

Разрыв С-Р связи в фосфонатах под действием ферментных биокатализаторов

© 2015. Е. Н. Ефременко¹, д.б.н., зав. лабораторией,
В. В. Завьялов², к.х.н., зам. начальника отдела, Н. В. Завьялова³, д.б.н., г.н.с.,
В. И. Холстов⁴, д.х.н., директор, А. А. Янковская⁵, офицер отдела,
¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
²Экспертно-криминалистический центр МВД России,
³27 Научный центр Минобороны России,
⁴Департамент реализации конвенционных обязательств Минпромторга России,
⁵Федеральное управление по безопасному хранению и уничтожению химического оружия,
e-mail: fubhuho@yandex.ru

В статье представлен обзор данных литературы и материалы собственных исследований, доказывающие факт разрыва С-Р связи в фосфонатах при биодеструкции фосфорорганических отравляющих веществ и продуктов их гидролиза с помощью ферментных биокатализаторов. Обсуждаются известные механизмы ферментативной деструкции фосфонатов.

Показано, что под действием фермента гексагистидин-содержащей органофосфатгидролазы (His₆-ОРН), иммобилизованного в сорбционном геле, образованном суперсорбентом Stochosorb 500 Powder, реакция гидролиза фосфорорганического отравляющего вещества нервно-паралитического действия ви-икс проходит до минерализации с разрывом С-Р связи и образованием неорганического соединения (фосфорной кислоты) непосредственно в слое фильтрующе-сорбирующего материала при нормальном атмосферном давлении и температуре, не превышающей температуру тела человека (36,6°C).

Разработана общая схема реакции гидролиза вещества ви-икс под действием фермента His₆-ОРН, иммобилизованного в сорбционном геле, содержащемся в ферментсодержащих пакетах фильтрующе-сорбирующих защитных материалов. Предложено использование фермента His₆-ОРН в качестве одного из эффективных средств решения проблемы глубокого разложения производных фосфонової кислоты, а также обеспечения надёжной защиты персонала.

Создан научно-практический задел в области исследований новых защитных материалов, который может быть применён для повышения безопасности работ, планируемых к проведению для разложения фосфонатов, накопленных за предыдущие годы уничтожения фосфорорганических соединений.

The review of modern literature data and materials of own investigations proving the fact of cleavage of C-P bond in phosphonates in the processes of biodestruction of organophosphorus chemical warfare agents and their hydrolytic products under the action of enzymatic biocatalysts is presented in the work. The mechanisms of enzymatic destruction of phosphonates are discussed.

It was shown that the hydrolysis of organophosphorous compound such as Vx possessing neuroparalytic action is going on up to complete its mineralization under the action of hexahistidine-organophosphate hydrolase (His₆-ОРН) immobilized in sorption gel composed by super absorbent Stochosorb 500 Powder. It is happens with the disruption of C-P bond and appearance of inorganic compound such as phosphoric acid directly in the layer of filtering-sorbing material at the regular atmospheric pressure and temperature not exceeding the body temperature (36.6°C).

The general scheme of Vx hydrolysis catalyzed by enzyme His₆-ОРН immobilized in sorbing gel, localized inside of enzyme-containing packet of filtering-sorbing protective materials was developed.

The use of enzyme His₆-ОРН as one of the effective means in a solution of the problem of deep destruction of phosphonic acid derivatives and thereby the solution of safe personnel defense was offered.

The theoretical and practical basis in the field of investigation of new safe materials that can be applied to increase security of activities that are planed in degradation of phosphonic acid derivatives, accumulated within the last decade of organophosphorous compounds' destruction, was created herein.

Ключевые слова: фосфонаты, биокатализаторы, фермент, деструкция, С-Р связь.

Keywords: phosphonates, biocatalysts, enzyme, destruction, C-P bond.

Биодеструкция С-Р связи в фосфонатах

Фосфонаты являются классом фосфорорганических соединений с С-Р связью, которая весьма устойчива к химическому гидролизу и термическому разрушению [1]. Фосфонаты

встречаются среди соединений как биогенного (2-аминоэтилфосфонової кислота [2], алафосфалин и фосфомицин [3]), так и антропогенного происхождения.

К производным фосфонової кислоты антропогенного происхождения относят-

ся отравляющие вещества (ОВ) нервно-паралитического действия (ви-икс, зарин и зоман). Продуктами их разложения являются менее токсичные эфиры метилфосфоновой кислоты, которые более устойчивы к биоразложению естественной микробиотой почвы, поэтому обнаруживаются спустя десятилетия даже на глубине свыше 1 м [4], однако они подвергаются деструкции под действием бактериальных ферментов.

В настоящее время известно несколько ферментов микроорганизмов, ответственных за процесс деструкции С-Р связи в клетках: фосфонатаза (2-фосфоацетальдегидгидролаза, ЕС 3.11.1.1), специфически разлагающая 2-фосфоацетальдегид [5], фосфоацетатгидролаза (ЕС 3.11.1.2), расщепляющая фосфоацетат [6], фосфонопируватгидролаза (ЕС 5.4.2.9) [7] и С-Р-лиаза [8]. Причём первые три фермента не способны разлагать С-Р связь в метилфосфоновой кислоте и используются в качестве субстратов для очень узкого круга фосфонатов с активированной С-Р связью.

