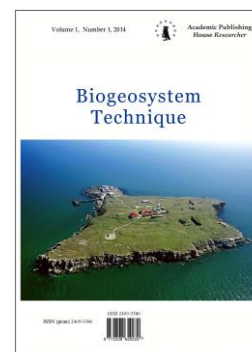


Copyright © 2019 by Academic Publishing House Researcher s.r.o.



Published in the Slovak Republic
Biogeosystem Technique
Has been issued since 2014.
E-ISSN: 2413-7316
2019, 6(2): 91-101

DOI: 10.13187/bgt.2019.2.91
www.ejournal19.com



Biodegradation of White Phosphorus – a Dangerous Industrial Contaminant

Anton Z. Mindubaev^{a,*}, Alexandra D. Voloshina^a, Natalia V. Kulik^a, Dmitry V. Ryzhikov^a,
Tatiana A. Barsukova^a, Yaw A. Akosah^b, Salima T. Minzanova^a, Lubov' G. Mironova^a

^a A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center
of Russian Academy of Sciences, Russian Federation

^b Kazan (Volga Region) Federal University, Russian Federation

Paper Review Summary:

Received: 2019, August 16

Received in revised form: 2019, September 28

Acceptance: 2019, September 29

Abstract

Possibility of white phosphorus degradation under the effect of waste water sludge (WWS) of waste-water treatment facilities is shown for the first time. White phosphorus to suppress the microorganisms growth not immediately after application, but in several days or even weeks. It means that toxic effect is conditions by the presence of intermediate products of degradation, which are accumulated in substrates. Considering the change in evolved gaseous products composition one can make a conclusion about greater stability of eubacteria to white phosphorus compared to that of methanogens. Microorganisms cultures are obtained, growing on substrata with white phosphorus content 0.01 and even 0.1 %. The P₄ concentration decrease in media is in inverse proportion to the duration of microflora growth lag-phase, as it was demonstrated by GCMS method. This fact indicates at the white phosphorus biodegradation process. Besides, in the present work the research work is presented, devoted to the search for the white phosphorus metabolites, and the probable way of the phosphorus metabolism is proposed for the first time. Inoculation of stable bacteria on synthetic medium, containing white phosphorus as a unique source of phosphorus, has demonstrated the possibility of their growth in such conditions.

Keywords: detoxication, white phosphorus, sewage sludge, anaerobic conditions, gas secretion kinetics, gas chromatography-mass spectrometry, metabolic pathway, nuclear magnetic resonance.

1. Введение

Наш проект направлен на разработку научных основ детоксикации белого фосфора – опасного промышленного загрязнителя окружающей среды. Белый фосфор широко применяется в химической промышленности и при производстве красного фосфора, в свою очередь, используемого в спичечной промышленности, в цветной металлургии, в бумажной промышленности, в производстве пластмасс (Gleason, 2007). Кроме того, белый фосфор применяется в военных целях (Рисунок 1, вверху слева) (Касаткин и др., 2017; Davis, 2002).

* Corresponding author

E-mail addresses: mindubaev-az@yandex.ru (A.Z. Mindubaev)

Поэтому проблема утечек фосфора в окружающую среду актуальна. Приемлемые способы детоксикации белого фосфора до сих пор не созданы, хотя работы в данном направлении ведутся. Предлагаемый метод основан на том, что бактерии окисляют токсичные фосфорсодержащие соединения до нетоксичных фосфатов, не представляющих угрозу для окружающей среды (Рисунок 1, вверху справа).

