

УДК 579.695+546.85+502.55+661.63

О РАЗЛОЖЕНИИ БЕЛОГО ФОСФОРА ОСАДКОМ СТОЧНЫХ ВОД

*А.З. Миндубаев, Й.А. Акосах, Ф.К. Алимова, Д.М. Афордоаны,
Ч. Болормаа, Р.М. Кагиров, С.Т. Минзанова, Л.Г. Миронова, Д.Г. Яхваров*

Аннотация

Впервые показана возможность деградации белого фосфора под действием осадка сточных вод водоочистных сооружений. Установлено, что в результате токсического воздействия продуктов разложения белого фосфора происходит угнетение метаногенного процесса деятельности микроорганизмов, а последующая адаптация микрофлоры к действию токсиканта приводит к полной биодеградации и переработке белого фосфора в нетоксичные продукты. При использовании метода ядерного магнитного резонанса установлено, что белый фосфор в результате контакта с активным илом окисляется до водорастворимых соединений.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, осадок сточных вод, анаэробные условия, кинетика выделения газа.

Введение

Белый фосфор молекулярной формулы P_4 является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды, способным аккумулироваться в организме [1–6]. Тем не менее P_4 широко применяется в промышленности. Соответственно, актуальной проблемой является детоксикация стоков с предприятий, содержащих следовые концентрации белого фосфора [7, 8].

Единственный метод детоксикации белого фосфора, известный в настоящее время, – его окисление до ортофосфорной кислоты раствором медного купороса [1]. Однако масштабы применения этого метода ограничены по причине высокой стоимости и токсичности медьсодержащих препаратов. Из анализа описанных в литературе методов детоксикации белого фосфора можно заключить, что ни один из них не является достаточно эффективным для очистки природных сред от данного вещества.

Одним из важнейших способов детоксикации служит биоочистка [9]. В современной литературе отсутствуют сведения об использовании активных илов в процессе биологической детоксикации P_4 . Согласно [1], еще до 1985 года велись исследования биодеградации P_4 микроорганизмами в анаэробных условиях. Однако авторы исследования [10] пришли к заключению об отсутствии роста микробной биомассы в присутствии белого фосфора и трансформации последнего в менее токсичные соединения. В работе [11] сообщается о переработке P_4 в почве, однако авторы утверждают исключительно абиогенный путь его трансформации, без участия почвенной микрофлоры. Между тем известно

явление самовозгорания насыщенного метаном болотного газа, образующегося в результате жизнедеятельности анаэробной микрофлоры. Причиной самовозгорания является примесь летучих соединений фосфора – фосфина и дифосфина, образующихся в результате анаэробного фосфатного дыхания (биохимического восстановления ортофосфата) [12]. Таким образом, существуют теоретические предпосылки для микробиологического восстановления белого фосфора.

Осадок сточных вод (ОСВ) состоит не только из микробной биомассы, но и из компонентов промышленных стоков, в первую очередь солей переходных металлов. Известно, что белый фосфор активно взаимодействует с ионами d^6 металлов, превращаясь в фосфин и ряд сходных продуктов [13]. Поэтому в ОСВ возможна как биологическая, так и абиогенная трансформация P_4 .

Другой путь деградации белого фосфора – его окисление до водорастворимых продуктов. Из данных, приведенных в литературе, известно, что гипофосфиты являются эффективными бактерицидными средствами [14]. Между тем фосфиты [15] сравнительно легко метаболизируются бактериями. Гипофосфиты, являющиеся структурными аналогами формиата, блокируют метаболизм анаэробных бактерий, особенно метаногенов, использующих формиат в качестве источника углерода [16]. Дальнейшее окисление гипофосфита в фосфит должно приводить к потере токсичности субстрата и активации жизнедеятельности микрофлоры, завершившей окисление фосфора до ортофосфата.

Из литературных источников известна поразительная способность микроорганизмов к разложению широкого круга токсичных веществ [9, 16, 17]. В настоящей статье предлагается новый подход к детоксикации белого фосфора – его переработка в нетоксичные соединения при помощи известного эффективного деструктора токсичных веществ – активного ила водоочистных сооружений, являющегося компонентом ОСВ.

