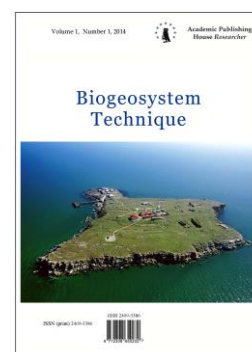


Copyright © 2019 by Academic Publishing House Researcher s.r.o.



Published in the Slovak Republic
Biogeosystem Technique
Has been issued since 2014.
E-ISSN: 2413-7316
2019, 6(2): 102-113

DOI: 10.13187/bgt.2019.2.102
www.ejournal19.com



The Effect of Culture Media Composition and Microorganism Species Affiliation on the Biological Destruction of White Phosphorus

Anton Z. Mindubaev^{a,*}, Edward V. Babynin^b, Elena K. Badeeva^a, Salima T. Minzanova^a,
Lubov' G. Mironova^a

^a A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Russian Federation

^b Kazan (Volga Region) Federal University, Russian Federation

Paper Review Summary:

Received: 2019, September 14

Received in revised form: 2019, September 18

Acceptance: 2019, September 29

Abstract

The presented study compared the growth of *Aspergillus niger* strain AM1 in culture media varying in composition but containing P₄ as the sole source of phosphorus. Of the ten media, two in which *Aspergillus* grew the fastest were selected. These media were concluded to be optimal for growth. Comparing the compositions of the media and the growth rate of *Aspergillus* in them, we found a key component that is a favorable factor for the growth of AM1 and the biodegradation of white phosphorus. This component was sodium nitrate (NaNO₃). It has also been shown that copper sulphate (CuSO₄) has no effect on the growth of *Aspergillus* in media with white phosphorus, regardless of the composition of these media. This result is in harmony with our previous findings. Furthermore, in the present work, attempts to increase the concentration of white phosphorus in the culture medium to values above 1 % are described for the first time. For this purpose, we added the following solvents to the culture media: dimethyl sulfoxide (DMSO) and diesel, in which white phosphorus dissolves relatively well. Apparently, the presence of these substances adversely affects the growth of *Aspergillus*. Therefore, the problem of further increasing the concentration of P₄ remains an unanswered.

White phosphorus, reacts with ions of divalent copper even at room temperature. and the Pridham-Gottlieb medium, which we have chosen for our purposes, contains copper sulfate in its composition. The addition of an emulsion of white phosphorus led to the formation of a black precipitate, which is evidence that a chemical reaction took place. Thus, the growth of microorganisms occurred in the presence of not so much white phosphorus as the products of its chemical transformations, and the experiments were not completely clean. Therefore, in the present study, we carried out further modification of the Pridham-Gottlieb nutrient medium, excluding from it not only phosphates as a source of phosphorus, but also copper sulfate. In addition, we compared the white phosphorus resistance of our *A. niger* strains AM1 and AM2, with three strains from the All-Russian Collection of Microorganisms (ARCM) (strains FW-650,

* Corresponding author

E-mail addresses: mindubaev-az@yandex.ru (A.Z. Mindubaev)

FW-2664 and FW-2731), as well as four different bacterial species. Though highest resistance was observed in strain AM1, the three strains of *A. niger*, sent from ARCM, also showed a higher resistance to white phosphorus than the bacteria. It was shown that exclusion of copper sulfate from the composition of the nutrient medium with white phosphorus does not prevent the growth of fungi. In addition, white phosphorus does not react with the formation of a precipitate and remains for a longer period under these conditions. This fact is a serious argument in favor of biodegradation and has practical applicability in the method of microbial detoxification of white phosphorus. However, a higher resistance of AM1 in comparison to the ARCM strains was only observed in a medium with copper. Apparently, strain AM1 is most resistant to the toxic products from the reaction of white phosphorus with Cu^{2+} .

Our previous studies demonstrated for the first time the presence of genotoxic properties in white phosphorus. This in no doubt makes white phosphorus even more dangerous to handle. However, our initial studies were carried out on prokaryotes (*Salmonella typhimurium*). Since the genetic apparatus of prokaryotes is differently arranged than in eukaryotes (including humans), the results of the studies on *Salmonella* is not completely transferable to humans. In addition to the gene mutations studied by the Ames test and the SOS-lux test, which have a common nature in all living organisms, there are genomic rearrangements that should be studied in eukaryotes. For this purpose, an Allium test is used on onion rootlets (*Allium cepa* L.). In this work, we present the first report on the negative effect of white phosphorus on the cell cycle of eukaryotes by the Allium test method. It turned out that white phosphorus, even at very low concentrations of 0.01 %, exponentially increases the number of chromosomal aberrations.

Keywords: white phosphorus, *Aspergillus niger*, biodegradation, bacteria, minimal inhibitory concentration, culture media culture mediums, growth factors, Allium test.

