

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
И НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 579.695;546.85;502.55;661.63

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ЖЕЛТОГО (БЕЛОГО) ФОСФОРА –
ВЕЩЕСТВА ПЕРВОГО КЛАССА ОПАСНОСТИ

© 2021 г. А. З. Миндубаев^а, *, Э. В. Бабынин^б, Е. К. Бадеева^с,
С. Т. Минзанова^с, Л. Г. Миронова^с, Й. А. Акосах^б

^аИнститут энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН,
ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111 Россия

^бИнститут органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН,
ул. Арбузова, 8, Казань, 420088 Россия

^сКазанский (Приволжский) федеральный университет,
ул. Университетская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: a.mindubaev@knc.ru

Поступила в редакцию 12.01.2021 г.

После доработки 09.03.2021 г.

Принята к публикации 11.03.2021 г.

Биодеградация является важным методом очистки сточных вод предприятий и окружающей среды от химических отходов. Но для элементного белого (желтого) фосфора биодеградация наблюдалась только в наших исследованиях. Это один из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Он и продукты его превращений применяются в промышленности, сельском хозяйстве, производстве лекарств и в военных целях. Впервые получены культуры микроорганизмов, растущих в средах с содержанием белого фосфора, многократно превышающим предельно допустимую концентрацию в сточных водах. Элемент фосфор представляет собой сильнейший яд в виде восстановленных соединений и ряда эфиров фосфорной кислоты. Но в полностью окисленном состоянии (неорганические фосфаты) он является биогенным элементом, необходимым для всех форм жизни. Биомасса Земли состоит из фосфора приблизительно на 3%. Перспективы биодеградации токсичных соединений фосфора, в том числе элементного фосфора, огромны. Практическое внедрение нового и обладающего рядом преимуществ способа обезвреживания позволит существенно сократить штрафы, налагаемые на предприятия, производящие и потребляющие желтый фосфор.

Ключевые слова: элементный фосфор, микробные культуры, черный аспергилл

DOI: 10.31857/S0044457X21080158

ВВЕДЕНИЕ

Метод биодеградации используется для очистки сточных вод много десятилетий [1]. Он основан на метаболическом обезвреживании токсичных соединений микроорганизмами – бактериями или грибами. Однако сравнительно недавно считалось, что способность к метаболизму ксенобиотиков – веществ, не встречающихся в природе и производимых химической промышленностью, у микроорганизмов очень ограничена, и большинство созданных человеком химических соединений ими не используется. Но в настоящее время убедительно показана способность как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов к деградации ксенобиотиков [2].

Главное преимущество биодеградации перед существующими альтернативными методами обезвреживания заключается в том, что при ее использовании в окружающую среду не вносятся новые химические загрязнители. Представленная

на рис. 1 схема метаболизма токсичного вещества второго класса опасности фенола, изображенная на основании данных [3], указывает на непревзойденное совершенство биохимии микроорганизмов.

На сегодняшний день известны бактерии и грибы, которые разлагают азокрасители [4], сырую нефть [5], капроновую ткань [6], пестицид глифосат [7], цианиды [8] и полихлорированные бифенилы [9], но главной сферой применения биодеградации являются органические соединения – их углеродный скелет подвержен ферментативным трансформациям. Неорганические вещества значительно реже подвергаются обезвреживанию этим методом, поскольку устойчивы к действию ферментов. Некоторые неорганические композиты даже специально применяются для подавления роста микроорганизмов [10], хотя примеры биодеградации известны и для них [11].

