

ВКЛЮЧЕНИЕ БЕЛОГО ФОСФОРА В ПРИРОДНЫЙ КРУГОВОРОТ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

А. З. Миндубаев^{1}, А. Д. Волошина¹, Н. В. Кулик¹, К. А. Сапармырадов²,
Х. Р. Хаяров², С. Т. Минзанова¹, Л. Г. Миронова¹, Д. Г. Яхваров¹*

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского Научного Центра РАН, г. Казань, Россия, *e-mail: mindubaev@iopc.ru

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия

Поступила в редакцию 27.06.2017 г.

Приведены результаты исследований биodeградации опасного токсиканта белого фосфора, подтверждающие гипотезу о включении элементного фосфора в природный круговорот биогенных элементов. Впервые достоверно продемонстрировано включение белого фосфора в биомассу растущих микроорганизмов в результате их посева в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. Показано, что микроорганизмы из разных таксономических групп (бактерии, плесневые грибы, стрептомицеты) имеют различную устойчивость к белому фосфору в процессе его биodeградации. Предложена гипотетическая схема биodeградации белого фосфора в природных условиях.

Ключевые слова: детоксикация, биodeградация, белый фосфор, *Pseudomonas alcaliphila*, *Streptomyces* sp., *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, культуральные среды, химическое равновесие, природный круговорот фосфора.

ВВЕДЕНИЕ

Биodeградация становится одним из наиболее популярных и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, зачастую очень токсичных [1]. Главное преимущество биodeградации, по сравнению с другими многочисленными методами обезвреживания стоков, загрязненных вод и почв, заключается в том, что при ее использовании в окружающую среду не вносятся новые химические загрязняющие агенты. В основе метода лежит уникальная способность микроорганизмов адаптироваться к самым неблагоприятным условиям существования. Достаточно вспомнить сообщение об обнаружении бактерии с мышьяком вместо фосфора в составе ДНК [2] или о том, что антибиотики могут служить единственным источником углерода для культуры микробов [3].

Поэтому, например, биоминерализация отходов производства синтетического каучука тиокола (производимого Казанским заводом синтетического каучука) сообществом сероокисляющих бактерий активного ила, длится всего 18 суток при 28°C; в стерильной среде за этот же период низкомолекулярный тиокол окисляется кислородом воздуха только на 3-5% [4]. Однако следует иметь ввиду, что токсичность тиокола и продуктов его распада сравнительно невелика.

Белый фосфор является одним из самых опасных веществ, применяемых в крупнотоннажном химическом производстве, а также относится к потенциально чрезвычайно опасным загрязнителям окружающей среды. Поэтому разработка способов его детоксикации является актуальным направлением исследований. В наших предыдущих работах было показано, что для этого может быть использован метод биодеградациии, который позволяет достаточно эффективно трансформировать белый фосфор в нетоксичные водорастворимые соединения [5]. Целью настоящего исследования было не только изучение биодеградациии белого фосфора, но также попытка проверить возможность включения белого фосфора в природный круговорот биогенных элементов на примере его деградациии микроорганизмами различных таксономических групп.

Будучи биогенным элементом, фосфор в биосфере Земли включен в биогеохимический круговорот, именуемый в англоязычной литературе “phosphorus recycling”. Исследования последних лет значительно расширили наши представления о круговороте фосфора. Выяснилось, что в него вступают не только фосфаты, но и соединения восстановленного фосфора, в том числе фосфорорганические [6]. Таким образом, известно, что в этот круговорот включен весь фосфор Земли. Однако до настоящего времени почти ничего не известно о метаболизме элементного фосфора. В некотором смысле, элементный фосфор остается «слабым звеном» круговорота. В связи с этим осуществление биологической деградациии элементного фосфора, с перспективой применения ее на практике, без сомнения, является важной задачей, затрагивающей охрану окружающей среды.

В литературных источниках не найдено сведений о доказанных примерах биологической деградациии белого фосфора. Предыдущие работы нашего коллектива [7] позволили пролить свет на практически неизученный вопрос токсичности белого фосфора для прокариот. Однако для убедительного доказательства биотрансформациии белого фосфора и включения его в природный круговорот необходим был важный шаг. До сих пор биодеградациия P_4 наблюдалась нами в осадках сточных вод (ОСВ). Данный субстрат имеет весомое преимущество – богатое видовое разнообразие микробного сообщества [8, 9], позволяющее добиться биодеградациии даже такого «трудного» ксенобиотика, как белый фосфор. Однако ОСВ имеет также и ряд недостатков – в первую очередь, это непостоянство состава и свойств, а также сложнейший химический состав. Следовательно, дальнейшую работу было необходимо вести в искусственных культуральных средах, имеющих стандартный, постоянный состав. Только в таких средах можно достоверно показать

обезвреживание белого фосфора микроорганизмами, а также вести их селекцию на способность обезвреживать все возрастающие концентрации белого фосфора.

Несмотря на значительное многообразие микробиологических культуральных сред, используемых в настоящее время, все они содержат источник биогенного элемента фосфора в виде точно рассчитанного соотношения дигидрофосфата и гидрофосфата калия или натрия. В отсутствие фосфора рост любых живых организмов, в том числе микроорганизмов, невозможен.

В этой работе нами был впервые произведен посев микрофлоры в искусственную культуральную среду, содержащую в качестве единственного источника фосфора белый фосфор (при отсутствии фосфатов) для того, чтобы установить, возможен ли рост микроорганизмов в этой среде. Если рост будет наблюдаться, то это станет доказательством включения белого фосфора в природный круговорот этого элемента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры бактерий, выделенных из осадка сточных вод с добавлением белого фосфора, рассмотренного в статье [7], были идентифицированы на приборе Bruker Daltonik MALDI Biotyper на базе протеомного центра КФУ. Идентификация проводилась на основе анализа белкового состава микробной клетки.

Был произведен посев устойчивой микрофлоры в искусственную культуральную среду, содержащую в качестве единственного источника фосфора белый фосфор. Посевы производились в модифицированную среду Придхем-Готлиба. Классическая среда Придхем-Готлиба не содержит специальных источников углерода: в качестве таковых выступают нефтепродукты. Наша модификация этой среды включает глюкозу, но не содержит источников фосфора (в качестве такового выступает белый фосфор). 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, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,15 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,27 г, агар – 4-8 г (полужидкая), источник Р – белый фосфор. В модификацию среды, содержащей источники фосфора, добавляли также фосфаты (в перерасчете на 1 л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 7,4 г, KH_2PO_4 – 2,38 г [10].

