

## ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТОВ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ БЕЛОГО ФОСФОРА 0.1% НА ПРЕДМЕТ МЕТАБОЛИТОВ И УСТОЙЧИВОЙ МИКРОФЛОРЫ

*Горбачук Е.В.<sup>1</sup>, Миндубаев А.З.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 420088, г. Казань, ул. Арбузова 8.

*e-mail: mindubaev@iopc.ru*

*поступила в редакцию 03 июня 2014 года*

### Аннотация

Методом <sup>31</sup>P ЯМР установлено, что белый фосфор подвергается метаболическому окислению до водорастворимых продуктов – гипофосфита и фосфита. Дальнейший метаболизм этих соединений должен приводить к безвредному фосфату, что открывает перспективы практического использования метода. В предыдущих работах нами впервые получены культуры микроорганизмов, выработавших устойчивость к белому фосфору. При этом основное внимание уделялось концентрации P<sub>4</sub> 0.01% по массе, поскольку в ней белый фосфор подвержен биодegradации. Нами также наблюдались микроорганизмы в субстратах с еще более высокой концентрацией белого фосфора, однако они не были охарактеризованы. В представленной работе мы выделили и описали бактерии из ОСВ с содержанием белого фосфора 0.1% по массе.

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

**Введение.** Метод биодegradации становится одним из наиболее часто применяемых для обезвреживания отходов, обогащенных неприродными веществами [1,2].

В предыдущих наших исследованиях [3-11] был предпринят поиск метаболитов белого фосфора. Из литературных источников не удалось извлечь информацию о метаболическом пути этого ксенобиотика. В спектре <sup>31</sup>P ЯМР, снятом с водной фазы ОСВ, нами был обнаружен сигнал, идентифицированный по химическому сдвигу как фосфит или гипофосфит [10,11]. Поскольку спектр был снят с развязкой по протонам, мы не могли более точно установить степень окисления фосфора. Более подробное ознакомление с продуктами метаболизма исследуемого вещества стало нашей приоритетной задачей.

В предшествующих работах нами впервые были описаны культуры микроорганизмов, устойчивые к белому фосфору [3,4,8]. При этом основной акцент ставился на концентрацию P<sub>4</sub> 0.01% по массе, поскольку в ней белый фосфор подвержен биодegradации. Нами также наблюдались микроорганизмы в субстратах с еще более высокой концентрацией белого фосфора, однако они не были охарактеризованы. В представленной работе мы выделили и описали бактерии из ОСВ с содержанием белого фосфора 0.1% по массе. Факт устойчивости микроорганизмов к такой концентрации токсиканта удивителен и является примером приспособительных возможностей живых организмов.

**Материалы и методы исследования.** Поиск метаболитов белого фосфора осуществлялся в том же самом субстрате, что использовался в работе [10]. После окончания эксперимента субстраты хранились на протяжении четырех лет при комнатной температуре, без яркого освещения, герметично закрытые.

Съемка <sup>31</sup>P ЯМР проводилась на приборе Avance 400, фирма Bruker. Спектры были сняты с водной фазы субстрата, отобранной через 1576 суток после первой съемки (опыт) и на 1581 сутки (контроль). 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). Очищенные образцы прозрачные, светло-желтого цвета, без опалесценции. Спектры сняты с количеством сканов 30000, без развязки по протонам.

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

Микробиологический посев производился из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 0.1%. Реакторы – 200 мл мерные склянки. Уплотненный и обезвоженный ОСВ были отобраны в середине января. Влажность обезвоженного ОСВ составила 77.8 %, влажность уплотненного 98.1%. Режим термостатирования термофильный (50 °С). Данный эксперимент был поставлен с целью узнать, как на деградацию белого фосфора и его токсические свойства влияет агрегатное состояние. Температура плавления белого фосфора составляет 44 °С, т.е. в термофильных условиях он представляет собой жидкость. Эксперимент проводился в трех повторах и продолжался 148 суток. После окончания процесса субстраты хранились на протяжении 913 суток при комнатной температуре, без яркого освещения, герметично закрытые. Из контрольного и опытного субстратов были произведены посеы микроорганизмов на плотную питательную среду МПА в чашке Петри. Инкубация продолжалась 48 часов (температура 37 °С). Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путем изучения морфологии бактерий и их колоний.