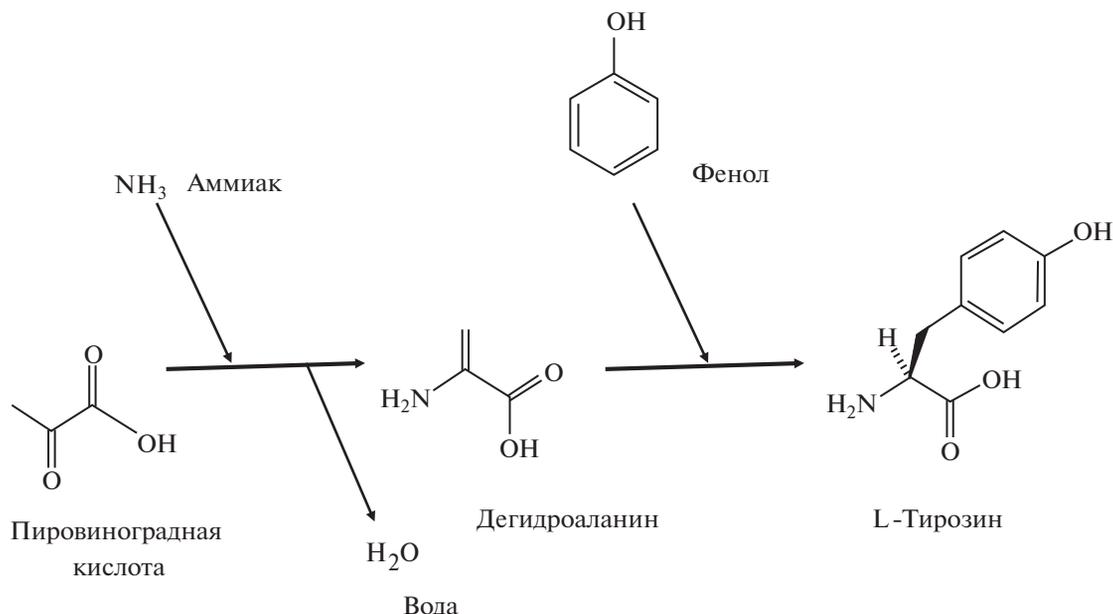


Рис. 1. Включение фенола в состав аминокислоты при помощи фермента β-тирозинызы.

Двенадцать лет назад возник наш проект обезвреживания ксенобиотиков, предназначенный для очистки сточных вод и загрязненных грунтов.

Цель работы – разработка научных основ детоксикации белого фосфора – опасного промышленного загрязнителя окружающей среды.

Белый (вещество технической чистоты носит название “желтый”) фосфор является крупнотоннажным продуктом химической промышленности, стратегически важным сырьем в производстве красного фосфора, фосфорного ангидрида, суперфосфата, фосфатных подкормок для животноводства, треххлористого и пятихлористого фосфора, сульфида фосфора, высокочистой фосфорной кислоты, фосфорорганических антипиренов, комплексонов, пестицидов, боевых отравляющих веществ (включая ставшие известными в последнее время “Новички”), лекарственных препаратов, в том числе последнего поколения, сплавов цветных металлов, полупроводников на основе фосфидов металлов и фосфина, дымообразующих составов. В нем нуждаются металлургические предприятия и предприятия оборонной промышленности.

Согласно обзору рынка, мировое производство белого фосфора в 2019 г. составляло 1.87 млн т. В мире 21 компания производит белый фосфор, из них 6 крупнейших находятся в Китае, США и Казахстане. В 2019 г. Китай произвел 1.48 млн т белого фосфора, США – 0.2, Казахстан – 0.12, Вьетнам – 0.08 млн т [12]. На территории Российской Федерации потребителями белого фосфора и производителями токсичных соединений фосфора являются ПАО Новочебоксарский Химпром,

ВАО Волгоградский Химпром, Камтэкс Химпром (г. Пермь), ООО “Химпром Технология” (г. Дзержинск). В ближайшие десятилетия замены белому фосфору не будет.

В связи с потребностью в перечисленных крупнотоннажных продуктах производство белого и желтого фосфора в России в будущем должно возобновиться.

Однако при всей своей востребованности белый фосфор чрезвычайно опасен (вещество первого класса опасности) и является загрязнителем окружающей среды [13–15]. Содержание основного загрязнителя в сточных водах с предприятий, производящих или потребляющих белый фосфор, не должно превышать двух частей на миллион. Желтый фосфор, имеющий техническую чистоту, содержит примеси, не менее токсичные, чем он сам. Расплавленный белый фосфор хорошо растворяет ртуть – единственный пример растворения металла в неметалле [16]. Это делает загрязнения желтым фосфором еще более опасными.

Следует особо указать, что все загрязнения желтым фосфором в России находятся в бассейне р. Волги – важнейшей водной и транспортной артерии. Поволжье – один из густонаселенных регионов нашей страны (рис. 2). Следовательно, связанные с загрязнениями экологические риски очень велики.

Высокая горючесть белого фосфора нашла применение в военных целях – в разработке специальных зажигательных боеприпасов и дымовых завес [17]. К сожалению, продолжается варварское применение белого фосфора в военных



Рис. 2. Большая физическая карта Поволжья (<http://kartgeoburo.ru>). Стрелками обозначены загрязнения желтым фосфором.

целях, например, в Сирии, на Украине. Напомним, что военное применение белого фосфора запрещено Протоколом III “Конвенции о конкретных видах обычного оружия” 1980 г. Угроза применения белого фосфора в террористических целях определяется и сравнительной легкостью его получения. Белый фосфор можно получать пиролизом без доступа воздуха практически любого вещества или материала, содержащего фосфор.