Посев *Aspergillus niger*, споры которого первоначально были случайно внесены вместе с белым фосфором, производили в среду, содержащую белый фосфор в концентрации 0,01 и 0,05% по массе. В контрольные среды К (+) вносился фосфат. В контрольные среды К (-) источники фосфора не вносились. Белый фосфор эмульгировали в стерилизованной автоклавированием дистиллированной воде. Изначально планировался посев устойчивых бацилл, однако в среды попали споры *A. niger*, вероятно, с белым фосфором, который не подвергся стерилизации. Произвели посев выросших *A. niger* в контрольные среды К (+) и К (-). Второй посев *A. niger* был произведен в среды аналогичного состава, третий - в среды с увеличенной концентрацией белого фосфора: 0,05, 0,1 и 0,2% по массе. Аналогично был произведен посев

Streptomyces sp., выделенного из ОСВ с 0,01% белого фосфора, соответствующий *Streptomyces* sp. А8, описанному в работе [11]. Четвертый пересев проводился в среды с концентрацией белого фосфора 0,1, 0,5 и 1% по массе. В этом посеве, помимо аспергилла и стрептомицета, высевался гриб *Trichoderma asperellum* F-1087, любезно предоставленный кафедрой биохимии ИФМиБ КФУ. После данного пересева был произведен посев грибов из среды с максимальной концентрацией белого фосфора (1%) в среду Сабуро с целью проверить жизнеспособность микроорганизмов после выдерживания в неблагоприятных условиях.

Был произведен посев *S.* sp. А8 из среды с фосфатом и *S.* sp. А8 из среды с содержанием белого фосфора 0,5% (при которой не наблюдался рост микроорганизмов) в среду Сабуро, с целью сравнения устойчивости этих двух линий микроорганизма.

Бактерии *Pseudomonas alcaliphila*, выделенные на кафедре биохимии КФУ из ОСВ с белым фосфором, высевали в среды идентичного состава, содержащие 0,01 и 0,05% белого фосфора, в чашки Петри и в плоскодонные колбы на 50 мл. Оптическая плотность измерялась на фотоэлектроколориметре АР-101 (АреI, Япония) при длине волны 540 нм. Второй посев той же культуры *P. alcaliphila* был произведен через 42 дня.

Рост микроорганизмов осуществлялся в термостате при 25°C.

Метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) применялся для обнаружения белого фосфора и его предполагаемых метаболитов в культуральной среде после 25 суток роста *A. niger*. Для масс-спектрометрии использовался газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010Ultra (Япония).

Секвенирование фрагмента гена 16S РНК *S.* sp. А8 с целью установления его видовой принадлежности, проводили в ЗАО Евроген (г. Москва). Для определения антибиотической активности *S.* sp. А8, в качестве тест-организмов использованы бактерии *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas putida*, пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Для определения фитотоксичности использовались семена сорных растений щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*) и лебеда голостебельная (*Atriplex nudicaulis*), а также одноклеточная зеленая водоросль (*Chlorella vulgaris*).

Посев в среду с фосфитом калия в качестве источника фосфора проводился следующим образом. Культура *Bacillus subtilis*, описанная в работе [12], высевалась в чашки Петри с модифицированной средой Придхем-Готлиба, содержащей в качестве единственного источника фосфора фосфит калия в концентрациях 0,08 и 0,8%. В качестве контролей выступала среда без источника фосфора и с фосфатом. Чашки с посевом выдерживались в термостате при 37°C в течение 13 суток. Среда с фосфитом была приготовлена следующим образом. Кристаллическая фосфористая кислота H_3PO_3 (ХЧ) была растворена в дистиллированной воде до концентрации 8% (0,8 г/10 мл), рН раствора 2,7. Затем раствор был нейтрализован 5 мл 1% водного КОН до рН 7,9 (благоприятный для роста бактерий). Раствор фосфита калия добавлялся в среды в соотношении 1/10 и 1/100. Конечная концентрация фосфита 0,8%

содержала такое же количество фосфора, как общее количество фосфата в контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ рибосомных белков, проведенный на кафедре биохимии Казанского федерального университета, позволил обнаружить пять видов бактерий, выживших после внесения белого фосфора в ОСВ: *Pseudomonas alcaliphila*, *Raoultella terrigena*, *Paenibacillus polymyxa*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Bacillus megaterium*. Псевдомонады и ряд бацилл известны как эффективные деструкторы неприродных веществ [13], однако устойчивость к белому фосфору была выявлена для них впервые [14].

Рост в присутствии белого фосфора *Aspergillus niger*. В посевах с *Aspergillus niger* на следующие сутки отмечалось образование черного осадка, предположительно, фосфидов, который на пятые сутки полностью исчез. Следует учесть, что среда Придхем-Готлиба богата ионами переходных металлов, в присутствии которых белый фосфор неустойчив и легко диспропорционирует до нерастворимых фосфидов и водорастворимых солей кислородсодержащих кислот фосфора [15]. По всей видимости, споры плесневого гриба случайно попали в среды с навесками белого фосфора: перед внесением в среды он не подвергался стерилизации в автоклаве при 120°C по причине высокого риска работы с этим веществом, особенно при нагреве. В средах с 0,01% белого фосфора выросло множество мелких колоний *A. niger*, а в средах с 0,05% - меньшее число колоний, но более крупных. По всей видимости, это означает, что в среде с большей концентрацией ксенобиотика не все споры смогли прорасти. *A. niger* полностью подавлял рост бацилл, выделенных из ОСВ, работа с которыми планировалась изначально.

