
ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ГЕТЕРОГЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ РАЗЛОЖЕНИЯ С-Р-СВЯЗИ В ПРОДУКТАХ УНИЧТОЖЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ*

Е.Н. Ефременко¹, И.В. Лягин¹, О.В. Сенько¹,
М.С. Сироткина¹, Н.В. Завьялова²

¹Кафедра химической энзимологии
Химический факультет
МГУ имени М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1/11, Москва, Россия, 119991

²ФГУ «27 Научный центр Министерства обороны РФ»
ул. 2-я Бауманская, 1-В, Москва, Россия, 105005

Представленный мини-обзор освещает современные решения проблемы разложения продуктов химического уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ, основанные на применении иммобилизованных клеток микроорганизмов, представляющих собой высокоэффективные гетерогенные биокатализаторы, способные обеспечить разложение соединений с С-Р-связью, а именно метилфосфоновой кислоты и ее эфиров.

Ключевые слова: иммобилизованные клетки, фосфорорганические соединения, биодеструкция.

Согласно Международным обязательствам по химическому разоружению [1], Российская Федерация к 2012 г. должна уничтожить все запасы фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ). Согласно принятым в РФ технологиям химического уничтожения ФОВ, в получаемых реакционных массах (РМ) остается высокий процент неразложившихся фосфорорганических соединений (ФОС), в частности метилфосфоновой кислоты (МФК), ее моно- и диэфиров [2]. Разрыв именно С-Р-связи в ФОС в составе РМ является основным показателем эффективной деструкции ФОВ, так как эта стадия делает весь процесс разложения ФОВ необратимым.

С-Р-связь характеризуется чрезвычайно высокой устойчивостью к химической деструкции [3; 4]. Биотехнологические способы разложения продуктов деструкции ФОВ, содержащих С-Р-связь, основаны на действии внутриклеточных ферментов бактериальных культур и выгодно отличаются от химических методов разложения ФОС тем, что они реализуются при температурах окружающей среды и не требуют применения токсичных соединений [5—9].

Согласно оценкам специалистов, наиболее актуальным и перспективным способом утилизации РМ ФОВ, образующихся после химического уничтожения ФОВ, признан биотехнологический способ, предполагающий биоразложение компонентов РМ ФОВ с использованием клеток индивидуальных бактериальных культур

* Работа выполнена при поддержке Федерального Агентства по науке и инновациям (гос. контракт № 02.515.11.5002) и Федерального Агентства по промышленности Российской Федерации (шифр «Биозащита»).

[10] или сложных по составу консорциумов клеток [11—17]. При этом использование клеток микроорганизмов, суспендированных в средах, приготовленных на основе РМ ФОВ, для разложения в них МФК или ее эфиров обладает рядом существенных недостатков, которые заключаются в следующем:

— необходимо использовать высокие концентрации клеток (10^9 кл/мл и выше) для повышения эффективности их действия, при этом наблюдается их агрегация, в результате чего снижаются скорости разложения МФК и ее эфиров;

— при использовании микробных консорциумов необходим контроль постоянства их сложного состава для обеспечения высокой эффективности их действия;

— необходима предварительная длительная (от двух недель и более) адаптация клеток к токсичным субстратам;

— необходима утилизация отработанной бактериальной биомассы и культивирование свежей порции метаболически активной биомассы клеток-деструкторов после завершения каждого рабочего цикла процесса разложения компонентов РМ ФОВ.

Известны способы биоразложения продуктов химического гидролиза ФОВ, основанные на использовании иммобилизованных клеток микроорганизмов, которые обладают повышенной устойчивостью к воздействию различных неблагоприятных факторов (к введению в среду высоких концентраций токсичных субстратов, изменению рН среды и др.), что позволяет многократно и длительно (в случае разложения МФК и ее эфиров — до 40 сут.) использовать иммобилизованные микробные гетерогенные биокатализаторы для проведения различных биотехнологических процессов (табл. 1).

Можно выделить несколько способов иммобилизации клеток микроорганизмов, используемых исследователями для получения гетерогенных биокатализаторов, предназначенных для разложения соединений с С-Р-связью: включение клеток в матрицу носителя [10; 11], адсорбция клеток на поверхности носителя [12—14], самопроизвольная иммобилизация одних клеток на поверхности других клеток, покрытых экзополисахаридами [17], и образование микробных биопленок [15; 16].

