов. Для масс-спектрометрии использовался газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010Ultra (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение. Отличие данного эксперимента от предыдущих, описанных в работах [6,7] состоит в том, что вносимая в субстраты 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. Газы имели резкий запах сероводорода, субстраты окрасились в угольно-черный цвет – признак избытка сульфидов. Известно, что сероводород оказывает токсическое действие на микроорганизмы [9]. Накопление сероводорода привело к постепенному прекращению выделения газообразных продуктов всеми повторами контролей и опытов. Следует особо подчеркнуть, что токсическое 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 субстраты был добавлен инокулят. После его внесения микрофлора субстратов активировалась, но не одновременно в разных повторах. В одном из трех повторов каждой серии, включая контроль, жизнедеятельность микрофлоры восстановилась сразу после внесения инокулята (рисунок 1a,d). В третьем повторе контроля активация жизнедеятельности микрофлоры отмечена через 30 суток после внесения инокулята, второй повтор активировался только спустя 112 суток после внесения инокулята.

В опыте второй повтор кратковременно активировался в период между 36 и 46 днем после внесения инокулята (рисунок 1b,e). После всплеска активности (на 45 сутки после внесения инокулята продуктивность составила 113 мл/сутки) выделение газа снова резко пошло на спад. Вероятно, начало проявляться токсическое воздействие белого фосфора. Во второй раз повтор активировался через 76 суток после внесения инокулята. По всей видимости, прошел период лаг-фазы, характерный для активных илов с внесенным белым фосфором. Вообще, кинетика второго повтора носит чрезвычайно интересный 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, сопровождавшейся детоксикацией. После этого микрофлора снова активировалась, снова метаболизировала белый фосфор и т.д. Следует особо обратить внимание на тот факт, что каждый последующий максимум газовыделения

более продолжителен и интенсивен по сравнению с предыдущим: вероятно, это указывает на эволюционную адаптацию микрофлоры, отбор более устойчивых форм. Третий повтор не активировался и спустя 240 дней после внесения инокулята (рисунок 1с,ф).

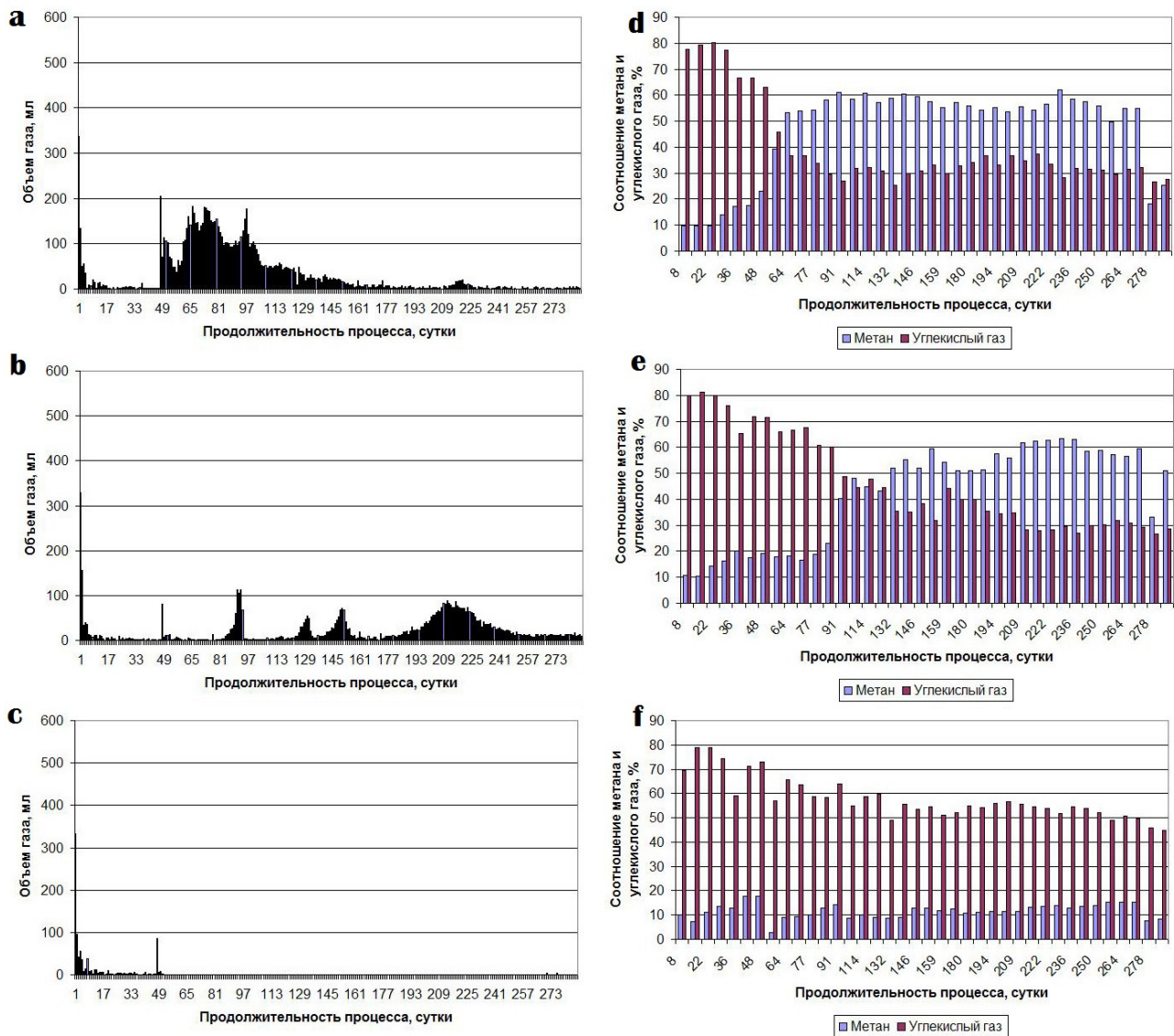


Рисунок 1. – Кинетики выделения газа (слева) и изменения состава газа (справа) в эксперименте с содержанием P_4 0,01%. а, d – первый повтор, b, e – второй повтор, c, f – третий повтор.

