

УДК 574; 574.9; 581.5; 613.1; 631.46
DOI 10.18413/2075-4671-2019-43-1-87-97

ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ СРЕД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ БЕЛЫМ ФОСФОРОМ

RATIONAL FOR THE METHOD OF BIOLOGICAL PURIFICATION OF ENVIRONMENTS CONTAMINATED WITH WHITE PHOSPHORUS

А.З. Миндубаев¹, Э.В. Бабынин², А.Д. Волошина¹, Х.Р. Хаяров², Е.К. Бадеева¹,
С.Т. Минзанова¹, Л.Г. Миронова¹, Й.А. Акосах²
A.Z. Mindubaev¹, E.V. Babynin², A.D. Voloshina¹, Kh.R. Khayarov², E.K. Badeeva¹,
S.T. Minzanova¹, L.G. Mironova¹, Ya.A. Akosah²

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
Россия, 420088, г. Казань, ул. Арбузова, 8

²Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

¹Institution of Science A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific
Center of Russian Academy of Sciences,
8 Arbuzova St, Kazan, 420088, Russia

²Kazan (Volgaregion) Federal University
18 Kremlevskaya St, Kazan, 420008, Russia

E-mail: mindubaev-az@yandex.ru; edward.b67@mail.ru; microbi@iopc.ru; khayarov.kh@gmail.com;
ybadeev.61@mail.ru; minzanova.salima@yandex.ru; mironoval1963@gmail.com;
akosah2005@gmail.com

Аннотация

Белый фосфор P₄ является веществом первого класса опасности. Тем не менее, не исключается проникновение данного вещества в окружающую среду, поскольку белый фосфор находит применение в промышленности и в военных целях. Следовательно, работы над созданием методов детоксикации этого вещества актуальны. Нашим коллективом впервые наблюдался рост микроорганизмов (грибов, стрептомицетов и бактерий) в культуральных средах, содержащих в качестве единственного источника фосфора белый фосфор. В данных средах микроорганизмы не только не погибали, но и не демонстрировали признаки фосфорного голодания. Это первый пример вхождения белого фосфора в природный круговорот биогенного элемента фосфора. В эксперименте самая высокая концентрация соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в пять тысяч раз, а в питьевой воде – в сто миллионов раз. После обнаружения метаболитов белого фосфора предложена схема его метаболизма. Впервые наблюдался рост устойчивости микробных культур к данному ксенобиотику. Показано, что устойчивость культур микроорганизмов к белому фосфору зависит от их таксономической принадлежности – штаммы грибов *Aspergillus niger* адаптируются к нему лучше, чем бактерии. Выделен штамм *Aspergillus niger*, наиболее устойчивый к высоким концентрациям токсиканта. Обоснована возможность создания и использования биологического метода ликвидации загрязнений белым фосфором.

Abstract

White phosphorus P₄ is a first class hazardous material. However, the introduction of this substance into the environment is undeniable, since white phosphorus is used in the industry and for military purposes. Consequently, the invention of efficient methods for detoxifying this substance is of great relevance. Our team was premier in observing the growth of microorganisms (fungi, streptomycetes and bacteria) in culture media containing white phosphorus as the sole source of phosphorus. In addition to survival, the absence of phosphorus starvation was likewise observed among microbes growing under such conditions. This is the first example of the introduction of white phosphorus into the natural cycle of



the biogenic element phosphorus. The highest P_4 concentration at which microbial growth is observed exceeds the TLV of P_4 in wastewater by five thousand times, and in drinking water by a hundred million times! Following the discovery of white phosphorus metabolites, a pathway of its metabolism has been proposed. For the first time, an increase in the resistance of microbial cultures to this xenobiotic was observed. It has been shown that the resistance of microorganism cultures to white phosphorus depends on their taxonomic identity: strains of the fungi *Aspergillus niger* adapt to it better than bacteria. A strain of *Aspergillus niger*, with the highest resistance to excessive concentrations of the toxicant, was isolated. Hence, the possibility of creating and using a biological method for the removal of white phosphorus contaminants is justified.

Ключевые слова: биодegradация, белый фосфор, защита окружающей среды, химическое загрязнение, химические отходы.

Keywords: biodegradation, white phosphorus, environmental protection, chemical pollution, chemical waste.

Введение

Биодegradация является важным методом обезвреживания промышленных стоков, содержащих самые разнообразные неприродные вещества – ксенобиотики. Преимущество биодegradации, по сравнению с другими методами детоксикации стоков, в ее сравнительной безопасности для окружающей среды. Фактически, применяются отработанные эволюцией естественные механизмы самоочистки биосферы [Миндубаев, 2018].

