

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К БЕЛОМУ ФОСФОРУ

А. З. Миндубаев^{1*}, А. Д. Волошина¹, Н. В. Кулик¹, Ш. З. Валидов²,
К. А. Сапармырадов², С. Т. Минзанова¹, Л. Г. Миронова¹, Д. Г. Яхваров¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского Научного Центра РАН, г. Казань,
*e-mail: mindubaev@iopc.ru

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Поступила в редакцию 26.12.2017 г.

С целью детоксикации опасного техногенного загрязняющего вещества – белого фосфора – изучено влияние направленной селекции различных микроорганизмов (*Aspergillus niger* AM1, *Streptomyces* sp. A8, *Trichoderma asperellum* F-1087) на их устойчивость к белому фосфору в синтетических культуральных средах, содержащих Р₄ в качестве единственного источника фосфора при его концентрации до 1%. Показан рост устойчивости изученных организмов в результате направленной селекции. Наилучшую приспособляемость к белому фосфору продемонстрировал стрептомицет штамма *Streptomyces* sp. A8, для которого проведены биохимический анализ и метаболическое профилирование. Разработана методика стерилизации Р₄ ацетоном в мягких условиях. Предложены практические рекомендации по обезвреживанию почвы, загрязненной белым фосфором, на примере ее обработки порошкообразным препаратом гриба *T. asperellum* F-1087.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, культуральные среды, *Aspergillus niger* AM1, *Streptomyces* sp. A8, *Trichoderma asperellum* F-1087.

ВВЕДЕНИЕ

Экологический кризис является одной из самых серьезных проблем современности. Неудивительно, что защита окружающей среды стала злободневной проблемой [1, 2]. В немалой степени кризис обусловлен накоплением токсичных отходов, устойчивость к которым у биосферы еще не выработалась, как не выработалась способность возвращать в природный круговорот ксенобиотики – чужеродные для живых организмов химические вещества, созданные человеком в последние годы.

Большинство химических продуктов, пусть и в очень малых количествах, постоянно выделяется живыми организмами и циркулирует в биосфере [3]. Недавно стало известно, что диатомовые водоросли *Nitzschia pellucida* выделяют крайне токсичный метаболит – бромциан [4]. А в присутствии избытка йодида они синтезируют еще более токсичный лакриматор йодциан.

Методами генной инженерии получены микроорганизмы, продуцирующие дивинил (1,3-бутадиен) – крупнотоннажное сырье в производстве каучуков и вещество, не найденное в живой природе [5]. Таким образом, существуют микроорганизмы-деструкторы, которые с подобными веществами постоянно сталкиваются и способны их разлагать. В работе коллектива из Индии сообщается, что плесневый гриб *Aspergillus tubingensis* TFR-5 накапливает в межклеточном пространстве наночастицы элементарного фосфора, восстанавливая фосфат [6]. Частицы покрыты белковой оболочкой, из чего авторы делают вывод о ферментативном биосинтезе этих частиц. Их работа – первое подтверждение того, что элементарный фосфор является природным веществом биологического происхождения. Результат исследований делает еще более убедительными аргументы в пользу биodeградации: если грибы способны синтезировать фосфор, значит, они должны и потреблять его со сравнительной легкостью.

Одним из опасных техногенных загрязняющих веществ является белый фосфор – востребованный и крупнотоннажный химический продукт. По материалам обзорной статьи [7], доля России в мировом потреблении белого фосфора в 2004 году составляла 5,7% (Китая 71,1%, США 8,6%, Казахстана 8,1%, Западной Европы 5,8%, Индии 0,7%). В этой связи, опасность обращения и контакта с белым фосфором придает актуальность работам по его обезвреживанию.

Данная публикация является продолжением цикла работ нашего коллектива, направленных на биodeградацию белого фосфора с помощью микроорганизмов [8-11]. В наших исследованиях также развивается концепция включения белого фосфора в природный круговорот этого элемента. Следует особо подчеркнуть, что белый фосфор является одним из наиболее опасных химических веществ. Так, среди 56 токсикантов, перечисленных в монографии [12], значение ПДК, меньше, чем у белого фосфора, имеют только бензпирен и тетраэтилсвинец (что свидетельствует о более высокой угрозе для окружающей среды), поэтому рост микроорганизмов в таких условиях представляет собой удивительное биологическое явление. Отметим, что биodeградация тетраэтилсвинца и бензпирена уже описана [13, 14].