Еще из того же самого субстрата был произведен посев анаэробных бактерий. Условия: пробирки, герметично закрытые резиновыми пробками. Среда Ван-Дель-Дена для сульфатредукторов следующего состава (в г на 1 л воды): аспарагин—1.0 (использовали рацемат D, L); MgSO<sub>4</sub> – 1.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.5; тартрат калия – 5.0, цитрат железа III – 0.2. Рост в термостате при 37 °С в течение пяти суток. Рост культур сопровождался выпадением черного осадка сульфида железа – маркера интенсивности роста сульфатредукторов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** На рисунке 1 приведены спектры <sup>31</sup>P ЯМР, снятые с опытного (вверху) и контрольного (внизу) образцов спустя 1570 (опыт) и 1575 (контроль) суток после окончания эксперимента. В обоих спектрах проявился интенсивный синглет в области 1.5 ppm, соответствующий фосфату. В опытном спектре, кроме него, присутствует дублет при 0.3 и 3.7 ppm, идентифицированный как фосфит, а также сигнал при 6.2 ppm, принадлежащий гипофосфиту. Вероятно, данный сигнал является центром триплета. Другой сигнал триплета наложился на сигнал при 3.7 ppm, из-за чего он стал несколько интенсивнее, а третий не виден из-за шумов – его интенсивность очень мала. Таким образом, спектр соответствует соединениям, которые, предположительно, являются метаболитами белого фосфора, т.е., является подтверждением предполагаемого нами метаболического пути. Сам белый фосфор мы в приведенном спектре не наблюдаем из-за его чрезвычайно низкой растворимости в воде.

Спектр на рисунке 1 (внизу), снятый с контрольного образца одновременно с опытным, на том же приборе и в тех же условиях, содержит только сигнал фосфата, изначально входившего в состав ОСВ. Это служит доказательством того, что обнаруженные гипофосфит и фосфит действительно являются метаболитами белого фосфора. Мы предполагаем, что фосфин также есть среди метаболитов белого фосфора, однако обнаружить его непросто: будучи газом, фосфин беспрепятственно улетучивается из ОСВ. К тому же, в присутствии солей переходных металлов он склонен образовывать нерастворимые фосфиды и комплексные соединения, в том числе и в субстратах биологического происхождения. Например, в гуано морских птиц [12]. В работе [13] есть ссылки на биологическое восстановление фосфата через фосфит и гипофосфит до фосфина (фосфатное дыхание), также отраженное нами на схеме в статьях [10, 11]. Возможно, фосфин и является предшественником гипофосфита. Для замещенных фосфинов метаболизм в соответствующие фосфиноксиды (более устойчивые, чем незамещенный фосфиноксид) культурами грибов уже известен [14].

Следует обратить внимание на то, что в ранних спектрах, приведенных в предыдущих статьях [10,11], отсутствует сигнал фосфата. Значит, за период хранения субстратов растворимость фосфата в них по какой-то причине выросла. Возможно, это обусловлено

гидролизом полифосфатов волютиновых зерен в условиях нехватки питательных веществ у бактерий в период хранения субстратов [15].