1. Материалы и методы

1.1. Состав субстрата. При проведении экспериментов использовали ОСВ одной партии. Для сокращения лаг-фазы роста микрофлоры активного ила в контрольный вариант и в опытный была добавлена растительная биомасса – жом растения амарант (*Amaranthus cruentus* L.), который является эффективным стимулятором метанового брожения [18]. Белый фосфор перед внесением в субстрат был диспергирован в воде при помощи ультразвукового диспергатора «Сапфир» (рабочая частота 35 кГц, 30 мин) при температуре 50 °С при перемешивании на магнитной мешалке в инертной атмосфере (аргон) до образования однородной суспензии со средним диаметром сферических частиц менее 0.1 мм.

1.2. Условия анаэробной переработки. Анаэробная переработка сырья осуществлялась в реакторах лабораторного масштаба объемом 200 мл, непрерывно термостатированных в мезофильном (38 °С) и термофильном (50 °С) режимах, при которых P_4 представляет собой твердое вещество и жидкость соответственно. Загрузка реактора составляла 150 г субстрата. Процесс переработки белого фосфора под действием активного ила исследовался на протяжении 150 дней и более. Построение кинетики выделения и изменения состава

газа, а также расчет его удельного выхода осуществлялись по средним значениям в программе Microsoft Excel.

1.3. Кинетика выделения и изменения состава газа. Газовая хроматография. Объем выделяющегося газа измерялся ежедневно. Качественный и количественный состав газа определялся еженедельно с помощью метода газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на колонке Porapak Q длиной 2.4 м (детектор по теплопроводности, газ-носитель – гелий). Температурный режим: колонка 85 ± 5 °С, испаритель 130 ± 10 °С, детектор 130 ± 10 °С. Каждая проба газа отбиралась дважды, полученные значения – средние.

1.4. Спектроскопия ^{31}P ЯМР. ЯМР-спектрометр высокого разрешения Avance 400 (Bruker) был использован для контроля переработки P_4 . Из реакционной смеси отбирали 5 г субстрата, предварительно тщательно перемешав смесь, добавляли в него 5 мл воды и 10 мл диэтилового эфира. После перемешивания полученной массы и расслоения смеси для ЯМР-анализа осторожно отбирали прозрачный верхний эфирный слой. В спектрах ЯМР ^{31}P , снятых с эфирных экстрактов, отмечалось наличие единственного сигнала с химическим сдвигом -536 м.д., соответствующего белому фосфору. Количество сканов при съемке спектров во всех случаях превышало 500.

1.5. Микробиологический посев. Посев производился после окончания анаэробной переработки из субстрата с исходным содержанием белого фосфора 1 : 1000.

Питательная среда – МПА.

Серийное разведение образцов осуществлялось в серии из 10 пробирок. В результате была получена серия разведений от 10^{-1} до 10^{-10} .

Посев производили из концентраций 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} в 3 повторах.

Посевы «газоном» осуществляли под плотной питательной средой в чашке Петри. Инкубация продолжалась 72 ч (температура 35 °С), наблюдался равномерный сплошной рост бактерий с разделением их на колонии. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путем изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду. Проводилось окрашивание препаратов по Граму. Использовался световой микроскоп Carl Zeiss Axio с компьютерным интерфейсом и увеличением в 1000 раз.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Зависимость кинетики газообразования и метаногенеза от концентрации белого фосфора. При содержании белого фосфора в растворе порядка 1 : 1000 наблюдалось длительное угнетение жизнедеятельности микрофлоры, выражающееся в снижении выделения газообразных продуктов жизнедеятельности по сравнению с контролем (рис. 1, а, б, ж) вплоть до временного прекращения выделения газа. Тем не менее даже при такой концентрации токсичного вещества полная гибель микроорганизмов не отмечалась (рис. 1, з). При содержании белого фосфора в иле 1 : 100000 наблюдалось незначительное угнетение