Целью работы стало морфологическое, биохимическое и генетическое описание штаммов, обезвреживающих белый фосфор. Для этого была проведена их селекция на рост устойчивости к данному веществу и изучен их рост в среде с двумя источниками фосфора (белый фосфор и фосфат).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуя рост микроорганизмов в средах, содержащих белый фосфор, но лишенных фосфата, мы непременно сталкивались с вопросом изменения рН данных сред в процессе развития микроорганизмов и детоксикации Р₄. Окисление белого фосфора неизбежно приводит к образованию кислот и росту кислотности, особенно заметному в отсутствие фосфатного буфера. Соли фосфорной кислоты в культуральных средах выполняют не только роль источника фосфора, но и роль буфера, гасящего колебания рН. Именно поэтому

фосфорная подкормка во все применяемые в настоящее время культуральные среды вносится в виде точно рассчитанного соотношения гидрофосфата и дигидрофосфата. Поэтому посев в среду, содержащую сразу два источника фосфора – классическая смесь гидрофосфата и дигидрофосфата, и белый фосфор, вызывает большой интерес.

Посев *A. niger* AM1, *Trichoderma asperellum* F-1087 и *Streptomyces* sp. A8 производили в среду Придхем Готлиба [8-11]. В качестве источника фосфора в среде был использован белый фосфор в концентрации 0,01 и 0,05% по массе. Через 60 дней биомассу микромицетов и актиномицетов пересевали на концентрации белого фосфора 0,05, 0,1 и 0,2%. После следующих 60 дней штаммы пересевали на более высокие концентрации P_4 0,5, и 1%.

Посев *A. niger* AM1 в четыре варианта сред был произведен аналогично вышеописанным методам [9, 10]. Однако эксперимент был усложнен по сравнению с предыдущими. Культура *A. niger* AM1 выращивалась в чашках Петри с подложкой из фильтровальной бумаги над агаризованной средой, как описано в работе [10]. При этом посев производился не в трех, а в четырех вариантах: модифицированная среда Придхем-Готлиба без источников фосфора, с фосфатом в концентрации 0,0475 М или 0,15% в пересчете на чистый фосфор, с 0,2% белого фосфора и, четвертый вариант – с 0,2% P_4 и с фосфатом (в той же концентрации, что во втором варианте). Все четыре варианта посева произведены в трех повторах.

Штамм *Streptomyces* sp. A8 выделен 10.09.2012 г. на среде Гаузе 1 с минеральным азотом из осадка сточных вод Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани после добавления в него эмульсии белого фосфора [8]. Идентификация *S.* sp. A8 проведена с использованием анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и культурально-морфологических характеристик. Определение уровня сходства с типовыми штаммами ближайших видов проводилось с использованием ресурсов и алгоритмов сайта EzBioCloud [15]. Определение культурально-морфологических характеристик штамма проведены с использованием сред Гаузе [16].

В ЗАО Евrogen (РФ, Москва) была определена нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК исследуемого стрептомицета, позволяющая определить его уникальность и степень родства с другими известными штаммами.

Проведен биохимический анализ штамма *Streptomyces* sp. A8 с помощью системы Biolog, позволяющей на основе скрининг-теста получать метаболический профиль по 94 пищевым субстратам. Метаболическое профилирование *S.* sp. A8 проводили с помощью системы GEN III OmniLog® II Combo Plus (Biolog, Inc., Хейворд, США) в микропланшетах GEN III. Планшеты были инокулированы штаммами *S.* sp. A8 в двух повторах согласно протоколу производителя и инкубировались при 28°C [17]. Определяли оптическую плотность при 590 нм по снижению содержания тетразолия фиолетового, который реагирует на окисление субстратов, через каждые 24 часа.

Для определения эффективности стерилизации белого фосфора ацетоном *A. niger* AM1 посеяли в модифицированную среду Придхем-Готлиба, состав которой представлен в статье [9]. Среда была приготовлена в двух вариантах, различающихся источником фосфора. Опытный вариант содержал белый фосфор в концентрации 0,2%, контрольный – смесь гидрофосфата и дигидрофосфата калия в концентрации, указанной в [9]. Культура *A. niger* AM1, взятая для посева, до него росла в среде идентичного состава, с 0,2% P₄. Посев проводился в трех идентичных повторах с целью подтверждения статистической достоверности результата. В данном посеве мы впервые применили стерилизацию ацетоном. В колбу Шленка с навеской белого фосфора (0,95 г) влили 20 мл ацетона и выдержали 15 мин при перемешивании (ручное взбалтывание) без нагрева. Слив ацетон и не дожидаясь его испарения, влили в колбу Шленка 50 мл дистиллированной воды, стерилизованной автоклавированием. Затем приготовили 2% эмульсию белого фосфора в этой воде (ультразвуковая ванна Сапфир (Россия), 30 мин, 50°C, аргон). Эмульсию смешивали со средой без источников фосфора в соотношении 2:18 мл, в результате получалось по 20 мл среды с содержанием P₄ 0,2%. Посев произвели на следующий день. Приблизительно через 12 суток культура *A. niger* AM1 достигла стадии зрелости, когда уже стало возможным исследование экспрессии генов. Культура хранилась в замороженном виде.

