

## Комбинированное применение ферментного и бактериального биокатализаторов в процессах биодеструкции ФОВ и продуктов их разложения

© 2015. Е. Н. Ефременко<sup>1,2</sup>, д.б.н., зав. лабораторией, И. В. Лягин<sup>1,2</sup>, к.х.н., с.н.с.,  
Д. А. Гудков<sup>1</sup>, к.х.н., н.с., Н. А. Степанов<sup>1,2</sup>, к.х.н., н.с., О. В. Сенько<sup>1,2</sup>, к.х.н., н.с.,  
О. В. Маслова<sup>1</sup>, к.х.н., н.с., Д. А. Ковалёв<sup>2</sup>, к.х.н., н.с., Н. В. Завьялова<sup>3</sup>, д.б.н., г.н.с.,  
В. И. Холстов<sup>4</sup>, д.х.н., директор, А. А. Янковская<sup>5</sup>, офицер отдела,

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН,

<sup>3</sup>27 Научный центр МО РФ,

<sup>4</sup>Департамент реализации конвенционных обязательств

Министерства промышленности и торговли РФ,

<sup>5</sup>Федеральное управление по безопасному хранению и уничтожению химического оружия,  
e-mail: fubhuho@yandex.ru

В статье представлены результаты комбинированного использования гексагистидин-содержащей органофосфатгидролазы, гидролизующей различные фосфорорганические соединения, и биокатализатора в виде иммобилизованных клеток бактерий рода *Pseudomonas*, осуществляющего метаболическое разложение метилфосфоновой кислоты, в процессах биодеструкции фосфорорганических отравляющих веществ и продуктов их гидролиза в составе сложных по химическому составу реакционных масс, образующихся в результате химического уничтожения супернейротоксикантов. Обсуждается эффективность разложения отдельных компонентов указанных сред на каждой стадии их обработки. Показано, что применение аэробного активного ила для удаления остаточных загрязнений в виде клеточных метаболитов на последней стадии обработки сред позволяет получить нетоксичные стоки, удовлетворяющие требованиям муниципальной канализационной системы.

The work presents results of combined application of hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase, hydrolyzing different organophosphate compounds, and biocatalyst based on immobilized bacterial cells of genus *Pseudomonas*, realizing the metabolic degradation of methylphosphonic acid, in the processes of biodestruction of organophosphorous chemical warfare agents and products of their hydrolysis in the content of reaction mass characterizing by complex content and accumulating during chemical elimination of superneurotoxins. The efficiency of degradation of components of the mentioned media at each stage of the biotreatment is discussed. It is shown, that the use of aerobic active sludge for removing of residual pollutions in the form of cell metabolites from media at the last stage of their treatment enables the obtaining of nontoxic waste water meeting the demands of municipal waste system.

Ключевые слова: фосфорорганические отравляющие вещества, гексагистидин-содержащая органофосфатгидролаза, иммобилизованные клетки, *Pseudomonas*, аэробный активный ил, биокатализаторы, биоразложение.

Keywords: organophosphorous chemical warfare agents, hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase, immobilized cells, *Pseudomonas*, aerobic active sludge, biocatalysts, biodegradation.

Согласно принятым в РФ технологиям химического уничтожения фосфоросодержащих отравляющих веществ (ФОВ), в получаемых реакционных массах (РМ) остаётся часть неразложившихся нейротоксичных фосфорорганических соединений (ФОС) [1, 2]. Дальнейшее обезвреживание образующихся РМ является крайне важной задачей, поскольку конечный состав РМ должен соответствовать нормативам токсикологической и

экологической безопасности [3], а это означает, что разложение фосфонатов, как наиболее токсичных компонентов РМ, должно быть максимальным. К тому же метилфосфоновая кислота (МФК), являющаяся продуктом разложения диизобутилового и изобутилового эфиров МФК (продуктов разложения вещества типа ви-икс), также должна быть подвержена разложению как предшественник синтеза ФОВ [4].

Для разложения фосфорорганических компонентов РМ, получаемых после уничтожения вещества типа ви-икс, наиболее эффективными являются биокаталитические способы, поскольку они предполагают проведение биодеградации компонентов РМ в экологически безопасных условиях (без применения сильных химических окислителей и концентрированных щелочных растворов), а также в технологическом плане не требуют применения высоких температур, повышенного давления и использования оборудования, изготовленного из дорогих коррозионностойких материалов [5, 6]. При этом существует небольшой набор биологических катализаторов, которые могут быть вовлечены в схему разложения компонентов РМ, и самым эффективным способом их использования может быть их комбинированное применение, позволяющее последовательно осуществлять процесс деструкции образующихся продуктов деградации ФОВ.

