

БЕЛЫЙ ФОСФОР КАК НОВЫЙ ОБЪЕКТ БИОДЕГРАДАЦИИ

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 05 июля 2013 года

Аннотация

Впервые показана возможность деградации белого фосфора под действием осадка сточных вод (ОСВ) водоочистных сооружений. Установлено, что в результате токсического воздействия продуктов разложения белого фосфора происходит угнетение метаногенного процесса деятельности микроорганизмов, а последующая адаптация микрофлоры к действию токсиканта приводит к полной биодegradации и переработке белого фосфора в нетоксичные продукты. Получены культуры микроорганизмов, растущих на субстратах с содержанием белого фосфора 0.01 и даже 0.1 %.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, осадки сточных вод, анаэробные условия, кинетика выделения газа.

Введение. Белый фосфор (P₄) является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Данное вещество обладает высокой химической активностью и летучестью, легко воспламеняется (вплоть до самовоспламенения), поражает все системы внутренних органов человека и животных. Хроническое отравление приводит к глубокой инвалидности, затрагивая кальциевый обмен, приводя к разрушению костей, малокровию, поражению печени, сердечно-сосудистой системы, репродуктивной функции [1].

Тем не менее, белый фосфор широко применяется в промышленности, поэтому не исключается попадание данного вещества в окружающую среду. Достаточно вспомнить недавнюю экологическую катастрофу на Украине, где в результате железнодорожной аварии 16 июля 2007 года воспламенились цистерны с техническим фосфором [2]. Единственный метод детоксикации белого фосфора, известный в настоящее время – его окисление до ортофосфорной кислоты раствором медного купороса: масштабы применения этого метода ограничены по причине высокой стоимости и токсичности медьсодержащих препаратов.

По этой причине приобрели актуальность разработки методов детоксикации, которые можно использовать крупномасштабно – недорогих и без использования токсичных реагентов. Известны попытки применения элементного (белого и красного) фосфора в качестве фосфорного удобрения [3, 4], но без большого успеха. Между тем, у элемента фосфора есть уникальное качество: будучи сильнейшим ядом в виде простого вещества, в окисленном состоянии (фосфорная кислота и ее производные) он абсолютно необходим для всех форм жизни, являясь биогенным макроэлементом. Таким образом, возможна его полная детоксикация, попытка осуществить которую была предпринята в недавних работах [5-7].

Биодegradация является одним из наиболее популярных и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных, бытовых и сельскохозяйственных стоков [8].

Целью проведенного нами исследования являлась переработка белого фосфора при помощи микроорганизмов, населяющих осадки канализационных стоков.

Экспериментальная часть.

Материалы и методы исследования. Состав субстрата, условия анаэробной переработки, кинетика выделения и изменения состава газа, газовая хроматография и спектроскопия ³¹P ЯМР описаны в работе [5].

Микробиологический посев. Производился после окончания анаэробной переработки. Из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 0,1 % производился на кафедре биохимии К(П)ФУ.

Питательная среда мясо-пептонный агар (МПА).

Разведение образцов производилось в серии из 10 пробирок. Посев производился из концентраций 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} от исходной, в 3-х повторях.

Посевы «газоном» производили под плотной питательной средой в чашке Петри. Инкубация продолжалась 72 часа (температура 35 °С), наблюдался равномерный сплошной рост бактерий с разделением их на колонии. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путём изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду. Проводилось окрашивание препаратов по Граму. Использовался световой микроскоп Carl Zeiss Axio с компьютерным интерфейсом, увеличение в 1000 раз.

Посев из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 0,01 % производился в виварии ИОФХ им. А.Е. Арбузова. Для выделения чистых культур актиномицетов использовали крахмало-аммиачный агар (КАА). Фрагменты колоний из исследуемых проб с помощью иглы переносили на пластинки КАА в чашках Петри. Через 2-3 суток при 25 на поверхности среды вырастали колонии актиномицетов.

Результаты исследования и их обсуждение.

Зависимость кинетики газообразования и метаногенеза от концентрации белого фосфора. При содержании белого фосфора в растворе порядка 0,1 %, наблюдалось длительное угнетение жизнедеятельности микрофлоры, выражающееся в снижении выделения газообразных продуктов жизнедеятельности по сравнению с контролем, вплоть до временного прекращения выделения газа. Тем не менее, даже при такой концентрации токсичного вещества не наблюдалась полная гибель микроорганизмов. При содержании белого фосфора в иле 0,01 %, наблюдалось значительное угнетение, вплоть до полного прекращения выделения газа, в течение 2-3 недель, причем угнетение наблюдалось не вначале эксперимента, а спустя приблизительно месяц. При содержании белого фосфора в субстрате 0,001 %, наблюдалось незначительное угнетение жизнедеятельности микрофлоры, без перерыва в выделении газа, указывающее на устойчивость природных популяций микроорганизмов активного ила к P_4 при разбавлении до указанной концентрации. После периода угнетения, жизнедеятельность микрофлоры, выраженная через выделение и состав газообразных продуктов метаболизма, начинала восстанавливаться. На содержание углекислого газа белый фосфор оказывал менее заметное угнетающее воздействие, чем на содержание метана. Из этого следует, что метаногенные археобактерии более чувствительны к отравлению этим веществом по сравнению с другими представителями микрофлоры активного ила.