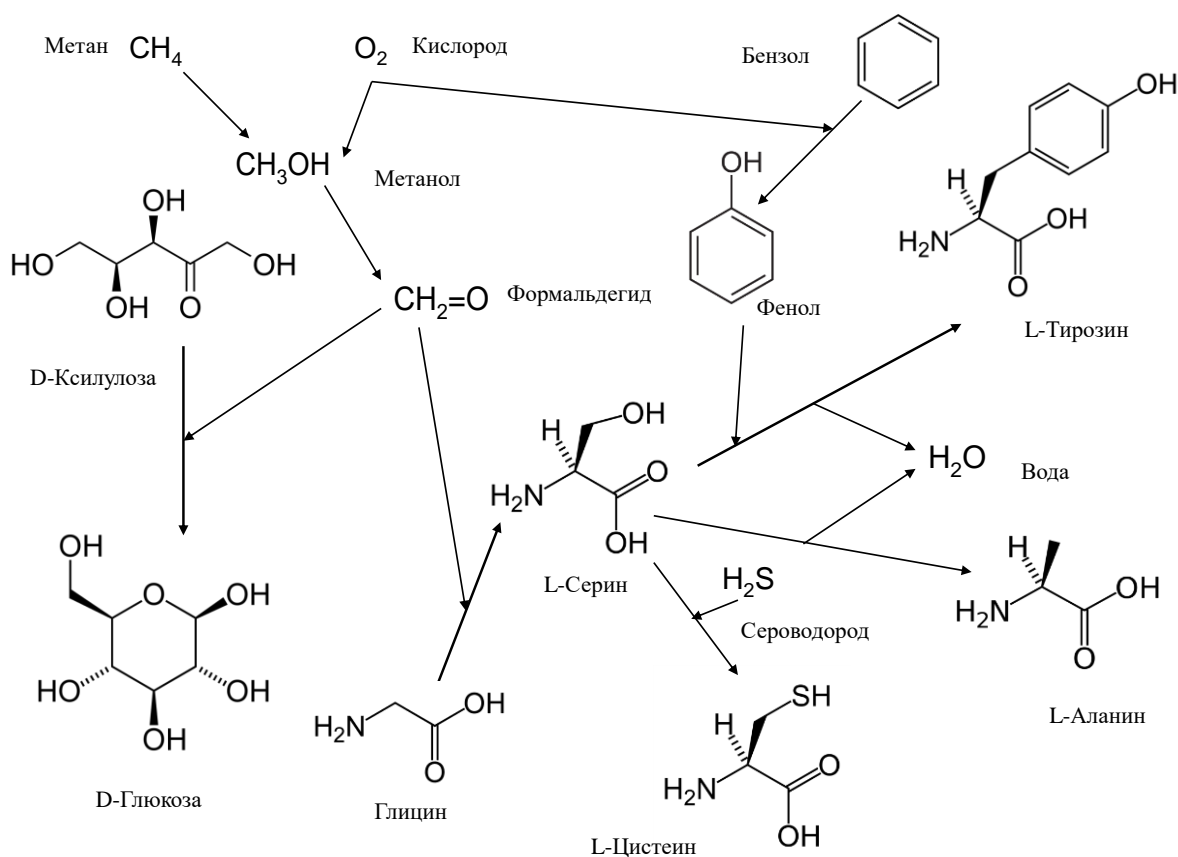
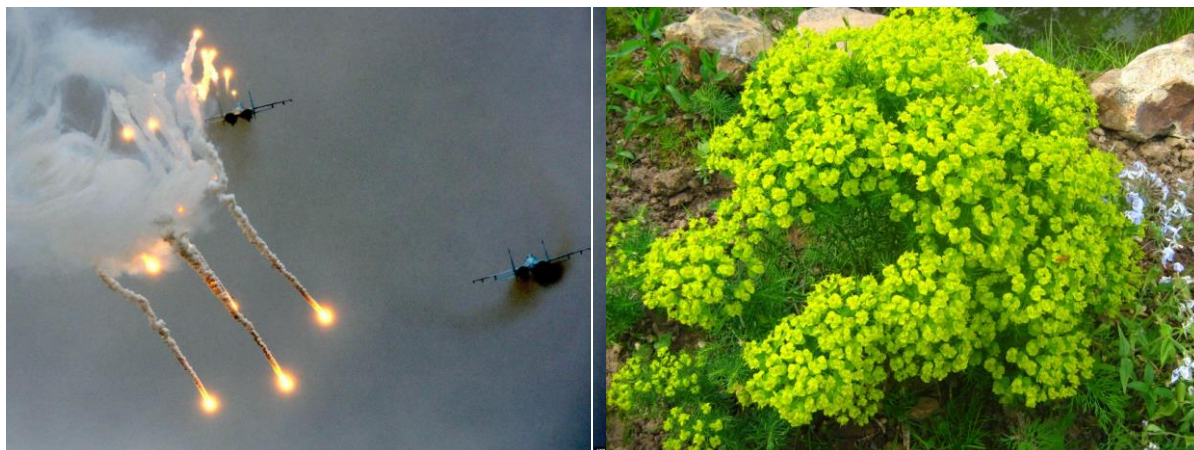


Рис. 1. Вверху. Многообразие форм фосфора. Слева вверху: взрывы фосфорных боеприпасов (изображение с сайта <https://free-news.su>). Справа вверху: предельно окисленная форма фосфора – фосфат – является подкормкой для растений и играет важнейшую роль в существовании абсолютно всех форм жизни. Изображение с сайта <http://samdizajner.ru> Внизу. Пример того, как два или три ядовитых вещества превращаются в одно полезное. Включение формальдегида и фенола (или бензола) в состав сахаров и аминокислот – блестящий пример биодетоксикации. Синтез метанола из метана осуществляется метанотрофными бактериями, серина и трехуглеродных сахаров из метанола – некоторыми метилотрофными бактериями и дрожжами, глюкозы из трехуглеродных сахаров – высшими организмами, аланина из серина – *Escherichia coli* и

Clostridium difficile, цистеина из серина – рядом микроорганизмов, тирозина из фенола – *Escherichia intermedia*, фенола из бензола – метанмонооксигеназой бактерий и грибов. Включение формальдегида, фенола и бензола в состав сахаров и аминокислот – убедительный пример биодеградаци. Рисунок А.З. Миндубаева

Содержание основного загрязнителя в сточных водах с предприятий, производящих или потребляющих белый фосфор, не должно превышать двух частей на миллион (Barber, 1996). По названным выше причинам приобрели актуальность разработки методов детоксикации P_4 – недорогих и без использования токсичных реагентов.

Биодегградация является одним из наиболее часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, в том числе очень токсичными (Meckenstock et al., 2015). Главное преимущество биодегградации, по сравнению с другими многочисленными методами обезвреживания стоков, заключается в том, что при ее использовании в окружающую среду не вносятся новые химические загрязняющие агенты. На Рисунок 1 внизу продемонстрирована показательная схема усвоения сразу нескольких токсичных веществ в едином метаболическом пути, демонстрирующая совершенство биохимии микроорганизмов и изображенная на основе литературных источников (Klein et al., 2019; Ettwig et al., 2010; Ro et al., 1997; Chung et al., 2015; Stover et al., 1992; Asojo et al., 2014; Skaugen et al., 1994; Jastrzębowska et al., 2015; Fuganti et al., 1974; Hofrichter, Ullrich, 2014; Busch et al., 2016). Включение нескольких токсичных ксенобиотиков (метан, бензол или фенол, индол) в состав сахаров и аминокислот, является, пожалуй, наиболее показательным примером биодегградации.

Это является весомым фундаментальным аргументом в пользу возможности биодегградации даже такого ксенобиотика, как белый фосфор. 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 (Duerksen-Hughes et al., 1997). В литературных источниках не найдено сведений о доказанных примерах биологической дегградации белого фосфора.

Десять лет назад возник наш проект переработки белого фосфора. Работы с этим веществом в нашем институте ведутся длительное время, и до сих пор в литературных источниках не были найдены сведения о его биодегградации, т.е. работа обладает новизной, а также значительным научным и практическим потенциалом. В результате проделанной работы впервые показана возможность дегградации белого фосфора под действием осадка сточных вод (ОСВ) водоочистных сооружений. Главное преимущество нашего метода – экологическая безопасность. Реализация метода внесет вклад в развитие зеленой химии в целом, поскольку проект направлен в новое для нее направление – поиск биологических катализаторов, ферментов, с новой, не изученной в настоящее время, активностью. Следует также учитывать параллельный вклад в фундаментальное научное знание, поскольку метаболизм белого фосфора до сих пор практически не изучен.