Характер изменения состава газов, соотношения в них метана и углекислого газа, соответствует активности газообразования (рисунки 1d,e,f). Таким образом, кинетики опытов носят характер, типичный для интоксикации микрофлоры белым фосфором. Высокая активность сменяется лаг-фазой, за которой следует повторная активация, связанная с адаптацией микрофлоры к белому фосфору и его переработкой. Однако в данном эксперименте кинетика дополнительно усложняется изначальной интоксикацией микрофлоры сероводородом.

Результат эксперимента однозначно свидетельствует именно о биологической деградации белого фосфора: разложение ксенобиотика начинается только после преодоления микрофлорой интоксикации сероводородом. Не вполне ясно, однако, почему один повтор каждой серии активировался сразу после внесения инокулята. Возможно, это результат того, что инокулят перед внесением не был перемешан: вероятно, ил в верхней части емкости содержал более активную микрофлору, что и обусловило резкую активацию именно первых повторов каждой серии. Тем не менее, даже в случае первого повтора белый фосфор в концентрации 0,01% существенно снижал суточную продуктивность газообразования.

На 223 сутки после внесения инокулята, из трех повторов опыта с 0,01% белого фосфора были отобраны пробы для хроматомасс-спектрометрического анализа. Следует отметить, что концентрация метаболитов в субстратах трех повторов заметно различается. Для представленной работы наиболее важно, что интенсивность сигнала белого фосфора в трех повторах обратно пропорциональна активности микробного метаболизма в них (рисунок 2).

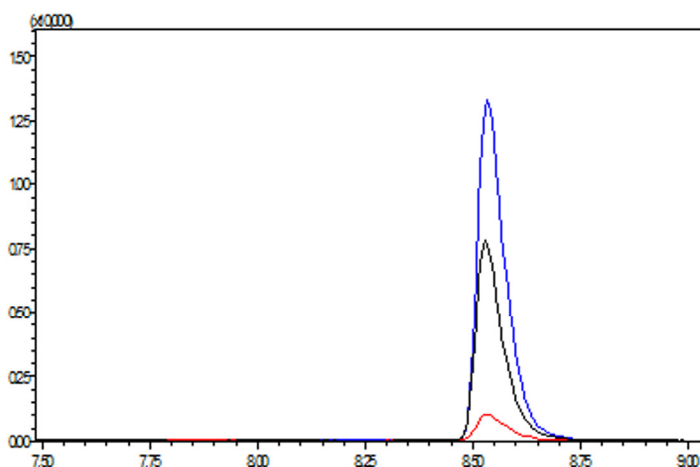


Рисунок 2. – Различия интенсивности сигнала белого фосфора для повторов опыта с 0.01% белого фосфора (наименее интенсивный сигнал первого повтора, обозначен красным цветом, средний по интенсивности – второго, обозначен черным, наиболее интенсивный – третьего, обозначен синим). Для большей наглядности нужно сравнить с диаграммами на рисунке 1

Сигнал белого фосфора по рассчитанной прибором шкале во втором повторе в 7,8 раз интенсивнее по сравнению с сигналом в первом, а в третьем – в 13,3 раз интенсивнее, чем в первом. Это означает четкую зависимость между скоростью исчезновения белого фосфора в субстрате 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.

До тех пор, пока микрофлора была подавлена избытком сероводорода, образовавшегося при анаэробном сбраживании измельченной фитомассы амаранта, белый фосфор в субстратах не подвергался деструкции. В дальнейшем скорость разложения P_4 была обратно пропорциональна активности микрофлоры в каждом из трех повторов. Если бы имела место абиотическая деградация, ее скорость носила бы постоянный характер и не зависела бы от продолжительности лаг-фаз. Таким образом, между активностью метаболизма микрофлоры и продолжительностью существования в субстрате белого фосфора есть обратная связь, что свидетельствует в пользу именно биологической деградации P_4 .

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность Салиме Тахиятулловне Минзановой, Любви Геннадьевне Мироновой, Дмитрию Григорьевичу Яхварову, Ильдару Хамитовичу Ризванову, Фариде Кашифовне Алимовой, Тане Барсуковой и Диме Белостоцкому за неоценимую помощь в работе.

Список литературы

- 1) Neilson A.H., Allard A.-S. Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007. 710 p.
- 2) Наумова Р.П. Микробный метаболизм неприродных соединений. Казань: Изд-во Казанского университета. 1985. 239 с.
- 3) Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Биodeградация как метод переработки отходов. Часть 1. Биodeградация ксенобиотиков // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.33, №3. С.1-37.
- 4) Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Биodeградация как метод переработки отходов. Часть 2. Взгляд на проблему. Являются ли ксенобиотики ксенобиотиками? // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.34, №4. С.1-20.

- 5) Перушкина Е.В., Шагинурова Г.И., Сироткин А.С., Васюнина Ю.В., Миндубаев А.З., Минзанова С.Т. Биодegradация серусодержащего полимера в процессе очистки сточных вод химических производств. // Химическая промышленность сегодня. 2008. №7. С.42-49.
- 6) 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.
- 7) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Белый фосфор как новый объект биодegradации // Грани науки. 2013. Т.1, №1. С.65-68.
- 8) 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.
- 9) Karhadkar P.P., Audic J.-M., Faup G.M., Khanna P. Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis // Water Research. 1987. V.21, N9. P.1061-1066.