

ПОИСК МЕТАБОЛИТОВ БЕЛОГО ФОСФОРА

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 26 декабря 2013 года

Аннотация

В предыдущих работах нами впервые была показана возможность биодegradации промышленного загрязнителя – белого фосфора осадком сточных вод из очистных сооружений. Также нами впервые получены культуры микроорганизмов, выработавших устойчивость к белому фосфору – в литературных источниках ссылки на подобные работы отсутствуют. Однако, биодegradация предполагает метаболический путь вещества, который в случае белого фосфора также неизвестен. В представленной работе описано исследование, посвященное поиску метаболитов белого фосфора, а также впервые составлен предполагаемый путь его метаболизма.

Ключевые слова: *детоксикация, белый фосфор, осадки сточных вод, анаэробные условия, метаболический путь, ядерный магнитный резонанс.*

Введение. Разнообразие микробных метаболических путей практически бесконечно, и постоянно происходит обнаружение новых. Если исходить из фундаментального постулата эволюции о том, что жизнь приспосабливается к любым неблагоприятным условиям, чему способствует естественный отбор, то возможности метода биодegradации еще далеко не исчерпаны и будут постоянно возрастать. Данный метод становится одним из наиболее часто применяемых для обезвреживания отходов, обогащенных неприродными веществами [1-3].

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 [4-10] позволили пролить свет на практически неизученный вопрос токсичности белого фосфора для прокариот, а также продемонстрировали факт взаимосвязи постепенного исчезновения белого фосфора и активности метаболических процессов в осадках сточных вод. Таким образом, впервые была подтверждена биодegradация элементного фосфора. Впервые выделены и охарактеризованы микроорганизмы, способные расти на субстратах, содержащих белый фосфор в концентрациях 0,01 % и даже 0,1 %: информация о живых организмах, выработавших устойчивость к этому загрязнителю, в литературных источниках не найдены. Таким образом, главная цель работы – доказательство именно биологической дegradации белого фосфора, в целом достигнута. Тем не менее, из закона сохранения массы следует, что исчезновение белого фосфора в осадке сточных вод должно сопровождаться накоплением продуктов его превращений. По спектру этих продуктов можно судить о путях метаболизма белого фосфора (практически не выявленных до сих пор), а также о перспективах и целесообразности практического внедрения биодegradации белого фосфора. Зачастую продукты метаболизма какого-либо вещества оказываются более опасными, чем исходный субстрат (так называемые летальные метаболиты), что накладывает ограничения на практическое применение метода. Поиск метаболитов белого фосфора и стал целью представленной работы.

Материалы и методы исследования.

При проведении экспериментов использовали смесь уплотненного (влажность 99%) и обезвоженного (влажность 81%) осадка сточных вод Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани. В качестве реактора использовалась 250 мл трехгорлая круглодонная колба с краном. Белый фосфор хранился под водой, перед внесением в субстрат был расплавлен на магнитной мешалке при 44 °С для образования мелкой суспензии. Процесс шел в мезофильном режиме при температуре 37 °С. Эксперимент продолжался 153 дня. Из них 65 дней субстраты находились в холодильнике, т.е. кинетика процессов имеет разорванный характер.

Состав субстрата:

Опыт. 37,5 г обезвоженного ОСВ + 4,95 г растительной биомассы, довели до 120 мл активным илом, + 30 мл суспензии белого фосфора (0,1281 г) в дистиллированной воде.

Контроль. 37,5 г обезвоженного ОСВ + 4,95 г растительной биомассы, довели до 150 мл уплотненным ОСВ.

Количественный состав газа был исследован с помощью метода газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) на колонке Порапак Q, длиной 2.4 метра, температурный режим составлял 80°С. Газ носитель - гелий. Детектор по теплопроводности.

Измерения концентраций элементов в субстратах проводились на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (фирма Thermo Scientific, США). Выбор спектральных линий обуславливался малыми шумами и отсутствием спектральных наложений. Измерения проводились по 3 раза, после чего результат усреднялся. Стандартизация проводилась с помощью 5 многоэлементных стандартов по 3 точкам для каждого из элементов. Относительная ошибка измерений, состоящая из случайных ошибок при разбавлении и ошибки прибора, не превышает 10 %. Анализ проводился в аксиальном режиме. Время промывки капилляров перед анализом 30 с. Скорость насоса при промывке 100 об/мин, во время анализа 50 об/мин. Поток аргона на распылителе и вспомогательный поток составляли 0,7 л/мин и 0,5 л/мин соответственно. Мощность, подаваемая на плазму, 1150 Вт. Интегрирование сигнала проводилось в течении 15 с. Более подробно исследование описано в [10].