Так, в данной работе для биоразложения фосфорорганических компонентов РМ вещества типа ви-икс использовался подход, основанный на последовательной обработке РМ препаратом фермента гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы ( $\text{His}_6\text{-ОРН}$ ) (I-ая стадия, рис. 1), который проявляет высокую гидролитическую активность по отношению к различным ФОВ, взятым для разложения, как в виде чистых веществ, так и в составе РМ [7, 8]. Далее ферментативные гидролизаты РМ обрабатывались биокатализатором, специально разработанным на основе клеток бактерий *Pseudomonas sp.78Г* [9], иммобилизованных методом включения в криогель поливинилового спирта (ПВС). Клетки обладали способностью осуществлять разложение МФК (II-ая стадия, рис. 1) и утилизировать фосфат, накапливающийся в среде с РМ после разложения всех ФОС, в качестве источника фосфора [10, 11]. При реализации

II-ой стадии в среду деградации РМ дополнительно вводилась глюкоза как необходимый для иммобилизованных клеток источник углерода. На III-ей стадии использованного способа обезвреживания РМ осуществлялась доочистка полученных сточных вод из реактора по разложению МФК от остаточных концентраций экотоксикантов с использованием стандартных очистных сооружений, работающих с применением активного аэробного ила.

Процесс трёхстадийной обработки реакционных масс, полученных гидролизной детоксикацией (РМ-ГД), был реализован в условиях пилотной установки. Для проведения стадии ферментативного гидролиза РМ ( $V_{\text{реактора}} = 50 \text{ л}$ ) был наработан препарат фермента  $\text{His}_6\text{-ОРН}$  с активностью 5000 ед/мл в количестве 30 л, а для определения эффективности разложения МФК под действием иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp. 78Г* на пилотной установке ( $V_{\text{реактора}} = 650 \text{ л}$ ) было наработано 120 кг биокатализатора (рис. 2).

Первоначально с использованием ферментного препарата был показан высокоэффективный гидролиз ФОВ в составе реакционных масс, полученных по рецептуре дегазации №4М (РМ-РД-4М) под действием  $\text{His}_6\text{-ОРН}$ . Было установлено, что введение этого фермента в реакционную массу РМ-РД-4М, содержащую остаточные концентрации зарина или вещества типа ви-икс ( $6 \times 10^{-6}$ ,  $7 \times 10^{-6}$  моль/л), с целью их биокаталитического гидролиза, обеспечивает глубокое ферментативное разложение указанных концентраций ФОВ в течение 30 мин. (рис. 3). При этом для вещества типа ви-икс степень разложения за указанное время составляет 94%, а для зарина в составе РМ-РД-4М было установлено 100% его разложение за тот же период времени.

Аналогичным образом была проведена обработка ферментом и образцов РМ-ГД с предварительным их разбавлением 100 ммоль/л карбонатным буфером до концентрации веще-



Рис. 1. Принципиальная схема биоразложения фосфорорганических компонентов РМ вещества типа ви-икс, использованная в работе и состоящая из трёх основных стадий: I – разложение в составе РМ остаточных концентраций вещества типа ви-икс и эфиров МФК; II – разложение МФК, III – доочистка сточных вод под действием аэробного активного ила.