Следовательно, создание эффективных методов обезвреживания белого фосфора – актуальная задача. В распоряжении Правительства предлагается стратегия развития промышленности по обработке, утилизации и обезвреживанию отходов производства и потребления на период до 2030 г. Эти запланированные меры свидетельствуют о злободневности ликвидации загрязнений особо опасными веществами, к которым относится и белый (желтый) фосфор. Следует иметь в виду, что очистка химических загрязнений требует значительных вложений. Новочебоксарский Химпром в год выделяет свыше 200 млн руб. на мероприятия по снижению выбросов (данные с официального сайта этого предприятия).

Но у элемента фосфора есть уникальное качество – будучи сильнейшим ядом в виде простого вещества, в окисленном состоянии (соли, ряд эфиров и амидов фосфорной кислоты) он абсолютно необходим для всех форм жизни, являясь биогенным макроэлементом [18]. Содержание его в земной коре сравнительно низкое и составляет 0.08–0.09%, человеческое тело на 1.1% состоит из фосфора, играющего в организме целый ряд ролей: от составной части костной ткани и эмали зубов до фосфолипидов клеточных мембран, наследственного материала нуклеиновых кислот и макроэргических молекул, без которых невозможен энергообмен [19, 20]. Большинство веществ вступают в метаболизм только в фосфорилированной форме [21].

С учетом этого существует перспектива биодеградации белого фосфора. Наибольшей трудностью для метаболизма белого фосфора является отсутствие углеродного скелета. Ферментные системы клетки адаптированы к метаболизму органических веществ. Белый фосфор представляет собой простое вещество, не только чрезвычайно токсичное, но и не встречающееся в природе.

В наших работах впервые получены культуры микроорганизмов, растущих в средах с содержанием белого фосфора до 1%. Это значение в 5000 раз превышает предельно допустимую концентрацию в сточных водах. Культуры уникальны, не имеют мировых аналогов и в настоящее время имеются только у нас.

Главное преимущество метода – экологическая безопасность. Все существующие в настоящий момент методы обезвреживания [22–24] на-

ряду с очевидными достоинствами представляют экологическую угрозу, поскольку требуют применения опасных химикатов. А также они требуют значительных энергетических затрат. Биологическая деградация белого фосфора – метод, не требующий отказа от других методов детоксикации. Он способен дополнить их, так как позволяет обезвреживать белый фосфор в следовой концентрации. Данный метод может использоваться для илов и шламмов после извлечения большей части содержащегося в них P_4 .

Впервые произведены посевы микроорганизмов (преимущественно плесневых грибов из родов *Aspergillus* и *Trichoderma*) в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В указанных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорного голодания, т.е. окисляли белый фосфор до фосфата, необходимого для жизнедеятельности! Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора и обезвреживания его живыми организмами. Результаты данной работы запатентованы в патенте России № 2603259 [25]. Конкурентов в производстве штаммов биодеструкторов белого фосфора в настоящее время нет не только в России, но и в мире.

Наш проект возник в 2009 г. в связи с заинтересованностью голландской фирмы Thermphos International. Задачей являлось обезвреживание белого и желтого фосфора, за присутствие которого в сточных водах предприятие выплачивало крупные штрафы. В 2010 г. сформулирован план работ, дальнейшие исследования стали его последовательной реализацией. В 2011 г. по итогам работы вышла первая публикация. В 2012 г. из осадка сточных вод, в которые добавляли белый фосфор, был выделен первый штамм устойчивого микроорганизма *Streptomyces* sp. A8. В 2013 г. методом хроматомасс-спектрометрии показана взаимосвязь между активностью микроорганизмов осадка сточных вод и скоростью снижения концентрации белого фосфора в осадке. В 2014 г. на средства гранта РФФИ 14-08-31091 мол_a (2014–2015 гг.) “Биологическая деградация промышленных стоков, содержащих белый фосфор и его производные” создана первая культуральная среда, содержащая в качестве источника биогенного элемента белый фосфор. Она была создана на основе известной среды Придхем Готлиба для микроорганизмов – деструкторов нефти, но состав был изменен: в качестве источника углерода была добавлена глюкоза и исключена смесь фосфатов в качестве источника фосфора. Из реактива белого фосфора, внесенного в эту питательную среду, был выделен штамм *Aspergillus niger* AM1. Вещество содержало жизнеспособные споры этого микроорганизма (табл. 1), что само по себе является неординарным явлением и демонстрирует

Таблица 1. Рост грибов *A. niger* в средах с различными источниками фосфора через 6 сут после посева