Биокатализаторы, полученные такими способами, имеют свои преимущества и недостатки. Так, включение клеток в носитель и адсорбция клеток на поверхности носителя — технически легко реализуемые и масштабируемые методы иммобилизации, что позволяет рассматривать их как наиболее приемлемые для промышленного исполнения. Вместе с тем сорбционный способ иммобилизации клеток характеризуется существенным недостатком, который заключается в заметной десорбции клеток с поверхности носителя, приводящей к потере активности гетерогенного биокатализатора при его эксплуатации.

В иммобилизованных консорциумах, как и в свободных, последовательные превращения продуктов гидролиза ФОВ осуществляются разными клетками микроорганизмов, при этом продукты жизнедеятельности одних клеток являются субстратами для других. Однако при иммобилизации диффузия веществ, являющихся метаболитами одних клеток, к другим клеткам, которые используют их в качестве субстратов, и биодоступность таких субстратов для пространственно разобщенных клеток существенно влияют на скорость процесса разложения ФОС в составе

РМ ФОВ. В случае иммобилизации высокоактивных монокультур все эти процессы осуществляются одними и теми же клетками, что в целом позволяет избежать проблем с массообменом, присутствующим в консорциумах, и, таким образом, существенно увеличить скорость превращения веществ [14].

Таблица 1

Биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов, осуществляющих деструкцию ФОС, содержащих С-Р-связь

Продуцент	Носитель	Источник ФОС	Основное контролируемое ФОС	Концентрация ФОС в среде с биокатализатором, мг/л	Время обработки, ч	Степень разложения ФОС, %	Дополнительный источник углерода	Ссылка
Индивидуальная культура бактерий <i>Pseudomonas sp.</i>	Криогель поливинилового спирта	РМ, полученная при уничтожении Vx	ИБЭМФК	2 370	72	65,0	Глюкоза, глицерин	[10]
Индивидуальная культура бактерий <i>E. coli</i>		РМ, полученная при уничтожении зарина	ИПЭМФК	250	26	100		
Бактериальный консорциум SX		Чистое вещество ИПЭМФК		400	240	87,5	Не вводился	[11]
				850	360	84,7		
				1 300	480	76,9		
Бактериальный консорциум APG				380	154	96,2		
	600		192	93,3				
	1 200	360	93,7					
Бактериальный консорциум GB2	Пенополиуретан	Щелочной гидролизат зарина	ИПЭМФК	Не указано		40,0	Глюкоза, глицерин, изопропанол	[12]
		Щелочной гидролизат Vx	ИБЭМФК	0,12	24	90,1		
			Не указано	28,2	360	75,0	[14]	
	Биопленка	Щелочной гидролизат зарина	ИПЭМФК	320	72	97,0	Кукурузный сироп	[15—16]
Активный ил	Поверхность клеток, покрытая экзополисахаридами		ИПЭМФК	2 820	3 744	100	Не вводился	[17]
			МФК	250	3 744	0		

Примечание. ИБЭМФК — изобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты, ИПЭМФК — изопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты.

Показано, что для эффективного применения иммобилизованных консорциумов для разложения МФК и ее эфиров, как и в случае свободных клеток, необходима обязательная предварительная их адаптация к ФОС в течение продолжительного времени (до 1 месяца). Также требуется контроль постоянства многокомпонентного состава микробных консорциумов в иммобилизованном состоянии для обеспечения высокой эффективности их действия, тогда как точный микробный состав консорциумов и концентрации в нем клеток различных микроорганизмов не всегда известны [11].

Установлено, что для утилизации ФОС, используемых клетками в качестве источника фосфора, необходимо присутствие в среде дополнительных источников

углерода [11; 15—17]. Показано, что наиболее эффективное функционирование биокатализаторов по разложению МФК происходит, когда соблюдается пропорция вводимого в среду углерода к фосфору, как 100 : 1 [16]. При этом источник углерода, привносимый в среду, может быть различным — иметь белковую или углеводную природу (см. табл. 1). При внесении дополнительных источников углерода в обрабатываемые биокатализаторами РМ ФОВ эффективность утилизации МФК составляет 40—100% в зависимости от ее исходной концентрации в среде [10; 12; 15; 16].