На пятые сутки переселили культуру *A. niger*, выросшую при 0,05% белого фосфора, в контрольные среды К (+) и К (-). Через шесть суток после посева наблюдалась следующая картина. В среде К (+) с фосфатом выросло значительное число сравнительно мелких колоний: это означает, что большинство спор проросло, что естественно в благоприятных условиях. В среде К (-) без источников фосфора, колонии выросли немногочисленные, занимающие сравнительно большую площадь, но очень ослабленные (практически прозрачные, с неразвитым мицелием и отдельными конидиеносцами, выглядящими, как россыпь черных точек, а не сплошное черное поле). По всей видимости, сказалась нехватка фосфора: агар, используемый для приготовления среды, содержит примесь фосфата, но это недостаточно для полноценного роста грибов (рис. 1). Известно, что растения и микроорганизмы в природных условиях часто испытывают фосфорное голодание, и вырабатывают к нему ряд адаптаций. Причем, согласно [16], микроорганизмы выдерживают более жесткий дефицит фосфора, что и наблюдалось нами. Любопытно, что в среде с 0,05% белого фосфора колоний выросло меньше, чем в К (+), однако они производили впечатление совершенно нормальных, не испытывающих дефицит питательных веществ [10, 17]. Отсюда следует вывод, что в среде с белым фосфором выживают не все споры гриба, но

выжившие обладают способностью использовать в качестве источника фосфора либо сам белый фосфор, либо продукты его химических превращений. Значительный размер колоний, выросших в присутствии P_4 , объясняется менее жесткой конкуренцией между немногими адаптировавшимися культурами.

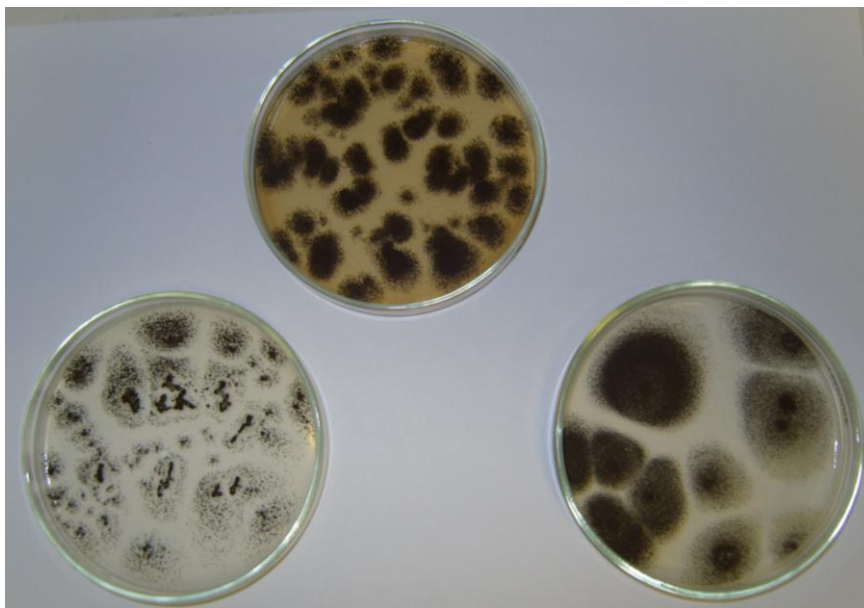


Рис. 1. Первый пересев устойчивых аспергиллов. Слева – среда без источника фосфора: наблюдается рост 33 ослабленных колоний аспергилла. Вверху – среда с фосфатом: наблюдается рост 49 колоний *A. niger*. Справа – среда с 0,05% белого фосфора: наблюдается рост 11 крупных колоний *A. niger*. Чашки сфотографированы через шесть суток после повторного посева.

После второго посева, произведенного через 63 дня после первого посева, наблюдался интенсивный рост аспергилла в среде, содержащей 0,01 и 0,05% белого фосфора. Судя по всему, среда с 0,01% белого фосфора более благоприятна для роста грибов: на четвертый день после посева колонии уже приобрели характерную черную окраску, свидетельствующую о спороношении. В среде с 0,05% P_4 колонии на четвертый день еще только приступали к размножению и имели светлую окраску. Отставание в развитии для них продолжало наблюдаться и на 19 сутки после посева: колонии грибов хотя и потемнели, но все же остались более светлыми, чем колонии при 0,01% белого фосфора. Поскольку черный цвет *A. niger* придают споры, светлая окраска свидетельствует о пониженной фертильности плесневого гриба, растущего при высокой концентрации P_4 .

Очередной (третий) пересев на 84 день после первого посева, был произведен в среды с более высокой концентрацией белого фосфора, с целью адаптации гриба к ней. Были выбраны концентрации 0,05, 0,1 и 0,2% P_4 . Последняя, самая высокая, концентрация ранее нами никогда не использовалась. Согласно [18], она соответствует тысячекратному превышению ПДК белого фосфора в сточных водах. Тем не менее, даже при столь высоком содержании белого фосфора в среде наблюдался интенсивный рост колоний

гриба. На четвертый день после посева при всех трех концентрациях белого фосфора наблюдалось начало спороношения, хотя при 0,1 и 0,2% P_4 грибы отставали в развитии по сравнению с концентрацией P_4 0,05%. Отставание в развитии у *A. niger* при концентрации белого фосфора 0,1 и 0,2%, по сравнению с 0,05%, наблюдалось и через 18 суток после посева. При самой малой концентрации P_4 колонии к этому времени стали практически черными, тогда как при более высоких имели серую окраску. Возможно, использованные концентрации исследуемого токсиканта отрицательно сказываются на фертильности грибов, хотя полностью не подавляют ее. Тем не менее, результаты посева позволяют заключить, что черный аспергилл легко переносит присутствие белого фосфора в среде даже при концентрации последнего 0,2%.

Четвертый пересев аспергилла был произведен через 112 суток после первого посева. Концентрацию белого фосфора в среде снова увеличили до 0,5 и 1% по массе. При внесении столь большого количества P_4 густой черный осадок в средах выпадал моментально. Среда издавали сильный специфический запах белого фосфора даже спустя несколько суток после посева. Через сутки рост посеянных микроорганизмов еще не наблюдался. Через четверо суток в среде с содержанием белого фосфора 0,5% наблюдался рост мелких колоний аспергилла, имеющих еще белый цвет (то есть рост был сильно замедлен). В средах с 1% белого фосфора через четверо суток после посева рост не наблюдался. По-видимому, выпавший черный осадок фосфидов перевел в нерастворимую форму микроэлементы, присутствующие в среде и необходимые для роста микроорганизмов. Следует отметить, что согласно [18], концентрация белого фосфора 0,5% соответствует 2500 ПДК.