Предыдущие работы нашего коллектива (Миндубаев и др., 2011; Миндубаев и др., 2014; Миндубаев и др., 2017) позволили пролить свет на вопрос токсичности белого фосфора для микроорганизмов. Точно также не найдена информация о путях метаболизма белого фосфора в присутствии микробиоты или в тканях высших организмов. В изданной литературе идет речь исключительно об абиогенных путях дегградации и детоксикации белого фосфора. В свете этого, количественные данные о зависимости между скоростью исчезновения белого фосфора в субстрате и интенсивностью микробного метаболизма в нем, без преувеличения, являются уникальными. Получая их, мы опирались не на изданные ранее работы, а исключительно на результаты собственных исследований.

2. Методология

При проведении экспериментов использовали смесь уплотненного и обезвоженного осадка сточных вод (ОСВ) Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани. В качестве дополнительного пищевого субстрата, позволяющего сокращать лаг-фазу роста микрофлоры активного ила, в контроль и опыт добавлялась растительная биомасса –

зеленая масса растения амарант (*Amaranthus cruentus* L) (Миндубаев и др., 2009). Фитомасса смешивалась с ОСВ в соотношении 1:1 на сухой вес. В одном из экспериментов фитомасса амаранта перед внесением в субстрат была измельчена до состояния порошка на ручном блендере Philips HR 1370. Белый фосфор перед внесением в субстрат был эмульгирован в воде при помощи ультразвуковой ванны “Сапфир” при температуре 50°C в инертной атмосфере (азот) до образования однородной эмульсии. Далее эмульсия P_4 вносилась в субстраты пипеткой при перемешивании: ее объем соответствовал рассчитанной конечной концентрации белого фосфора в субстрате.

Анаэробная переработка сырья осуществлялась в реакторах лабораторного масштаба, непрерывно термостатированных при 38 °С. Загрузка реактора составляла 150–300 г субстрата, в зависимости от объема реактора (200–400 мл). В эксперименте с измельченной фитомассой во все повторы было добавлено по 60 г инокулята, после чего объемы субстратов достигли 360 мл, а концентрация P_4 в сериях опытов снизилась с 0,01 до 0,008.

Для контроля переработки P_4 были использованы ЯМР спектрометр высокого разрешения Avance 400 (Bruker) и газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010Ultra (Япония). Для поиска белого фосфора спектры ^{31}P ЯМР снимались с экстрактов ОСВ в органическом растворителе (диэтиловый эфир), для поиска метаболитов – с отфильтрованной водной фазы ОСВ.

Микробиологический посев из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 0,1 % производился после окончания анаэробной переработки. Посевы «газоном» осуществляли под плотную питательную среду МПА в чашке Петри. Посев из субстратов с исходным содержанием P_4 0,01 % проводился на крахмало–аммиачный агар.

Нами впервые проведен посев устойчивой микрофлоры в искусственную культуральную среду, содержащую в качестве единственного источника фосфора белый фосфор, и наблюдался рост в этой среде. Посев чистой культуры *Bacillus subtilis* из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 0,1 % производился в модифицированную среду Придхем-Готлиба. Наша модификация включает глюкозу, но не содержит источники фосфора (в качестве такового выступает белый фосфор). Среды разлиты в 200 мл склянки по 100 мл. Культивирование продолжалось 19 суток при температуре 37°C.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Условия биodeградации

При содержании белого фосфора в субстрате 0,1 % по массе, наблюдалось необратимое угнетение жизнедеятельности микрофлоры по сравнению с контролем, выражающееся в снижении выделения газообразных продуктов жизнедеятельности. Тем не менее, даже при такой концентрации токсичного вещества не наблюдалась полная гибель микроорганизмов. При содержании P_4 в иле 0,01% по массе, наблюдалось значительное угнетение, вплоть до полного прекращения выделения газа (Рисунок 2).

3.2. Мониторинг биodeградации

Из осадков с концентрацией P_4 0,01% первая проба для ^{31}P ЯМР анализа была взята на 35 день. Спектры продемонстрировали наличие одного сигнала, соответствующего белому фосфору. Значит, срок в 35 дней недостаточен для переработки P_4 ОСВ. Вторая проба была отобрана на 63 день. Спектр показал отсутствие сигналов фосфорных соединений, в том числе P_4 (кислоты фосфора в эфирную фракцию не переходят). Таким образом, срок продолжительностью 63 суток оказался достаточным для переработки белого фосфора в концентрации 0,01 %.