Предполагается, что клетки *E. coli* и других микроорганизмов обладают полиферментным комплексом – С-Р-лиазой, отвечающим за расщепление алкилфосфонатов с неактивированной С-Р связью. В ходе расщепления образуются соответствующие алканы и фосфат, который далее используется в качестве единственного источника фосфора. Генетические исследования установили, что С-Р-лиаза в клетках *E. coli* кодируется четырнадцатью генами *phn* оперона, *phnCDEFGHIJKLMNOP* [9]. *Phn* оперон является частью *Pho* регулона, состоящего из генов и оперонов, транскрипция которых индуцируется в условиях фосфорного голодания.

Установлено, что С-Р-лиаза проявляет свою активность только в клетках, и её актив-

ность никогда достоверно не была обнаружена в бесклеточных экстрактах. Данный факт существенно ограничил изучение механизма действия этого фермента и дал скачок развитию альтернативных методов изучения фермента в поиске аналогичных химических процессов, а также исследованиям *in vivo*. Результатом исследований стали три предположительных механизма действия С-Р-лиазы.

Согласно *первому механизму*, процесс инициируется образованием фосфонильного радикала, последующая фрагментация которого приводит к образованию метафосфата и алкильного радикала. Далее алкильный радикал взаимодействует с растворителем и, отрывая атом водорода от молекулы воды, превращается в алкан. Данный механизм был предложен по аналогии с механизмом химического разрушения С-Р связи с помощью $Pb(OAc)_4$ при нагревании (рис. 1) [10]. При нагревании $Pb(OAc)_4$ генерирует большое количество радикалов, которые атакуют алкилфосфонат. В результате внутримолекулярной перегруппировки происходит высвобождение алкильного радикала, который может взаимодействовать с растворителем с образованием алкана или алкена. Данный механизм согласуется с процессом биоразложения алкилфосфонатов ввиду того, что продуктом деградации $CD_3PO_3H_2$ клетками *E. coli* является CD_3H .

Образование алкильного радикала является специфической особенностью деградации алкилфосфонатов. Обнаружение среди продуктов деградации не только алканов, но и алкенов свидетельствует в пользу свободно-радикального механизма деградации. Вместе с этим в случае биоразложения фосфонатов количество образовавшихся алканов существенно превышает количество алкенов: их соотношение равно 30:1 [11]. Данное значе-

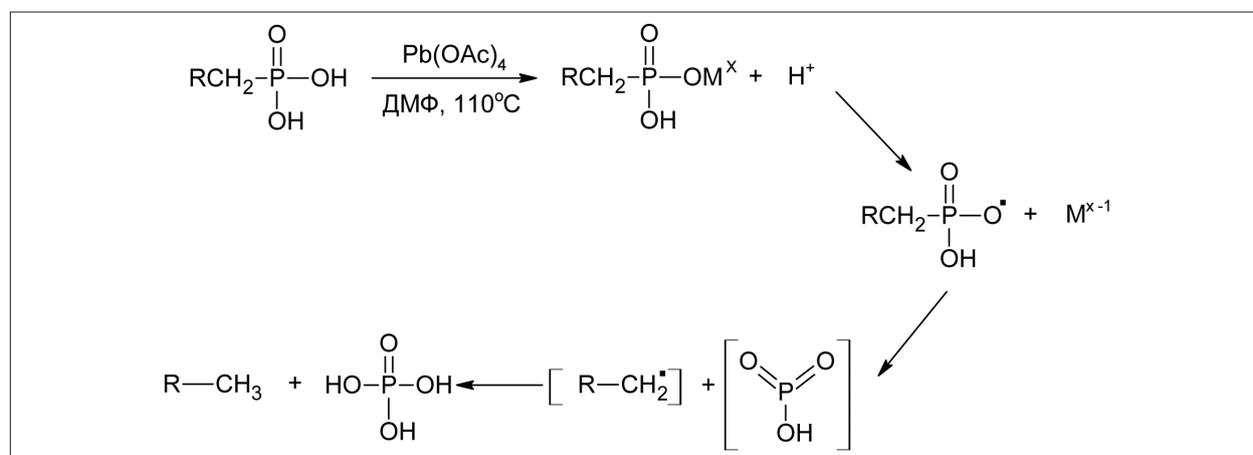


Рис. 1. Радикальный механизм разрушения С-Р связи. ДМФ – диметилформамид, М – металл.