На пятые сутки колонии аспергилла приобрели желтоватый цвет. Ясно, что грибы развивались очень медленно. По-видимому, данные концентрации белого фосфора были близки к предельным, при которых еще возможен рост грибов. На восьмые сутки на поверхности колоний аспергилла наблюдалась россыпь спор, т.е. гриб сохранил способность к размножению! Через 25 суток после пересева все культуральные среды стали прозрачными, без замутнений и взвесей, и не издавали запах белого фосфора, хотя в некоторых из них сохранились отдельные крупинки черного осадка. Через данный промежуток времени был снят ГХМС-спектр пробы среды с 0,5% P_4 , на которой рос *A. niger*. Метод газовой хроматографии и ранее успешно применялся для обнаружения следов белого фосфора в биологических матрицах [19]. Анализ ГХМС не выявил присутствия летучих соединений фосфора (P_4 , фосфина и прочих) в средах, а нелетучий фосфат не анализируется этим методом. Таким образом, культуральная среда полностью очистилась от белого фосфора и продуктов его неполного окисления.

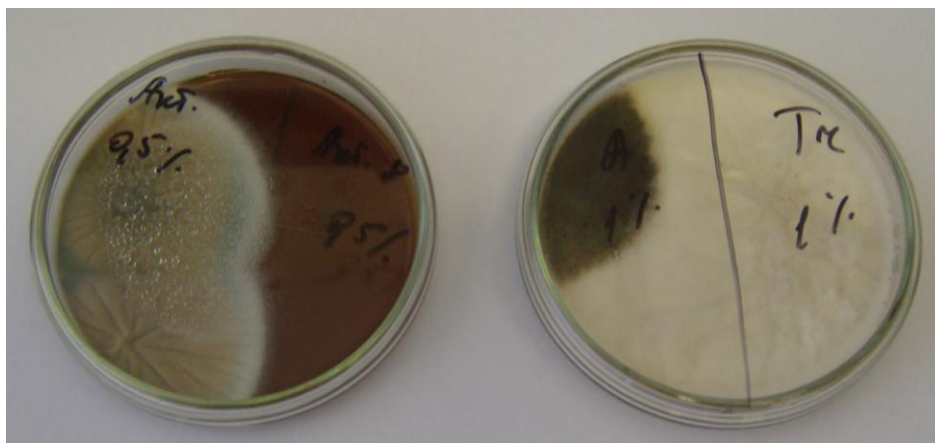


Рис. 2. Рост микроорганизмов в среде Сабуро. Справа – посеы грибов триходермы и аспергилла, пересейанных со среды с 1% белого фосфора. Колония триходермы имеет светлую окраску, и сплошь покрывает значительную часть поверхности среды в чашке Петри. Черная колония аспергилла значительно меньше: его рост замедлен после 19 суток выдерживания в крайне неблагоприятных условиях, что свидетельствует о меньшей устойчивости к белому фосфору. Слева – посеы *S. sp.* и *S. sp. A8*, пересейанных со среды с 0,5% P_4 . Колония *S. sp.* с левой стороны чашки покрывает более половины поверхности среды, тогда как рост *S. sp. A8* не наблюдается. Снимок сделан через семь суток после посева.

Рост в присутствии белого фосфора *Streptomyces sp. A8*. Посев проводился в среды с концентрацией белого фосфора: 0,05, 0,1 и 0,2% по массе, те же самые, в которые был произведен третий пересев аспергилла. Стрептомицет также отлично выдерживал концентрации P_4 вплоть до 0,2%. Кроме того, внешне колонии актиномицета, выросшие на трех концентрациях белого фосфора, практически не отличались.

Рост стрептомицетов при 0,5% не наблюдался и спустя 19 суток после посева. Тем не менее, на рис. 2, слева видно, что актиномицет *S. sp. A8*, пересевавшийся ранее в среды с белым фосфором, сохранил жизнеспособность при концентрации белого фосфора в среде 0,5%, и стал интенсивно расти в среде Сабуро. Следует отметить отсутствие роста *S. sp. A8*, пересевавшегося в среду с фосфатом. Вероятно, этот микроорганизм, изначально выделенный из ОСВ с белым фосфором, частично утратил устойчивость после длительного культивирования без P_4 , и погиб в среде с 0,5% белого фосфора. Таким образом, устойчивость к белому фосфору, так же как известные признаки устойчивости к другим ксенобиотикам, является приобретенной и может усиливаться или ослабевать в зависимости от условий культивирования микроорганизмов.

Надо отметить, что на тридцать восьмые сутки посева *S. sp.* приобрел яркую лимонно-желтую окраску, не характерную для исходной культуры (рис. 3, справа). Это в сочетании с тем фактом, что и аспергилл в сходных условиях стал желтым (рис. 3, в центре), позволяет сделать предположение, что желтые пигменты каким-то образом способствуют выживанию микроорганизмов в

присутствии белого фосфора и отсутствии фосфатов. Любопытно, что в литературных источниках встретилась информация о выработке стрептомицетами желтых пигментов феноксазиновой природы гриксазонов в условиях нехватки фосфата [20].

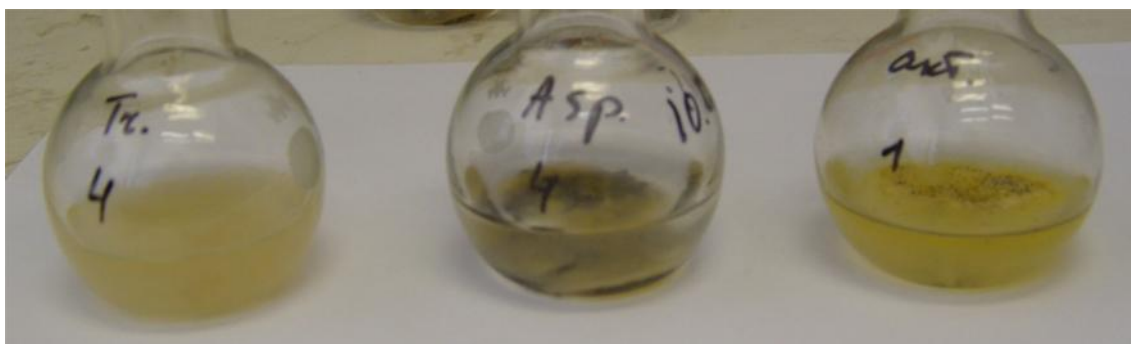


Рис. 3. Второй пересев стрептомицетов и триходермы, и пятый пересев аспергилла. Справа – колония стрептомицета *S. sp.* на поверхности среды с 0,2% белого фосфора, имеющая насыщенный желтый цвет и покрытая россыпью спорангиев. В центре – аспергилл в среде с 0,5% белого фосфора, также имеющий желтоватую окраску. Слева – триходерма в среде с 0,5% белого фосфора, занявшая весь объем колбы и окрасившаяся в характерный кремовый цвет. Снимок сделан через 49 суток после посева.