Генетический анализ проводился следующим образом. Образцы ДНК из культуры гриба *A. niger* AM1 выделялись методом, описанным в [18]. Далее проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) полученных фрагментов ДНК. Фрагмент ITS1 и ITS2 амплифицировали с помощью праймеров LR1 5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3' и ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'. Нуклеотидную последовательность полученного фрагмента определяли по методу Сэнгера [19]. Полученную последовательность сравнивали с аналогичными последовательностями в базе данных GenBank [20] с помощью программы BLAST [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях мы наблюдали адаптацию микроорганизмов к возрастающим концентрациям белого фосфора в различных средах, вплоть до его содержания 1% по массе (что соответствует превышению ПДК в сточных водах в 5000 раз [8, 9]). Это открывает перспективы для практического применения метода биодеградациии для ликвидации загрязнений белым фосфором.

Сравнение адаптации и устойчивости различных организмов к P₄

Были продолжены исследования по выращиванию микроорганизмов в средах с белым фосфором в качестве единственного источника фосфора с целью выяснения изменения устойчивости микроорганизмов в результате направленной селекции - последовательного ряда пересевов микроорганизмов в культуральную среду, содержащую возрастающие концентрации белого фосфора в качестве единственного источника биогенного элемента фосфора.

Направленную селекцию вели в средах, содержащих от 0,2 до 1% Р₄, для трех типов микроорганизмов: стрептомицета *Streptomyces* sp. А8, плесневого гриба *A. niger* и гриба, задепонированного во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) как штамм *T. asperellum* F-1087 (в коллекции Венского технического университета он значится как *Trichoderma harzianum* 2243). Результаты экспериментов подробно описаны в наших предыдущих работах [22, 23].

Обобщение полученных результатов представлено на рис. 1. Из рисунка видно, что наилучшую приспособляемость к белому фосфору проявили стрептомицеты. Через пять последовательных посевов их устойчивость возросла пятикратно. Грибы росли и адаптировались медленнее (у плесневого гриба после восьми посевов устойчивость выросла вдвое), однако их изначальная устойчивость была выше, чем у актиномицетов, особенно у триходермы.

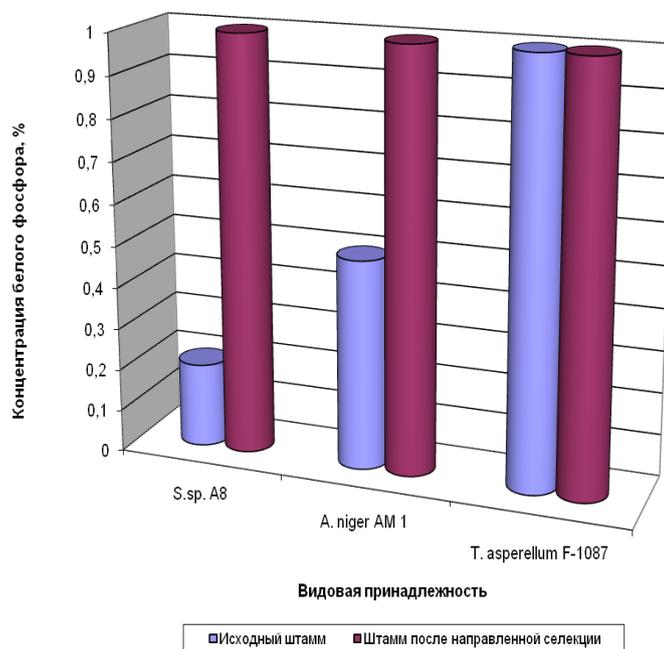


Рис. 1. Адаптация и рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору до и после направленной селекции.