Источник фосфора	Количество колоний <i>A. niger</i>	Внешний вид колоний
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O - 7.4$ г, $KH_2PO_4 - 2.38$ г	49	Крупные спорообразующие
P_4 0.05 мас. %	11	Спорообразующие, замедленный рост
Отсутствует	33	Мелкие, спорообразование снижено

изумительную жизнеспособность микроорганизмов [26]. В следующих исследованиях мы впервые в мире приготовили ряд культуральных сред, в составе которых содержался белый фосфор в качестве единственного источника данного биогенного элемента. Рост грибов в таких средах свидетельствует о превращении белого фосфора в фосфат, без которого невозможны метаболические процессы и сама жизнедеятельность. Это позволяет пересматривать определение белого фосфора как биоцида.

В 2015 г. осуществлена селекция штаммов на рост устойчивости к белому фосфору. Показано, что деструкторами белого фосфора являются не только черные аспергиллы, но и плесневые грибы триходермы (*Trichoderma asperellum*). Выделенный из белого фосфора штамм *Aspergillus niger* зарегистрирован в базе Gen Bank под названием AM1. В 2016 г. в результате селекции получен суперустойчивый штамм *Aspergillus niger* AM2.

В 2017 г. впервые продемонстрирована генотоксичность белого фосфора на прокариотическом организме – бактерии *Salmonella typhimurium* и эукариотическом – растении *Allium cepa*. Исследования впервые показали, что белый фосфор является сильным мутагеном и даже в низкой концентрации (0.008%) вызывает резкое увеличение частоты генных и геномных перестроек.

В 2018 г. проведены протеомные исследования, оптическая и электронная микроскопия штаммов AM1 и AM2, позволившие установить механизмы адаптации аспергиллов к белому фосфору. Выяснилось, что в устойчивости к этому веществу задействованы как минимум три механизма: утолщение и усложнение структуры клеточной стенки – физического барьера на пути проникновения токсичных веществ в клетки; увеличение числа и размеров митохондрий – органелл, отвечающих за клеточное дыхание и продуцирующих активные формы кислорода, окисляющие ксенобиотики; изменение белкового профиля – появление белков, запускающих каскадные реакции ответа на стрессирующие факторы [27].

Методом ядерного магнитного резонанса установлены метаболиты белого фосфора. Показано влияние наших штаммов аспергилла на деструкцию белого фосфора. Установлено, что один из промежуточных продуктов – гипофосфит – в присутствии аспергиллов окисляется в культуральной среде быстрее по сравнению с

контролем – стерильной средой. Начаты работы по расширению спектра обезвреживаемых соединений, включающих красный фосфор, фосфит, гипофосфит, фосфонаты, которые успешно продолжают по настоящее время. Показано, что красный фосфор – вторая практически значимая аллотропная модификация этого элемента – также служит источником фосфора для наших штаммов. Более того, он не проявляет токсические свойства в отношении аспергиллов. Штаммы *Aspergillus niger* AM1 и AM2 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов с целью дальнейшего патентования. Присвоенные во Всероссийской коллекции микроорганизмов названия штаммов не раскрываем в публикациях, поскольку это может воспрепятствовать получению патентов на эти культуры. За период 2019 г. оптимизирован состав культуральных сред, обнаружена минимальная ингибирующая концентрация белого фосфора для грибов. В 2020 г. построены филогенетические деревья штамма AM1. Согласно полученным данным, штамм AM1 имеет китайское происхождение и, вероятно, был завезен в Россию вместе с белым фосфором китайского производства. У близкородственных штаммов способность к усвоению фосфора из труднодоступных источников уже сформировалась эволюционно – они растворяют малорастворимые фосфатные минералы и делают почвенный фосфор более доступным. В настоящее время ведется работа по полной расшифровке геномов AM1 и AM2. Начаты исследования биодegradации нефти и нефтепродуктов нашими культурами грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получена культура микроорганизмов, растущая в средах, содержащих белый фосфор. В данных условиях микроорганизмы растут и не испытывают фосфорное голодание. Следовательно, белый фосфор может служить источником биогенного элемента, окисляясь (вероятно, с участием ферментных систем микроорганизмов) до безвредной и биосовместимой формы – фосфата. Этот результат не описан в более ранних источниках. Он является, по всей вероятности, первым в мире примером включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора. Работа имеет важное фундаментальное, а в перспек-