Съемка ³¹P ЯМР проводилась на приборе Avance 400, фирма Bruker. Спектр был снят с водной фазы субстрата, отобранной на 147 день эксперимента. Для этого в отобранные опытный и контрольный образцы (по 5 мл) перед осаждением взвесей на центрифуге (4000 оборотов в мин, 30 мин) было добавлено по 1 мл 1н водного NaOH (до pH ≈ 9) с целью осаждения переходных металлов в виде нерастворимых гидроксидов, для предотвращения уширения сигналов. Очищенный образец прозрачный, светло-желтого цвета, с опалесценцией. Спектр снят с числом сканов 15000.

Результаты и их обсуждение.

Химия белого фосфора достаточно хорошо известна [12], но его метаболизм до сих пор не раскрыт, из литературы удается почерпнуть о нем только фрагментарные сведения [13]. Наши предыдущие исследования показали, что анаэробная микрофлора угнетается белым фосфором не сразу, а спустя достаточно продолжительный промежуток времени. Причем активность жизнедеятельности снижается плавно. Из этого наблюдения можно сделать вывод, что белый фосфор нетоксичен для микрофлоры, а угнетение осуществляется полупродуктами его метаболизма.

Одним из претендентов на эту роль является фосфин PH₃, который может образоваться из белого фосфора путем анаэробного восстановления. Фосфин, чрезвычайно токсичный газ (смерть может наступить при длительном вдыхании фосфина в концентрации 10 мг/м³ воздуха), применяется в сельском хозяйстве в качестве фумиганта: им протравливают хранящееся зерно. Легко гидролизующиеся фосфиды, например, фосфид цинка, используется как родентициды – при поедании грызунами они образуют фосфин в желудке [14]. Однако, фосфин нами не был обнаружен ни методом ³¹P ЯМР, ни газовой хроматографией. Против версии о влиянии фосфина на микрофлору говорит и следующий

факт. Согласно обзору [14], посвященному механизмам токсического действия фосфина, он является ядом, угнетающим клеточное дыхание и поражающим митохондрии. Собственно говоря, токсическое действие оказывает не фосфин, а продукт его окисления фосфиноксид, состоящий из двух таутомерных форм $\text{H}_3\text{P}=\text{O}$ и $\text{H}_2\text{P}(\text{OH})$, и образующийся в митохондриях. Из вышесказанного следует вывод, что в анаэробных условиях фосфин не должен проявлять токсических свойств. Этот вывод напрямую подтверждается на страницах [14], где сообщается об отсутствии токсичности фосфина для анаэробных микроорганизмов. В книге [15] приводится любопытное сравнение токсикологических свойств фосфина и белого фосфора. Авторы предполагают, что в организме белый фосфор восстанавливается до фосфина, чему есть косвенные подтверждения. А в справочнике [16] фосфор описывается как ферментный яд, тормозящий окислительные процессы в клетках. Таким образом, выстраивается логичная метаболическая цепочка белый фосфор \rightarrow фосфин \rightarrow фосфиноксид. Если она реально существует, то белый фосфор, так же как фосфин, не должен подавлять жизнедеятельность анаэробных микроорганизмов. И как раз это наблюдалось в наших исследованиях.

Тем не менее, сильное угнетение жизнедеятельности микрофлоры наблюдалось. Значит, токсичные продукты распада белого фосфора все-таки образуются. В работе [14] сообщается, что продуктами метаболизма фосфина у беспозвоночных являются фосфорноватистая и фосфористая кислоты – продукты дальнейшего окисления фосфиноксида. Гипофосфиты, в свою очередь, проявляют бактерицидные свойства. Для нас наиболее интересным фактом стало угнетающее действие гипофосфита на метаболизм метаногенной анаэробной микрофлоры, описанное в [17]. Причина заключается в том, что фосфорноватистая кислота является структурным аналогом муравьиной кислоты. Поэтому она эффективно ингибирует ферменты, ответственные за метаболизм формиата, играющий для метаногенных архей важнейшую роль.