Продолжительность детоксикации белым фосфором. Из субстратов с концентрацией P_4 0,01 % (мезофильный и термофильный) первая проба для ЯМР анализа была взята на 35 день. Спектры продемонстрировали наличие одного сигнала, соответствующего белому фосфору (рисунок 1). Значит, вне зависимости от режима термостатирования срок в 35 дней недостаточен для переработки P_4 активным илом.

Вторая проба из субстрата с концентрацией белого фосфора 0,01 % (мезофильный) была отобрана на 63 день. Проба отбиралась из другой повторности опыта, чтобы исключить влияние на процесс предыдущего отбора пробы. Спектр показал отсутствие сигналов фосфорных соединений, в том числе белого фосфора. Следует отметить, что вторая проба была отобрана на фоне резкой активации процесса выделения газа субстратом. Таким образом, срок продолжительностью 63 суток оказался достаточным для переработки белого фосфора в концентрации 0,01 %. Отсутствие соединений фосфора в эфире косвенно свидетельствует о метаболизме P_4 в водорастворимые соединения, не экстрагируемые эфиром, т.е. об его окислении. В таком случае, период угнетения жизнедеятельности

микроорганизмов, наблюдавшийся во всех экспериментах, вероятнее всего, обусловлен накоплением токсичных для бактерий гипофосфитов. Дальнейшее возобновление активного метаболизма связано с последующим окислением гипофосфит-ионов до нетоксичных фосфитов и фосфатов. Температурный режим процесса не играл существенной роли. Предположительно, адаптация микрофлоры активного ила к присутствию P_4 и его метаболизм осуществляются именно в период угнетения жизнедеятельности. Соответственно, не играло роли и агрегатное состояние P_4 .

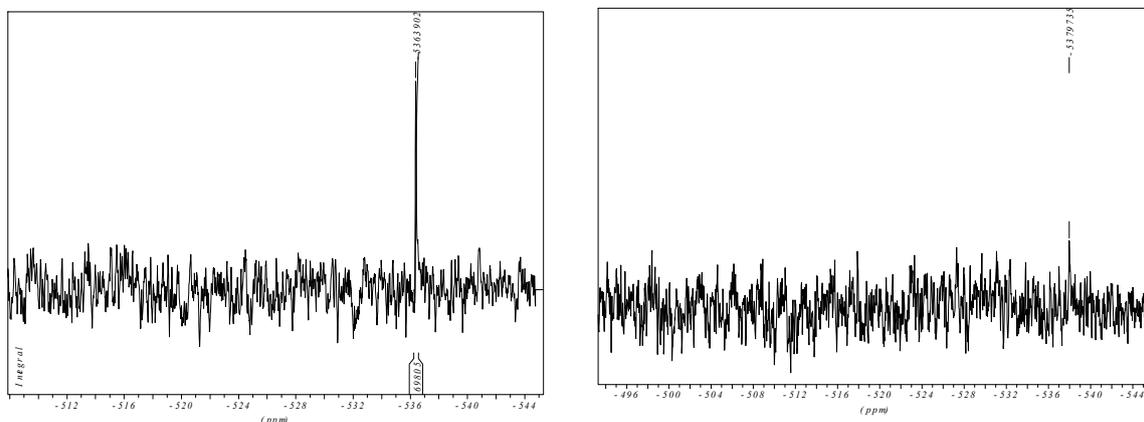


Рисунок 1. – Изменение интенсивности сигнала белого фосфора в спектрах ЯМР в зависимости от продолжительности процесса анаэробной переработки. Режим мезофильный. На 35 день эксперимента (слева) сигнал белого фосфора четко различим, на 63 день (справа) спектр не содержит сигналы.

На поверхности субстратов с добавлением белого фосфора 0,01 % наблюдался рост колоний микроорганизмов, которые по внешним признакам идентифицировали как актиномицеты. С целью определения видовой принадлежности и дальнейшего получения накопительных культур, произвели посев на культуральную среду (см. Материалы и методы). Выращенные микроорганизмы были идентифицированы как представители рода *Streptomyces* (рисунок 2).