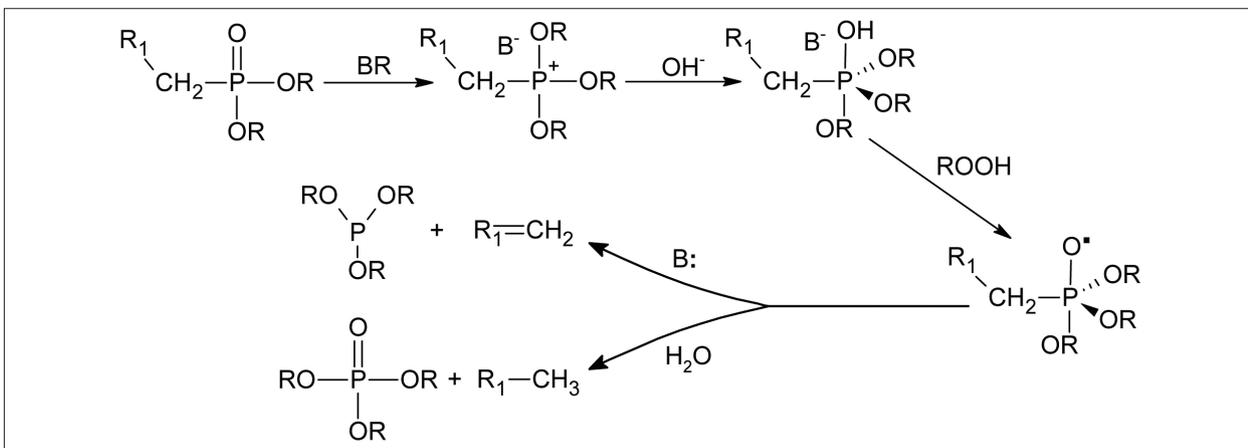


Рис. 2. Схема реакции разрушения С-Р связи, идущая через образование фосфониевого иона.

ние не согласуется с таковым для реакции с $Pb(OAc)_4$, для которой оно составляет 8:1. Таким образом, полного соответствия данного механизма с биоразложением С-Р связи не наблюдается. При этом остаётся не выясненным конечный фосфорсодержащий продукт. Предполагается, что разрушающаяся метафосфорная кислота быстро реагирует с водой и образуется ортофосфорная кислота. Однако есть и альтернативное предположение, согласно которому фосфорсодержащий продукт разложения С-Р связи может взаимодействовать с нуклеотидами и участвовать в образовании молекулы АТФ. Учитывая, что в некоторых работах среди продуктов деградации алкилфосфонатов была обнаружена α -1-этилфосфорнорибоза [12], не исключено, что именно нуклеозиды являются акцепторами фосфорной группы алкилфосфонатов. Кроме того, не выясненным остаётся вопрос отсутствия в качестве продуктов реакции $R-CH_2OH$ и $R-CH_2-CH_2-R$, которые могут образовываться в ходе радикального процесса.

Согласно второму механизму расщепление С-Р связи в алкилфосфонатах с помощью С-Р-лиазы осуществляется через образование фосфониевого иона (рис. 2) [13]. Алкилфосфонаты могут быть превращены в алкилфосфониевые ионы присоединением электрофила по Ad_E механизму по двойной связи между кислородом и фосфором. Алкилфосфониевые ионы стабилизируются в органических растворителях (хлороформ, ацетонитрил). Далее в результате добавления перекиси водорода происходит образование радикала. Внутримолекулярная перегруппировка приводит к гомолитическому разрыву С-Р связи с образованием алкильного радикала, который, взаимодействуя с растворителем, образует алкан. В присутствии сильного основания

возможно образование алкена, фосфорная группа при этом переходит в фосфит. Алканы, таким образом, будут главными продуктами биodeградации, следовые количества алкенов могут возникать в результате конкурентного β -элиминирования фосфониевого иона.

Недостатком данного механизма является использование в качестве исходного субстрата триэфиров алкилфосфонатов, свойства которых существенно отличаются от свойств солей и кислот. Кроме того, стоит отметить, что образование фосфониевого иона, который возникает только в органических растворителях, маловероятно во внутриклеточных условиях.

Согласно третьему механизму дефосфорилирование происходит как побочная реакция конденсации аминоксиде фосфоната с пиридоксалем или с пиридоксальфосфатом (рис. 3) [14].

Исследования реакций трансаминирования и дефосфорилирования 2-амино-3-фосфонопропионовой кислоты, катализируемые ионами металла и пиридоксалем [15] показали, что добавление ионов металла является обязательным условием для проведения реакции дефосфорилирования. В смесях, содержащих только 2-амино-3-фосфонопропионовую кислоту, или 2-амино-3-фосфонопропионовую кислоту и пиридоксаль без ионов металла, или 2-амино-3-фосфонопропионовую кислоту с ионами металла, не происходит образование фосфатов.

Следовательно, для реакции дефосфорилирования необходимо присутствие ионов металла и пиридоксала. Более поздние исследования [16] внесли уточнения в механизм реакции аминоксиде фосфонатов с пиридоксалем (рис. 4).