На основе литературных источников [Brysketal., 1969; Fugantietal., 1974; Jenrichetal., 2007; Jiangetal., 2010; Morgan, Greenberg, 2010; Kalyuzhnaya et al., 2015; Kang, Lee, 2016] можно изобразить показательную схему усвоения сразу нескольких токсичных веществ в едином метаболическом пути, демонстрирующий совершенство биохимии микроорганизмов. Включение нескольких токсичных ксенобиотиков (метан, бензол или фенол, синильная кислота) в состав сахаров и аминокислот, является, пожалуй, наиболее показательным примером биодegradации.

Это является весомым аргументом в пользу возможности биодegradации даже такого опасного ксенобиотика, как белый фосфор.

Белый фосфор (вещество технической чистоты носит название «желтый фосфор») – вещество, чрезвычайно опасное в обращении. Его токсичность очень велика, что и позволяет относить белый фосфор к первому классу опасности [Toxicological profile for white phosphorus, 1997]. Предложения отказаться от применения белого фосфора раздавались на всем протяжении его использования. Тем не менее, белый фосфор на протяжении последних трехсот лет находит применение. Причина этого – сравнительно низкая цена, доступность и многообразие химических превращений. Таким образом, белый фосфор – это своего рода узловая точка, связывающая природные месторождения фосфатов и все многообразие фосфорсодержащих продуктов химической промышленности.

В настоящее время производство белого фосфора охватил кризис, связанный с постепенным отказом от фосфорорганических пестицидов – одного из важнейших продуктов переработки P_4 . Тем не менее, спрос на другие товары, производимые из белого фосфора – фосфорный ангидрид, красный фосфор, термическую фосфорную кислоту, фосфиды, нисколько не падает, и вряд ли упадет. К тому же, сейчас мы становимся свидетелями возникновения новой сферы применения фосфорорганических соединений – в качестве лекарственных препаратов. Их производство вполне способно заместить утраченную нишу пестицидов. Внедрение на мировом рынке новых лекарств приведет к новому витку роста производства белого фосфора. Следовательно, работы по обезвреживанию утечек и розливов этого вещества тоже не утратят актуальность.

Доля России в мировом потреблении белого фосфора в 2004 г. составляла 5.7 % (Китая 71.1 %, США 8.6 %, Казахстана 8.1 %, Западной Европы 5.8 %, Индии 0.7 %) (Gleason, 2004). Согласно <http://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/phosphorus.html>, 70 % произведенного белого (желтого) фосфора уходит на производство высокочистой, термической, фосфорной кислоты, 18 % превращается в треххлористый фосфор (мировое производство PCl_3 составляет 700000 т.), 5 % – в пентасульфид фосфора, 2 % – в восстановитель гипофосфит натрия, 1 % – в красный фосфор, и остальные 4 % на другие нужды (производство гербицида глифосата, фосфидов, фосфина: последнего в мире в год производится 1500 т). В этой связи, опасность обращения и контакта с белым фосфором придает актуальность работам по его обезвреживанию.

В настоящее время в Российской Федерации производство белого фосфора отсутствует. Тем не менее, его использование на промышленных предприятиях сохраняется. Следует особо указать на тот факт, что все загрязнения белым и желтым фосфором на территории РФ находятся в бассейне реки Волга (рис. 1, вверху слева) – важнейшей водной и транспортной артерии нашей страны, в регионе с самой высокой плотностью населения в России. Соответственно, связанные с загрязнениями экологические риски очень велики.