1. Введение

Защита окружающей среды стала злободневной проблемой (Петросян, Шувалова, 2017). В значительной степени кризис обусловлен накоплением токсичных отходов, устойчивость к которым у биосферы еще не выработалась. Чрезвычайно опасным в обращении отходом является белый фосфор P_4 . Его токсичность настолько велика, что позволяет относить белый фосфор к веществам первого класса опасности. Тем не менее, P_4 находит применение. Причина этого – сравнительно низкая цена, доступность и многообразие химических превращений. Таким образом, белый фосфор это узловая точка, связывающая природные месторождения фосфатов и все многообразие фосфорсодержащих продуктов химической промышленности. Следует особо указать на то, что все загрязнения белым и желтым фосфором на территории РФ находятся в бассейне реки Волга – важнейшей водной и транспортной артерии нашей страны, в регионе с самой высокой плотностью населения в России. Соответственно, связанные с загрязнениями экологические риски очень велики. Следует особо подчеркнуть, что среди 56 перечисленных в монографии (Алексеев и др., 2013) токсикантов меньше, чем у белого фосфора, значение ПДК (следовательно, более высокую угрозу для окружающей среды) имеют только бензпирен и тетраэтилсвинец, поэтому рост микроорганизмов в таких условиях представляет собой неординарное биологическое явление.

Большинство химических продуктов, которые принято считать искусственными, постоянно выделяется живыми организмами и циркулирует в биосфере (Миндубаев и др., 2013). Например, стало известно, что диатомовые водоросли *Nitzschia pellucida* выделяют высокотоксичные метаболиты – бромциан и 1,2-дихлорэтан (Vanelslander et al., 2012). В присутствии избытка йодида они синтезируют еще более токсичный лакриматор йодциан. До обнаружения этого факта никто не предполагал существование в природе этих веществ.

О том, насколько легко у микроорганизмов вырабатывается способность к биодegradации, свидетельствует такой пример. Штамм *Pseudomonas putida* СВВ5, получивший неофициальное определение «бактерия кофеман», получен путем селективного выращивания почвенной бактерии на чистом кофеине. В его геноме присутствует «кофеиновый оперон», в ряд стадий разлагающий кофеин до углекислого газа и аммиака. Кофеин является для штамма единственным источником углерода и азота. Эта высокоспециализированная бактерия находит практическое применение в качестве биологического сенсора кофеина, а также для декофеинизации напитков. Выведен этот

уникальный микроорганизм был в результате направленной селекции (несколько последовательных пересевов в среду, содержащую кофеин в качестве единственного источника азота и углерода). Исходная культура была получена из почвы клумбы студенческого городка, на которую регулярно выливали остатки кофе (Summers et al., 2013; Yu et al., 2009).

Выполненная нашим коллективом работа является первым задокументированным примером усвоения искусственного ксенобиотика белого фосфора биосферой (Миндубаев и др., 2018a, b). В данной статье представлено дальнейшее развитие исследований биодegradации белого фосфора.

2. Методология

Пересев культуры *A. niger* AM1 произведен по стандартной схеме, в трех повторах. Через 49 суток во всех повторах колонии были покрыты черной россыпью спор. Это доказывает, что и в среде с белым фосфором аспергилл может сохранять нормальную фертильность. Обращает на себя внимание тот факт, что в одном повторе колония стала развиваться быстрее, чем в других, хотя условия были идентичны. Возможно, это следствие мутации, обеспечившей лучшую приспособленность к экстремальным условиям существования.

Для сравнения устойчивости к белому фосфору нескольких культур черного аспергилла, применялся наш штамм *Aspergillus niger* AM1, а также три штамма из Всероссийской коллекции микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрыбина: FW-650, FW-2664 и FW-2731, выделенные из арктических вечномерзлых грунтов (Таглу (Канада), многолетнемерзлые отложения, возраст – 170 лет, глубина 20,50-20,55 м; Камчатка (Россия), пепел вулканический мерзлый, глубина 1,8-1,85 м; Камчатка (Россия), мерзлота, вулканический пепел, глубина 14,5 м соответственно). Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия) по интенсивности поглощения света λ 550 нм. Максимальная концентрация белого фосфора достигала 1 %. Для сравнения высевались культуры бактерий *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus firmus* и *Salmonella typhimurium*. Целью данных исследований являлось обнаружение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) белого фосфора для перечисленных микроорганизмов.

В представленной работе сравнивался рост аспергилла AM1 в культуральных средах, различающихся по составу, но в качестве источника фосфора содержащих белый фосфор. Из десяти сред были выбраны две, в которых аспергилл рос наиболее быстро. Эти среды решено считать оптимальными для роста. Сравнивая составы сред и скорость роста в них аспергилла, мы нашли важнейший компонент, который является благоприятным фактором для роста AM1 и биодegradации белого фосфора. Этим компонентом оказался нитрат натрия NaNO_3 . Использование планшетов и планшетного ридера позволило нам производить параллельные посевы разных штаммов и сравнивать скорость их роста в средах, различающихся по составу, и с различными концентрациями белого фосфора. Мы впервые провели параллельные посевы культур аспергиллов в культуральные среды нескольких составов, приведенных в Таблице 1.

МОПС (3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота), применяемая для создания буферных растворов в биохимии.

Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия) по интенсивности поглощения света λ 550 нм. После посева замеряется оптическая плотность в каждой лунке (всего в планшете их 96) при помощи специального спектрофотометра – планшетного ридера. Дно планшета оптическое.