Рост в присутствии белого фосфора *Trichoderma asperellum* F-1087. Гриб *T. asperellum* F-1087, предоставленный кафедрой биохимии КФУ [21], был посеян при концентрации P_4 0,1, 0,5 и 1%. Через четверо суток в среде с самой малой концентрацией выросла одна крупная колония триходермы, т.е. данный гриб тоже способен усваивать белый фосфор. На пятые сутки колонии триходермы приобрели кремовый цвет (рис. 3, слева).

На восьмые же сутки наблюдался рост колонии триходермы на белом фосфоре при его концентрации 0,5%. В средах с 1% P_4 рост триходермы стал наблюдаться только на 11 сутки после посева. В случае триходермы прослеживается четкая зависимость: чем выше концентрация белого фосфора в среде, тем медленнее растет гриб. На 12 сутки после посева при 0,1% белого фосфора гриб уже спороносил и имел розовую окраску, при 0,5% P_4 колония была еще бесцветная, но уже всплыла на поверхность среды (формирование воздушного мицелия) и имела форму, близкую к правильному кругу, а при 1% колония была еще более бесформенная и росла в толще среды (стадия субстратного мицелия). Через 19 суток наблюдались исходные, взятые для посева, колонии аспергиллов, лежащие на дне колб со средой, содержащей 1% P_4 . Они производили впечатление погибших, но это оказалось не так. Дальнейший посев в среду Сабуро (уже без белого фосфора) показал, что аспергилл сохранил жизнеспособность. Это открывает перспективы для дальнейшей селекции аспергилла на увеличение устойчивости.

Триходерма *T. asperellum* F-1087 проявила бóльшую устойчивость к белому фосфору, чем *A. niger* и тем более, чем стрептомицеты. На восемнадцатые сутки после посева триходерма приобрела окраску и начала

спороносить при 0,5% белого фосфора. Следует особо подчеркнуть, что триходерма адаптировалась к таким высоким концентрациям белого фосфора сразу, без предварительного культивирования с рядом пересевов. Ранее данный штамм гриба никогда не выращивался в присутствии белого фосфора. Напомним о том, что концентрация белого фосфора 1% это превышение ПДК в сточных водах в 5000 раз. А ПДК элементного фосфора в водных объектах хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования, согласно данным из монографии [22], составляет всего 0,0001 мг/л, т.е. концентрация 1% превышает ее уже в сто миллионов ($1 \cdot 10^8$) раз!

Пересев в среду Сабуро показал интересные результаты. Так, оказалось, что *A. niger* сохранил жизнеспособность после 19 суток культивирования в среде с 1% белого фосфора, несмотря на отсутствие роста: по всей видимости, он находился в ней в состоянии анабиоза, из которого вышел в лишенной токсичности среде (рис. 2, справа). Тем не менее, из-за различий в окраске грибов отчетливо видно, что триходерма росла более интенсивно и ее мицелий занимал большую часть чашки Петри. Это служит еще одним подтверждением ее более высокой устойчивости к белому фосфору.

Рост в присутствии белого фосфора *Pseudomonas alcaliphila*. Бактерии *Pseudomonas alcaliphila*, выделенные на кафедре биохимии КФУ и идентифицированные на приборе Bruker Daltonik MALDI Biotyper [14], высевали в те же самые среды, в которые был произведен второй посев аспергилла, содержащие 0,01 и 0,05% белого фосфора, в двух повторах. Контролем служил посев в среду с фосфатом. Рост культур отслеживался по изменению оптической плотности сред. В контроле (среда с фосфатом) наблюдался интенсивный рост бактерий. Данные по изменению оптической плотности культур показали, что меньшую концентрацию белого фосфора бактерии перенесли легче – в первые шесть дней после посева наблюдалось медленное нарастание оптической плотности в обоих повторах, отражающее рост количества микробных клеток в единице объема среды. На седьмые сутки рост оптической плотности остановился, а на восьмые наблюдалось ее снижение. После этого дальнейшие замеры были прекращены. При большей концентрации в обоих повторах наблюдалось снижение оптической плотности культур на протяжении всех восьми суток наблюдений, указывающее на отсутствие адаптации (табл. 1).

Таблица 1. Кинетика изменения оптической плотности культур *P. alcaliphila* по дням, в зависимости от концентрации белого фосфора в средах*

Концентрация Р ₄ , %	Изменение оптической плотности (λ_{540}) по дням после посева				
	1	2	4	6	8
0,01	0,068	0,070	0,080	0,085	0,081
0,01	0,072	0,072	0,083	0,091	0,085
0,05	0,103	0,079	0,060	0,058	0,062
0,05	0,108	0,084	0,060	0,058	0,056

*Выполнено в двух повторах, первый посев

Внешне все культуральные среды остались бесцветными и прозрачными, т.е. количество бактерий продолжало оставаться очень малым. Поскольку в средах с белым фосфором бактерии росли недостаточно интенсивно, второй посев *P. alcaliphila* производили снова из исходной культуры, т.е. пересев, как в случае с аспергиллами, не был осуществлен. Результаты можно видеть в таблице 2.

Таблица 2. Кинетика изменения оптической плотности культур *P. alcaliphila* по дням, в зависимости от концентрации белого фосфора в средах*

Концентрация P ₄ , %	Изменение оптической плотности (λ_{540}) по дням после посева			
	1	2	3	5
0,01	0,248	0,299	0,309	0,311
0,05	0,309	0,296	0,290	0,292

*Выполнено в одном повторе, второй посев

Результаты для второго посева, представленные в таблице, хорошо коррелируют с данными для первого. При меньшей концентрации белого фосфора снова наблюдался незначительный рост оптической плотности в первые дни эксперимента. К пятому дню рост фактически вышел на плато. При большей концентрации наблюдалось снижение оптической плотности по сравнению с ее исходным значением.