36 ПОВОЛЖЬЕ

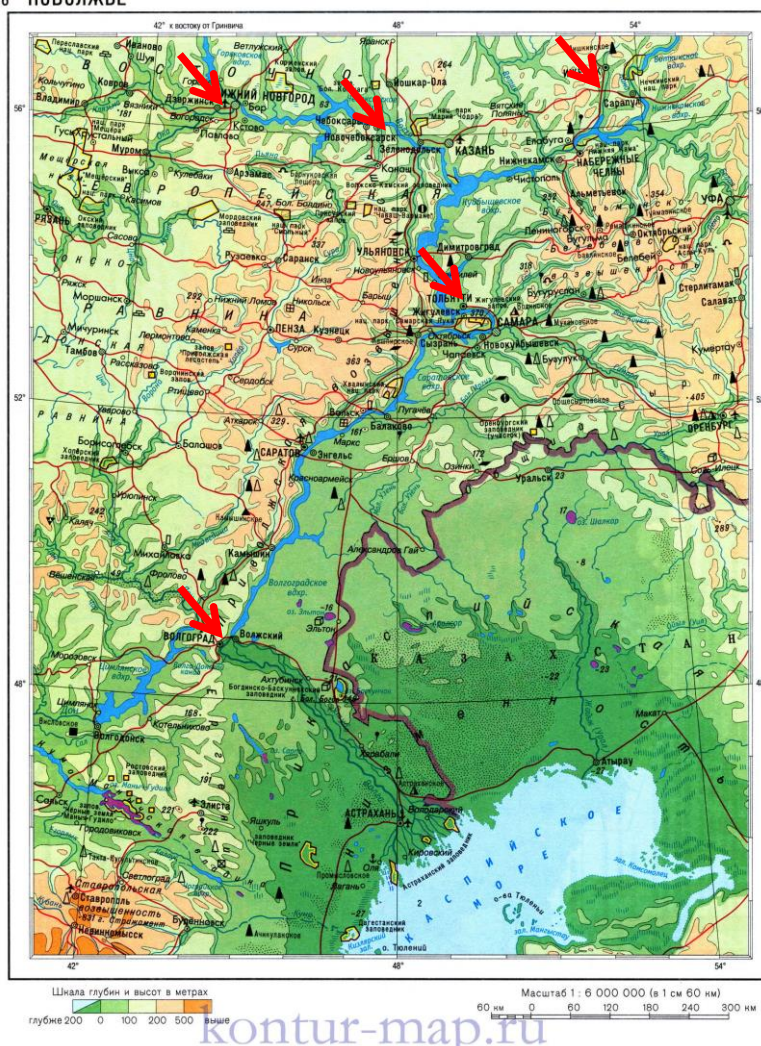


Рис. 1. Большая физическая карта Поволжья с сайта <http://rus-map.ru>. Стрелками обозначены загрязнения желтым фосфором (обозначения автора).

Fig. 1. A large physical map of the Volga region from the site <http://rus-map.ru> Red arrows indicate contamination with yellow phosphorus (author's designations).



Белый фосфор закупается, например, Республикой Чувашия в качестве сырья для ПАО Новочебоксарский Химпром. Кроме того, на территории Чувашии находятся полигоны захоронения химических отходов, в том числе и желтого фосфора. Только осенью 2015 г. на территорию Чувашии было ввезено 100 т. желтого фосфора, предположительно, с целью захоронения. Имеется в виду именно однократный ввоз, т. е. общее количество данного вещества на территории Республики не уточняется. Учитывая географически близкое расположение Новочебоксарского Химпрома и полигонов захоронения рядом с ним от городов Чебоксары и Казань, можно предполагать, что в случае возникновения фосфорной тучи в зону поражения войдут и они. Тем более, следует иметь в виду, что города Казань и Новочебоксарск соединены общей водной артерией – рекой Волга (см. рис. 1). Причем Казань расположена ниже по течению реки, следовательно, в случае техногенных аварий и катастроф, связанных с желтым фосфором, создается прямая угроза экологической обстановке в столице Татарстана.

Горючесть и высочайшая токсичность белого фосфора опосредовали его применение в военных целях, в качестве зажигательного оружия. 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. Так, осенью 2016 г. боевики ИГИЛ применили в г. Алеппо (Сирия) боеприпасы, содержащие белый фосфор, хлор и иприт – отравляющие вещества, запрещенные в качестве боевых. В настоящее время в арсеналах Российской Федерации хранится более миллиона устаревших боеприпасов, снаряженных белым фосфором, включающих ручные гранаты и снаряды калибра 82–240 мм. Большинство из них представляет угрозу для окружающей среды и населения. Это продемонстрировал, например, пожар на складе боеприпасов вблизи удмуртского поселка Пугачево (35 км от Ижевска, 10 км от татарстанского Агрыза) в июне 2011 г. Из-за наличия на нем белого фосфора, пожар неожиданно возобновлялся после полного тушения. В силу ряда сложностей обращения с белым фосфором, вопрос об утилизации таких боеприпасов до пожара в Удмуртии даже не рассматривался.

Анализ известных на настоящий момент методов детоксикации белого фосфора позволяет заключить, что эффективные методы до сих пор не созданы [Toxicological profile for white phosphorus, 1997].

Но элемент фосфор обладает важным качеством. Являясь в виде простого вещества сильнейшим ядом, в окисленном состоянии (фосфорная кислота и её производные) он незаменим для всех форм жизни, являясь биогенным макроэлементом. С учетом этого, потенциал биодegradации белого фосфора велик.

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 [Jackman et al., 1970; Rodriguez et al., 1972], но без большого успеха. В работе [Bohn et al., 1970] сообщается о естественной детоксикации белого фосфора в почве, однако авторы предполагают абиотическое окисление: исследования проводились на щелочных почвах, а в щелочной среде белый фосфор нестабилен даже в отсутствие кислорода.

Данная публикация является продолжением цикла наших работ [Миндубаев и др., 2018 (а); Миндубаев и др., 2018 (b)], которые показали, что микроорганизмы выживают при контакте с белым фосфором, перерабатывают его в нетоксичные соли фосфорной кислоты.

Цель настоящей работы – сравнить устойчивость и способность к биодegradации белого фосфора у микроорганизмов различных штаммов и таксономических групп. Найти для них минимальные ингибирующие концентрации (МИК) этого вещества. Подобрать эффективные методы стерилизации белого фосфора.