Таблица 1. Состав культуральных сред, примененных в исследовании

Соль	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
NaCl	5	2,5	2,5		2,5	2,5	2,5	2,5		2,5
NaNO ₃			4	4					4	
MgSO ₄	0,2	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
FeSO ₄						0,01		0,01		
CaCl ₂	0,1			0,01						
FeCl ₃				0,01						
KCl		0,5		0,1		0,29	0,5	0,5	0,5	
(NH ₄) ₂ SO ₄			1		5	5				
МОПС	8,4									
KOH	1,1									
NH ₄ Cl	1,1	1,1								
KNO ₃										2

До сих пор максимальная концентрация белого фосфора в культуральных средах составляла 1 %. Поскольку минимальная ингибирующая концентрация данного вещества для аспергиллов не найдена, есть основания полагать, что аспергиллы могут расти в средах с концентрацией P₄ более 1 %. Это имеет важное практическое значение, поскольку расширяет возможности создаваемого метода. Мы делали попытки увеличивать концентрацию белого фосфора в среде до значений выше 1 %. Для этого мы добавляли в среды органические растворители – диметилсульфоксид (ДМСО) и дизельное топливо (жидкая смесь углеводородов C₁₀-C₄₀). Известно, что растворимость белого фосфора в органических растворителях на порядки превосходит таковую в воде. Растворимость в воде составляет 0,0003 % при 15 °С. Именно по этой причине белый фосфор в культуральной среде находится в состоянии эмульсии, а не раствора. Растворимость в ДМСО составляет при 20 °С примерно 0,025 %, т.е. выше, чем в воде приблизительно на два порядка (Dautert et al., 1975). Растворимость белого фосфора в соляровом масле при 20 °С еще выше и составляет 12 г/л, или 1,2 % (Rivera et al., 1996). Поэтому, возникла идея увеличивать концентрацию белого фосфора в средах путем добавления в них растворителей.

Наши предыдущие исследования впервые продемонстрировали наличие у белого фосфора генотоксических свойств (Миндубаев и др., 2017а). Это, без сомнения, делает белый фосфор еще более опасным в обращении веществом. Тем не менее, наши первые исследования проводились на прокариотах – бактериях *Salmonella typhimurium*. Поскольку генетический аппарат прокариот устроен иначе, чем у эукариот (включая человека), то результаты исследований на сальмонеллах нельзя полностью переносить на человека. Помимо генных мутаций, исследуемых тестом Эймса и SOS-lux тестом, и имеющих общую природу у всех живых организмов, существуют геномные перестройки, которые следует изучать на эукариотах. Для этой цели подходит Allium тест на корешках лука репчатого (*Allium cepa* L.).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Адаптация гриба аспергилла к белому фосфору

Большие перспективы открывает спонтанное появление в среде с белым фосфором культуры *A. niger* AM1 с измененной морфологией и окраской, растущей в среде с исследуемым ксенобиотиком более быстро, чем исходный штамм (Рисунок 1). Возможно, это результат мутации и дальнейший этап адаптации микроорганизма к среде, содержащей белый фосфор. Через 55 суток после посева лидирующая культура стала вырабатывать пигмент и приобретать более насыщенную желтую окраску (Миндубаев и др., 2017б). Колонии в остальных двух повторах растут медленнее и имеют гораздо более светлую окраску. Через 59 суток окраска лидирующей колонии была визуальным образом охарактеризована как темно-оранжевая. Окрасилась не только колония, но и культуральная среда, т.е. пигмент хорошо растворим в воде.

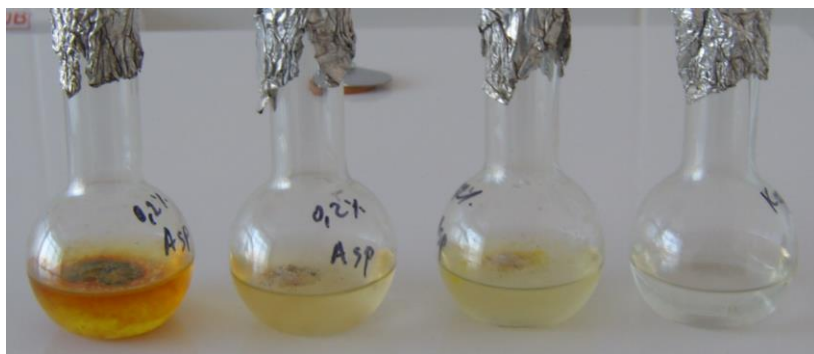


Рис. 1. Второй посев *A. niger* AM1. Крайняя справа колба – стерильная среда. Крайняя слева – культура аспергилла, отличающаяся от прочих усиленным ростом. Обращает на себя внимание необычно яркая окраска этой культуры. Две колбы в центре – остальные повторы посева, растущие медленнее. Снимок сделан через 60 суток после посева

Через 180 суток произвели пересев мутантного *A. niger* AM1. Через две недели колония созрела. Культура, судя по виду и окраске спор, безусловно, является черным аспергиллом, но морфология колонии необычная. Воздушный мицелий низкий, споры формируются почти на поверхности среды. В первые двое суток культура отличалась от предковой выделением в среду желтого пигмента, но после созревания спор приобретала аналогичную черную окраску и становилась неотличимой. Это является еще одним свидетельством того, что в культуре произошла мутация. Детальное изучение морфологии этого аспергилла продемонстрировало его сходство с предковым AM1. А судя по тому, что измененный гриб эффективнее набирал биомассу в среде с белым фосфором, эта мутация повышает его приспособленность к существованию в данной среде. Было принято решение назвать этот штамм *A. niger* AM2.