Таким образом, вполне вероятно, что подавление жизнедеятельности микрофлоры в наших опытах было обусловлено накоплением гипофосфита. Тем не менее, данное подавление было обратимым, заканчивалось восстановлением метаболической активности. Значит, микрофлора смогла нейтрализовать предполагаемое воздействие гипофосфит-анионов. В статье [18] как раз описано микробное окисление гипофосфита и фосфита до фосфата в анаэробных условиях. Авторы указали на возможность анаэробного окисления фосфина, однако доказательств этому не нашли. Следует иметь в виду, что все три соединения являются сильными восстановителями, и могут окисляться даже сравнительно слабыми акцепторами электронов, присутствующими в среде обитания анаэробных бактерий. В [14], например, сообщается, что фосфин восстанавливает дисульфидные группы до сульфгидрильных. А в публикации [19] описано восстановление гипофосфита микрофлорой. Авторы продемонстрировали, что микроорганизмы активного ила продуцируют фосфин не только из фосфолипида лецитина и неорганического фосфата, но и из гипофосфита, хотя значительно медленнее и после продолжительной лаг-фазы. Возможно, гипофосфит является промежуточным продуктом биологического восстановления фосфата в фосфин («фосфатного дыхания», о котором часто сообщается в литературных источниках, но, к сожалению, нигде не приводится его схема).

Продуктом окисления гипофосфита является фосфористая кислота, которая обладает свойствами фунгицида [20], однако бактерии сравнительно легко метаболизируют ее в фосфат – наиболее естественную форму фосфора в живом организме [18].

Сопоставляя источники с результатами собственных экспериментов, мы предположили, что в наших субстратах белый фосфор окисляется до гипофосфитов и фосфитов, которые и оказывают угнетающее действие на микрофлору. Однако попытки доказать это столкнулись с определенными трудностями. Сам белый фосфор мы легко обнаруживали в субстратах как методом ГХМС в газовой фазе, так и ^{31}P ЯМР в экстрактах органическими растворителями (диэтиловый эфир, хлористый метилен). Однако полярные метаболиты следует искать в водной фазе, и они слишком малолетучи для анализа ГХМС. Съемка спектров ЯМР водной

фазы в нашем случае редко давала положительный результат, поскольку осадки сточных вод содержат высокие концентрации ионов металлов парамагнетиков (железо, никель, кобальт), попадающих туда, вероятно с, промышленных предприятий г. Казани [11]. Их присутствие приводит к недопустимому уширению сигналов в спектрах.

Следует также обратить внимание на очень высокое содержание фосфора в субстрате, достигающее почти 8% на сухой вес (что соответствует примерно 1,5% на сырой). Практически весь этот фосфор присутствует в виде солей и эфиров ортофосфорной кислоты. Таким образом, обнаружение сигнала фосфата тем или иным методом нам ни о чем не скажет – фосфат, образовавшийся из белого фосфора, станет незаметным на фоне фосфата, присутствующего в ОСВ изначально. Следовательно, интерес для нас представляют только сигналы фосфора, отличного от фосфата. На рисунке 1 мы приводим спектры ^{31}P ЯМР, снятые с контрольного и опытного образцов. В опытном спектре проявился только один сигнал в области 3,86 м.д., соответствующий фосфиту или гипофосфиту. К сожалению, 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.

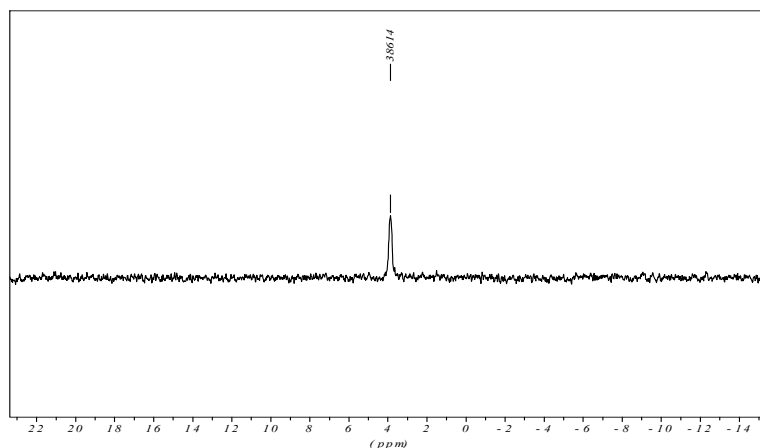


Рисунок 1. – Сигнал в области 3,86 м.д. спектра ^{31}P ЯМР, соответствующий фосфиту или гипофосфиту – возможным метаболитам белого фосфора