Таким образом, результаты двух посевов псевдомонад продемонстрировали, что эти бактерии, в отличие от грибов и стрептомицетов, не росли в средах, содержащих белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В работе [12] мы уже сообщали о том, что бактерии из рода *Bacillus* выживали при концентрации белого фосфора в ОСВ 0,1%, но только за счет сильного замедления метаболизма и темпа размножения, а не за счет эффективной деструкции этого вещества. Возможно, это справедливо и для *P. alcaliphila*. Если справедлива гипотеза о том, что организмы из разных таксономических групп имеют различную устойчивость к белому фосфору, то это является серьезным аргументом в пользу того, что он разлагается под воздействием ферментных систем, а не только за счет абиотического окисления. Очень интересен ответ на вопрос о роли микроорганизмов в самом первом этапе превращений, затрагивающем непосредственно белый фосфор: подвергается ли он ферментативным реакциям, или его дегградация обусловлена сдвигом химического равновесия микроорганизмами, потребляющими продукты абиотического распада белого фосфора? Если верен первый вариант, то это – обнаружение нового вида ферментативной активности.

Можно изобразить следующую гипотетическую схему биодегградации белого фосфора. На первом этапе P₄ диспропорционирует до смеси фосфидов, гипофосфитов, фосфитов и фосфатов. Далее микроорганизмы употребляют водорастворимые окисленные продукты, и тем самым смещают химическое равновесие в сторону дальнейшего окисления фосфора. Наряду с этим, возможен дополнительный путь – наличие ферментов с неизвестным видом активности, для которых белый фосфор является субстратом. Их обнаружение

(или обнаружение новой активности у ранее известных ферментов) стало бы значительным фундаментальным достижением.

На основании полученных данных по морфологии [23] видовая принадлежность штамма А8 была определена как *Streptomyces xanthocidicus*, но данные по геномике ее не подтвердили. Поэтому правильно продолжать называть штамм *Streptomyces* sp. А8. Вызывает интерес тот факт, что штамм *S.* sp. А8 совершенно не проявлял фитотоксического влияния на два вида сорных трав (рис. 4). Вероятно, это связано с тем, что в среде обитания этого штамма (осадки сточных вод) отсутствуют высшие растения. По этой же причине большинство штаммов стрептомицетов, в том числе *S.* sp. А8, не подавляли рост пекарских дрожжей. Зато данный штамм эффективно подавляет зеленые водоросли и бациллы – организмы, близкие к обитающим в сточных водах (рис. 4, внизу) [11]. В работе [12] сообщается, что представители рода *Bacillus* также вырабатывают адаптации к присутствию белого фосфора, следовательно, бациллы и *S.* sp. А8 могут конкурировать даже в условиях сильнейшего химического загрязнения, что не может не вызывать удивление. Этим и объясняется угнетающее влияние *S.* sp. А8 на *B. megaterium*. Возможно, и присутствие ядовитого вещества повлияло на свойства культуры, у которой пропала необходимость синтезировать собственные токсины.

В работе [12] мы исследовали состав метаболитов белого фосфора в культуральной среде, в которой росли сенные палочки (*Bacillus subtilis*), выделенные нами ранее из ОСВ, содержащего 0,1% белого фосфора. В спектре ³¹P ЯМР наблюдались сигналы фосфата и фосфита (рис. 5). Следовательно, вызывала интерес возможность наблюдения роста бактериальной культуры в среде, содержащей фосфит в качестве единственного источника фосфора. Такой посев был нами проведен. В контроле с фосфатом в качестве источника фосфора, разумеется, наблюдался интенсивный рост колоний бацилл. В среде без источника фосфора рост не наблюдался даже через 13 суток после посева, что также естественно. В средах с 0.08 и 0.8% фосфита калия в качестве единственного источника фосфора рост колоний не наблюдался, однако изначально гладкая поверхность агара стала щербатой – углубления образовались в результате метаболизма бактерий. Таким образом, жизнедеятельность микроорганизмов наблюдалась, но очень слабая, бактерии практически не размножались. Видимые колонии не сформировались даже спустя 13 суток, что для прокариот является очень продолжительным сроком. По-видимому, фосфит для данной культуры бактерий является трудноусваиваемым субстратом [24]. Данный результат хорошо коррелирует с данными, о том, что выделенные из ОСВ бактерии устойчивы к белому фосфору, но не способны его усваивать.