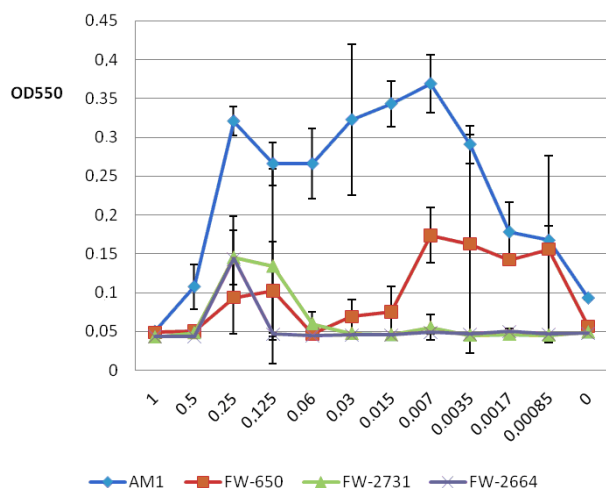


Рис. 2. Сравнение роста четырех штаммов *A. niger* в присутствии белого фосфора. На оси абсцисс указаны концентрации P₄ в %, на оси ординат оптическое поглощение при λ 550 нм. Заметно, что штамм AM1 намного более устойчив к белому фосфору по сравнению со штаммами из ВКМ

3.2. Минимальные ингибирующие концентрации белого фосфора

Выяснилось, что все четыре штамма *A. niger* выдерживают концентрацию белого фосфора 1 %. МИК для них так и не была найдена. По-видимому, высокая устойчивость к белому фосфору – признак, характеризующий все черные аспергиллы, или большинство из них. Тем не менее, в широком диапазоне концентраций штамм AM1, споры которого были изначально выделены из реактива белого фосфора, рос быстрее, т.е. оказался намного более устойчивым (Рисунок 2). Для бактерий МИК была найдена и составила для *A. xylosoxidans* 0,125 %, *B. firmus* 0,25 %, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. typhimurium* 0,5 %. Из этого следует

вывод, что черные аспергиллы более устойчивы к белому фосфору по сравнению с бактериями.

3.3. Оптимизация состава культуральных сред

Одними из наиболее оптимальных для роста являются среды №3 и №4. В обеих средах присутствует нитрат натрия. Наименее благоприятной является среда №5, которая отличается от среды №3 отсутствием NaNO_3 , заменой его сульфатом аммония (аммонийная форма азота). Из этого результата можно сделать вывод о том, что *A. niger* AM1 предпочитает нитратный азот аммонийному, и что нитрат является важным фактором, благоприятствующим росту данного микроорганизма и биодegradации белого фосфора.

Следует подчеркнуть, что добавление в культуральную среду сульфата меди практически не влияет на характер роста грибов (Рисунок 3). Этот факт является дополнительным аргументом в пользу того, что имеет место биодegradация белого фосфора, а не химическая нейтрализация ионами меди.

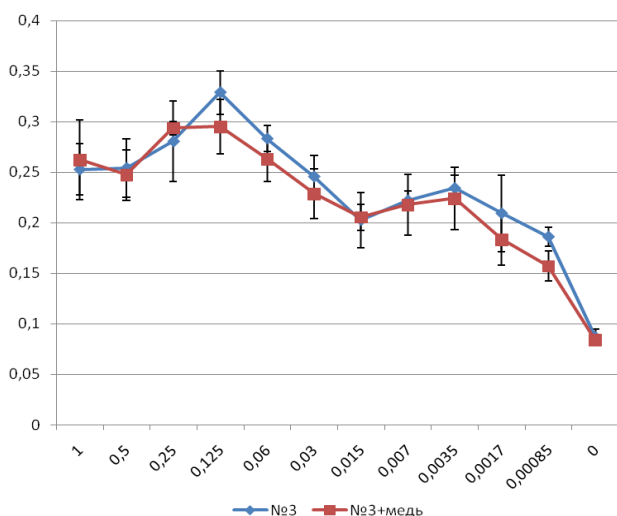


Рис. 3. Рост AM1 в среде №3 (пятые сутки после посева). Видно, что рост в варианте среды с медью и без меди практически одинаковый – графики накладываются друг на друга. Ось абсцисс – концентрация белого фосфора, %. Ось ординат – оптическое поглощение при λ 550 нм

В средах №7 и №8 рост практически отсутствовал, что подтвердило значение нитратов для роста аспергиллов.

На рисунке 4 представлен рост культур в среде №9 с белым фосфором в присутствии и в отсутствие фосфатов. Видно, что оптимальными концентрациями белого фосфора на среде без фосфатов является 0,125-0,5 %. При снижении концентрации белого фосфора плотность культуры снижается. Это связано с растущей нехваткой биогенного элемента фосфора. При концентрации белого фосфора 1 % рост культуры также подавляется, что связано уже с токсичностью белого фосфора. Интересно, что в среде с фосфатами белый фосфор подавляет рост и при 0,125-0,5 %. Данный результат может свидетельствовать о том, что фосфатное голодание, вероятно, индуцирует синтез ферментов, способствующих разложению белого фосфора. Подобная индукция широко распространена в природе и хорошо изучена на примере лактозного оперона бактерий (Marbach, Bettenbrock, 2012).