Объекты и методы исследования

В работе мы использовали культуры, выделенные нами *Aspergillus niger* AM1 и AM2, *Streptomyces* sp. A8, *Bacillus subtilis* (без названия штамма) и *Pseudomonas alcaliphila* был идентифицирован до вида с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF (без названия штамма). Также, мы использовали коллекционные штаммы *Trichoderma asperellum* ВКПМ F-1087 и три штамма *Aspergillus niger* (FW-650, FW-2664 и FW-2731), бактерии *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus firmus* и *Salmonella typhimurium* BA13.

Впервые произведен посев микробиоты в культуральную среду, содержащую в качестве единственного источника фосфора белый фосфор в концентрациях до 1 %. Посев культуры *Bacillus subtilis* проводился в модифицированную нами среду Придхем-Готлиба. Эта среда, созданная для культивирования микроорганизмов нефтеструктуров, не содержит источники углерода, кроме нефтепродуктов. Наша модификация в качестве источника углерода содержит глюкозу. Ее состав (в перерасчете на 1 л): глюкоза – 5 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.64 г, MgSO_4 – 0.49 г, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02 г, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.15 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.27 г, и белый фосфор в различных концентрациях. В контрольную среду в качестве источника фосфора вносили $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 7.4 г, KH_2PO_4 – 2.38 г. Полуужидкая модификация среды (ПГА) достигалась после внесения агара – 4–8 г. Белый фосфор эмульгировали в дистиллированной воде, предварительно стерилизованной автоклавированием. Концентрация белого фосфора до культивирования рассчитывалась следующим образом. Готовилась эмульсия из 1 г белого фосфора в 50 мл воды, ее расчетная концентрация составляла 2 %. После культивирования концентрация белого фосфора не замерялась, однако сам факт роста микроорганизмов указывает на ее снижение: для роста нужен фосфат, а он мог образоваться только из белого фосфора.

Посев *Aspergillus niger* AM1, споры которого были внесены в среду вместе с белым фосфором, производили в аналогичные по составу среды, с содержанием белого фосфора в диапазоне концентраций 0.01 и 0.05 % по массе. В контрольные среды К (+) вносился фосфат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 7.4 г, KH_2PO_4 – 2.38 г). В контрольные среды К (–) источники фосфора не вносились. К (+) и К (–) использовались в качестве контроля для *A. niger* AM1. Через 60 суток после посева биомассу стрептомицетов и грибов пересевали в концентрации P_4 0.05, 0.1 и 0.2 % по массе. По прошествии следующих 60 суток штаммы пересевали в еще более высокие концентрации белого фосфора 0.5, и 1 %. Концентрации 0.05, 0.1 и 0.2 % использовали для всех исследуемых культур грибов и стрептомицетов, но не бактерий, поскольку последние не переносят высокие концентрации.

Посев *A. niger* AM1, *T. asperellum* F-1087 и *Streptomyces* sp. A8 осуществляли в виде спор, бактерии – в виде вегетативных клеток. Взвесь спор содержала 10^8 грибковых тел в мл, вносилась по 0.2 мл на 20 мл среды. Культуры выращивали в колбах в 20 мл питательной среды без перемешивания и чашках Петри. Культивирование производилось в термостате, при 25°C.

Мы впервые применили стерилизацию белого фосфора ацетоном. В шленк с навеской P_4 вливали ацетон из расчета приблизительно 1:40 по объему и выдерживали 15 мин. при ручном взбалтывании без нагрева.

Генетический анализ образцов ДНК из культуры гриба *A. Niger* AM1 проводился по методике, описанной в [Sambrook, Russell, 2001].

Для сравнения устойчивости к белому фосфору штаммов черного аспергилла, применялся наш штамм *Aspergillus niger* AM1, а также три штамма из Всероссийской



коллекции микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрябина: FW-650, FW-2664 и FW-2731, выделенные из арктических вечномёрзлых грунтов (Таглу (Канада), многолетнемерзлые отложения, возраст – 170 лет, глубина 20.50–20.55 м; Камчатка (Россия), пепел вулканический мерзлый, глубина 1.8–1.85 м; Камчатка (Россия), мерзлота, вулканический пепел, глубина 14.5 м соответственно). Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия) по интенсивности поглощения света λ 550 нм. Максимальная концентрация белого фосфора достигала 1 %. Для сравнения высевались культуры бактерий *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus firmus* и *Salmonella typhimurium*. Целью данных исследований являлось обнаружение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) белого фосфора для перечисленных микроорганизмов.

Для установления природы устойчивости аспергилла к P₄ произведен пересев в среду с фосфатом в качестве источника фосфора, без P₄. Подростую в этой среде культуру снова посеяли в среду с 0.2 % белого фосфора. В качестве контроля посеяли также *A. niger* AM1, до этого росший в среде с белым фосфором.