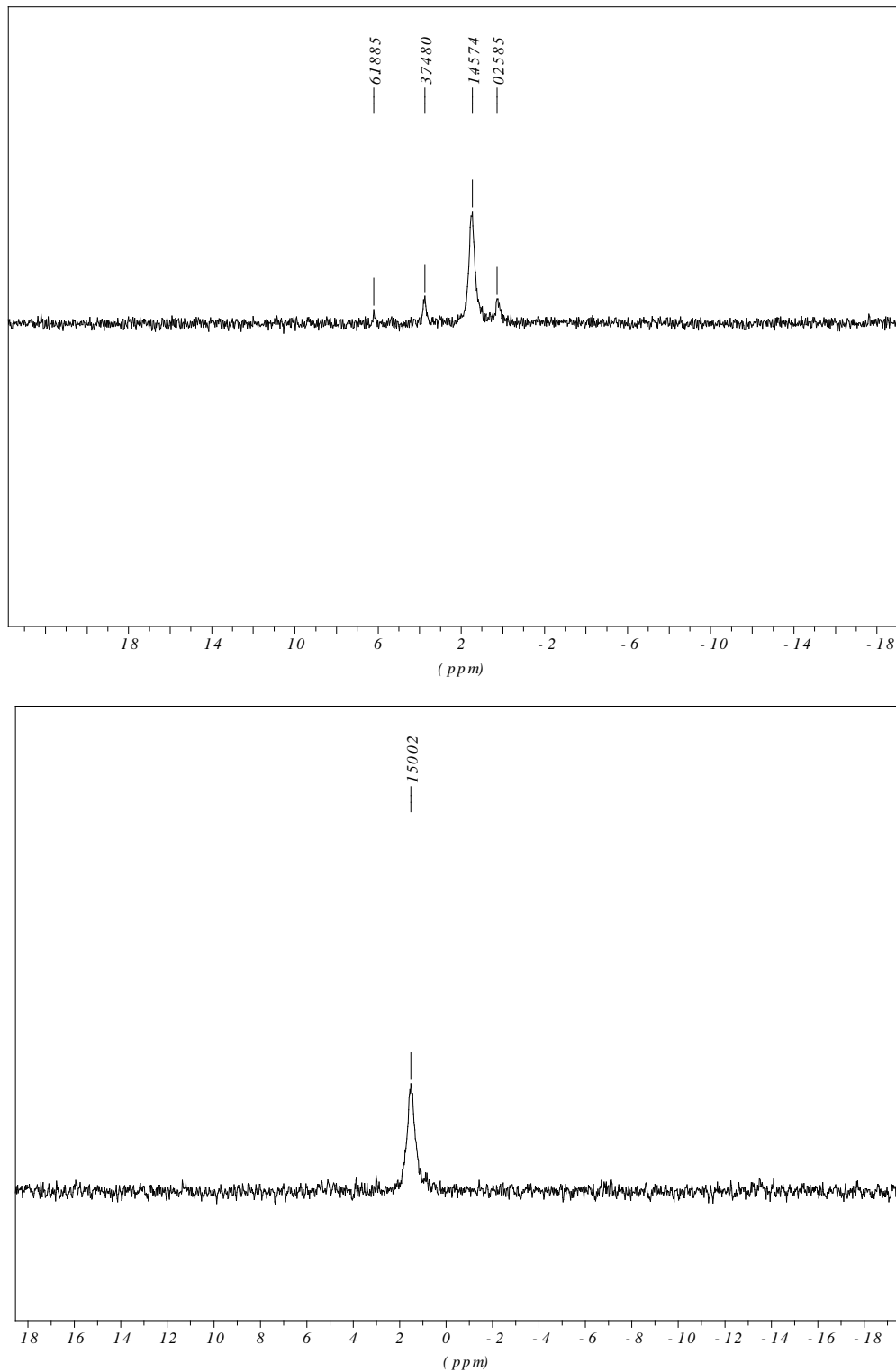
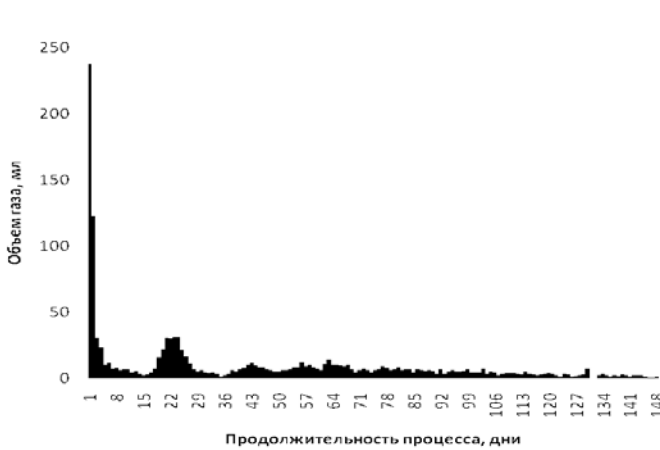