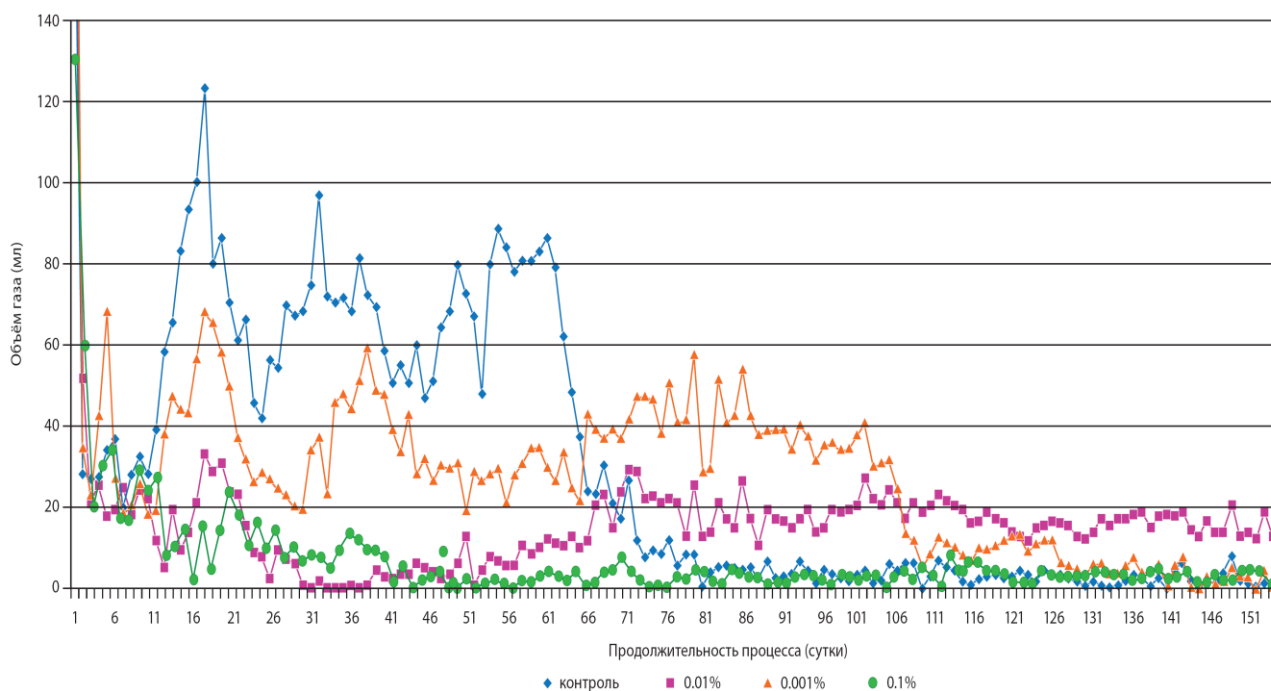


Рис. 2. Кинетика выделения газа в зависимости от концентрации белого фосфора. Удельные выходы газа составили 30,5 мл газа/мл субстрата в контроле, 28,3 мл газа/мл субстрата при концентрации 0,001 %, 16,0 мл газа/мл субстрата при концентрации 0,01 % и 5,8 мл газа/мл субстрата при концентрации 0,1 %, соответственно. Все точки на диаграммах усреднены из трех повторов. Продолжительность эксперимента 148 суток

На содержание углекислого газа белый фосфор оказывал менее заметное угнетающее воздействие, чем на содержание метана (Рисунок 3). Из этого следует, что метаногенные археобактерии более чувствительны к отравлению этим веществом по сравнению с другими представителями микрофлоры активного ила – эубактериями, продуцирующими углекислый газ (Миндубаев и др., 2014).

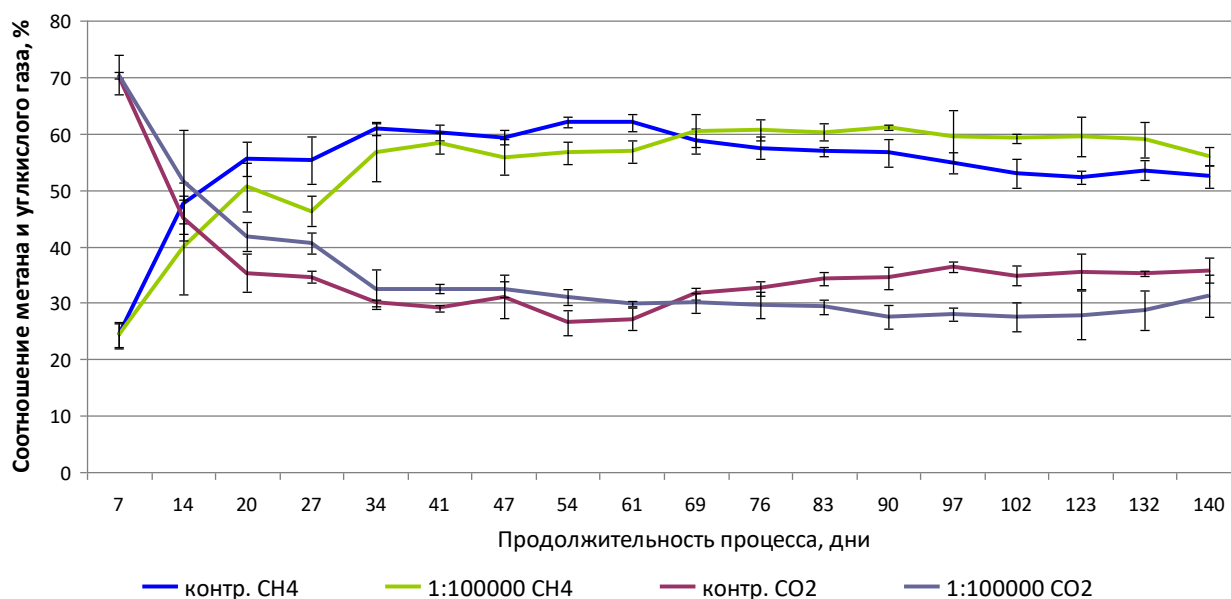


Рис. 3. Зависимость кинетики изменения состава газа от концентрации белого фосфора в осадках (0,001 % белого фосфора). В опытах содержание метана растет медленнее, чем в контролях, а на содержание CO_2 присутствие белого фосфора почти не влияет

3.3. Устойчивые микроорганизмы

Следует отметить, что на поверхности осадков с добавлением P_4 0,01% наблюдался рост колоний микроорганизмов. В контрольных образцах без белого фосфора рост микроорганизмов не наблюдался. Выделенные микроорганизмы идентифицировали как представителей рода *Streptomyces*. При одинаковом разведении из опытного (с P_4) субстрата с содержанием белого фосфора 0,1 %, на МПА выросло больше колоний бактерий, чем из контрольного. Плотность клеточной суспензии в контроле составляла $2,5 \times 10^8$ клеток/мл субстрата, а в опыте – $1,5 \times 10^{10}$ клеток/мл субстрата, т.е. на два порядка больше. Выращенные бактерии были идентифицированы как представители рода *Bacillus* (Миндубаев и др., 2011). Итак, во всех случаях мы наблюдаем сходное явление – отсутствие или ослабление роста микроорганизмов в контрольных субстратах после прекращения выделения газа. Вероятно, это различие вызвано тем, что охарактеризованные микроорганизмы лучше адаптируются к присутствию белого фосфора. В контрольных субстратах они угнетены присутствием других групп микроорганизмов.