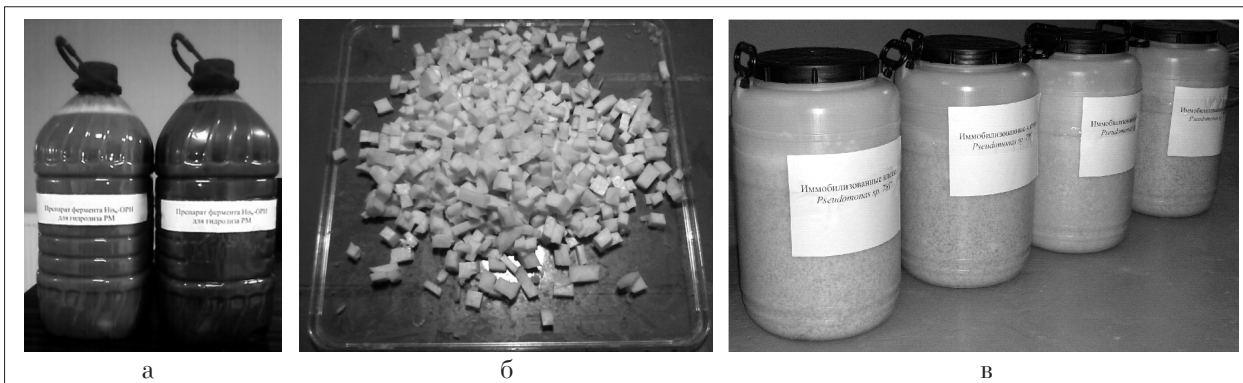


Рис. 2. Внешний вид препаратов, разработанных в рамках этой работы и наработанных для их применения на пилотной установке с целью биообработки реакционных масс, полученных после уничтожения ФОВ: а – ферментный препарат His<sub>6</sub>-ОРН (V тары=5л); б, в – биокатализатор в виде иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* 78Г (V тары=50 л).

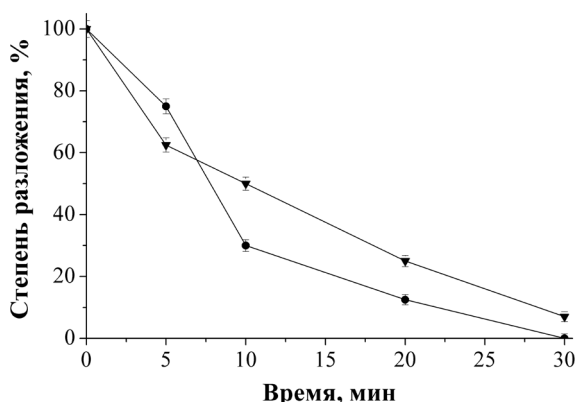


Рис. 3. Гидролиз  $6 \times 10^{-6}$  моль/л зарина (●) и  $7 \times 10^{-6}$  моль/л вещества типа ви-икс (▼) под действием фермента His<sub>6</sub>-ОРН в составе реакционных масс, полученных по технологии РМ-РД-4М.

ства типа ви-икс, равной  $7,5 \times 10^{-6}$  моль/л. При этом концентрации О,О'-диизопропилового эфира МФК и О-изобутилового эфира МФК составили, соответственно,  $9,6 \times 10^{-4}$  моль/л и  $35,8 \times 10^{-3}$  моль/л. Далее ферментативно обработанные образцы РМ подавались в реактор с иммобилизованными клетками бактерий. Результаты суммарного разложения фосфонатов в составе РМ-ГД под действием фермента His<sub>6</sub>-ОРН и биокатализатора (табл. 1) по-

казали, что основная доля всех фосфонатов подвергалась деструкции на ферментативной стадии обработки РМ, но иммобилизованные клетки бактерий, осуществляя разложение МФК и утилизируя фосфаты, способствовали сдвигу общего химического равновесия в системе в сторону образования конечного продукта (фосфата), что и обеспечивало в целом глубокое биоразложение ФОС в составе РМ.

Было установлено, что клетки *Pseudomonas sp.* 78Г, иммобилизованные в криогель ПВС, осуществляют 100%-ное разложение МФК в концентрации 200 мг/л за 28 ч, а 300 мг/л – за 40 ч со скоростью 7,2-7,5 мг/л/ч, что в 25 раз быстрее, по сравнению со свободными клетками того же штамма (рис. 4). При этом исходная концентрация МФК, которая может быть введена в реактор без риска снижения эффективности каталитического действия биокатализатора в виде иммобилизованных клеток бактерий, была практически в 2 раза выше, по сравнению со свободными клетками. Также была показана возможность повторного использования биокатализатора в виде иммобилизованных клеток в процессе разложения МФК. Характеристики биокатализатора при этом мало отличались от тех, что иммобилизованные клетки демонстрировали после их первичного примене-

Таблица 1

Достижимая общая степень деструкции различных ФОС на стадии обработки ферментом His<sub>6</sub>-ОРН и биокатализатором в виде иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* 78Г в процессе комплексного биоразложения РМ-ГД

Стадия обработки	Достижимая общая степень разложения, %		
	ИБЭМФК	ДИБЭМФК	МФК
Обработка ферментом	83 ± 2	97 ± 2	65 ± 3
Обработка биокатализатором в виде иммобилизованных клеток	91 ± 3	99 ± 1	90 ± 1