Интересное решение использовалось в ряде работ, где в качестве дополнительного источника углерода при разложении ФОС, содержащих С-Р-связь, были апробированы гидролизаты взрывчатых веществ [13—14]. Таким образом, в одной каталитической системе была предпринята попытка одновременного решения проблемы деструкции РМ ФОВ и утилизации гидролизатов взрывчатых веществ, в частности, тринитротолуола. Однако авторы такого решения не приводят данных, позволяющих оценить, насколько эффективно эти субстраты способны заменить традиционно используемые источники углерода.

Применение генно-инженерных клеток *E. coli*, синтезирующих рекомбинантный фермент органофосфатгидролазу (ОФГ, ЕС 3.1.8.1), для получения иммобилизованных биокатализаторов, имеет дополнительные преимущества по сравнению с природными индивидуальными культурами, осуществляющими деструкцию С-Р-связи в молекулах ФОС [10]. С одной стороны, ОФГ, находясь в составе клеток, способна проявлять гидролитическую активность к широкому спектру ФОС [18] и обеспечивать полный гидролиз остаточных концентраций ФОВ (зарина, зомана, Vx) в составе РМ при введении в них иммобилизованных клеток-продуцентов фермента [19]. С другой стороны, сами клетки *E. coli* способны катализировать разрыв С-Р-связи в молекуле МФК, поскольку содержат природный фермент фосфонатазу [7]. При этом не требуется длительная адаптация клеток к токсичным ФОС. Таким образом, эти клетки могут быть использованы для комплексной трансформации компонентов РМ ФОВ, а именно для разложения самих ФОВ, МФК и ее эфиров в составе РМ [20]. К тому же использование клеток индивидуальной культуры, а не консорциума микроорганизмов должно гарантировать процесс получения иммобилизованного биокатализатора с хорошо воспроизводимыми свойствами и существенно упрощать контроль его состояния в процессе деструкции продуктов ФОВ.

При выборе носителя для иммобилизации клеток-деструкторов С-Р-связи большое внимание уделяется инертности матрицы к МФК и ее эфирам. В случае сорбции носителем этих ФОС из реакционной среды значительное их количество остается не разложившимся [14].

Одним из наиболее перспективных полимерных носителей, характеризующихся химической инертностью по отношению к компонентам РМ ФОВ, является криогель поливинилового спирта (ПВС) (см. табл. 1). Макропористая структура носителя обеспечивает благоприятные условия для массообменных процессов внутри гранул и, следовательно, гарантирует высокий уровень метболической активности иммобилизованных клеток [10]. В отличие от многих других гетерогенный биокатализатор на основе криогеля ПВС может быть реутилизирован при

расплавлении полимерной матрицы при температуре 80 °С, а полученный гомогенный раствор полимера вновь использован для формирования каталитически активных гранул с включенными в них клетками-деструкторами С-Р-связи [21].

Показано, что применение высокоэффективных микробных деструкторов С-Р-связи для создания гетерогенных биокатализаторов на основе клеток, иммобилизованных в криогель ПВС, позволяет увеличить как минимум в 10 раз их операционную стабильность и стабильность при хранении по сравнению со свободными клетками [10; 20], а также дает возможность создания высоких концентраций клеток, равномерно распределенных в объеме рабочих реакторов при разложении соединений с С-Р-связью. Последнее обстоятельство позволяет получать биокаталитические системы с увеличенной как минимум в 10 раз скоростью комплексной деградации ФОС в составе РМ ФОВ по сравнению со свободными клетками [10; 22]. При этом концентрации ФОС, подвергающиеся полной деструкции иммобилизованными гетерогенными биокатализаторами, могут быть увеличены в 5—10 раз по сравнению с теми концентрациями, которые допустимы при работе со свободных клетками-деструкторами ФОС.