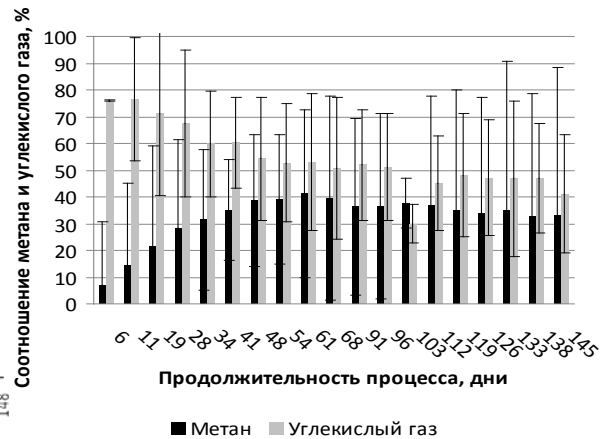
Рисунок 1. – Сигналы в области 0.25 и 3.75 ppm спектра  $^{31}\text{P}$  ЯМР (вверху), соответствуют фосфиту. Сигнал в области 6.19 ppm относится к гипофосфиту. Оба вещества рассматривались как возможные метаболиты белого фосфора. Сигнал в области 1.46 ppm относится к фосфату. Спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР, снятый с контроля (внизу), содержит только сигнал фосфата при 1.50 ppm – значит, остальные сигналы в опытном спектре действительно принадлежат водорастворимым 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. Но следует иметь в виду, что белый фосфор практически нерастворим в воде. Его растворимость составляет всего 0.0003 г / л при 15 °С [16]. Поэтому, на момент добавления щелочи его концентрация в пробе была исчезающе мала и не могла служить источником продуктов распада, улавливаемых методом ЯМР. То есть, эти продукты возникли еще до внесения щелочи в пробу.

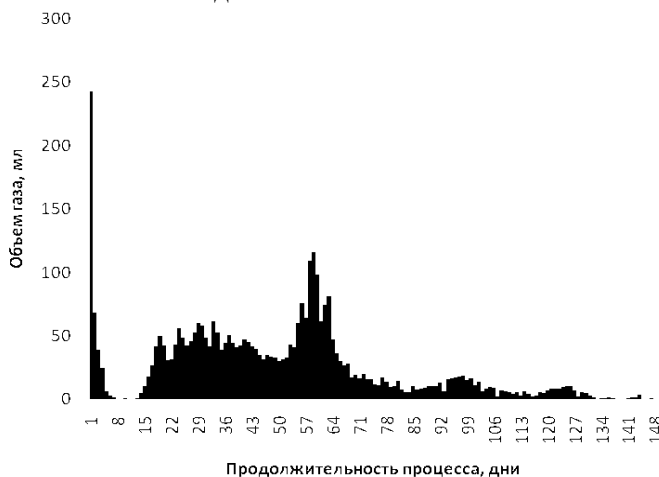
Согласно [17], еще в 1970 гг проводились исследования метаболизма белого фосфора у животных. Лабораторным крысам перорально вводился раствор белого фосфора, меченого радиоактивным изотопом  $^{32}\text{P}$ , в арахисовом масле. В моче животных была обнаружена радиоактивная метка в составе двух фракций: неорганического фосфата, и органического фосфата в составе биологических веществ. Таким образом, работа не только проливает свет на метаболизм  $\text{P}_4$ , но и является первым указанием на его включение в природный круговорот фосфора. Однако, в упомянутом исследовании не были обнаружены промежуточные продукты окисления. Они-то и были найдены впервые в представленной работе. В предыдущих работах [10,11] мы приводили примеры биологического окисления гипофосфита и фосфита до фосфата – абсолютно безвредной составляющей части всех живых организмов. Следовательно, данный результат открывает блестящие перспективы практического применения биодегradации белого фосфора.