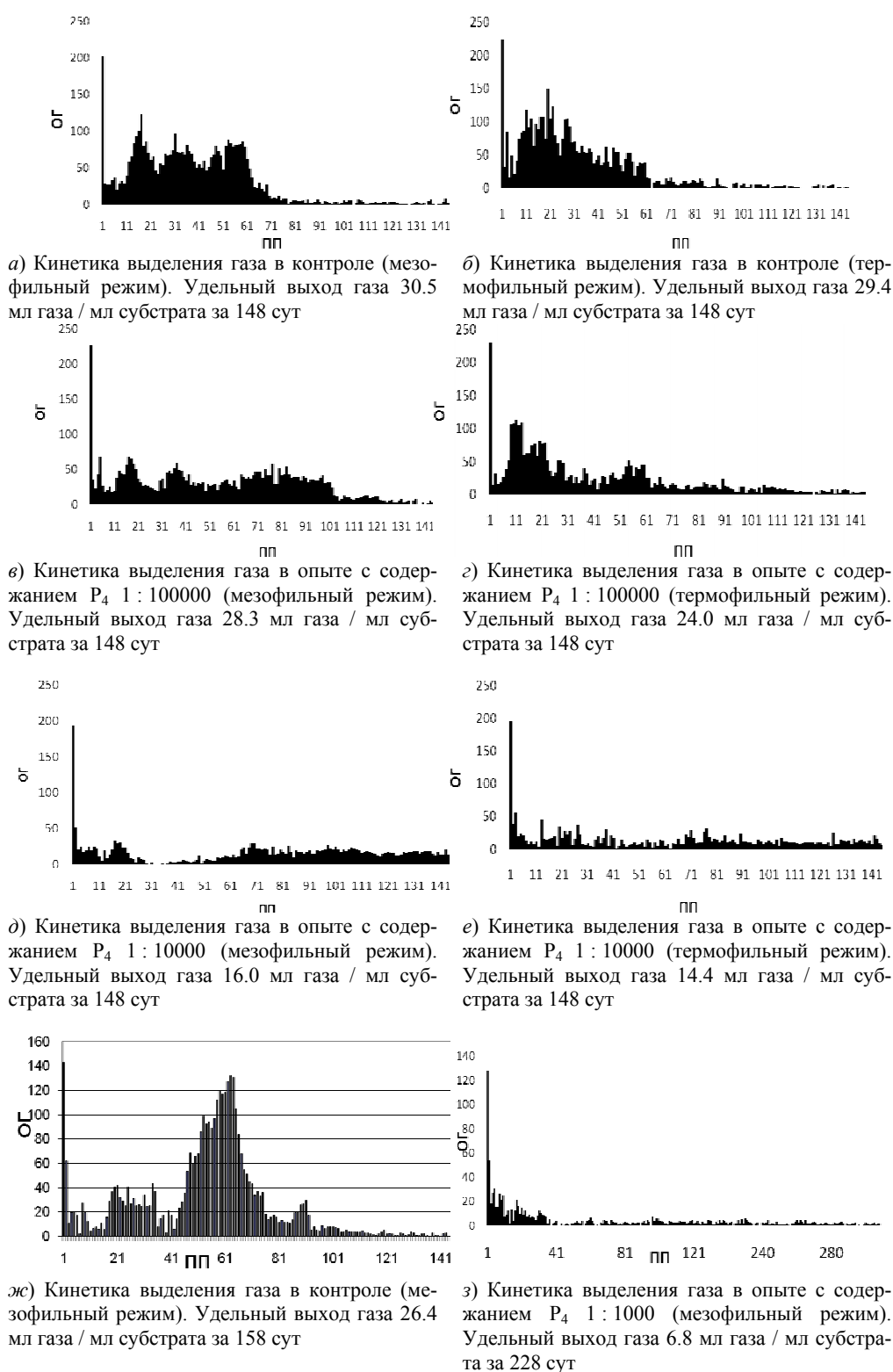


Рис. 1. Зависимость кинетики выделения газа от концентрации белого фосфора в субстратах (ОГ – объем газа, мл, ПП – продолжительность процесса, дни)

жизнедеятельности микрофлоры без перерыва в выделении газа, свидетельствующее об устойчивости природных популяций микроорганизмов активного ила к P_4 при разбавлении до указанной концентрации (рис. 1, в, з). При содержании белого фосфора в иле 1 : 10000 проявлялось значительное угнетение, вплоть до полного прекращения выделения газа, в течение приблизительно 2–3 недель, причем угнетение наблюдалось не в начале эксперимента, а спустя приблизительно месяц (рис. 1, д, е). Удельный выход газа в каждом случае представлен на рис. 1. Показано, что концентрация белого фосфора 1 : 100000 приводит к очень незначительному снижению данного показателя, что позволяет говорить о полной адаптации микрофлоры. При концентрации 1 : 10000 удельный выход газа снижался вдвое по сравнению с контролем, а при 1 : 1000 – еще значительнее. Соответственно, увеличивалась продолжительность выделения газа. Термофильный режим оказался несколько менее продуктивным по удельному выходу газа, однако зависимость выхода от концентрации P_4 сохранялась.