Аминогруппа фосфоната образует основание Шиффа с пиридоксалем. Происходит перераспределение электронной плотности и

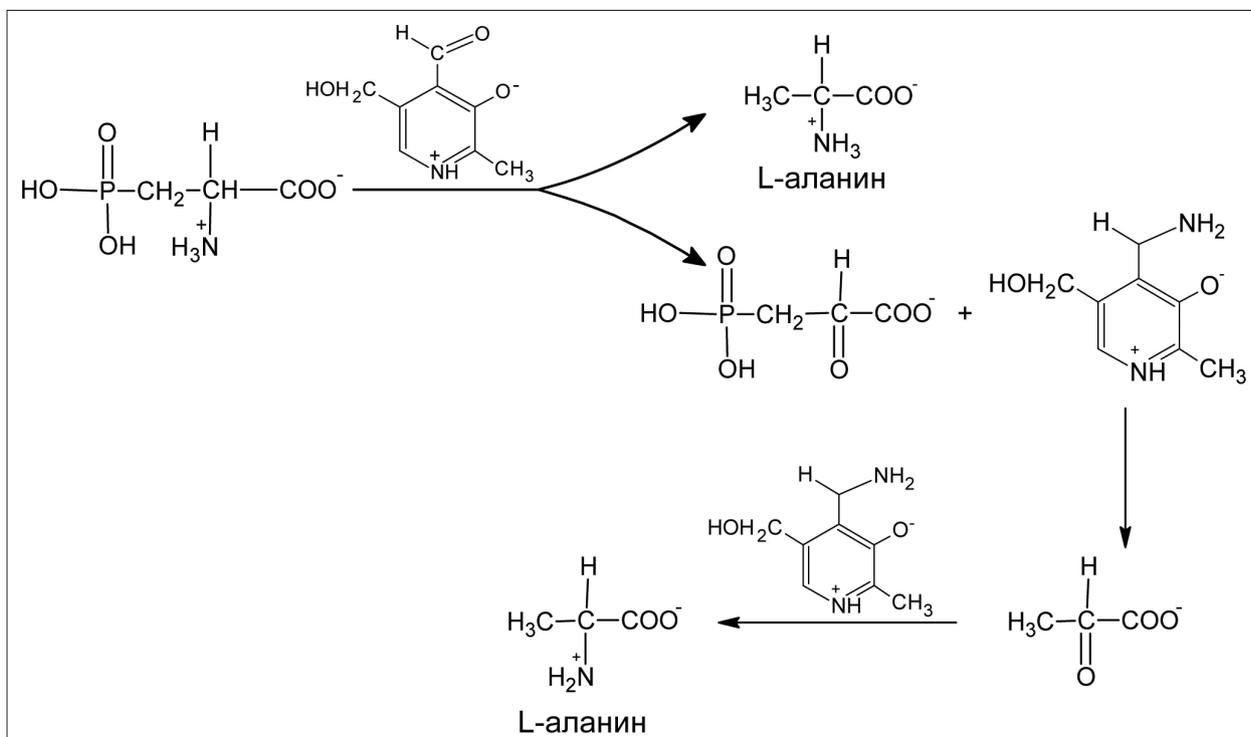


Рис. 3. Образование L-аланина из 2-амино-3-фосфоно-пропионой кислоты под действием пиридоксала.

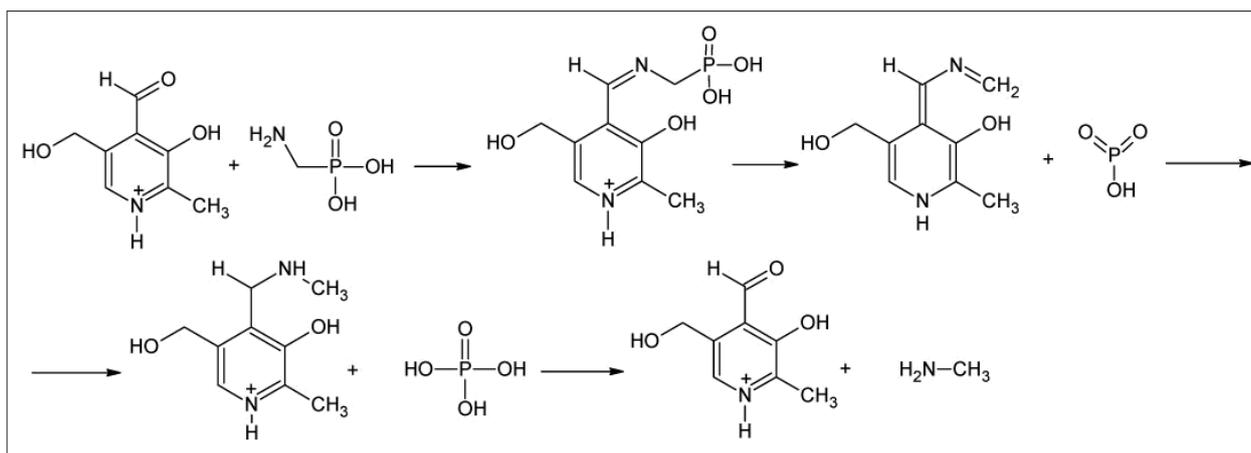


Рис. 4. Механизм реакции дефосфорилирования аминоксфоната с пиридоксалем.