1.4. Связь активности микробного метаболизма и разложения белого фосфора. Отличие эксперимента, описанного в работе (Миндубаев и др., 2014), состоит в том, что вносимая в субстраты фитомасса амаранта (Рисунок 4) была измельчена до состояния порошка. Это резко активировало метаболические процессы в первые сутки эксперимента, как в контроле, так и в опытах. При этом интенсивно выделялся сероводород, образующийся при анаэробном разложении белковых веществ амаранта. Накопление сероводорода привело к постепенному прекращению выделения газообразных продуктов во всех образцах. Токсичное влияние P_4 в опытах в этот период не наблюдалось: характер затухания метаболических процессов в контролях и опытах был одинаковым. По этой причине на 48 день эксперимента во все субстраты был добавлен инокулят, представляющий собой ОСВ той же партии. После его внесения микрофлора субстратов активировалась, но не одновременно в разных повторах. В одном из трех повторов, включая контроль, жизнедеятельность микрофлоры восстановилась сразу после внесения инокулята. Кинетика второго повтора имеет выраженную лаг-фазу. Третий повтор не активировался (Рисунок 5, слева). Результат эксперимента однозначно свидетельствует о биологической деградации P_4 : разложение ксенобиотика начинается только после преодоления микрофлорой интоксикации сероводородом. Анализ ГХМС показал, что концентрация белого фосфора обратно пропорциональна активности микробного метаболизма в них (Рисунок 5, справа). Это означает четкую зависимость между скоростью исчезновения белого фосфора в субстрате и интенсивностью микробного метаболизма в нем.



Рис. 4. Амарантовое поле. Изображение с сайта <https://wallpaperscraft.ru>

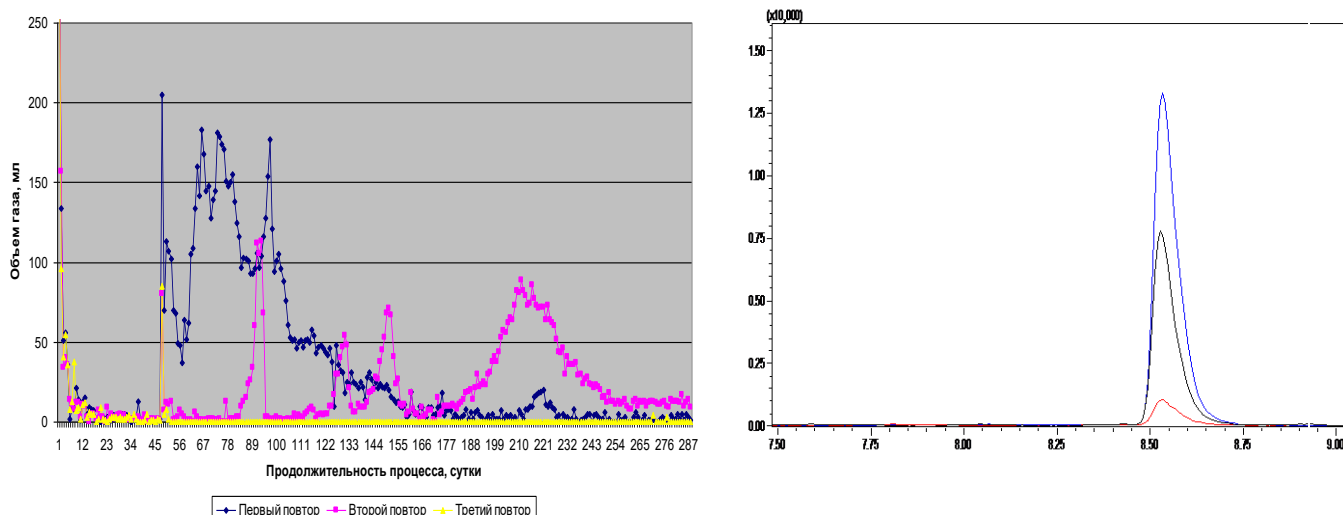


Рис. 5. Различия интенсивности сигнала ГХМС белого фосфора для повторов опыта (наименее интенсивный сигнал – первого повтора, средний по интенсивности – второго, наиболее интенсивный – третьего). Слева: Кинетика выделения газа в опыте с содержанием P_4 0.01% (три повтора). Удельная продуктивность первого, второго и третьего повторов 27.3, 17.2 и 2.4 мл газа/ мл субстрата за 288 суток, соответственно. Справа: Спектр ГХМС для трех повторов, снятый на 223 сутки эксперимента. Для большей наглядности нужно сравнить с диаграммами на рис. слева

3.5. Метаболические превращения белого фосфора

В опытном спектре ^{31}P ЯМР, снятом с водной фазы, проявились сигналы, соответствующие фосфиту и гипофосфиту (Миндубаев и др., 2017) (Рисунок 6). Таким образом, он является подтверждением предполагаемого нами метаболического пути.