После периода угнетения жизнедеятельность микрофлоры, проявляющаяся в том числе в выделении газообразных продуктов и изменении их состава, начинала восстанавливаться (рис. 1, в–е, з; 2, в–е). На содержание углекислого газа белый фосфор оказывал менее заметное угнетающее воздействие, чем на содержание метана. Из этого следует, что метаногенные археобактерии более чувствительны к отравлению этим веществом по сравнению с другими представителями микрофлоры активного ила.

Процессы с P_4 становились активными после того, как процессы в контроле затухали по причине исчерпания доступных для микроорганизмов питательных веществ. При этом процессы с более высоким содержанием токсичного вещества сохраняли активность дольше (рис. 1, 2). Из приведенных наблюдений следует, что теоретическая удельная продуктивность процессов анаэробного метанового брожения активного ила одинаковая, а токсическое действие P_4 выражается в увеличении продолжительности процесса за счет длительной непродуктивной фазы угнетения.

2.2. Продолжительность детоксикации белым фосфором. Из субстратов с концентрацией P_4 1 : 10000 (мезофильный и термофильный режимы) первая проба для ЯМР-анализа была взята на 35-й день. Спектры продемонстрировали наличие одного сигнала, соответствующего белому фосфору (рис. 3). Значит, вне зависимости от режима термостатирования срок в 35 дней недостаточен для переработки P_4 активным илом. Вторая проба из субстрата с концентрацией белого фосфора 1 : 10000 (мезофильный режим) была отобрана на 63-й день. Проба отбиралась из другой повторности опыта, чтобы исключить влияние кислорода, попадающего в реактор при отборе пробы, на изучаемый процесс. Спектр показал отсутствие сигналов фосфорных соединений, в том числе белого фосфора. Следует отметить, что вторая проба была отобрана на фоне резкой активации процесса выделения газа илом. Таким образом, срок продолжительностью 63 дня оказался достаточным для переработки белого фосфора в концентрации 1 : 10000.