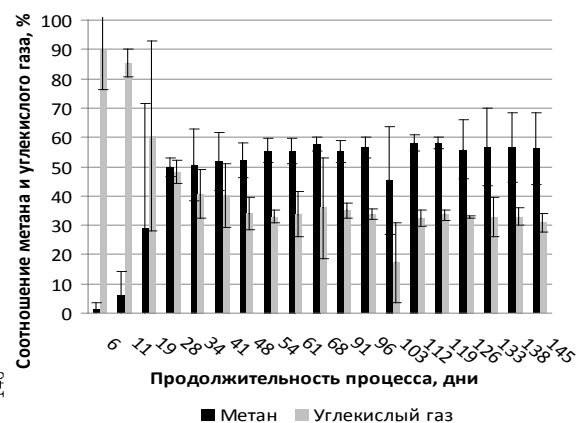
A1. Кинетика выделения газа в опыте



A2. Кинетика изменения состава газа в опыте



B1. Кинетика выделения газа в контроле



B2. Кинетика изменения состава газа в контроле

Рисунок 2. – Кинетики выделения газа (слева) и изменения состава газа (справа) в эксперименте.

Эксперимент с термофильными условиями показал, что температурный режим и агрегатное состояние белого фосфора заметным образом не сказываются на его токсических свойствах. В любом случае, концентрация 1:1000 слишком велика и адаптация микрофлоры не наблюдается. Как видно из диаграмм (рисунок 2), на протяжении всего эксперимента

выделение газа плавно снижалось. Это означает накопление в субстрате токсичных метаболитов и прогрессирующее угнетение микрофлоры. Удельный выход газа в опыте составил 9.0 мл газа / мл субстрата, а в контроле 24.0 мл газа / мл субстрата (рисунок 2, А1, Б1). К концу эксперимента из трех повторов опыта признаки жизнедеятельности демонстрировал только один.

В опыте наблюдается очень сильный разброс значений по составу газа, в контроле такой разброс значительно меньше (рисунок 2, Б1, Б2). Низкая сходимость значений в опыте объясняется тем, что интоксикация белым фосфором (или продуктами его распада) нарушает правильную кривую роста анаэробных бактерий, наблюдаемую в контроле.

Несмотря на сильное угнетение, на поверхности опытного субстрата выросли колонии бактерий, а в контроле они не наблюдались.

Микроорганизмы были идентифицированы по морфологическим признакам как представители рода *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. subtilis* var. *mesentericus*, *B. cereus* и *B. macerans*). Представители данной группы часто выступают в роли деструкторов неприродных соединений, однако устойчивость к белому фосфору наблюдается для них впервые.