ИБЭМФК – О-изобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты  
 ДИБЭМФК – О,О'-диизобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты  
 МФК – метилфосфоновая кислота

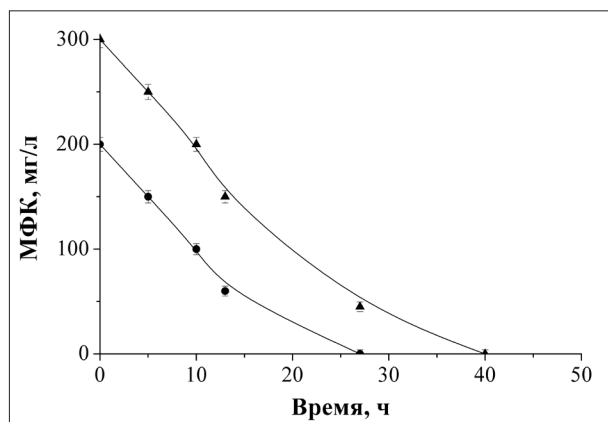


Рис. 4. Кинетика разложения метилфосфоновой кислоты (▲ – 300 мг/л, ● – 200 мг/л) под действием иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* 78Г.

ния (табл. 2). Согласно уровню концентрации внутриклеточного АТФ в иммобилизованных клетках, который контролировался с использованием высокочувствительного биолюминесцентного метода, основанного на применении люциферин-люциферазного реагента, клетки сохраняли высокий энергетический статус благодаря активному метаболизму и демонстрировали при этом практически постоянный уровень скорости деструкции МФК.

Процесс утилизации накапливающегося в среде фосфата и усвоения глюкозы иммо-

билизованными клетками бактерий сопровождался накоплением в среде метаболитов и некоторым увеличением уровня ХПК среды деградации РМ. Обработка такой среды аэробным активным илом (рис. 1) позволила получить сточные воды, соответствующие по своим характеристикам нормам канализационного стока (табл. 3). При этом был проведён не только анализ компонентного состава полученного стока, но и сделана оценка экотоксичности полученных сточных вод с использованием иммобилизованных клеток светящихся фотобактерий, быстро теряющих свою биолюминесценцию в присутствии различных токсикантов [12].

Комплексная биологическая обработка РМ-ГД, содержащих 0,1% вещества типа ви-икс и высокие концентрации различных фосфонатов, была проведена в рамках этой работы впервые и представляет собой совершенно новый биотехнологический процесс, основанный на применении оригинальных российских биокатализаторов (ферментного и микробного).

Таким образом, в процессах безопасного разложения компонентов РМ, полученных после химического уничтожения отравляющих веществ, было продемонстрировано эффективное применение биокатализаторов, разра-

Таблица 2

Характеристики биокатализатора на основе иммобилизованных клеток бактерий, включённых в криогель поливинилового спирта, при их первичном и повторном использовании для разложения МФК в ферментативно обработанных образцах РМ-ГД

Параметры сравнения	Применение биокатализатора	
	первичное	повторное
АТФ, моль/г биокатализатора	$(2,01 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	$(1,96 \pm 0,04) \times 10^{-9}$
Скорость разложения МФК	$7,35 \pm 0,05$ мг/л/ч	$7,50 \pm 0,15$ мг/л/ч

Таблица 3

Состав сточных вод, обработанных аэробным активным илом после комплексного биоразложения ФОС в составе РМ-ГД под действием фермента His<sub>6</sub>-ОРН и биокатализатора в виде иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* 78Г

Контролируемый параметр	ПДК для канализационного стока, мг/л	Обнаруженная концентрация, мг/л
Азот (аммонийный)	20,0	38 ± 2
Азот (нитрат)	10,2	5,9 ± 0,3
Азот (нитрит)	1,0	3,6 ± 0,4
Сульфаты	500	31 ± 3
Хлориды	350	30 ± 1
Фосфаты	1,14	2,5 ± 0,4
МФК	–	< 0,1
Изобутиловый эфир МФК	–	< 0,1
ХПК	500	460 ± 9
Экотоксичность, определяемая с использованием клеток светящихся бактерий	≤ 20	< 20

ботанных в РФ, в виде фермента, способного, согласно результатам работы, не только катализировать гидролиз ФОВ в составе реакционных масс, содержащих высокие концентрации продуктов разложения отравляющих веществ, но и осуществлять частичное разложение даже этих продуктов; а также в виде иммобилизованных клеток микроорганизмов, обладающих уникальными каталитическими характеристиками для деградации ФОС, являющихся продуктами разложения фосфорорганических отравляющих веществ, в том числе в средах со сложным химическим составом.