высвобождение метафосфорной кислоты, которая, реагируя с водой, образует ортофосфорную кислоту. Далее происходит гидролиз основания Шиффа с образованием амина и пиридоксала. Исследования разрушения С-Р связи различных субстратов показали [16], что данный механизм имеет ограниченное применение: далеко не все субстраты взаимодействуют согласно ему.

Сегодня чётко установлено, что способность разлагать фосфонаты по С-Р-лиазному механизму встречается среди ферментов грамотрицательных бактерий гораздо чаще, чем среди ферментных систем грамположительных бактерий. Это отдельные представите-

ли семейств *Arthrobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*) и *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Agrobacterium*).

По способности расщеплять С-Р связь с помощью С-Р-лиазы бактерии делят на три класса [17]. Первый класс бактерий представлен клетками *E. coli*, способными разлагать алкил- и фенилфосфоновую кислоты, но не глифосат. Второй класс бактерий представлен клетками *Enterobacter aerogenes*, способными эффективно разлагать алкил- и фенилфосфоновую кислоты, однако разложение глифосата они производят слабо. Третий класс бактерий представлен клет-

ками рода *Pseudomonas*, способными осуществлять разложение алкил- и фенилфосфоновой кислоты и глифосата одинаково эффективно. Однако интересно отметить, что С-Р-лиазную активность внеклеточных экстрактов как у клеток *E. coli*, так и у *Pseudomonas sp. PG2982* тестировать не удалось [18, 19].

Использование биотехнологического подхода к разрыву С-Р связи в фосфонатах, основанного на применении ферментных технологий, стало возможным только после того, как на протяжении последних 10 лет был проведён большой объём исследований в различных странах мира, направленных на поиск источников выделения ферментов, активных по отношению к фосфонатам и продуктам их химического разрушения [20], на сравнение их каталитических характеристик и оценку возможности масштабирования их производств для практического использования в технологии разложения фосфонатов.

Интересным объектом исследований в процессах разложения фосфонатов стал фермент органофосфатгидролаза (ОРН, ЕС 3.1.8.1) [21], которая характеризуется самой широкой субстратной специфичностью и является единственным ферментом в мире среди всех известных на сегодняшний день, способным гидролизовать ви-икс наряду с заринном и зоманом и продуктами их детоксикации. Учитывая способность ОРН гидролизовать фосфонаты, стала очевидной возможность применения этого фермента в технологии уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) на разных этапах её реализации: 1) для проведения гидролиза остаточных количеств ФОВ и продуктов их химического гидролиза, 2) в составе индивидуальных самодезазирующих средств защиты от воздействия ФОВ, 3) в составе препаратов и средств, предназначенных для эффективной дегазации территорий, технического инвентаря, оборудования и помещений на объектах по хранению и уничтожению химического оружия.

При введении гексагистидинового (His_6) последовательности на N-конец молекулы ОРН (His_6 -ОРН) был получен рекомбинантный фермент, который проявлял высокую каталитическую активность по отношению к различным ФОВ в сравнении с другими известными ферментами, гидролизующими подобные соединения: к ви-икс – в 2,2 раза, к зарину – в 7 раз при нейтральном значении рН [5, 6, 8, 22–25].

Успешные результаты по применению His_6 -ОРН для гидролиза чистых ОВ послу-

жили основанием для проведения испытаний данного фермента в реакциях гидролиза ФОВ в составе реакционных масс [6]. Проведённые исследования показали, что, бесспорно, непрерывные технологии, основанные на применении проточных реакторов, заполненных иммобилизованными формами фермента, представляются наиболее привлекательными способами решения технологических задач [17, 18]. Помимо этого использование иммобилизованных препаратов обеспечивает возможность их многократного применения, что существенно снижает стоимость процесса в целом. Все эти и многие другие факторы увеличивают интерес к разработкам эффективных иммобилизованных форм ОРН для деструкции ФОВ [20, 21].

Применение His_6 -ОРН в качестве компонента средств защиты для разрыва С-Р связи в молекулах ФОВ

При решении комплекса вопросов, связанных с реализацией технологии уничтожения ФОВ, ферментативное разложение фосфонатов представляет большой интерес для создания новых высокоэффективных средств защиты персонала с использованием ферментсодержащих препаратов.

Обсуждая вопросы, связанные с обеспечением безопасности персонала, следует отметить, что наиболее эффективными в составе средств индивидуальной защиты являются материалы, обеспечивающие не только эффективную сорбцию и удержание ОВ, но и осуществляющие их разложение (дегазацию).

Так, известны различные фильтрующе-сорбирующие защитные материалы, механизм защитного действия которых основан на применении сорбентов, содержащих различные вещества, катализирующие разложение сорбированных токсичных веществ до существенно менее токсичных продуктов.