Наиболее подходящей средой оказалась среда №10, включающая в свой состав три основных соединения: NaCl , KNO_3 и MgSO_4 . Остальные микроэлементы поступают в среду, вероятно, с раствором глюкозы, которая используется в качестве источника углерода (Миндубаев и др., 2019а).

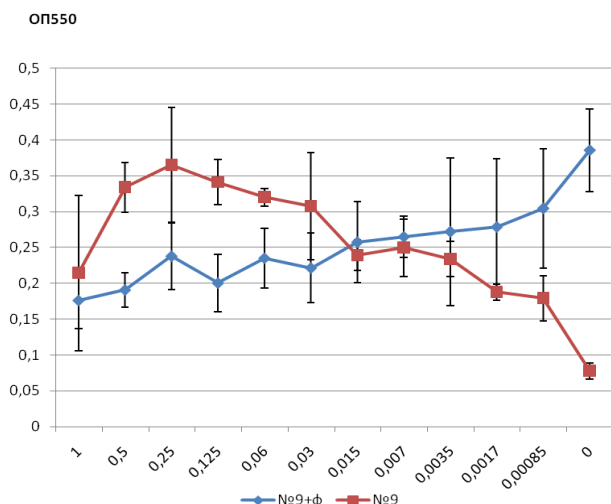


Рис. 4. Рост штамма *Aspergillus niger* AM1 при разных концентрациях белого фосфора в среде №9 с фосфатами и без, на 5 сутки. По оси X отложен % белого фосфора в среде

3.4. Поиск путей эффективного растворения белого фосфора в культуральных средах

Без источников фосфора и в присутствии ДМСО рост отсутствует. Это легко объясняется отсутствием биогенного фосфата в среде. При добавлении глюкозы, но без фосфора – рост наблюдается с уменьшением концентрации ДМСО. Возможно, глюкоза содержит примесь фосфата. Но ДМСО подавляет рост. Этот растворитель малотоксичен, но его смеси с водой обладают высокой осмотической активностью, т.е. в средах с ДМСО микроорганизмы испытывают дефицит влаги. В среде с фосфатом, но без глюкозы, наблюдается несколько больший рост на ДМСО. Возможно, в отсутствие глюкозы включается система использования ДМСО в качестве источника углерода (Kino et al., 2004). Тем не менее, на ДМСО аспергилл растет намного медленнее, чем на глюкозе, поэтому для биодegradации белого фосфора среда такого состава не подходит. Поскольку мы планируем использовать в опытах сочетание ДМСО с глюкозой без фосфата, то это дает возможную концентрацию ДМСО около 1%. Это слишком низкие значения для достижения высоких концентраций фосфора. Поэтому, растворение белого фосфора в ДМСО не приведет к росту эффективности биодegradации.

Другим потенциальным растворителем для белого фосфора является дизельное топливо. К сожалению, в наших исследованиях не наблюдался рост *A. niger* AM1 в среде с дизтопливом в качестве источника углерода, хотя в контроле (с глюкозой) гриб растет. Таким образом, вопрос об увеличении концентрации белого фосфора в средах выше 1% остается открытым.

3.5. Генотоксичность и фитотоксичность белого фосфора

В представленной работе мы впервые исследовали негативное влияние белого фосфора на клеточный цикл эукариот методом Allium теста. Оказалось, что белый фосфор даже в очень низких концентрациях, около 0,01%, оказывает фитотоксическое действие и на порядок увеличивает количество хромосомных aberrаций (Миндубаев и др., 2019b) (Рисунок 5).



Рис. 5. Наглядная демонстрация фитотоксичности белого фосфора: в его присутствии (левая луковица) корешки достоверно отстают в росте по сравнению с контролем (правая луковица). Концентрация P_4 в опыте 0,016 %. Снимок сделан через 2 суток после начала проращивания

4. Заключение

Исследование показало, что все изучаемые нами штаммы черного аспергилла (*A. niger*) обладают устойчивостью к белому фосфору. Минимальная ингибирующая концентрация для них не найдена. Поэтому, вполне закономерно, что именно споры черного аспергилла сохранили жизнеспособность в белом фосфоре, из которого впервые были выделены. Тем не менее, штамм *A. niger* AM1, выделенный из реактива белого фосфора, проявляет заметно большую устойчивость к данному веществу, по сравнению с штаммами из арктических вечномёрзлых грунтов. В отличие от грибов, представители четырех родов бактерий угнетаются белым фосфором, МИК составляет для них величины от 0,125 % до 0,5 %. Результат обладает новизной и интересен. Из него следует вывод о наличии у черных аспергиллов защитных механизмов, позволяющих им быть устойчивыми к токсичному загрязнителю окружающей среды белому фосфору. Эти механизмы отсутствуют у бактерий и наиболее выражены у штамма *A. niger* AM1. Есть предположение, что этот механизм устойчивости связан с морфологией грибов, в первую очередь со строением клеточной стенки. Дальнейшие исследования, связанные с оптической и электронной микроскопией, должны подтвердить или опровергнуть данное предположение.