тиве и прикладное значение как основа создания нового метода обезвреживания белого (желтого) фосфора.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-08-31091 мол_а) и Фонда содействия инновациям (проект № 39113, заявка № С1-34299).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Статья публикуется по итогам Шестого Междисциплинарного научного форума с международным участием “Новые материалы и перспективные технологии”, Москва, 23–26 ноября 2020 г., <https://n-materials.ru>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saraswat S.* // J. Bioremed. Biodeg. 2014. V. 5. № 251. P. 1. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000251>
2. *Meckenstock R.U., Elsnor M., Griebler C. et al.* // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 49. № 12. P. 7073. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00715>
3. *Do Q., Nguyen G.T., Phillips R.S.* // Amino Acids. 2016. V. 48. P. 2243. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2263-7>
4. *Pereira L., Coelho A.V., Viegas C.A. et al.* // J. Biotechnol. 2009. V. 139. P. 68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.09.001>
5. *Atlas R.M.* // Microbiol. Rev. 1981. V. 45. № 1. P. 180.
6. *Otzen M., Palacio C., Janssen D.B.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 6699. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9073-7>
7. *Grandcoin A., Piel S., Baures E.* // Water Research. 2017. V. 117. № 187e197. P. 187. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>
8. *Knowles K.J.* // Bacteriolog. Rev. 1976. V. 40. № 3. P. 652. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>
9. *Furukawa K., Fujihara H.* // J. Biosci. Bioengineer. 2008. V. 105. № 5. P. 433. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.433>
10. *Грищенко Д.Н., Слободюк А.Б., Курявый В.Г. и др.* // Журн. неорган. химии. 2020. Т. 65. № 10. С. 1408. [*Grishchenko D.N., Slobodyuk A.B., Kuryavyy V.G. et al.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2020. V. 65. № 10. P. 1606.] <https://doi.org/10.1134/s0036023620100083>
11. *Мухаметова Г.М., Винокуров Е.Г., Бабусенко Е.С. и др.* // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2018. Т. 61. № 9–10. С. 89.
12. Yellow Phosphorus Market: Production Capacity reach to 1.87 million tons in 2019 // HDIN Research. 31.10.2019. <https://www.hdinresearch.com/news/36>
13. *Walsh M.E., Collins C.M., Racine C.* // Environ. Toxicol. Chem. 1996. V. 15. № 6. P. 846. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150605>
14. *Vann S.L., Sparling D.W., Ottinger M.A.* // Environ. Toxicol. Chem. 2000. V. 19. № 10. P. 2525. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191019>
15. *Aviv U., Kornhaber R., Harats M. et al.* // Disaster Mil. Med. 2017. V. 3. № 6. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s40696-017-0034-y>
16. *Ван Везер Дж.Р.* // Пер. с англ. под ред. Шерешевского А.И. М.: Изд-во иностр. литер., 1962. 688 с.
17. *Кальной А.И., Тарасов С.В., Катунин Ф.А. и др.* // Наука и военная безопасность. 2017. № 4. С. 13.
18. *Cummins C.C.* // Daedalus. 2014. V. 143. № 4. P. 9. https://doi.org/10.1162/DAED_a_00301
19. *Takeda E., Taketani Y., Sawada N. et al.* // BioFactors. 2004. V. 21. № 1–4. P. 345. <https://doi.org/10.1002/biof.552210167>
20. *Цыганова А.А., Голованова О.А., Еловский А.Н.* // Журн. неорган. химии. 2020. Т. 65. № 7. С. 888. [*Tsyganova A.A., Golovanova O.A., Elovsky A.N.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2020. V. 65. № 7. P. 975.] <https://doi.org/10.1134/S0036023620070220>
21. *Gray L.R., Tompkins S.C., Taylor E.B.* // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. № 14. P. 2577. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1539-2>
22. *Ma H., Feng X.* // Chem. Engineer. Transact. 2017. V. 61. P. 451. <https://doi.org/10.3303/CET1761073>
23. *Li S., Yang J., Wang C. et al.* // Energy Fuels. 2018. V. 32. № 4. P. 5279. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b03964>
24. *Ning P., Wang X., Bart H.-J. et al.* // J. Cleaner Production. 2011. V. 19. № 13. P. 1547. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.05.001>
25. *Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Волошина А.Д. и др.* // Пат. РФ № 2603259 от 1.11.2016. // Бюл. изобр. 33. Дата приоритета 28.07.2015 г.
26. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В. и др.* // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22. № 1. С. 33. <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2018-1-33-37>
27. *Миндубаев А.З., Кузнецова С.В., Евтюгин В.Г. и др.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 2. С. 156. [*Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtugin V.G. et al.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 2. P. 194.] <https://doi.org/10.1134/S0003683820020118>