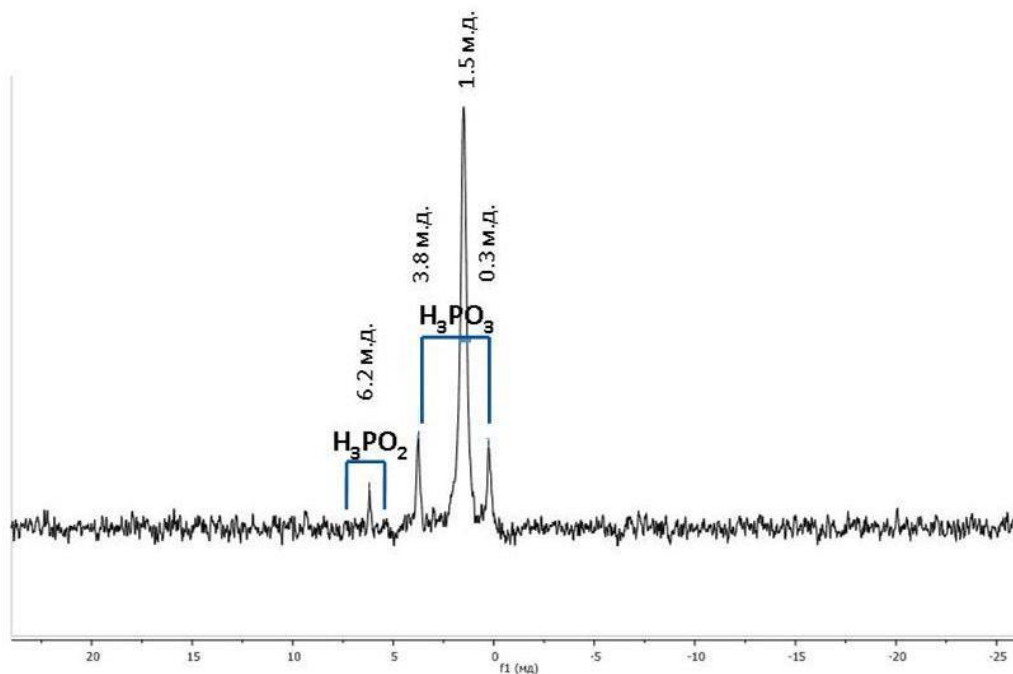


Рис. 6. ^{31}P ЯМР спектр водной фазы опыта с содержанием P_4 в ОСВ 0,1 %. Продолжительность эксперимента 153 сут. Сигналы в области 0,3 и 3,8 ppm соответствуют фосфиту. Сигнал в области 6,2 ppm относится к гипофосфиту. Оба вещества рассматривались как возможные метаболиты белого фосфора. Сигнал в области 1,5 ppm относится к фосфату

3.6. Искусственные культуральные среды с белым фосфором

Бациллы растут очень интенсивно в синтетической среде, содержащей фосфат. В среде без источников фосфора признаки жизнедеятельности вообще не наблюдаются, среда прозрачна, отсутствует показатель брожения глюкозы – выделение газа. Самый интересный результат демонстрирует среда с белым фосфором. В ней присутствуют отдельные мелкие колонии. Наблюдалось выделение газа. Значит, бациллы смогли расти, хоть и очень медленно, на продуктах окисления белого фосфора, включающие незначительные количества фосфата и фосфита! Рост в культуральных средах с белым фосфором наблюдался нами впервые.

4. Заключение

Впервые показана возможность деградации белого фосфора (P_4) под действием осадка сточных вод (ОСВ) водоочистных сооружений. Показано, что белый фосфор угнетает рост микроорганизмов за счет образования токсичных промежуточных продуктов его деградации. Доказано, что снижение концентрации P_4 обратно пропорционально продолжительности лаг-фазы роста и прямо пропорционально активности метаболических процессов микрофлоры. Проведен поиск метаболитов белого фосфора и предложен путь его метаболизма.

Установлено, что белый фосфор проявляет выраженное токсическое действие на микрофлору активного ила, подавляя рост микроорганизмов. Однако использованная в данной работе концентрация белого фосфора (от 0,1 до 0,01 % включительно) не привела к гибели микрофлоры, а в концентрации 0,001 % он практически не оказывает влияние на удельную продуктивность газообразования. Последующая адаптация микрофлоры к действию токсиканта приводит к полной биодеградации и переработке белого фосфора в нетоксичные продукты с сохранением исходной метаболической активности. Между жизнедеятельностью микрофлоры и скоростью разложения в субстрате белого фосфора есть прямая связь, что свидетельствует в пользу именно биологической деградации P_4 . Методом ^{31}P ЯМР обнаружены предполагаемые метаболиты P_4 . Выделены и охарактеризованы микроорганизмы, способные расти в субстратах, содержащих белый фосфор в концентрации до 0,1 % по массе. Посев устойчивых бактерий в синтетическую среду, содержащую белый фосфор в качестве единственного источника фосфора, продемонстрировал возможность их роста в таких условиях. Полученные нашим коллективом результаты открывают перспективы практического применения биодеградации белого фосфора.

4. Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-08-31091 мол_а).

Литература

- Касаткин и др., 2017 – Касаткин А.В., Ватутин Н.М., Колтунов В.В., Малинин С.Е. Особенности фосфоросодержащих боеприпасов специального назначения и методы их утилизации. *Вестник технологического университета*, 2017. 20(5): 39-43.
- Миндубаев и др., 2009 – Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Скворцов Е.В., Миронов В.Ф., Зобов В.В., Ахмадуллина Ф.Ю., Миронова Л.Г., Белостоцкий Д.Е., Коновалов А.И. Стимулирующее влияние сухой фитомассы амаранта *Amaranthus cruentus* на биометаногенез в трудноферментируемых субстратах. *Вестник Казанского технологического университета*. 2009. 4: 220-226.
- Миндубаев и др., 2011 – Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордьян 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. 153(2): 110-119.
- Миндубаев и др., 2014 – Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Кулик Н.В., Ахоссийенагбе С.К., Алимова Ф.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Панкова А.В., Болормаа Ч., Сапармырадов К.А., Яхваров Д.Г. Белый фосфор как новый объект биологической деструкции // *Бутлеровские сообщения*. 2014. 40(12): 1-26.
- Миндубаев и др., 2017 – Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Яхваров Д.Г. (2017). Биодеградация белого фосфора // *Природа*. 2017. 5: 29-43.