ВКЛЮЧЕНИЕ БЕЛОГО ФОСФОРА В ПРИРОДНЫЙ КРУГОВОРОТ

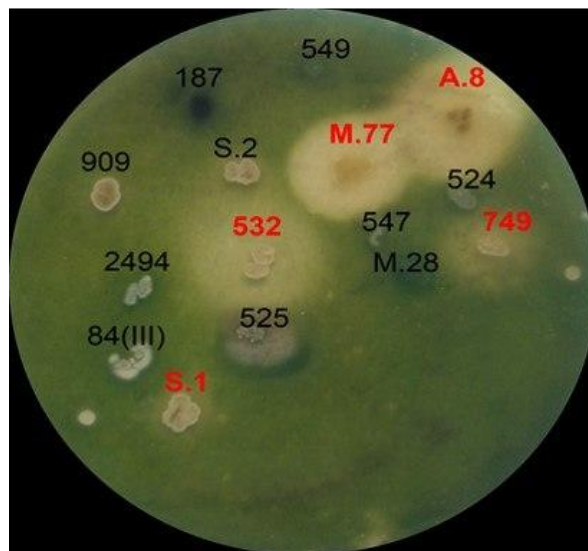
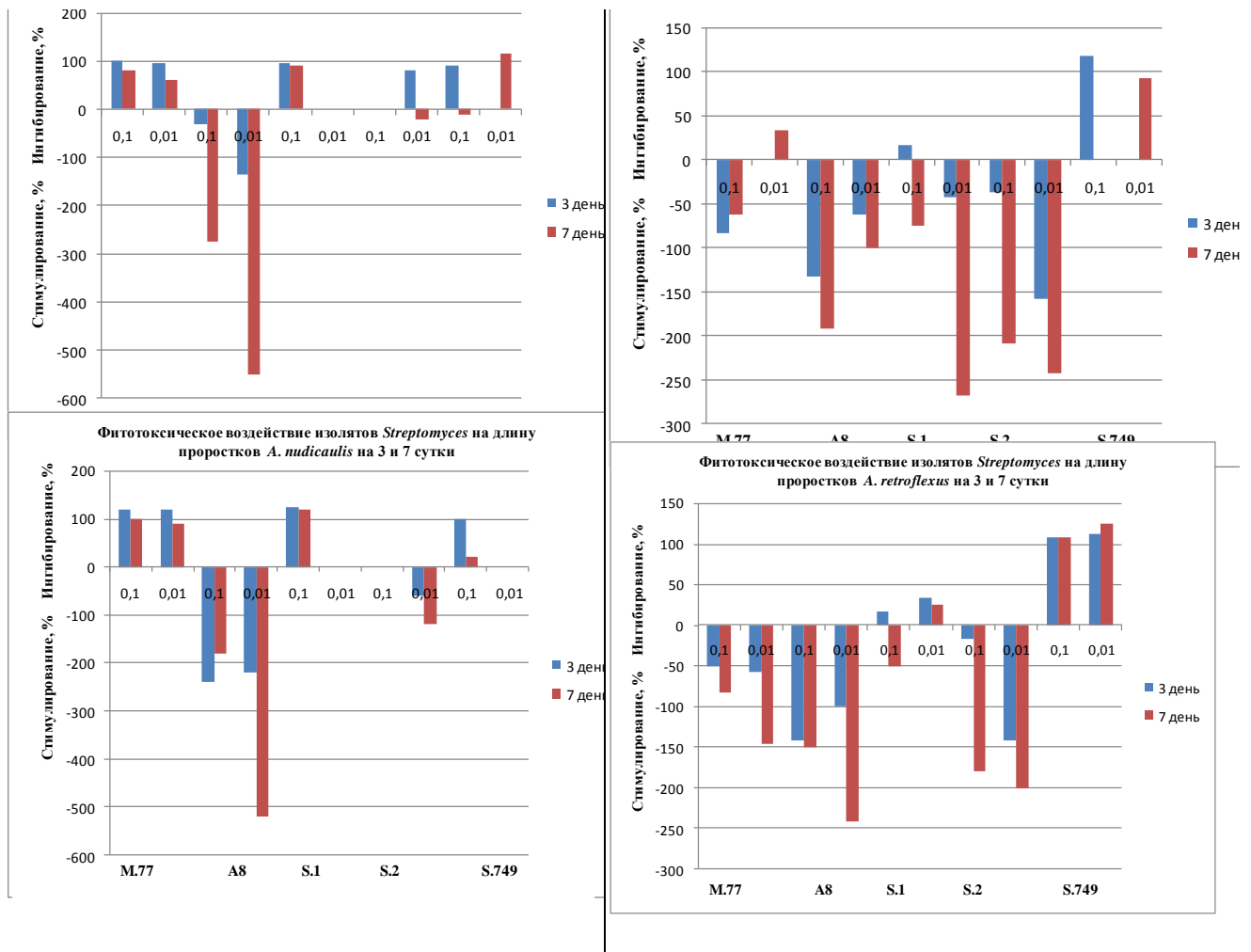


Рис. 4. Слева. Фитотоксическое воздействие *Streptomyces* на длину корней (вверху) и проростков (внизу) *A. nudicaulis* на 3 и 7 сутки. Справа. Фитотоксическое воздействие *Streptomyces* на длину корней (вверху) и проростков (внизу) *A. retroflexus* на 3 и 7 сутки. Фотография внизу - колонии стрептомицетов в культуре одноклеточной зеленой водоросли *C. vulgaris*. Штамм А8 (вверху справа) подавляет рост хлореллы на значительном расстоянии.

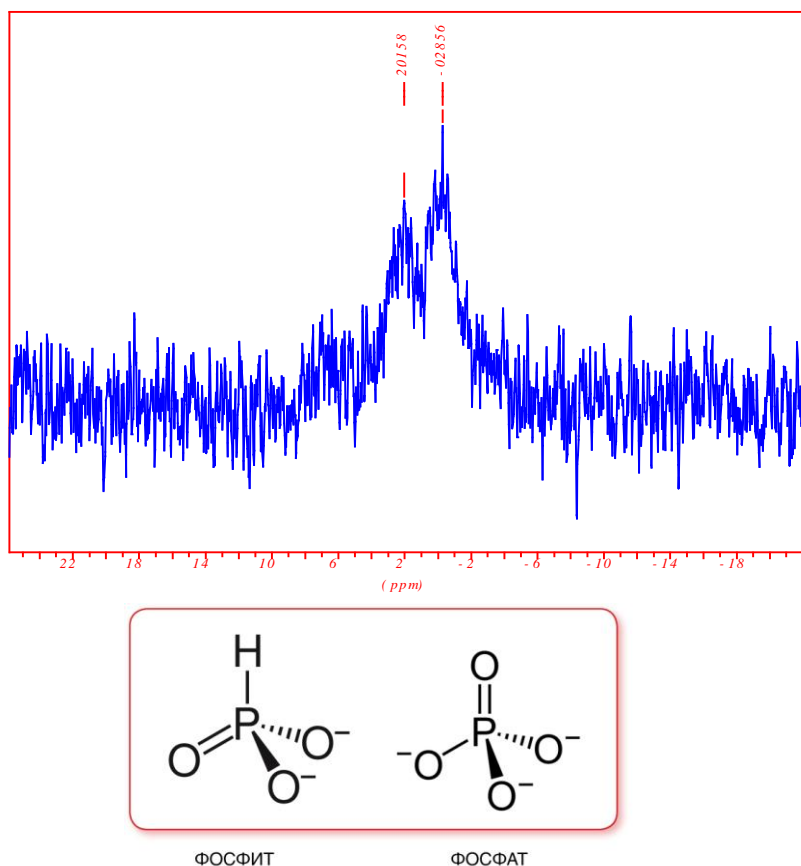


Рис. 5. Вверху. Спектр ^{31}P ЯМР, снятый с пробы культуральной среды, содержащей в качестве единственного источника фосфора белый фосфор. Наблюдаются сигналы фосфата $-0,3$ ppm и фосфита при $2,0$ ppm. Эти вещества могли образоваться только в результате окисления белого фосфора (см. [10]). Внизу. Структурное сходство фосфата и фосфита, определяющее токсические свойства последнего.