Сравнение роста *A. niger* AM1 в культуральных средах 19 различных составов показало следующее. Сульфат меди практически не оказывает влияние на рост аспергилла в средах с белым фосфором. Соответственно, выдвигаемая гипотеза о чисто химическом обезвреживании белого фосфора, без привлечения биологического объекта – микроорганизма и его ферментных систем – не подтверждается.

Наилучший рост наблюдается в средах №3, №4 и №10. Эти среды объединяет присутствие в их составе нитрата натрия в качестве источника азота. Соответственно, можно делать вывод о том, что нитрат является важным ростовым фактором для *A. niger* AM1, и рекомендовать для его промышленного культивирования среды, содержащие нитраты. Замена нитратного азота аммонийным (сульфат аммония) даже в равной доле не приводит к усилению роста нашего штамма. В меньшей степени, но также важным фактором роста является железо, причем как в трехвалентном состоянии (в виде хлорида железа), так и в двухвалентном (сульфат железа).

К сожалению, попытки увеличить концентрацию белого фосфора в средах путем добавления биосовместимых органических растворителей (таких, как ДМСО), на которые мы возлагали большие надежды, до сих пор не привели к успеху. Тем не менее, прекращать

попытки еще рано. Другой возможный вариант увеличения концентрации белого фосфора в среде – приготовление 2% эмульсии фосфора не в физиологическом растворе, а непосредственно в среде.

Механизм генотоксического действия, вероятно, основан на высокой реакционной способности P_4 . Вполне возможно, что и обнаруженная в наших исследованиях генотоксичность белого фосфора обусловлена образованием реакционноспособных метаболитов, образующих аддукты с азотистыми основаниями ДНК.

5. Благодарности

Эта работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 15-29-02629 офи_м и Фонда содействия инновациям, проект № С1-34299.

Литература

[Алексеев и др., 2013](#) – Алексеев В.А., Бузмаков С.А., Панин М.С. Геохимия окружающей среды. Пермь: Издательство Пермского государственного национального исследовательского университета. 2013. 359 с.

[Миндубаев и др., 2013](#) – Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Биодegradация как метод переработки отходов. Часть 2. Взгляд на проблему. Являются ли ксенобиотики ксенобиотиками? // *Бутлеровские сообщения*. 2013. 34(4): 1-20.

[Миндубаев и др., 2017a](#) – Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Валидов Ш.З., Сапармырадов К.А., Хаяров Х.Р., Бадеева Е.К., Барсукова Т.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г. Обезвреживание белого фосфора посредством микробиологического разложения // *Бутлеровские сообщения*. 2017. 52(12): 87-118.

[Миндубаев и др., 2017b](#) – Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Хаяров Х.Р., Сахапов И.Ф., Бадеева Е.К., Стробыкина А.С., Валидов Ш.З., Бабаев В.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г. Динамика превращений белого фосфора культурой черного аспергилла // *Бутлеровские сообщения*. 2017. 51(8): 1-26.

[Миндубаев и др., 2018a](#) – Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г. Фосфиноксид как предполагаемый интермедиат биологических процессов // *Бутлеровские сообщения*. 2018. 53(3): 1-34.

[Миндубаев и др., 2018b](#) – Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Яхваров Д.Г. Микробиологическая деградация белого фосфора // *Экология и промышленность России*. 2018. 22(1): 33-37.

[Миндубаев и др., 2019a](#) – Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Влияние состава культуральных сред на биодegradацию белого фосфора грибами *Aspergillus niger* // *Бутлеровские сообщения*. 2019. 58(5): 1-23.

[Миндубаев и др., 2019b](#) – Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д. Генотоксичность и цитогенетическое действие белого фосфора // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. 9(1): 81-94.

[Петросян, Шувалова, 2017](#) – Петросян В.С., Шувалова Е.А. Химия и токсикология окружающей среды. М.: ООО "Буки Веди". 2017. 640 с.

[Dautert et al., 1975](#) – Dautert H., Schaffrath W., Scheler H. Die Löslichkeit von farblosem Phosphor in ausgewählten organischen Lösungsmitteln [1] // *Zeitschrift für Chemie*. 1975. 15(9): 368-369.

[Kino et al., 2004](#) – Kino K., Murakami-Nitta T., Oishi M., Ishiguro S., Kirimura K. Isolation of Dimethyl Sulfone-Degrading Microorganisms and Application to Odorless Degradation of Dimethyl Sulfoxide // *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. 2004. 97(1): 82-84.

[Marbach, Bettenbrock, 2012](#) – Marbach A., Bettenbrock K. Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA // *Journal of Biotechnology*. 2012. 157(1): 82-88.

[Rivera et al., 1996](#) – Rivera Y.B., Olin T., Bricks R.M. Summary and Evaluation for White Phosphorus. A Literature Remediation: Review / US Army Corps of Engineers Waterways Experiment Station. Technical Report IRRP-96-7. 1996. 61 p.

[Summers et al., 2013](#) – *Summers R.M., Seffernick J.L., Quandt E.M., Yu Ch.L., Barrick J.E., Subramanian M.V.* Caffeine Junkie: an Unprecedented Glutathione S-Transferase-Dependent Oxygenase Required for Caffeine Degradation by *Pseudomonas putida* CBB5 // *J. Bacteriol.* 2013. 195(17): 3933-3939.