Известно, что белый фосфор диспропорционирует до фосфина и гипофосфита в щелочной среде, т.е. сигнал ЯМР может соответствовать не метаболиту, а продукту химического распада. Однако, согласно [13], для протекания этой реакции требуется нагрев выше температуры человеческого тела, который нами не проводился. Кстати, в этой же работе высказывается предположение о ферментативном окислении белого фосфора в гипофосфит в сыворотке крови.

Сигнал фосфата в области 0 ppm отсутствует: скорее всего, это связано с низкой водорастворимостью фосфатов, прочно связанных в клетках микроорганизмов. Вероятно, после осаждения образца на центрифуге в процессе подготовки к съемке спектра, практически весь фосфат остался в осадке. Тем более, что бактерии способны накапливать фосфор в виде полифосфата волютиновых гранул [21], который еще хуже растворим в воде. Спектр, снятый с контрольного образца одновременно с опытным, на том же приборе и в тех же условиях, вообще не содержит сигналы. Это служит доказательством того, что обнаруженные соединения действительно являются метаболитами белого фосфора.

Итак, если объединить информацию, полученную из наших спектрометрических данных и из рассмотренных литературных источников, посвященных метаболическому восстановлению и окислению фосфора, то можно изобразить следующую схему предполагаемого метаболизма белого фосфора (рисунок 2).

Разумеется, представленная схема сильно упрощена. Нам еще ничего не известно о задействованных в метаболизме элементарного фосфора ферментных системах, поэтому они не указаны. Точно так же мы не стали показывать на схеме предполагаемые органические метаболиты (замещенные фосфины, фосфинаты и фосфонаты, в конечном счете также окисляющиеся до фосфата) по причине того, что они еще не найдены. Конечно, очень важно получить более точные спектральные данные для однозначной идентификации метаболита с рисунка 1. Однако, на основании литературных данных, можно предположить, что это все-таки гипофосфит, поскольку именно он угнетает рост бактерий и с трудом подвергается дальнейшему метаболизму, особенно в анаэробных условиях. Следовательно, он и должен накапливаться в период угнетения роста микрофлоры.

Изначально предполагались два генеральных пути метаболизма белого фосфора: восстановление до фосфина, либо окисление до кислородсодержащих кислот. Спектроскопия ^{31}P ЯМР показала реализацию второго варианта – накопление в субстрате водорастворимого метаболита, предположительно, гипофосфита или фосфита. Этот результат подтверждается и кинетикой изменения активности микрофлоры после внесения белого фосфора: гипофосфиты вызывают бактериостатический эффект, который нами и наблюдался. Далее гипофосфиты и фосфиты могут окисляться в безвредный фосфат – это следует из литературных данных. Этот результат отнюдь не исключает возможность существования других метаболических путей – со временем приведенная схема превращений наверняка будет усложняться. Следующим важнейшим этапом исследований станет поиск ферментных систем, участвующих в разложении белого фосфора.