Такие защитные материалы при попадании на их поверхность зарина в концентрации 10 г/м^2 обеспечивают его разложение за 3 ч при температуре $40\text{--}50^\circ\text{C}$. Однако использование таких химических катализаторов в составе защитных материалов приводит к колоссальному удорожанию самих материалов, поскольку эффективный гидролиз обеспечивается лишь высокой концентрацией катализаторов (до 65% от массы сорбента) и высокой степенью их измельчения (размер гранул до 250 мкм) [26].

Альтернативу химическим катализаторам, вводимым в сорбенты в составе защитных фильтрующе-сорбирующих самодезазирую-

щихся материалов, могут составить ферменты, способные высокоспецифично катализировать гидролиз токсичных веществ, поскольку известно, что скорости разложения ФОВ под действием, например, ОРН превышают скорости реакций, катализируемых химическими реагентами [20, 21], и при этом одинаковая степень конверсии ФОВ обеспечивается существенно меньшими количествами ферментов в сравнении с химическими катализаторами.

Очевидно, что наиболее целесообразным является использование ферментов в иммобилизованной форме, что обеспечивает длительное сохранение каталитической активности ферментов и упрощает процедуру их введения в структуру защитных материалов.

В России разработан ферментсодержащий материал, предназначенный для использования в составе средств индивидуальной защиты от ФОВ. Действие данного материала основано на одновременной абсорбции и детоксикации (гидролизе) ФОВ под действием иммобилизованного фермента His_6 -ОРН [27]. В качестве носителя для физической иммобилизации фермента используется сорбент на основе акрилата, который обладает колоссальной абсорбционной ёмкостью и способен удерживать большие объёмы сорбируемых веществ. Такой фильтрующе-сорбирующий самодегазирующийся материал при нанесении на его поверхность ви-икс в концентрации 10 г/м^2 обеспечивает нейтрализацию его паров при температуре до 45°C на 100% за 3–7 ч. при рН 7,8–10,5, гарантируя отсутствие паров токсичного химиката за слоем защитного материала на протяжении не менее 96 часов. Данный материал сохраняет свои защитные свойства на 100% после его хранения в герметичной упаковке до 12 месяцев.

При проведении исследований по оценке защитных характеристик ферментсодержащих пакетов материалов по ФОВ на примере вещества ви-икс был предположен следующий механизм их защитного действия от ФОВ.

В защитном слое ферментсодержащих пакетов фильтрующе-сорбирующих защитных материалов сначала осуществляется сорбция подведённых к нему паров ФОВ и их растворение в жидкости, содержащейся в сорбционном геле, создаваемом суперсорбентом Stochosorb 500 Powder. Затем растворённый токсичный химикат (ТХ) равномерно распределяется в объёме сорбционного геля и молекулы ТХ поступают к активному центру фермента His_6 -ОРН, и далее под действием фермента происходит гидролиз ТХ (ФОВ).

Для подтверждения этого механизма защитного действия ферментсодержащих пакетов фильтрующе-сорбирующих защитных материалов были проведены исследования на пакетах материалов, в защитном слое которых использовался сорбционный гель с иммобилизованным ферментом His_6 -ОРН и на его аналоге, не содержащем фермент, который использовался в качестве контроля.

Было установлено, что представляющие собой олеофобную мембрану верхние слои изучаемых пакетов материалов содержат ви-икс и дисульфид – один из первичных продуктов его распада, в то время как в нижнем слое ферментсодержащего пакета материалов ви-икс и дисульфид отсутствуют, однако присутствуют продукты деструкции вещества ви-икс: метилфосфоновая кислота, её кислый эфир и фосфорная кислота.

В нижнем слое контрольного пакета в отличие от ферментсодержащего пакета ви-икс и дисульфид были обнаружены, хотя и в меньших количествах, чем в верхнем слое (на один десятичный порядок меньше), что свидетельствует о том, что основная часть ФОВ осталась на поверхности покровного слоя. Согласно проведённому хроматографическому определению было установлено, что продукты деструкции вещества ви-икс-метилфосфоновая кислота, её кислый эфир и фосфорная кислота в нижнем слое контрольного пакета отсутствуют.

Наличие кислого эфира метилфосфоновой кислоты, самой метилфосфоновой кислоты и фосфорной кислоты в нижнем слое ферментсодержащего пакета свидетельствует о произошедшем биокаталитическом процессе гидролиза как самого вещества ви-икс, так и продуктов его деструкции (эфиров метилфосфоновой кислоты, метилфосфоновой кислоты) под действием иммобилизованного фермента His_6 -ОРН. Обнаружение фосфорной кислоты в свою очередь указывает на возможное расщепление С-Р связи в метилфосфоновой кислоте.

Таким образом, проведённые исследования на примере гидролиза вещества ви-икс подтвердили предполагаемый механизм защитного действия ферментсодержащих пакетов материалов, основанный на реакции ферментативного гидролиза ФОВ.