[Asojo et al., 2014](#) – Asojo O.A., Nelson S.K., Mootien S., Lee Y., Rezende W.C., Hyman D.A., Matsumoto M.M., S. Reiling, Kelleher A., Ledizet M., Koskib R.A., Anthony K.G. Structural and biochemical analyses of alanine racemase from the multidrug-resistant *Clostridium difficile* strain 630 // *Acta Cryst.* 2014. 70(7): 1922-1933.

[Barber, 1996](#) – Barber J.C. Processes for the disposal and recovery of phosphy water. Patent USA US5549878, 1996.

[Busch et al., 2016](#) – Busch F., Rajendran Ch., Heyn K., Schlee S., Merkl R., Sterne R. Ancestral Tryptophan Synthase Reveals Functional Sophistication of Primordial Enzyme Complexes // *Cell Chemical Biology.* 2016. 23(6): 709-715.

[Chung et al., 2015](#) – Chung S.T., Chacko Sh.K., Sunehag A.L., Haymond M.W. Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review // *Diabetes.* 2015. 64(12): 3996-4010.

[Davis, 2002](#) – Davis K.G. Acute Management of White Phosphorus Burn // *Military medicine.* 2002. 167(1): 83-84.

[Duerksen-Hughes et al., 1997](#) – Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff L., Thampi S., Donkin S. Toxicological profile for white phosphorus. U.S. Department of health and human services. USA, 1997. 248 p.

[Ettwig et al., 2010](#) – Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J.C.T., van Alen Th., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., Op den Camp H.J.M., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.-J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S.M., Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // *Nature.* 2010. 464(7288): 543-548.

[Fuganti et al., 1974](#) – Fuganti C., Ghiringhelli D., Giangrasso D., Grasselli P. Stereochemical course of the enzymic synthesis of L-tyrosine from phenol and L-serine catalysed by tyrosine phenol lyase from *Escherichia intermedia* // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1974. 18: 726-727.

[Gleason, 2007](#) – Gleason W. An Introduction to Phosphorus: History, Production, and Application // *JOM.* 2007. 59(6): 17-19.

[Hofrichter, Ullrich, 2014](#) – Hofrichter M., Ullrich R. Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases // *Current Opinion in Chemical Biology.* 2014. 19: 116-125.

[Jastrzębowska et al., 2015](#) – Jastrzębowska K., Gabriel I. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids.* 2015. 47(2): 227-49.

[Klein et al., 2019](#) – Klein F., Grozeva N.G., Seewald J.S. Abiotic methane synthesis and serpentinization in olivine-hosted fluid inclusions // *PNAS.* 2019. 116(36): 17666-17672.

[Meckenstock et al., 2015](#) – Meckenstock R.U., Elsner M., Griebler C., Lueders T., Stumpp C., Aamand J., Agathos S.N., Albrechtsen H.-J., Bastiaens L., Bjerg P.L., Boon N., Dejonghe W., Huang W.E., Schmidt S.I., Smolders E., Sørensen S.R., Springael D., van Breukelen B.M. Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers // *Environ. Sci. Technol.* 2015. 49(12): 7073-7081.

[Ro et al., 1997](#) – Ro Y.T., Eom C.Y., Song T., Cho J.W., Kim Y.M. Dihydroxyacetone Synthase from a Methanol-Utilizing Carboxydobacterium, *Acinetobacter* sp. Strain JC1 DSM 3803 // *J. Bacteriol.* 1997. 179(19): 6041-6047.

[Skaugen et al., 1994](#) – Skaugen M., Nissen-Meyer J., Jung G., Stevanovic S., Sletten K., Inger C., Abildgaard M., Nes I.F. In Vivo Conversion of L-Serine to D-Alanine in a Ribosomally Synthesized Polypeptide // *J. Biol. Chem.* 1994. 269(44): 27183-27185.

[Stover et al., 1992](#) – Stover P., Zamora M., Shostak K., Gautam-Basak M., Schirch V. *Escherichia coli* Serine Hydroxymethyltransferase. The role of histidine 228 in determining reaction specificity // *J. Biol. Chem.* 1992. 267(25): 17679-11687.

References

[Asojo et al., 2014](#) – Asojo O.A., Nelson S.K., Mootien S., Lee Y., Rezende W.C., Hyman D.A., Matsumoto M.M., S. Reiling, Kelleher A., Ledizet M., Koskib R.A., Anthony K.G. (2014). Structural and biochemical analyses of alanine racemase from the multidrug-resistant *Clostridium difficile* strain 630. *Acta Cryst.* 70(7): 1922-1933.

[Barber, 1996](#) – Barber J.C. (1996). Processes for the disposal and recovery of phosphy water. Patent USA US5549878.