Для слежения за переработкой P₄ был использован ЯМР спектрометр высокого разрешения *Avance 400 (Bruker)*. С целью приготовления образцов для съемки спектра среды отбирались при помощи инсулиновых шприцев. Опытную среду очистили от гифов гриба при помощи фильтра *Millex-HV (Syringe-driven Filter Unit)*, надеваемого на шприц. Диаметр фильтра 33 мм, диаметр пор 0.45 мкм. Параметры съемки спектров: *Bruker Avance III 400* МГц ³¹P{¹H} – (161.9 МГц, 25 °С).

Статистическую обработку данных проводили в программе Excel.

Результаты и их обсуждение

Бактерии *Bacillus subtilis* растут в среде с фосфатом. В среде без источников фосфора жизнедеятельность не наблюдается, что вполне закономерно. Интересный результат показало наблюдение за средой с белым фосфором. В ней присутствуют отдельные мелкие колонии. Наблюдалось выделение газа. Значит, бациллы смогли расти в среде с продуктами окисления белого фосфора, хотя рост очень медленный в сравнении с контролем. Он наблюдался нами впервые.

Споры черного аспергилла попали в среду случайно, вместе с эмульсией белого фосфора, который был обсеменен ими. В среде К (+) (рис. 2,верху) выросли 49 развитых колоний *Aspergillus niger* AM1. В среде К (–) без источников фосфора выросло 11 колоний, с неразвитым мицелием и без характерной черной окраски (рис. 2,внизу слева). Сказалась нехватка фосфора. Интересно, что в среде с 0.05 % белого фосфора (рис. 2,справа) колоний выросло меньше (33 колонии), чем в К (+), однако они быстро развились и не испытывали дефицит питательных веществ.

Таким образом, в среде с белым фосфором (P₄) выжили не все споры гриба, но выжившие дали начало культуре, обладающей способностью использовать в качестве источника фосфора белый фосфор. Следующие пересевы были произведены в среды с более высокой концентрацией белого фосфора, 0.05, 0.1, 0.2 и 0.5 %, для адаптации гриба. При таком высоком содержании белого фосфора в среде наблюдался рост колоний гриба, хотя и медленный в сравнении с контролем. Черный аспергилл переносит присутствие белого фосфора в среде даже в концентрации 0.5 %. Стрептомицет *S. sp.*, также отлично выдерживает концентрации P₄ вплоть до 0.2 %. Внешне колонии актиномицета, выросшие при трех разных концентрациях белого фосфора, практически не отличались. Бактерии *Pseudomonas alcaliphila*, как оказалось, не растут в средах, содержащих белый фосфор в качестве единственного источника фосфора.

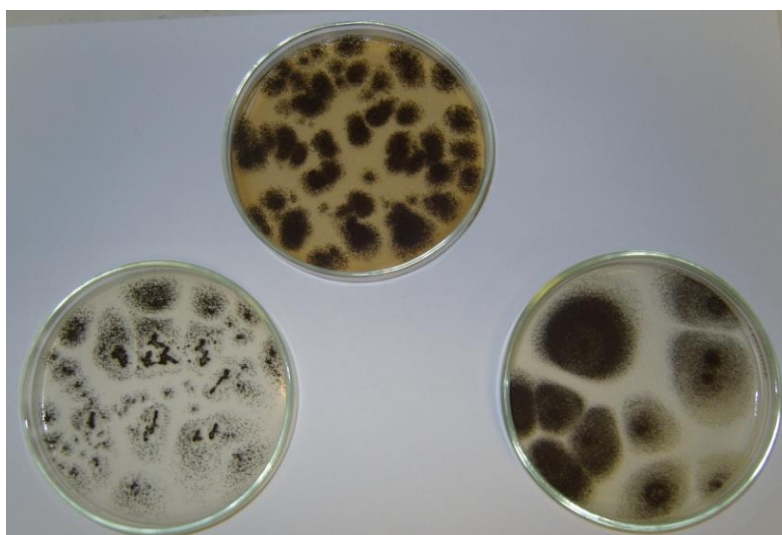


Рис.2. Первый пересев устойчивых грибов *A. niger*.
 Fig. 2. The first reseeded of resistant *A. niger* fungal strains.

В снятых скульптуральных сред спектрах ^{31}P ЯМР проявились сигналы, характерные для фосфата, фосфита и гипофосфита. Эти соединения могли образоваться только из белого фосфора, возможно, в результате микробного метаболизма. На основании спектральных данных можно изобразить следующую гипотетическую схему биodeградации белого фосфора (рис. 3), включающую последовательное окисление до нетоксично фосфата – естественной природной формы элемента фосфора.