Выдвинутое предположение о возможности расщепления С-Р связи в процессе ферментативной деструкции ФОВ и первичных продуктов представляется чрезвычайно важным, так как гарантирует обеспечение надёжной защиты организма человека при использовании в средствах индивидуальной

защиты ферментсодержащих пакетов материалов не только от самих высокотоксичных ФОВ, но и от достаточно токсичных продуктов их первичного гидролиза (например, эфиров метилфосфоновой кислоты).

Для подтверждения этого было проведено исследование гидролиза ФОВ непосредственно в ферментсодержащем гелеобразующем полимерном сорбенте. Было показано, что ферментативному гидролизу под воздействием His₆-ОРН подвергается не только вещество ви-икс (вещество не обнаруживается), но и метилфосфоновая кислота и её эфиры. Вместо этих соединений была обнаружена фосфорная кислота – продукт деструкции метилфосфоновой кислоты. Фосфорная кислота могла в исследуемой системе образоваться только при расщеплении С-Р связи между атомом фосфора и метильным радикалом в молекуле метилфосфоновой кислоты.

При этом необходимо отметить, что использовавшиеся в ходе вышеизложенных исследований ви-икс и метилфосфоновая кислота перед началом экспериментов были подвергнуты тщательной проверке на наличие примесей, и фосфорная кислота при этом обнаружена не была.

Проведённые исследования и полученные результаты позволили разработать общую схему реакции гидролиза вещества ви-икс под действием фермента His₆-ОРН, иммобилизованного в сорбционном геле ферментсодержащих пакетов фильтрующе-сорбирующих защитных материалов (рис. 5).

Таким образом, на примере вещества ви-икс было установлено, что фермент His₆-ОРН, иммобилизованный в гелеобразующем полимерном сорбенте, способен катализировать расщепление как Р-S и Р-О связей, а также Р-F и Р-CN связей, как было установлено ранее [20, 22], так и С-Р связи, и осуществлять деструкцию как высокотоксичных фосфорорганических отравляющих веществ, так и первичных продуктов их гидролиза, до образования фосфорной кислоты – неорганического соединения, т.е. проводить минерализацию фосфорорганических токсичных химикатов.

Как установлено, ферментативный гидролиз ви-икс под действием органофосфатгидролазы является наиболее трудноосуществимым, что позволяет считать данный ТХ «тест-веществом» по ферментативному гидролизу фосфорорганических соединений так же, как иприт уже давно является «тест-веществом» по проникновению через защитные материалы [20].

Заключение

На сегодняшний день изучение возможности использования ферментов, способных осуществлять гидролиз ФОВ, является одним из главных направлений исследований специалистов, решающих вопросы экологически приемлемой детоксикации фосфонатов в различных странах мира.

Совокупность достижений в области химической энзимологии и биотехнологии обеспечила наличие научно-практической базы для развития нового ферментативного подхода к решению комплекса ключевых проблем, связанных как с реализацией технологий уничтожения ФОС, так и с обеспечением безопасности занятого в данном процессе персонала.

Проведённые экспериментальные исследования показали, что под действием фермента His₆-ОРН, иммобилизованного в сорбционном геле, образованном суперсорбентом Stochosorb 500 Powder, реакция гидролиза ФОВ нервно-паралитического действия ви-икс проходит с разрушением С-Р связи и образованием неорганического соединения – фосфорной кислоты.

Полученные результаты позволяют предложить использование фермента His₆-ОРН в качестве одного из эффективных путей решения проблемы глубокого разложения фосфонатов, а также обеспечения надежной защиты персонала. Созданный научно-практический задел в этой области исследований новых защитных материалов может быть применён для повышения безопасности работ, планируемых к проведению для разложения фосфонатов, накопленных за предыдущие годы уничтожения ФОС.

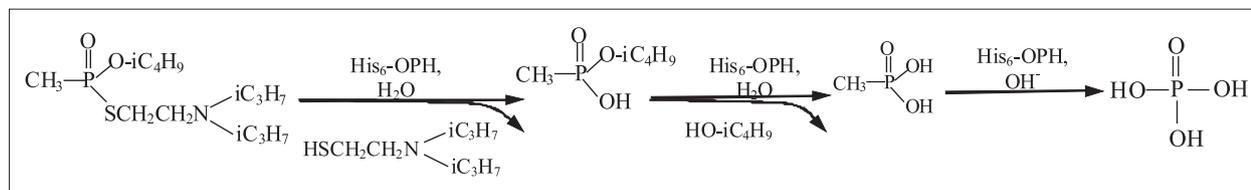


Рис. 5. Общая схема ферментативного гидролиза ви-икс с разрушением С-Р связи и образованием фосфорной кислоты.