## Заключение

В данной работе показана эффективность комбинированного использования биокатализаторов в виде фермента  $\text{His}_6$ -ОРН и иммобилизованных клеток-деструкторов ФОС рода *Pseudomonas* для решения таких сложных экологических задач, к которым относится детоксикация сред с остаточными концентрациями ФОВ. Результаты работы подтверждают уникальные каталитические характеристики и большой прикладной потенциал применённых биокатализаторов. Способность эффективного функционирования разработанных биокатализаторов в сложных по химическому составу системах открывает новые возможности для биокаталитического, экологически безопасного решения проблем, связанных с деструкцией ФОВ и продуктов их деградации.

## Литература

1. Уткин А.Ю., Либерман Б.М., Кондратьев В.Б., Капашин В.П., Холстов В.И. Математическое описание процессов детоксикации фосфорорганических отравляющих веществ // РХЖ. 2007. Т. LI (2). С. 12–18.
2. Уткин А. Ю., Пыжьянов И.В., Шелученко В.В., Петрунин В.А., Капашин В.П., Холстов В.И., Кондратьев В.Б. Способ уничтожения химических боеприпасов, снаряжённых фосфорорганическими отравляющими веществами и имеющих в корпусе технологические резьбовые отверстия // Патент РФ на изобретение № 2352375 (20.04.2009).
3. Munro N. B., Talmage S. S., Griffin G. D., Waters L. C., Watson A. P., King J. F., Hauschild V. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // Research Reviews. 1999. V. 107. № 12. P. 933–974.
4. Международная конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении // ОЗХО. С. N. 610. 2005. 179 с.
5. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А., Лягин И.В., Сенько О.В., Гладченко М.А., Сироткина М.С., Холстов А.В., Варфоломеев С.Д., Холстов В.И. Экологически безопасная биодеградация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // РХЖ. 2010. Т. LIV. № 4. С. 19–24.
6. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Гудков Д.А., Аксенов А.В., Степанов Н.А., Сироткина М.С., Спиричева О.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Варфоломеев С.Д., Кондратьев В.Б., Холстов В.И. Способ биоразложения фосфорорганических соединений в составе реакционных масс, получаемых после химического уничтожения вещества типа ви-икс // Патент РФ на изобретение № 2408724 (10.01.2011). Бюл. № 1.
7. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Завьялов В.В., Варфоломеев С.Д., Завьялова Н.В., Холстов В.И. Ферменты в технологии уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ // РХЖ. 2007. Т. LI. № 2. С. 24–29.
8. Ефременко Е.Н., Вотчицева Ю.А., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д., Гачок И.В., Завьялова Н.В., Капашин В.П., Холстов В.И. Способ ферментативного гидролиза боевых отравляющих веществ // Патент РФ на изобретение № 2296164 (27.03.2007). Бюл. № 9.
9. Харечко А.Т., Мягких А.В., Колесников И.О., Колесников Д.П., Королев В.Д., Лысов А.А., Матущенко Ю.А., Завьялова Н.В., Климентьев Ю.А. Штамм *Pseudomonas species* 78Г, предназначенный для деградации продуктов деструкции фосфорорганических отравляющих веществ // Патент РФ на изобретение № 2154103 (10.08.2000). Бюл. № 22.
10. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Сенько О.В., Лобастов С.Л., Лягин И.В., Аксенов А.В., Варфоломеев С.Д. Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток бактерий для разложения метилфосфоновой кислоты // Патент РФ на изобретение № 2360967 (10.07.2009). Бюл. № 19.
11. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Сенько О.В., Сироткина М.С., Завьялова Н.В. Иммобилизованные гетерогенные биокатализаторы для разложения С-Р-связи в продуктах уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ // Вестн. РУДН. Сер. «Экология и безопас. жизнедеят.». 2011. № 1. С. 61–66.
12. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Куц В.В., Аленина К.А., Холстов А.В., Исмаилов А.Д. Люминесцентный биокатализатор для определения токсикантов // Патент РФ на изобретение № 2394910 (20.07.2010). Бюл. № 20.