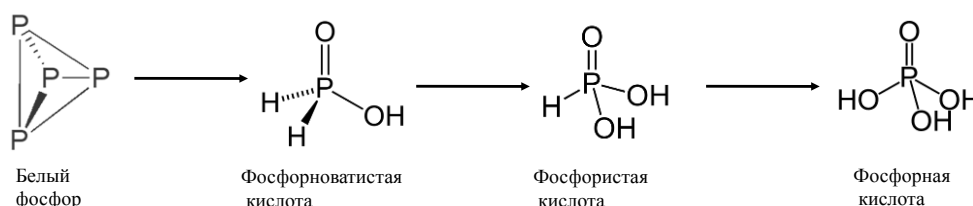


Рис. 3.Предполагаемый метаболический путь белого фосфора.
 Fig. 3. Alleged scheme of white phosphorus metabolism

Следующий пересев *Streptomyces* sp. A8 продемонстрировал рост устойчивости к белому фосфору. Наблюдался рост в среде, содержащей 0.5 % белого фосфора. В предыдущих посевах *S. sp.* рос при концентрациях не более 0.2 %, хотя в среде с 0.5 % сохранял жизнеспособность. Следует отметить, что рост начался с длительной задержкой. Даже на 20 сутки после посева признаки роста были неочевидными. В среде с 0.2 % белого фосфора рост происходил значительно быстрее.

В шестом посева *A. niger* наблюдается начало роста гриба в среде с 1 % белого фосфора. В предыдущих посевах максимальная концентрация белого фосфора, при которой рос аспергилл, составляла 0.5 %.

Четвертый пересев стрептомицетов продемонстрировал дальнейший рост устойчивости. Рост наблюдался в среде с 1 % белого фосфора. Данная концентрация соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз. А ПДК белого фосфора в водных объектах хозяйственно-питьевого водопользования составляет всего 0.0001 мг/л, т. е. концентрация 1 % превышает ее уже в сто миллионов раз [Алексеев и др., 2013].

Таким образом, устойчивость к белому фосфору, так же как к другим ксенобиотикам, является приобретенным признаком.



В итоге, наибольшую приспособляемость к белому фосфору проявили стрептомицеты. Грибы адаптируются медленнее, однако их устойчивость изначально была выше, особенно у триходермы [Миндубаев и др., 2018 (а)].

Для доказательства уникальности штамма гриба, споры которого попали в культуральную среду вместе с белым фосфором, была установлена нуклеотидная последовательность регионов ITS1 и ITS2. Система BLAST позволила идентифицировать данный микроорганизм как новый штамм черного аспергилла *Aspergillus niger*, которому мы присвоили номер *A. niger* AM1.

Производя посеvy микроорганизмов в среды с белым фосфором, мы сталкивались с серьезной проблемой – отсутствие эффективного метода стерилизации P₄. Был опробован метод стерилизации в мягких условиях, без применения высоких температур. Для этого навеска ксенобиотика должна погружаться в органический растворитель, который легко проникает через гидрофобные оболочки микробных спор и умерщвляет их [McDonnell, Russell, 1999]. Мы предпочли пользоваться ацетоном по причине сравнительно низкой растворимости в нем белого фосфора. В низких концентрациях ацетон усваивается микроорганизмами в качестве источника углерода [Hausinger, 2007], поэтому мы не стремились удалять остатки ацетона из шленка с навеской. В контрольных средах рост отсутствовал даже спустя 100 с лишним дней. Это указывает на то, что использованный метод стерилизации навесок P₄ эффективен.

Интересно спонтанное появление в среде с белым фосфором культуры *Aspergillus niger* AM1 с измененной морфологией и окраской, быстрее растущей в среде с исследуемым ксенобиотиком. Возможно, это результат мутации и дальнейший этап адаптации микроорганизма к среде, содержащей белый фосфор. В одном повторе посева колония стала развиваться быстрее, чем в других, хотя условия были совершенно идентичны. Через 55 суток после посева лидирующая культура стала вырабатывать пигмент и приобретать более насыщенную желтую окраску. Колонии в остальных двух повторях растут медленнее и имеют гораздо более светлую окраску. Окрасилась не только колония, но и культуральная среда, т. е. пигмент хорошо растворим в воде. Примерно в это время мы дали этому аспергиллу неофициальное название «рыжий гриб».

Культура, судя по виду и окраске спор, безусловно, является черным аспергиллом, но морфология колонии необычная. Воздушный мицелий низкий, споры формируются почти на поверхности среды. Возможно, это следствие того, что в культуре произошла мутация. А судя по тому, что «рыжий» гриб эффективнее набирал биомассу в среде с белым фосфором, его приспособленность к существованию в данной среде выше, чем у предковой культуры. Мы дали этому штамму временное название *A. niger* AM2.

Метод ЯМР показал устойчивость культуры AM1 к продуктам неполного окисления P₄. Сам факт возникновения устойчивости к этой группе веществ очень интересен (фосфиты и гипофосфиты являются антимикробными агентами [Smillie et al., 1989]), однако ожидаемый результат – полное метаболическое превращение белого фосфора в фосфат – еще предстоит подтвердить.