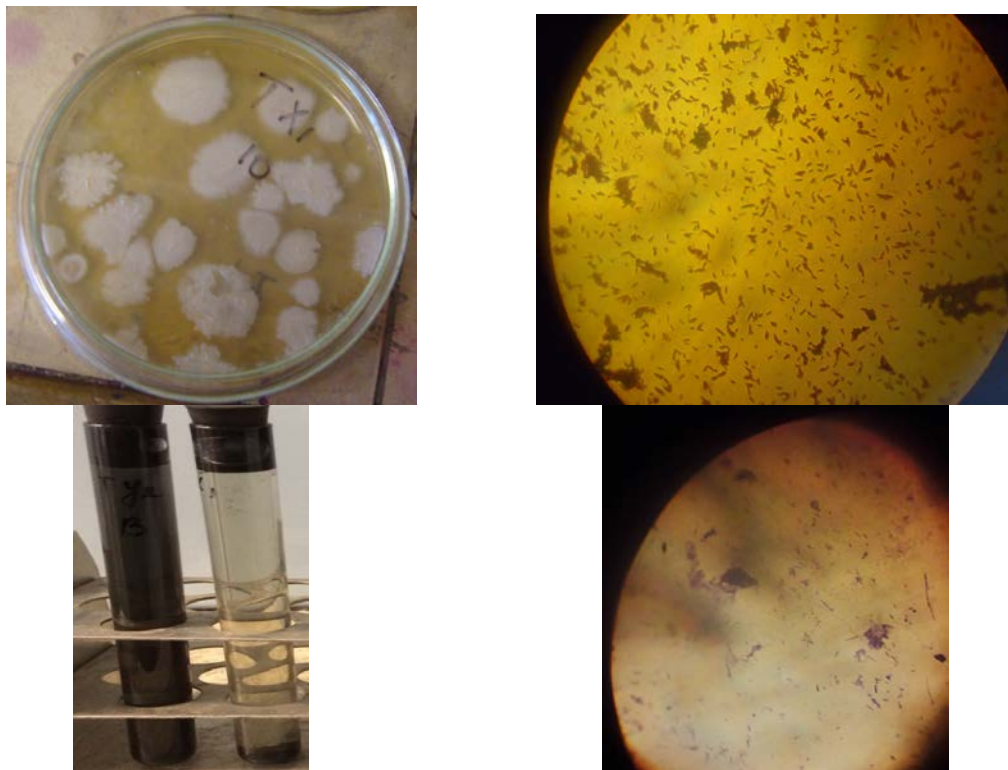


Рисунок 3. – Колонии бацилл, устойчивых к белому фосфору в концентрации 0.1% по массе (вверху, слева) и окрашенный по Граму мазок (световой микроскоп, увеличение в 600 раз)(вверху, справа).

Внизу слева – культуры сульфатредукторов (левая пробирка - контроль, среда в ней содержит заметно больше осадка, правая - опыт), внизу справа окрашенный по Граму мазок из опытной пробирки (световой микроскоп, увеличение в 600 раз).

В аэробных условиях на пластинках МПА в чашках Петри наблюдались преимущественно колонии бацилл (рисунок 3, вверху).

*Bacillus subtilis*: подвижные палочки, одиночные или соединенные в цепочки. Споры расположены центрально. Колонии сухие, морщинистые, срастающиеся с агаром.

*Bacillus subtilis* var. *mesentericus*: подвижные палочки, одиночные или соединенные в цепочки. Споры расположены центрально. Колонии тонкие, сухие, морщинистые, не срастаются с агаром.

*Bacillus cereus*: подвижные толстые палочки, одиночные или соединенные в цепочки. Споры расположены центрально. Колонии толстые, со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями.

*Bacillus macerans*: подвижные палочки, одиночные или соединенные в цепочки. Споры расположены терминально, придавая клеткам булабовидную форму. Колонии от светло-бежевого до бежевого цвета, блестящие, однородные, круглые, края неровные.

Следует отметить, что наиболее активный рост сульфатредукторов (отслеживаемый по интенсивности выпадения черного осадка) наблюдался в посевах из контроля, где белого фосфора не было (рисунок 3, внизу). Значит, белый фосфор угнетает сульфатредукторов – облигатных анаэробов. Этот результат хорошо коррелирует с полученными нами ранее в отношении метаногенов – тоже строгих анаэробов. В предыдущих исследованиях нами было показано, что присутствие белого фосфора подавляет метаногенез [5-7, 10]. Представленный результат служит еще одним подтверждением того, что строгие анаэробы не принимают участие в биодеградации белого фосфора.