[Vanelslander et al., 2012](#) – *Vanelslander B., Paul C., Grueneberg J., Prince E.K., Gillard J., Sabbe K., Pohnert G., Vyverman W.* Daily bursts of biogenic cyanogen bromide (BrCN) control biofilm formation around a marine benthic diatom // *PNAS.* 2012. 109(7): 2412-2417.

[Yu et al., 2009](#) – *Yu Ch.L., Louie T.M., Summers R., Kale Y., Gopishetty S., Subramanian M.* Two Distinct Pathways for Metabolism of Theophylline and Caffeine Are Coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5 // *J. Bacteriol.* 2009. 191(14): 4624-4632.

References

[Alekseenko et al., 2013](#) – *Alekseenko V.A., Buzmakov S.A., Panin M.S.* (2013). Geokhimiya okruzhayushchei sredy [Geochemistry of the environment]. Perm': Izdatel'stvo Permskogo gosudarstvennogo natsional'nogo issledovatel'skogo universiteta. 359 p. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2013](#) – *Mindubaev A.Z., Yakhvarov D.G.* (2013). Biodegradatsiya kak metod pererabotki otkhodov. Chast' 2. Vzglyad na problemu. Yavlyayutsya li ksenobiotiki ksenobiotikami? [Biodegradation as a method for waste processing: view on the problem. Part 2. Are xenobiotics really xenobiotics?]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 34(4): 1-20. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2017a](#) – *Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Babynin E.V., Validov Sh.Z., Saparmyradov K.A., Khayarov Kh.R., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A., Yakhvarov D.G.* (2017). Obezvrezhivanie belogo fosfora posredstvom mikrobiologicheskogo razlozheniya [Neutralization of white phosphorus by means of microbiological decomposition]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 52(12): 87-118. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2017b](#) – *Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Khayarov Kh.R., Sakhapov I.F., Badeeva E.K., Strobykina A.S., Validov Sh.Z., Babaev V.M., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A., Yakhvarov D.G.* Dinamika prevrashchenii belogo fosfora kul'turoi chernogo aspergilla [Dynamics of white phosphorus transformation by a culture of black aspergill]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 51(8): 1-26. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2018a](#) – *Mindubaev A.Z., Akosah Y.A., Yakhvarov D.G.* (2018). Fosfinoksid kak predpolagaemyi intermediat biologicheskikh protsessov [Phosphine oxide as a prospective intermediate of biological processes]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 53(3): 1-34. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2018b](#) – *Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Babynin E.V., Badeeva E.K., Khayarov Kh.R., Minzanova S.T., Yakhvarov D.G.* (2018). Mikrobiologicheskaya degradatsiya belogo fosfora [Microbiological degradation of white phosphorus]. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii.* 22(1): 33-37. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2019a](#) – *Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A.* (2019). Vliyanie sostava kul'tural'nykh sred na biodegradatsiyu belogo fosfora gribami *Aspergillus niger* [The influence of the culture media composition on the white phosphorus biodegradation by *Aspergillus niger*]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 58(5): 1-23. [in Russian]

[Mindubaev et al., 2019b](#) – *Mindubaev A. Z., Babynin E.V., Piskunov D.B., Makhyanov A.N., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Voloshina A.D.* (2019). Genotoksichnost' i tsitogeneticheskoe deistvie belogo fosfora [Genotoxicity and cytogenetic effect of white phosphorus]. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya.* 9(1): 81-94. [in Russian]

[Petrosyan, Shuvalova et al., 2017](#) – *Petrosyan V.S., Shuvalova E.A.* (2017). Khimiya i toksikologiya okruzhayushchei sredy [Chemistry and toxicology of the environment]. M.: Buki Vedi LLC. 640 p. [in Russian]

[Dautert et al., 1975](#) – *Dautert H., Schaffrath W., Scheler H.* (1975). Die Löslichkeit von farblosem Phosphor in ausgewählten organischen Lösungsmitteln [1] *Zeitschrift für Chemie.* 15(9): 368-369.

[Kino et al., 2004](#) – *Kino K., Murakami-Nitta T., Oishi M., Ishiguro S., Kirimura K.* (2004). Isolation of Dimethyl Sulfone-Degrading Microorganisms and Application to Odorless Degradation of Dimethyl Sulfoxide. *Journal Of Bioscience And Bioengineering.* 97(1): 82-84.

Marbach, Bettenbrock, 2012 – Marbach A., Bettenbrock K. (2012). Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*. 157(1): 82-88.

Rivera et al., 1996 – Rivera Y.B., Olin T., Bricks R.M. (1996). Summary and Evaluation for White Phosphorus. A Literature Remediation: Review. US Army Corps of Engineers Waterways Experiment Station. Technical Report IRRP-96-7. 61 p.

Summers et al., 2013 – Summers R.M., Seffernick J.L., Quandt E.M., Yu Ch.L., Barrick J.E., Subramanian M.V. (2013). Caffeine Junkie: an Unprecedented Glutathione S-Transferase-Dependent Oxygenase Required for Caffeine Degradation by *Pseudomonas putida* CBB5. *J. Bacteriol.* 195(17): 3933-3939.