Оказалось, что все четыре штамма *A. niger* FW-650, FW-2664 и FW-2731 и AM1 выдерживают концентрацию белого фосфора 1 %. МИК для них так и не была найдена. Поскольку все исследованные штаммы представляют собой случайную выборку из общего разнообразия *A. niger*, можно предполагать, что высокая устойчивость к белому фосфору – признак, характеризующий все черные аспергиллы, или большинство из них. Тем не менее, при концентрациях 0.5 и 0.25 % штамм AM1 рос быстрее, т. е. оказался более устойчивым (рис. 4).

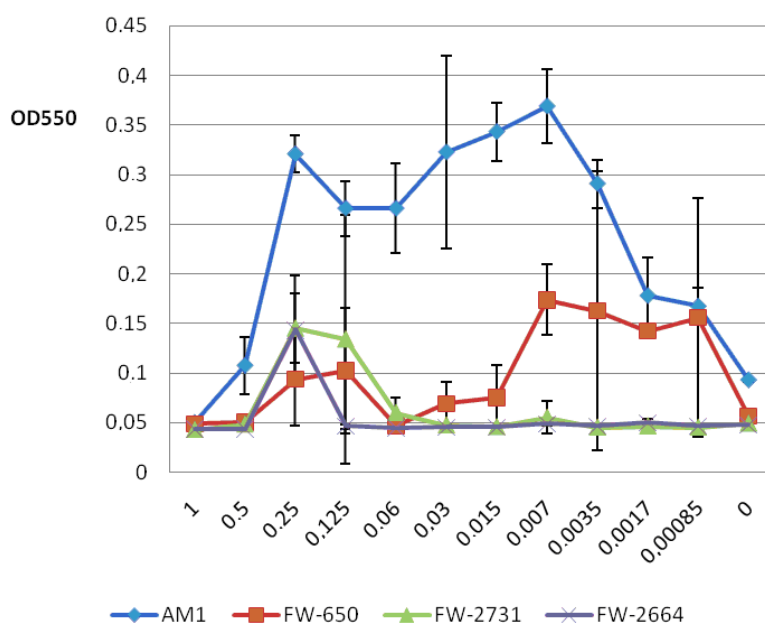


Рис. 4. Сравнение роста четырех штаммов *A. niger* в присутствии белого фосфора. На оси абсцисс указаны концентрации P_4 в %, на оси ординат оптическое поглощение при λ 550 нм.

Fig. 4. Comparison the growth of *A. niger* strains in a phosphate deficient medium containing white phosphorus, on the third day of cultivation. X-axis: concentration (%) of white phosphorus. Y-axis: optical density at $\lambda = 550$ nm.

Для бактерий МИК была найдена и составила для *A. xylosoxidans* 0.125 %, *B. firmus* 0.25 %, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. typhimurium* 0.5 %.

Из этого следует вывод, что черные аспергиллы более устойчивы к белому фосфору по сравнению с бактериями. Этот вывод совпадает с результатами, полученными нами ранее.

Ожидалось, что после роста в благоприятных условиях – в среде с фосфатом – *A. niger* AM1 мог утратить устойчивость к белому фосфору. В действительности, гриб, росший до пересева на фосфате, продолжал расти. Из этой картины можно сделать вывод, что резистентность к белому фосфору у исследуемого нами штамма черного аспергилла закреплена в геноме, и является наследуемым признаком, передающимся в ряду поколений даже в отсутствие P_4 .

Все предлагаемые методы обезвреживания загрязнений белым фосфором наряду с очевидными достоинствами имеют ряд недостатков: требуют внесения токсичных окислителей (экологическая угроза), либо значительных энергозатрат. Биологическая деградация белого фосфора – новый подход, не требующий отмены других методов детоксикации. Он способен дополнить их, поскольку позволяет обезвреживать белый фосфор в следовой концентрации без применения опасных химикатов и жестких физических (температура, электрический ток, ультразвук и проч.) воздействий. Данный метод, например, может использоваться для илов и шламов после извлечения (рециклинга) значительной части содержащегося в них P_4 .

Главные преимущества метода – простота разрабатываемой технологии в использовании, дешевизна, экологическая безопасность. Реализация метода внесет вклад в развитие биотехнологии в целом, поскольку проект направлен в новое для нее направление. Следует также учитывать параллельный вклад в фундаментальное научное знание, поскольку метаболизм белого фосфора до сих пор практически не изучен.



Выводы

1. Впервые показано, что в культуральной среде, содержащей белый фосфор в качестве единственного источника фосфора, микроорганизмы могут расти и спороносить.
2. В процессе селекции возможен рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору.
3. В результате селекции получена культура черного аспергилла, более адаптированная к росту в среде с белым фосфором по сравнению с исходной культурой.
4. Устойчивость к белому фосфору у черного аспергилла АМ1 может иметь наследственный характер.
5. Устойчивость к белому фосфору – признак, присутствующий у различных штаммов черного аспергилла. Но у штамма АМ1, впервые выделенного из реактива белого фосфора, устойчивость существенно выше, чем у других штаммов.
6. Бактерии более чувствительны к токсическому действию белого фосфора, чем исследованные нами грибы.
7. Методом ЯМР определены метаболиты белого фосфора в питательной среде.
8. В целом, исследование показало возможность создания биологического метода ликвидации загрязнений белым фосфором.