ВЫВОДЫ

Впервые достоверно продемонстрировано включение белого фосфора в биомассу растущих микроорганизмов. Согласно современным представлениям, ни один живой организм не способен поддерживать жизнедеятельность в отсутствие фосфатов. Фосфор играет ключевую роль в метаболических процессах – это является биологической аксиомой. Поэтому рост микробных культур в среде, содержащей белый фосфор в качестве единственного источника фосфора, сам по себе свидетельствует о том, что элементный фосфор окисляется до фосфата и, таким образом, полностью обезвреживается.

Разнообразие микроорганизмов, потенциально способных вырабатывать устойчивость к белому фосфору, достаточно велико. Это бациллы, псевдомонады, стрептомицеты, плесневые грибы и ряд других. Известно, что микроорганизмы адаптируются к токсическому загрязнению окружающей среды разнообразными способами. Это означает, что понятия «устойчивость штамма к загрязнению» и «биодegradация» тесно взаимосвязаны, но не тождественны [25]. В нашем случае, плесневые грибы растут в культуральных средах, содержащих до 1% P_4 , стрептомицеты – до 0,2%, тогда как бактерии –

псевдомонады и бациллы – практически не растут, а впадают в анабиоз даже при значительно меньших концентрациях. Это является аргументом в пользу метаболического окисления белого фосфора, в котором задействованы ферментные системы приспособленных организмов. Если бы имело место чисто химическое окисление белого фосфора кислородом воздуха, то таксономическая принадлежность микробов не оказывала бы влияния на их рост.

Список литературы:

1. *Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.O.* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2008. Vol. 44. No. 2. P. 117.
2. *Wolfe-Simon F., Switzer Blum J., Kulp T.R., Gordon G.W., Hoeft S.E., Pett-Ridge J., Stolz J.F., Webb S.M., Weber P.K., Davies P.C.W., Anbar A.D., Oremland R.S.* // Science. 2010. Vol. 332. No. 6034. P. 1163.
3. *Dantas G., Sommer M.O.A., Oluwasegun R.D., Church G.M.* // Science. 2008. Vol. 320. No. 5872. P. 100.
4. *Перушкина Е.В., Шагинурова Г.И., Сироткин А.С., Васюнина Ю.В., Миндубаев А.З., Минзанова С.Т.* // Химическая промышленность сегодня. 2008. № 7. С. 42.
5. *Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 39. № 7. С. 1.
6. *Singh B.K., Walker A.* // FEMS Microbiol Rev. 2006. Vol. 30. P. 428.
7. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Сапармырадов К.А., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г.* // Химическая безопасность. 2017. Т. 1. № 1. С. 177.
8. *Seviour R.J., Nielsen P.H.* Microbial Ecology of Activated Sludge. London: IWA Publishing, 2010.
9. *Миндубаев А.З., Белостоцкий Д.Е., Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Алимова Ф.К., Миронова Л.Г., Коновалов А.И.* // Ученые записки КГУ. Сер. Естеств. науки. 2010. Т. 152. Кн. 2. С. 178.
10. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Кулик Н.В., Алимова Ф.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Сапармырадов К.А., Хаяров Х.Р., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41. № 3. С. 54.
11. *Болормаа Ч., Сапармырадов К.А., Алимова Ф.К., Миндубаев А.З.* // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 38. № 6. С. 147.
12. *Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 37. № 3. С. 67.
13. *Wackett L.P.* // Nature biotechnology. 2003. Vol. 21. No. 2. P. 136.
14. *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.* // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 40. № 12. С. 1.
15. *Peruzzini M., Gonsalvi L., Romerosa A.* // Chem. Soc. Rev. 2005. Vol. 34. No. 12. P. 1038.
16. *Киселева М.А.* Дис...канд.биол.наук. С-Пб: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН 2008. 23 с.
17. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Яхваров Д.Г.* // Природа. 2017. № 5. С. 29.
18. Patent 5549878 US, 1996.
19. *Johnston J.J., Goldage D.A., Kohler D.J., Cummings J.L.* // Environ. Sci. Technol. 2000. Vol. 34. No. 9. P. 1856.
20. *Ohnishi Y., Furusho Y., Higashi T., Chun H.-K., Furihata K., Sakuda S., Horinouchi S.* // J. Antibiot. (Tokyo). 2004. Vol. 57. No. 3. P. 218.
21. Патент 2603259 РФ, 2016.

22. Алексеев В.А., Бузмаков С.А., Панин М.С. Геохимия окружающей среды. Пермь: Издательство Пермского государственного национального исследовательского университета, 2013.
 23. Waksman S.A. The Actinomycetes. Classification, Identification and Description of Genera and Species. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1961. Vol. 2.
 24. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Аккизов А.Ю., Яхваров Д.Г. // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 47. № 7. С. 1.
 25. Наумова Р.П. Микробный метаболизм не природных соединений. Казань: Изд-во Казанского университета, 1985.
-

INVOLVING WHITE PHOSPHORUS INTO NATURAL CYCLE OF BIOGENIC ELEMENTS

*A. Z. Mindubaev**, *A. D. Voloshina*, *N. V. Kulik*, *K. A. Saparmyrado*¹,
*Kh. R. Khayarov*¹, *S. T. Minzanova*, *L. G. Mironova*, and *D. G. Yakhvarov*

State Budgetary-Funded Institution of Science Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan',

*e-mail: mindubaev@iopc.ru

¹Kazan (Volga region) Federal university, Kazan'

Received June 27, 2017

Abstract – The results of examining biodegradation of a hazardous toxicant – white phosphorus are presented, which confirm a hypothesis of involving elemental phosphorus into natural cycle of biogenic elements. The involvement of white phosphorus in the biomass of growing microorganisms after their inoculation into culture media containing white phosphorus as the single source of phosphorus has been reliably demonstrated for the first time. It has been shown that microorganisms of different taxonomic groups (i.e. bacteria, mold fungi, streptomycetes) exhibit different kinds of resistance to white phosphorus in the course of its biodegradation. A hypothetical scheme is proposed for biodegradation of white phosphorus in the open environment.

Keywords: detoxification, white phosphorus, *Pseudomonas alcaliphila*, *Streptomyces* sp., *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, culture medium, chemical equilibrium, phosphorus natural cycle.