Vanelslander et al., 2012 – Vanelslander B., Paul C., Grueneberg J., Prince E.K., Gillard J., Sabbe K., Pohnert G., Vyverman W. (2012). Daily bursts of biogenic cyanogen bromide (BrCN) control biofilm formation around a marine benthic diatom. *PNAS*. 109(7): 2412-2417.

Yu et al., 2009 – Yu Ch.L., Louie T.M., Summers R., Kale Y., Gopishetty S., Subramanian M. (2009). Two Distinct Pathways for Metabolism of Theophylline and Caffeine Are Coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. *J. Bacteriol.* 191(14): 4624-4632.

Влияние на биодegradацию белого фосфора состава культуральных сред и видовой принадлежности микроорганизмов

Антон Зуфарович Миндубаев^{a,*}, Эдуард Викторович Бабынин^b,
Елена Казимировна Бадеева^a, Салима Тахиятулловна Минзанова^a,
Любовь Геннадьевна Миронова^a

^a Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Российская Федерация

^b ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Российская Федерация

Аннотация. В представленном исследовании сравнивался рост аспергилла AM1 в культуральных средах, различающихся по составу, но в качестве источника фосфора содержащих белый фосфор. Из десяти сред были выбраны три, в которых аспергилл рос наиболее быстро. Эти среды решено считать оптимальными для роста. Сравнивая составы сред и скорость роста в них аспергилла, мы нашли ключевой компонент, который является благоприятным фактором для роста AM1 и биодegradации белого фосфора. Этим компонентом оказался нитрат натрия NaNO_3 . Также, показано, что сульфат меди CuSO_4 не оказывает никакого влияния на рост аспергиллов в средах с белым фосфором, независимо от состава этих сред. Данный результат хорошо согласуется с полученными нами ранее. Также, в представленной работе впервые описаны попытки увеличить концентрацию белого фосфора в культуральной среде до значений выше 1%. Для этого мы добавляли в культуральные среды растворители – диметилсульфоксид (ДМСО) и дизельное топливо, в которых белый фосфор сравнительно хорошо растворим. Оказалось, что присутствие этих веществ неблагоприятно сказывается на росте аспергиллов. Поэтому, вопрос о дальнейшем увеличении концентрации P_4 остается открытым.

Белый фосфор даже при комнатной температуре реагирует с ионами двухвалентной меди, а среда Придхем-Готлиба, которую мы выбрали для наших целей, содержит в своем составе сульфат меди. При добавлении в эту среду эмульсии белого фосфора выпадал осадок черного цвета, т.е. реакция действительно происходила. Таким образом, рост микроорганизмов происходил в присутствии не столько белого фосфора, сколько продуктов его химических превращений, и эксперименты оказывались не вполне чистыми. Поэтому, в представленной работе мы осуществили дальнейшую модификацию питательной среды Придхем-Готлиба, исключив из нее не только фосфаты в качестве источника фосфора, но и сульфат меди. Помимо этого, мы сравнили устойчивость к белому фосфору нашего штамма

* Корреспондирующий автор

Адреса электронной почты: mindubaev-az@yandex.ru (А.З. Миндубаев)

черного аспергилла AM1 и трех штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (FW-650, FW-2664 и FW-2731), а также четырех видов бактерий. Три штамма *A. niger*, присланные из ВКМ, так же продемонстрировали более высокую устойчивость к белому фосфору, чем бактерии. Но у штамма AM1 она все равно выше. Показано, что исключение из состава питательной среды с белым фосфором сульфата меди не препятствует росту грибов, хотя белый фосфор в этих условиях не вступает в реакцию с образованием осадка и сохраняется более длительное время. Этот факт является серьезным аргументом в пользу биодegradации и практической применимости метода детоксикации белого фосфора микроорганизмами. Тем не менее, более высокая устойчивость AM1 по сравнению со штаммами из ВКМ проявляется в среде с медью. По-видимому, он наиболее устойчив именно к токсичным продуктам реакции белого фосфора с Cu^{2+} .

Наши предыдущие исследования впервые продемонстрировали наличие у белого фосфора генотоксических свойств. Это, без сомнения, делает белый фосфор еще более опасным в обращении веществом. Тем не менее, наши первые исследования проводились на прокариотах – бактериях *Salmonella typhimurium*. Поскольку генетический аппарат прокариот устроен иначе, чем у эукариот, то результаты исследований на сальмонеллах нельзя полностью переносить на человека. Помимо генных мутаций, исследуемых тестом Эймса и SOS-lux тестом, и имеющих общую природу у всех живых организмов, существуют геномные перестройки, которые следует изучать на эукариотах. Для этой цели подходит Allium тест на корешках лука репчатого (*Allium cepa* L.). В представленной работе мы впервые исследовали негативное влияние белого фосфора на клеточный цикл эукариот методом Allium теста. Оказалось, что белый фосфор даже в очень низких концентрациях, порядка 0.01 %, на порядок увеличивает количество хромосомных aberrаций.

Ключевые слова: белый фосфор, *Aspergillus niger*, биодegradация, бактерии, минимальная ингибирующая концентрация, культуральные среды, факторы роста, Allium тест.