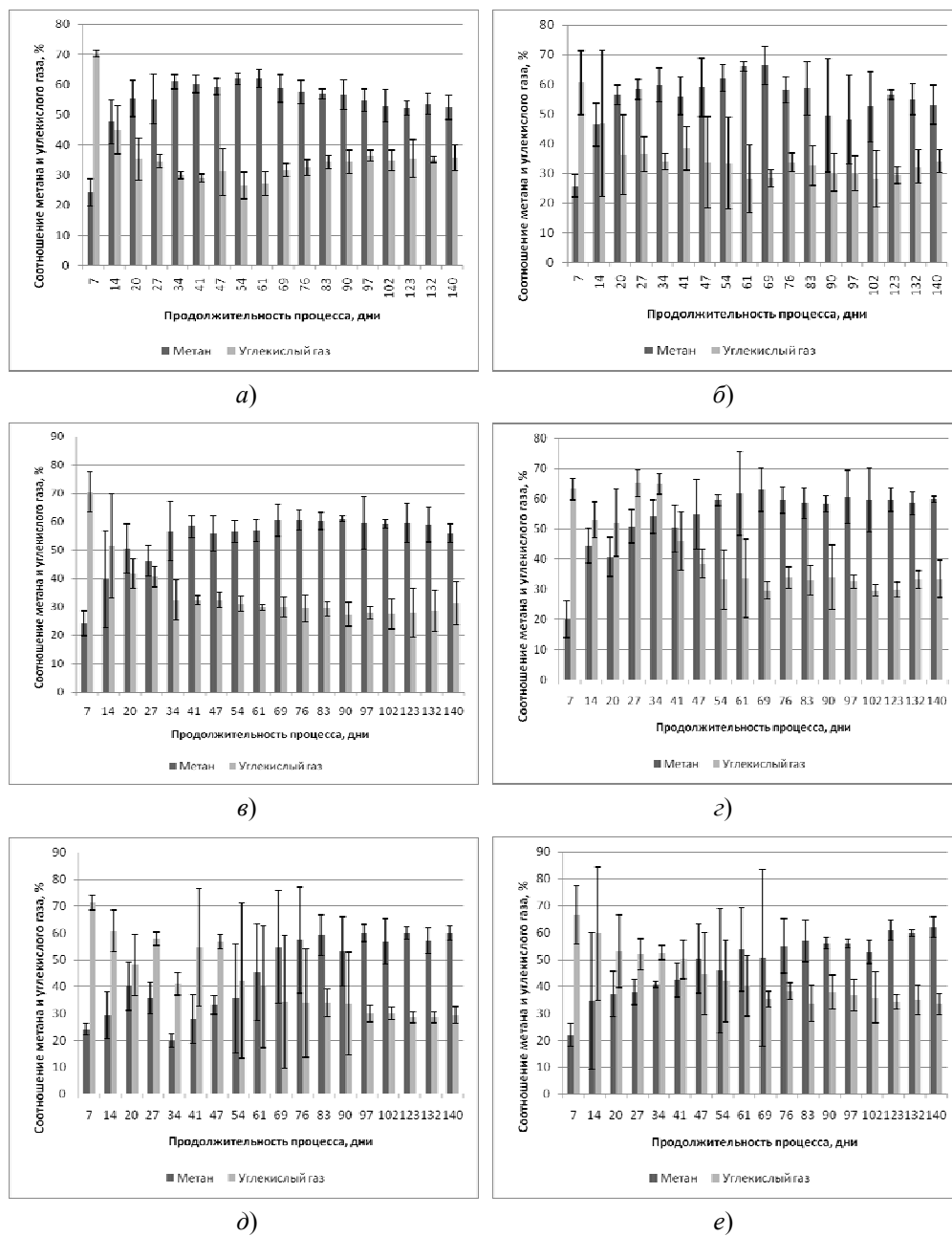


Рис. 2. Зависимость кинетики изменения соотношения метана и CO_2 в газе от концентрации белого фосфора в субстратах: *a, б* – контроль; *в, г* – содержание P_4 1 : 100000; *д, е* – содержание P_4 1 : 10000. Слева – мезофильный режим; справа – термофильный режим

2.3. Путь детоксикации белого фосфора. Отсутствие соединений фосфора в эфире косвенно свидетельствует о метаболизме P_4 в водорастворимые соединения, не экстрагируемые эфиром, то есть о его окислении. В таком случае период угнетения жизнедеятельности микроорганизмов, наблюдавшийся во всех экспериментах, вероятнее всего, обусловлен накоплением токсичных для бактерий

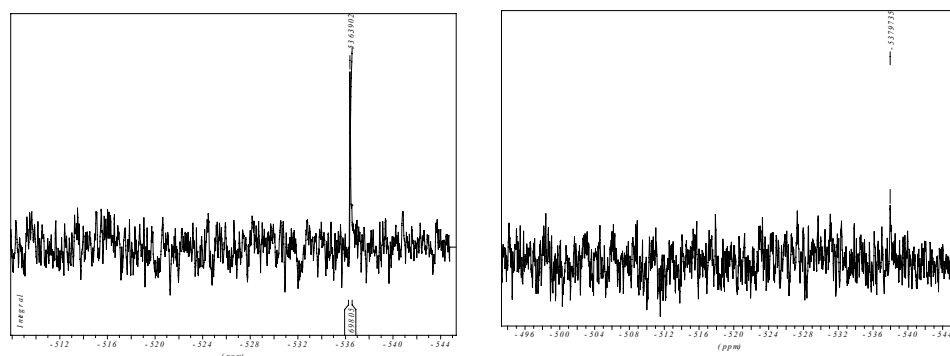


Рис. 3. Изменение интенсивности сигнала белого фосфора в спектрах ЯМР в зависимости от продолжительности процесса анаэробной переработки. На 35-й день эксперимента (слева) сигнал белого фосфора четко различим, на 63-й день (справа) спектр не содержит сигналы

гипофосфитов. Дальнейшее возобновление активного метаболизма связано с последующим окислением гипофосфит-ионов до нетоксичных фосфитов и фосфатов.