- Busch et al., 2016 – Busch F., Rajendran Ch., Heyn K., Schlee S., Merkl R., Sterne R. (2016). Ancestral Tryptophan Synthase Reveals Functional Sophistication of Primordial Enzyme Complexes. *Cell Chemical Biology*. 23(6): 709-715.
- Chung et al., 2015 – Chung S.T., Chacko Sh.K., Sunehag A.L., Haymond M.W. (2015). Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review. *Diabetes*. 64(12): 3996-4010.
- Davis, 2002 – Davis K.G. (2002). Acute Management of White Phosphorus Burn. *Military medicine*. 167(1): 83-84.
- Duerksen-Hughes et al., 1997 – Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff I., Thampi S., Donkin S. (1997). Toxicological profile for white phosphorus. U.S. Department of health and human services. USA. 248 p.
- Ettwig et al., 2010 – Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J.C.T., van Alen Th., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., Op den Camp H.J.M., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.-J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S.M., Strous M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*. 464(7288): 543-548.
- Fuganti et al., 1974 – Fuganti C., Ghiringhelli D., Giangrasso 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*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, 18: 726-727.
- Gleason, 2007 – Gleason W. (2007). An Introduction to Phosphorus: History, Production, and Application. *JOM*. 59(6): 17-19.
- Hofrichter, Ullrich, 2014 – Hofrichter M., Ullrich R. (2014). Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 19: 116-125.
- Jastrzębowska et al., 2015 – Jastrzębowska K., Gabriel I. (2015). Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids*. 47(2): 227-249.
- Kasatkin et al., 2017 – Kasatkin A.V., N.M. Vatutin, Koltunov V.V., Malinin S.E. (2017). Osobennosti fosforosoderzhashchikh boepripasov spetsial'nogo naznacheniya i metody ikh utilizatsii [Features of phosphorus-containing ammunition for special purposes and methods for their utilization]. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*. 220(5): 39-43. [in Russian]
- Klein et al., 2019 – Klein F., Grozeva N.G., Seewald J.S. (2019). Abiotic methane synthesis and serpentinization in olivine-hosted fluid inclusions. *PNAS*. 116(36): 17666-17672.
- Meckenstock et al., 2015 – Meckenstock R.U., Elsner M., Griebler C., Lueders T., Stumpp C., Aamand J., Agathos S.N., Albrechtsen H.-J., Bastiaens L., Bjerg P.L., Boon N., Dejonghe W., Huang W.E., Schmidt S.I., Smolders E., Sørensen S.R., Springael D., van Breukelen B.M. (2015). Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers. *Environ. Sci. Technol*. 49(12): 7073-7081.
- Mindubaev et al., 2009 – Mindubaev A.Z., Minzanova S.T., Skvortsov E.V., Mironov V.F., Zobov V.V., Ahmadullina F.J., Mironova L.G., Belostotsky D.E., Konovalov A.I. (2009). Stimuliruyushchee vliyanie sukhoi fitomassy amaranta *Amaranthus cruentus* na biometanogenez v trudnofermentiruemykh substratakh [Stimulating influence of dry phytomass of amaranth *Amaranthus cruentus* on biomethanogenesis in poorly fermentable substrata]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 4: 220-226. [in Russian]
- Mindubaev et al., 2011 – Mindubaev A.Z., Akosah Y.A., Alimova F.K., Afordoanyi D.M., Kagirov R.M., Minzanova S.T., Mironova L.G., Yakhvarov D.G. (2011). O razlozhenii belogo fosfora osadkom stochnykh vod [On the white phosphorus degradation by wastewater mud]. *Uchen.zap. Kazan. un-ta. Ser. Estestv. Nauki*. 153(2): 110-119. [in Russian]
- Mindubaev et al., 2014 – Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Gorbachuk E.V., Kulik N.V., Ahossiyenagbe S.C., Alimova F.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Pankova A.V., Bolormaa C., Saparmyradov K.A., Yakhvarov D.G. (2014). Belyi fosfor kak novyi ob"ekt biologicheskoi destruktzii [White phosphorus as a new object of biological destruction]. *Butlerovskie soobshcheniya*. 40(12): 1-26. [in Russian]
- Mindubaev et al., 2017 – Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Validov Sh.Z., Yakhvarov D.G. (2017). Biodegradatsiya belogo fosfora [Biodegradation of white phosphorus]. *Priroda*. 5: 29-43. [in Russian]

Ro et al., 1997 – Ro Y.T., Eom C.Y., Song T., Cho J.W., Kim Y.M. (1997). Dihydroxyacetone Synthase from a Methanol-Utilizing Carboxydobacterium, *Acinetobacter* sp. Strain JC1 DSM 3803. *J. Bacteriol.* 179(19): 6041-6047.

Skaugen et al., 1994 – Skaugen M., Nissen-Meyer J., Jung G., Stevanovic S., Sletten K., Inger C., Abildgaard M., Nes I.F. (1994). In Vivo Conversion of L-Serine to D-Alanine in a Ribosomally Synthesized Polypeptide. *J. Biol. Chem.* 269(44): 27183-27185.

Stover et al., 1992 – Stover P., Zamora M., Shostak K., Gautam-Basak M., Schirch V. (1992). *Escherichia coli* Serine Hydroxymethyltransferase. The role of histidine 228 in determining reaction specificity. *J. Biol. Chem.* 267(25): 17679-11687.

Биодеградация белого фосфора – опасного промышленного загрязнителя

Антон Зуфарович Миндубаев^{a, *}, Александра Дмитриевна Волошина^a,
Наталья Владимировна Кулик^a, Дмитрий Валентинович Рыжиков^a,
Татьяна Александровна Барсукова^a, Йав Абайе Акосах^b,
Салима Тахиятулловна Минзанова^a, Любовь Геннадьевна Миронова^a

^a Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Российская Федерация

^b ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Российская Федерация

Аннотация. Впервые показана возможность деградации белого фосфора под действием осадка сточных вод (ОСВ) водоочистных сооружений. Показано, что белый фосфор угнетает рост микроорганизмов не сразу после внесения, а спустя несколько дней или даже недель. Это означает, что токсическим действием обладают промежуточные продукты деградации, накапливающиеся в субстратах. Также по изменению состава выделяющихся газообразных продуктов можно делать вывод о большей устойчивости к белому фосфору эубактерий по сравнению с метаногенами. Получены культуры микроорганизмов, растущих на субстратах с содержанием белого фосфора 0,01 и даже 0,1 %. Метод ГХМС продемонстрировал, что скорость снижения концентрации P₄ в средах обратно пропорциональна продолжительности лаг-фазы роста и активности метаболических процессов микрофлоры. Это указывает на наличие биодеградации белого фосфора. Кроме того, в представленной работе проведен поиск метаболитов белого фосфора, а также впервые составлен предполагаемый путь его метаболизма. Посев устойчивых бактерий на синтетическую среду, содержащую белый фосфор в качестве единственного источника фосфора, продемонстрировал возможность их роста в таких условиях.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, осадки сточных вод, анаэробные условия, кинетика выделения газа, газовая хроматомасс-спектрометрия, метаболический путь, ядерный магнитный резонанс.

* Корреспондирующий автор

Адреса электронной почты: mindubaev-az@yandex.ru (А.З. Миндубаев)