Список литературы

References

1. Алексеев В.А., Бузмаков С.А., Панин М.С. 2013. Геохимия окружающей среды. Пермь, Издательство Пермского государственного национального исследовательского университета, 359.
Alekseenko V.A., Buzmakov S.A., Panin M.S. 2013. Geochemistry of the environment. Perm, Publishing house of the Perm State National Research University, 359. (in Russian).
2. Миндубаев А.З. 2018. Кто съел полиэтилен? Наука и жизнь, 4: 32–38.
Mindubaev A.Z. 2018. Who ate the polyethylene? Nauka i Zhizn, 4: 32–38. (in Russian).
3. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Хаяров Х.Р., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г. 2018. Новое в исследованиях биodeградации белого фосфора. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки, 42 (3): 308–315.
Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Khayarov K.R., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. 2018. New in the studies of biodegradation of white phosphorus. Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences series, 42 (3): 308–315. (in Russian).
4. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Яхваров Д.Г. 2018. Микробиологическая деградация белого фосфора. Экология и промышленность России, 22 (1): 33–37.
Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Babynin E.V., Badeeva E.K., Khayarov Kh.R., Minzanova S.T., Yakhvarov D.G. 2018. Microbiological degradation of white phosphorus. Ecology and Industry of Russia, 22 (1): 33–37. (In Russian).
5. Bohn H.L., Johnson G.V., Cliff J.H. 1970. Detoxification of White Phosphorus in Soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 18 (6): 1172–1173.
6. Brysk M.M., Corpe W.A., Hanks L.V. 1969. β -Cyanoalanine Formation by *Chromobacterium violaceum*. Journal of bacteriology, 97 (1): 322–327.
7. Fuganti C., Ghiringhelli D., Giangrosso D., Grasselli P. 1974. Stereochemical course of the enzymic synthesis of L-tyrosine from phenol and L-serine catalysed by tyrosine phenol lyase from *Escherichia intermedia*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 18: 726–727.
8. Gleason W. 2007. An Introduction to Phosphorus: History, Production, and Application. JOM, 59 (6): 17–19.
9. Hausinger R.P. 2007. New Insights into Acetone metabolism. Journal of bacteriology, 189 (3): 671–673.
10. Jackman R.H., Lambert J.P., Rothbaum H.P. 1970. Red phosphorus as a fertilizer for grass-clover pasture. New Zealand Journal of Agricultural Research, 13 (2): 232–241.
11. Jenrich R., Trompetter I., Bak S., Olsen C.E., Møller B.L., Piotrowski M. 2007. Evolution of heteromeric nitrilase complexes in Poaceae with new functions in nitrile metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104 (47): 18848–18853.

12. Jiang H., Chen Y., Jiang P., Zhang C., Smith T.J., Murrell J.C., Xing X.-H. 2010. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (3): 277–288.
13. Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. 2015. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*, 29: 142–152.
14. Kang T.J., Lee E.Y. 2016. Metabolic versatility of microbial methane oxidation for biocatalytic methane conversion. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 35: 8–13.
15. McDonnell G., Russell A.D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1): 147–179.
16. Morgan J., Greenberg A. 2010. Insights into the Formation and Isomerization of the Benzene Metabolite Muconaldehyde and Related Molecules: Comparison of Computational and Experimental Studies of Simple, Benzo-Annulated, and Bridged 2, 3- Epoxyoxepins. *The Journal of organic chemistry*, 75 (14): 4761–4768.
17. Rodriguez A., Bohn H.L., Johnson G.V. 1972. White phosphorus as a phosphatic fertilizer. *Soil Science Society of America Journal*, 36 (2): 364–366.
18. Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Immunol, 49: 895–909.
19. Smillie R., Grant B.R., Guest D. 1989. The Mode of Action of Phosphite: Evidence for Both Direct and Indirect Modes of Action on Three Phytophthora spp. in Plants. *Phytopatology*, 79 (9): 921–926.
20. Toxicological profile for white phosphorus. 1997. U.S. Department of health and human services. USA, 248.

Ссылка для цитирования статьи
Reference to article

Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Хаяров Х.Р., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Обоснование метода биологической очистки природных сред от загрязнения белым фосфором // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2019. Т. 43, №1. С. 87–97. doi: 10.18413/2075-4671-2019-43-1-87-97

Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Khayarov Kh.R., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Ya.A. Rational for the Method of Biological Purification of Environments Contaminated with White Phosphorus // Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural Sciences Series. 2019. V. 43, №1. P. 87–97. doi: 10.18413/2075-4671-2019-43-1-87-97