2.4. Влияние температурного режима. Температурный режим процесса не играл существенной роли. Предположительно, адаптация микрофлоры активного ила к присутствию P_4 и его метаболизм осуществляются именно в период угнетения жизнедеятельности. Соответственно, не играло существенной роли и агрегатное состояние P_4 .

2.5. Механизм детоксикации белого фосфора. Нам до сих пор не известен механизм деградации белого фосфора, роль в нем живых микроорганизмов и переходных металлов. Цель дальнейших исследований будет состоять в определении роли биологических и абиотических процессов.

2.6. Токсическое воздействие белого фосфора на микрофлору ОСВ. При одинаковом разведении из опытного (с белым фосфором) субстрата выросло больше колоний бактерий, чем из контрольного. Плотность клеточной суспензии в контроле составляла $2.5 \cdot 10^8$ клеток / мл субстрата, а в опыте $1.5 \cdot 10^{10}$ клеток / мл субстрата, то есть на два порядка больше. Вероятно, это различие вызвано тем, что в контроле исчерпались питательные вещества, и популяция сократилась. В опыте плотность популяции осталась такой же, как в исходном иле, бактерии не погибли, а впали в анабиоз. Судя по морфологии колоний (одинаковый размер, структура поверхности, цвет), все они принадлежат одному виду грамположительных бактерий. По всей видимости, это связано со спецификой культуральной среды, на которой растут не все виды бактерий. Идентификация видовой принадлежности бактерий еще не проводилась, однако уже получены фотографии мазков в световом микроскопе. Выращенные бактерии выглядят как палочки с двумя спорами на концах и образуют капсулу.

Таким образом, присутствие в субстрате белого фосфора в концентрации 0.1% не приводит к гибели бактерий.

Заключение

В литературных источниках не удалось найти сведений о присутствии элементарного фосфора в природе. Соответственно, трудно ожидать наличия у живых клеток сформировавшихся эволюционно механизмов защиты от этого токсиканта. Тем не менее известной химической реакцией является распад дифосфина в анаэробных условиях до фосфина и элементарного фосфора [19]. Между тем дифосфин является одним из типичных продуктов бактериального фосфатного дыхания. Теоретически можно предположить присутствие следовых количеств элементарного фосфора в местах возникновения болотных огней и самовозгорающихся свалочных газов. Таким образом, вполне возможно, что историческое знакомство анаэробной микрофлоры с элементарным фосфором уже состоялось. Если это соответствует истине, то задача биологической детоксикации белого фосфора оказывается вполне решаемой.

Summary

A.Z. Mindubaev, Y.A. Akosah, F.K. Alimova, D.M. Afordoanyi, Ch. Bolormaa, R.M. Kagirov, S.T. Minzanova, L.G. Mironova, D.G. Yakhvarov. On the White Phosphorus Degradation by Wastewater Mud.

The possibility of degradation of white phosphorus under the action of wastewater mud (WWM) of waste-water treatment facilities is demonstrated for the first time. It was established that the toxic action of white phosphorus degradation products results in the suppression of methanogenic process of microorganisms activity, while the following adaptation of microflora to the toxicant action leads to the complete biodegradation and processing of white phosphorus into non-toxic products. Using NMR spectroscopy, it was found that white phosphorus oxidizes to water-soluble compounds as a result of the contact with activated sludge (biological solids).

Key words: detoxication, white phosphorus, wastewater mud, anaerobic conditions, gas emission kinetics.