Таким образом, концентрация белого фосфора 0.1% по массе слишком велика для микрофлоры ОСВ и не подвергается полной деструкции, однако даже при такой концентрации у микроорганизмов вырабатывается устойчивость. Судя по резко сниженному выделению газа в опыте по сравнению с контролем, адаптированные бактерии имеют замедленный метаболизм.

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-08-31091 мол\_а. Авторы выражают искреннюю признательность Александре Дмитриевне Волошиной, Наталье Владимировне Кулик, Салиме Тахиятулловне Минзановой, Любове Геннадьевне Мироновой, Дмитрию Григорьевичу Яхварову, Хасану Рафаэлевичу Хаярову и Фариде Кашифовне Алимовой за неоценимую помощь в работе.

#### Список литературы

- 1) Singh B.K., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. // FEMS Microbiol Rev. 2006. V.30,N.3. P.428-471.
- 2) Ермакова И.Т., Винокурова Н.Г., Зеленкова Н.Ф., Баскунов Б.П., Леонтьевский А.А. Трансформация тиоморфолина грибом *Bjerkandera adusta* // Микробиология. 2008. Т.77,№5. С. 617-622.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Болормаа Ч. Возможность анаэробной биодеградации белого фосфора // Экологический вестник Северного Кавказа. 2013. Т.9,№2. С.4-15.
- 6) Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Связь между микробным метаболизмом и скоростью деструкции белого фосфора в осадке сточных вод // Экологический вестник Северного Кавказа. 2014. Т.10,№1. С.88-96.
- 7) Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Новое подтверждение биодеградации белого фосфора // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.36, №10. С.1-12.
- 8) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Белый фосфор как новый объект биодеградации // Грани науки. 2013. Т.1,№1. С.65-68.
- 9) 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.
- 10) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Поиск метаболитов белого фосфора // Грани науки. 2014. Т.2,№1. С.82-87.

- 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) Zhu R., Sun L., Kong D., Geng J., Wang N., Wang Q., Wang X. Matrix-bound phosphine in Antarctic biosphere // Chemosphere. 2006. V.64,N.8. P.1429-1435.
- 13) Jenkins R.O., Morris A., Craig P.J., Ritchie A.W., Ostah N. Phosphine generation by mixed – and monoseptic – cultures of anaerobic bacteria // The Science of the Total Environment. 2000. V.250,N1-3. P.73-81.
- 14) Holland H.L., Carey M., Kumaresan S. Fungal biotransformation of organophosphines // Xenobiotica. 1993. V.23,N.5. P.519-524.
- 15) Mino T. Microbial Selection of Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Activated Sludge Wastewater Treatment Processes for Enhanced Biological Phosphate Removal // Biochemistry (Moscow). 2000. V.65,N.3. P.341-348.
- 16) Зефилов Н.С., Кулов Н.Н., Золотов Ю.А., Кабанов В.А., Колечиц И.В., Колотыркин Я.М., Коптюг В.А., Кутепов А.М., Малюсов В.А., Нефедов О.М., Тальрозе В.Л., Спирин А.С., Степанов Н.Ф., Шолле В.Д., Ягодин Г.А. Химическая энциклопедия // Изд. Большая российская энциклопедия. 1998. Т.5. ТРИ-ЯТР. 783 с.
- 17) Lee C.C., Dilley J.V., Hodgson J.R., Helton D.O., Wiegand W.J., Roberts D.N., Anderson B.S., Halfpap L.M., Kurtz L.D. Mammalian Toxicity of Munitions Compounds. Phase I: Acute Oral Toxicity, Primary Skin and Eye Irritation, Dermal Sensitization and Disposition and Metabolism // Report No 1, AD B011150. Midwest Research Institute, Kansas City, MO DAMD-17-74-C-4073. 1975. 101 p.