Заключение. Анализ биотехнологических решений в области уничтожения химического оружия свидетельствует о том, что именно они оказываются максимально эффективными при решении вопросов, связанных с утилизацией компонентов РМ ФОВ. Биокаталитические системы обеспечивают проведение процессов деструкции компонентов РМ ФОВ с максимальными скоростями, их применение технически легко реализуемо и экологически оправдано.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. GE. 92-619266. — Париж, 1993.
- [2] Капашин В.П., Назаров В.Д., Гольшиков Д.В., Комиссаров, Никифоров Г.Е., Судаков А.Ю. ВВАН, 2005. — С. 14—20.
- [3] Патент РФ № 2175110, 2001.
- [4] Патент США № 5998691, 1999.
- [5] Huang J., Su Z., Xu Y. // J. Mol. Evol. — 2005. — V. 61. — P. 682—690.
- [6] Kononova S.V., Nesmeyanova M.A. // Biochemistry (Moscow). — 2002. — V. 67(2). — P. 184—195.
- [7] Matys S.V., Laurinavichius K.S., Krupyanko V.I., Nesmeyanova M.A. // Proc. Biochem. — 2001. — V. 36. — P. 821—827.
- [8] Mendz G.L., Mégraud F., Korolik V. // Arch. Microbiol. — 2005. — V. 183. — P. 113—120.
- [9] Review and assessment of the proposals for design and operation of designated chemical agent destruction pilot plants (DCAPP-Blue Grass II). Letter report. The National Academies Press, Washington, DC, 2006.
- [10] Патент РФ № 2360967, 2009.
- [11] Zhang Y., Autenrieth R.L., Bonner J.S., Harvey S.P., Wild J.R. // Biotechnol. Bioeng. — 1999. — V. 64(2). — P. 221—233.
- [12] DeFrank J.J., Guelta M., Harvey S., Fry I.J., Earley J.P., Lupton F.S. Enzymes in Action: Green Solution for Chemical Problems / Ed. Zwanenburg B. et al. — Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000. — P. 193—209.
- [13] Патент США № 6498281, 2002.

- [14] Патент США № 6080906, 2000.
[15] Патент США № 6599733, 2003.
[16] Патент США № 7001758, 2006.
[17] *Harvey S.P., Carey L.F., Haley M.V., Bossle P.C., Gillitt N.D., Bunton C.A.* // *Bioremed. J.* — 2003. — V. 7(3—4). — P. 179—185.
[18] *Efremenko E., Lyagin I., Gudkov D., Varfolomeyev S.* // *Biocatal. Biotransfor.* — V. 25(2—4). — P. 359—364.
[19] *Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Завьялов В.В., Варфоломеев С.Д., Завьялова Н.В., Холстов В.И.* // *ЖРХО им. Д.И. Менделеева.* — 2007. — Т. LI(2). — С. 24—29.
[20] *Efremenko E.N., Lyagin I.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Spiricheva O.V., Azizov R.E.* *Leading-Edge Environmental Biodegradation* / Ed. L.E. Pawley. — Nova Science Publishers Inc., N.-Y., 2007. — Ch. 1. — P. 11—51.
[21] *Efremenko E., Lyagin I., Senko O., Gudkov D., Varfolomeev S.* *Sol-Gel Methods for Materials Processing: Focusing on Materials for Pollution Control, Water Purification, and Soil Remediation* / Ed. P. Innocenzi et al. — Springer, Netherlands, 2008. — P. 77—89.
[22] Заявка на Патент РФ № 2009104506 (приоритет от 11.02.2009).

IMMOBILIZED HETEROGENEOUS BIOCATALYSTS FOR DESTRUCTION OF C-P-BOND IN THE HYDROLYTIC PRODUCTS OF THE ORGANOPHOSPHOROUS CHEMICAL WARFARE AGENTS

**E.N. Efremenko¹, I.V. Lyagin¹, O.V. Senko¹,
M.S. Sirotkina¹, N.V. Zavyalova²**

¹Chemical Enzymology Department
Chemical Faculty

M.V. Lomonosov Moscow State University
Lenin's Hills, 1/11, Moscow, Russia, 119991

²Scientific Center of the Russian Defense Ministry
^{2nd} *Baumanskaya str., 1-V, Moscow, Russia, 105005*

The mini-review is focused on the modern solutions of a problem of degradation of neutralization products of organophosphorous chemical warfare agents, based on application of immobilized cells of microorganisms, being highly effective heterogeneous biocatalysts, capable of providing the destruction of compounds with C-P bond: methylphosphonic acid and its ethers.

Key words: immobilized cells, organophosphorous compounds, biodestruction.