Литература

1. Freedman L.D., Doak G.O. The preparation and properties of phosphonic acids // *Chem. Rev.* 1957. V. 57. № 3. P. 479–523.
2. Horiguchi M., Kandatsu M. Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from Rumen protozoa // *Nature.* 1959. V. 184. № 4690. P. 901–902.
3. Hilderbrand R.L., Henderson T.G. The role of phosphonates in living system. London: C.R.C. Press. 1989. P. 5–30.
4. Small M.J. Compounds formed from the chemical decontamination of HD, GB, and VX and their environmental fate. Fort Detrick, MD: U.S. Army Medical Bioengineering research and Development Laboratory. Tech rpt 8304, 1984. DTIC accession no. AD-A149515.
5. LaNauze J.M., Rosenberg H., Shaw D.C. The enzymic cleavage of the carbon-phosphorus bond: Purification and properties of phosphonate // *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. V. 212. P. 332–350.
6. McMullan G., Quinn J.P. In vitro characterization of a phosphate starvation-independent carbon-phosphorus bond cleavage activity in *Pseudomonas fluorescens* 23F // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 2. P. 320–324.
7. Ternan N.G., Hamilton J.T.G., Quinn J.P. Initial in vitro characterisation of phosphonopyruvate hydrolase, a novel phosphate starvation-independent, carbon-phosphorus bond cleavage enzyme in *Burkholderia cepacia* Pal6 // *Arch. Microbiol.* 2000. V. 173. № 1. P. 35–41.
8. Wackett L.P., Shames S.L., Venditti C.P., Walsh C.T. Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 2. P. 710–717.
9. Metcalf W.W., Wanner B.L. Mutational analysis of an *Escherichia coli* fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using Tnpho A elements // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 3430–3442.
10. Frost J.W., Loo S., Cordeiro M.L., Li D. Radical-based dephosphorylation and organophosphonate biodegradation // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. V. 109. P. 2166–2174.
11. Cordeiro M.L., Pompliano D.L., Frost J.W. Degradation and detoxification of organophosphonates: cleavage of the carbon-phosphorus bond // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 332–334.
12. Avila L.Z., Draths K.M., Frost J.W. Metabolites associated with organophosphonate C-P bond cleavage: chemical synthesis and microbial degradation of [³²P]-ethylphosphonic acid // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1991. V. 1. № 1. P. 51–54.
13. Avila L.Z., Bishop P.A., Frost J.W. Hydrocarbon and phosphate triester formation during homolytic hydrolysis of organophosphonium ions: an alternate model for organophosphonate biodegradation // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. № 6. P. 2242–2246.
14. Cassaigne A., Lacoste A.-M., Neuzil E. Transamination non enzymatique des acides amines // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. V. 252. P. 506–515.
15. Martell A.E., Langohr M.F. Metal ion- and pyridoxal-catalysed transamination and dephosphorylation of 2-amino-3-phosphonopropionic acid. A new phosphonate model // *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1977. V. 10. P. 342–344.
16. Avila L.Z., Loo S.H., Frost J.W. Chemical and mutagenic analysis of aminomethylphosphonate biodegradation // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. V. 109. № 22. P. 6758–6764.
17. Матыс С.В. Деградация метилфосфоната *E. coli*: физиологические и биохимические аспекты. Диссертация. 2003. С. 56.
18. Нифантьев Э.Е. Химия фосфорорганических соединений. М.: 1971.
19. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // *Биохимия.* 2002. Т. 67. С. 220–233.
20. Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферменты деструкции фосфорорганических нейротоксинов // *Успехи биологической химии.* 2004. Т. 44. С. 307–340.
21. Ефременко Е., Сергеева В. Органофосфатгидролаза – фермент, катализирующий деградацию фосфорсодержащих отравляющих веществ и пестицидов // *Известия АН Сер. Хим.* 2001. Т. 10. С. 1743–1749.
22. Dumora C., Marche M., Doignon F., Aigle M., Cassaigne A., Crouzet M. First characterization of the phosphonoacetaldehyde hydrolase gene of *Pseudomonas aeruginosa* // *Gene.* 1997. V. 197. № 1-2. P. 405–412.
23. Baker A.S., Ciocci M.J., Metcalf W.W., Kim J., Babbitt P.C., Wanner B.L., Martin B.M., Dunaway-Mariano D. Insights into the mechanism of catalysis by the P-C bond-cleaving enzyme phosphonoacetaldehyde hydrolase derived from gene sequence analysis and mutagenesis // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 9305–9315.
24. Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Carbon-phosphorus bond cleavage by gram-positive and gram-negative soil bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989. V. 31. P. 283–287.
25. Schowanek D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. P. 895–903.
26. Vempati R.K., Biehl E.R., Hegde R.S., Don Y.S. Method fo degrading chemical warfare agents using MN (VII) oxide with and without solid support // Патент США № 8084662 B2 (27.12.2011).
27. Ефременко Е.Н., Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Гореленков В.К., Гудков Д.А., Лягин И.В., Варфоломеев С.Д., Холстов В.И. Фильтрующе-сорбирующий самодегазирующийся материал для средств индивидуальной защиты от воздействия фосфорорганических соединений // Патент РФ на изобретение № 2330717 (10.08.2008). Бюл. № 22.