Литература

1. Toxicological profile for white phosphorus. – Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, 1997. – URL: <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/i/fulltext/toxprofiles/phosphorus.pdf>, свободный.
2. *Vann S.L., Sparling D.W., Ottinger M.A.* Effects of white phosphorus on mallard reproduction // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2000. – V. 19, No 10. – P. 2525–2531.
3. *Roebuck B.D., Nam S.-I., Macmillan D.L., Baumgartner K.J., Walsh M.E.* Toxicology of white phosphorus (P₄) to ducks and risk for their predators: effects of particle size // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1998. – V. 17, No 3. – P. 511–518.
4. *Sparling D.W., Day D., Klein P.* Acute Toxicity and Sublethal Effects of White Phosphorus in Mute Swans, *Cygnus olor* // *Environ. Contamin. Toxicol.* – 1999. – V. 36, No 3. – P. 316–322.
5. *Gonzalez-Andrade F., Sanchez-Q D., Martinez-Jarreta B., Borja J.* Acute exposure to white phosphorus: a topical problem in Ecuador (South America) // *Legal Medicine.* – 2002. – V. 4, No 3. – P. 187–192.

6. *Nam S.-I., Macmillan D.L., Roebuck B.D.* The translocation of white phosphorus from hen (*Gallus domesticus*) to egg // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1996. – V. 15, No 9. – P. 1564–1569.
7. *Walsh M.E., Collins C.M., Racine C.* Persistence of White Phosphorus Particles in Sediment. – Hanover, N. H.: U.S. Army Corps of Engineers, Cold Regions Research & Engineering Laboratory, 1995. – IV+46 p.
8. *Walsh M.E., Collins C.M., Racine C.* Persistence of white phosphorus (P₄) particles in salt marsh sediments // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1996. – V. 15, No 6. – P. 846–855.
9. *Mogensen A.S., Dolfig J., Haagensen F., Ahring B.K.* Potential for anaerobic conversion of xenobiotics // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2003. – V. 82. – P. 69–134.
10. *Spanggord R.J., Renwick R., Chou T.-W., Wilson R., Podoll R.T., Mill T., Parnas R., Platz R., Roberts D.* Environmental fate of white phosphorus/felt and red phosphorus/butyl rubber military screening smokes: Final Report. ADA176922, U.S. Army Medical Research and Development Command. – Menlo Park, CA: SRI International, 1985. – URL: <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA176922&Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf>, свободный.
11. *Bohn H.L., Johnson G.V., Cliff J.H.* Detoxification of White Phosphorus in Soil // *J. Agr. Food Chem.* – 1970. – V. 18, No 6. – P. 1172–1173.
12. *Roels J., Verstaete W.* Biological formation of volatile phosphorus compounds // *Biores. Technol.* – 2001. – V. 79, No 3. – P. 243–250.
13. *Di Vaira M., Peruzzini M., Stoppioni P.* d⁶ metal systems for white phosphorus activation // *Compt. Rendus Chimie.* – 2010. – V. 13, No 8–9. – P. 935–942.
14. *Suppmann B., Sawers G.* Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter // *Mol. Microbiol.* – 1994. – V. 11, No 5. – P. 965–982.
15. *Malacinski G., Konetzka W.A.* Bacterial Oxidation of Orthophosphite // *J. Bacteriol.* – 1966. – V. 91, No 2. – P. 578–582.
16. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия. 2005. – 603 с.
17. *Миндубаев А.З., Белостоцкий Д.Е., Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Алимова Ф.К., Миронова Л.Г., Коновалов А.И.* Метаногенез: биохимия, технология, применение // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2010. – Т. 152, кн. 2. – С. 178–191.
18. *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 // *Вестн. Казан. технол. ун-та.* – 2009. – № 4. – С. 220–226.
19. *Рипан Р., Четьяну И.* Фосфор (часть книги «Руководство к практическим работам по неорганической химии») // *Химия и химики.* – 2008. – № 2. – URL: <http://chemistry-chemists.com/N2/62-79a.htm>, свободный.

Поступила в редакцию
22.03.11

Миндубаев Антон Зуфарович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.
E-mail: mindubaev@iopc.ru

Акосах Йав Абайе – студент биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: akosah2005@yahoo.co.uk

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *farida_alimova@hotmail.com*

Афордоаньи Даниэль Мавуэна – студент биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.

Болормаа Чулуун – аспирант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *chboloroo0809@yahoo.com*

Кагиров Рустам Муратович – младший научный сотрудник Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

E-mail: *rustik7@rambler.ru*

Минзанова Салима Тахиятулловна – кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

E-mail: *minzanova@iopc.ru*

Миронова Любовь Геннадьевна – инженер-исследователь Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

Яхваров Дмитрий Григорьевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

E-mail: *yakhvar@iopc.ru*