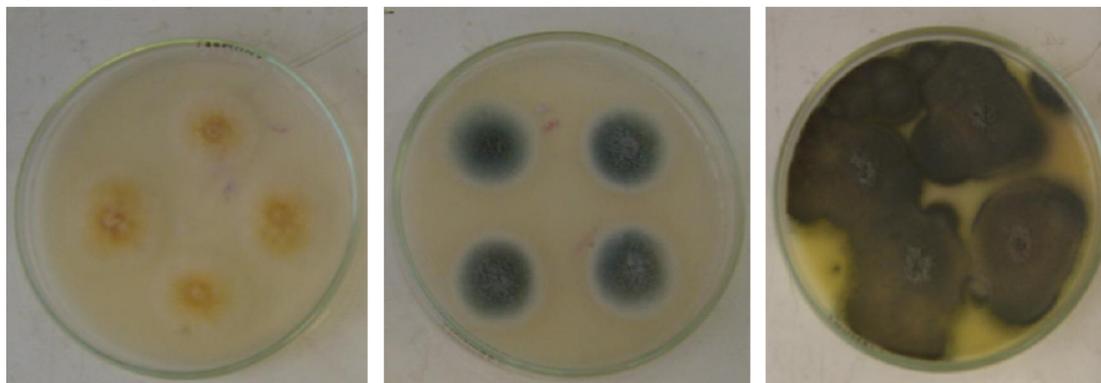


Рисунок 2. – Колонии актиномицетов на крахмал-аммиачной среде в опыте с содержанием белого фосфора 0,01 % масс.

При одинаковом разведении из опытного (с белым фосфором) субстрата с содержанием белого фосфора 0,1 %, выросло больше колоний бактерий, чем из контрольного (таблица 1).

Таблица 1. Количество колоний бактерий, выросших из опытного, с содержанием белого фосфора 0,1 %, и контрольного субстратов при двух разведениях.

Субстрат	Разведение					
	10^7			10^8		
Опыт	56	76	70	21	26	21
Контроль	5	0	1	0	1	0

Исходя из приведенных в таблице данных, плотность клеточной суспензии в контроле составляла $2,5 \cdot 10^8$ клеток / мл субстрата, а в опыте $1,5 \cdot 10^{10}$ клеток / мл субстрата, т.е. на два

порядка больше. Судя по морфологии колоний (одинаковый размер, структура поверхности, цвет), все они принадлежат одному виду грамположительных бактерий. Вероятно, это связано со спецификой культуральной среды, на которой растут не все виды бактерий.

Следует подчеркнуть, что в контрольных субстратах (без белого фосфора) рост колоний не наблюдался. Отсутствие роста микроорганизмов в контрольных субстратах после прекращения выделения газа, кажется парадоксальным (получается, что в присутствии токсичного ксенобиотика микроорганизмы лучше растут по сравнению с контролем). Вероятно, это различие вызвано тем, что в контроле исчерпались питательные вещества, и популяция сократилась. В опыте плотность популяции осталась такой же, как в исходном иле, бактерии при этом не погибли, а впали в анабиоз, из которого вышли в благоприятных условиях.

Заключение. Впервые показана возможность деградации белого фосфора под действием осадка сточных вод (ОСВ) водоочистных сооружений. Установлено, что в результате токсического воздействия продуктов разложения белого фосфора происходит угнетение метаногенного процесса деятельности микроорганизмов, а последующая адаптация микрофлоры к действию токсиканта приводит к полной биодеградации и переработке белого фосфора в нетоксичные продукты с сохранением исходной активности. При использовании ряда аналитических методов, включая метод ядерного магнитного резонанса, установлено, что белый фосфор в концентрации 0,01 % и 0,001 % в результате контакта с активным илом окисляется до водорастворимых соединений. Нам до сих пор не известен механизм деградации, роль в нем живых микроорганизмов. Однако полученные нами данные по выживаемости микрофлоры свидетельствуют в пользу ее участия в процессе деструкции белого фосфора.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность Александре Дмитриевне Волошиной, Наталье Владимировне Кулик, Чулуун Болормаа, Салиме Тахиятуллоевне Минзановой, Любове Геннадьевне Мироновой, Дмитрию Григорьевичу Яхварову и Фариде Кашифовне Алимовой за неоценимую помощь в работе.

Список литературы

- 1) Toxicological profile for white phosphorus // U.S. Department of health and human services. USA. 1997. 248 p.
- 2) Бадюгин И.С. Зажигательные и токсические свойства фосфора. Уроки Львовской аварии // Военно-медицинский журнал. 2009. Т.330, №9. С.20-26.
- 3) Rodriguez A., Bohn H.L., Johnson G.V. White phosphorus as a phosphatic fertilizer // Soil Sci. Soc. Am. Proc. 1972. V.36, N.2. P.364-366.
- 4) Jackman R.H., Lambert J.P., Rothbaum H.P. Red phosphorus as a fertilizer for grass-clover pasture // New Zealand Journal of Agricultural Research. 1970. V.13, N.2. P.232-241.
- 5) 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.
- 6) Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордоаньи Д.М., Кагиров Р.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Синяшин О.Г., Яхваров Д.Г. Анаэробная детоксикация белого фосфора осадком сточных вод водоочистных сооружений // Материалы XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Волгоград, 25-30 сентября. 2011. Т.3. С.477.
- 7) Миндубаев А.З., Белостоцкий Д.Е., Овусу-Африйе К., Мбама Ж.Л., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г., Алимова Ф.К. Анаэробная биодеградация белого фосфора осадком сточных вод // Сборник материалов Всероссийской конференции «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды». Новочебоксарск, 25-26 октября. 2012. С.118-119.
- 8) Mogensen A.S., Dolfing J., Haagensen F., Ahring B.K. Potential for Anaerobic Conversion of Xenobiotics // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2003. V.82. P.69-134.