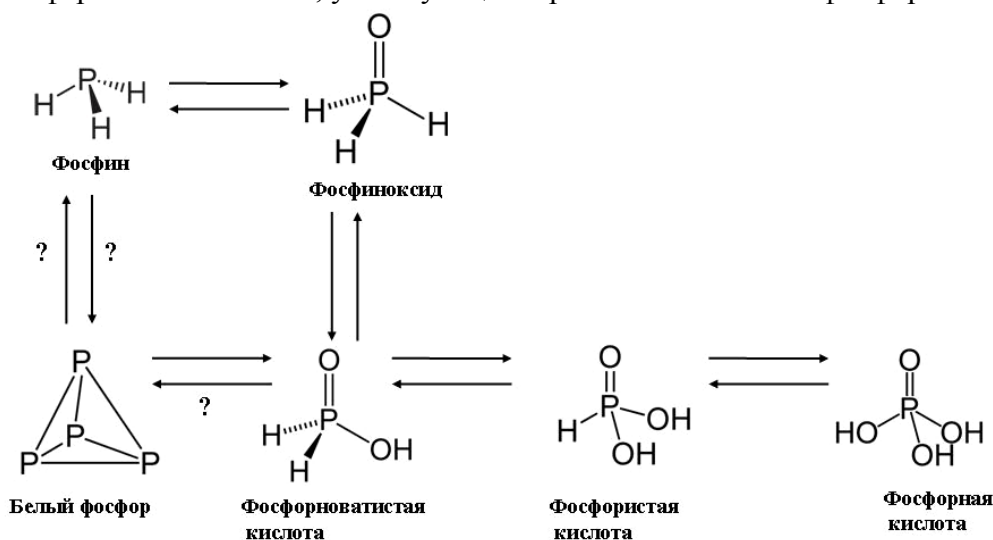


Рисунок 2. – Предполагаемый метаболический путь белого фосфора (знаком вопроса обозначены еще не обнаруженные превращения).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-08-31091 мол_а. Авторы выражают искреннюю признательность Салиме Тахиятулловне Минзановой, Любове Геннадьевне Мироновой, Дмитрию Григорьевичу Яхварову, Шамилю Камилевичу Латыпову, Фариде Кашифовне Алимовой за неоценимую помощь в работе.

Список литературы

- 1) Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.O. Organization of Metabolic Pathways and Molecular-Genetic Mechanisms of Xenobiotic Degradation in Microorganisms: A Review // Applied Biochemistry and Microbiology. 2008. V.44, N.2. P.117-135.
- 2) Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Биodeградация как метод переработки отходов. Часть 1. Биodeградация ксенобиотиков // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.33, №3. С.1-37.
- 3) 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.

- 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., Яхваров Д.Г. Биологическая деградация белого фосфора: осуществимость и перспективы // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.33, №2. С.1-17.
- 7) 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.
- 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) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Белый фосфор как новый объект биodeградации // Грани науки. 2013. Т.1, №1. С.65-68.
- 10) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Зависимость скорости деструкции белого фосфора в осадке сточных вод от интенсивности микробного метаболизма // Грани науки. 2013. Т.1, №2. С.58-62.
- 11) 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.
- 12) Холин К.В., Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Волошина А.Д., Белостоцкий Д.Е., Зобов В.В., Миронов В.Ф., Коновалов А.И., Алимова Ф.К., Галеева Э.И., Нефедьев Е.С. Физико-химический и биохимический анализ отработанных биогазовых субстратов, а также перспективы их практического применения // Вестник Казанского технологического университета. 2010. №2. С.457-464.
- 13) Милюков В.А., Будникова Ю.Г., Синяшин О.Г. Органическая химия элементного фосфора. Успехи химии. 2005. Т.74, №9. С.859-885.
- 14) Toxicological profil for white phosphorus. U.S. Department of health and human services. USA. 1997. 248 p.
- 15) Nath N.S., Bhattacharya I., Tuck A.G., Schlipalius D.I., Ebert P.R. Mechanisms of Phosphine Toxicity // Journal of Toxicology. 2011. V.2011. P.1-9.
- 16) Krieger R.I. Handbook of Pesticide Toxicology // Academic Press. 2001. P.1908. T.W. Clarkson. Chapter 61 – Inorganic and Organometal Pesticides. P.1357-1428.
- 17) Голиков С.Н. Неотложная помощь при острых отравлениях. М.: Изд. Медицина. 1978. 312 с.
- 18) 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. P.177-188.
- 19) 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, N.5. P.937-944.
- 20) Rutishauser B.V., Bachofen R. Phosphine Formation from Sewage Sludge Cultures // Anaerobe. 1999. V.5, N.5. P.525-531.
- 21) Griffith J.M., Smillie R.H., Niere J.O., Grant B.R. Effect of phosphate on the toxicity of phosphite in *Phytophthora palmivora* // Arch Microbiol. 1989. V.152, N.5. P.425-429.
- 22) Kuroda A., Ohtake H. Molecular Analysis of Polyphosphate Accumulation in Bacteria // Biochemistry. 2000. V.65, N.3. P.304-308.