Изучение морфологии и метаболического профилирования стрептомицета

Для штамма *S.sp. A8* (рис. 2) характерны следующие признаки: Цепочки спор прямые, споры с гладкой поверхностью. На минеральном агаре (Гаузе 1) воздушный мицелий (ВМ) светло-серого цвета, субстратный мицелий (СМ) буроватый, серовато-коричневый, не содержит растворимый пигмент (РП). На овсяном агаре ВМ имеет серый цвет, СМ – бесцветный, РП отсутствует. На глицерин-нитратном агаре ВМ - светло-серый, СМ – желто-серый, РП – отсутствует. На органическом агаре ВМ- белый или светло-серый, СМ – желтоватый до буроватого, РП – нет. Меланоидные пигменты не образует. Физиолого-биохимические признаки следующие. Штамм *Streptomyces* sp. А.8 утилизирует глюкозу, также обладает гидролитической активностью в отношении крахмала. Восстанавливает нитраты до нитритов.



Рис. 2. Внешний вид колоний актиномицета *Streptomyces* sp. A8.

Культивировать следует в течение 3-4х дней при температуре 28°C. Рекомендуемые метод/условия сохранения: Для длительного хранения культуру замораживают (-80°C) в 30% глицерине, а также хранят в ампулах в лиофилизированном состоянии (защитная среда – обезжиренное молоко).

При секвенировании амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК получена нуклеотидная последовательность размером 1209 нуклеотидов [9]. Результаты анализа фрагмента гена 16S рРНК показали, что штамм A8 относится к роду *Streptomyces*, поскольку процент сходства с типовыми штаммами ближайших видов *Streptomyces* составляет, согласно данным с сайта EzBioCloud [15], от 98,4 до 99,67%, при этом он наиболее близок (99,67%) к типовому штамму *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455T.

Метаболическое профилирование *Streptomyces* sp. A8 продемонстрировало пищевые предпочтения стрептомицета. Например, на метилглюкозиде культура растет отлично, а при росте на слизи (галактаровой) кислоте к концу недели ее плотность остается прежней (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение роста *Streptomyces* sp. A8 на 94 пищевых субстратах, на планшете GEN III MicroPlate™ (Рост оценивается по изменению оптической плотности при $\lambda = 590$ нм, прямо пропорциональной плотности культуры)

Субстраты/Сутки	1	2	3	4	6	7
Отрицательный контроль	0,171	0,16	0,182	0,186	0,204	0,184
Декстрин	0,452	1,034	1,107	1,057	1,049	1,049
D-Мальтоза	0,173	0,227	0,29	0,344	0,529	0,594
D-Трегалоза	0,193	0,369	0,607	0,833	1,333	1,406
D-Целлобиоза	0,397	1,13	1,266	1,324	1,344	1,246
Генциобиоза	0,22	0,485	0,779	1,013	1,183	1,27
Сахароза	0,166	0,145	0,154	0,157	0,17	0,179
D-Тураноза	0,212	0,195	0,211	0,218	0,265	0,318
Стахиоза	0,168	0,156	0,166	0,168	0,176	0,173
Положительный контроль	1,009	1,615	1,562	1,467	1,616	1,758
pH 6	0,934	1,745	1,633	1,606	1,619	1,682
pH 5	0,441	1,314	1,544	1,446	1,542	1,535
D-Рафиноза	0,181	0,16	0,166	0,171	0,211	0,18
α -D-Лактоза	0,173	0,162	0,174	0,179	0,189	0,194
D-Мелибиоза	0,161	0,148	0,158	0,161	0,171	0,174

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

β-Метил-D -глюкозид	0,197	0,291	0,454	0,6	0,86	0,933
D-Салицин	0,197	0,266	0,373	0,459	0,667	0,748
N-Ацетил-D -глюкозамин	0,196	0,279	0,381	0,442	0,578	0,622
N- Ацетил -β-D-маннозамин	0,18	0,18	0,194	0,203	0,243	0,237
N- Ацетил -D-галактозамин	0,185	0,179	0,188	0,196	0,217	0,226
N-Ацетилнейраминовая кислота	0,348	0,819	1,122	1,14	1,062	1,021
1% NaCl	1,456	1,832	1,819	1,488	1,386	1,551
4% NaCl	0,947	1,771	1,679	1,597	1,5	1,452
8% NaCl	1,526	2,044	1,793	1,719	1,792	1,893
α-D-Глюкоза	0,252	0,515	0,839	1,097	1,12	1,129
D-Манноза	0,238	0,424	0,644	0,873	1,234	1,268
D-Фруктоза	0,318	0,724	1,074	1,162	1,211	1,238
D-Галактоза	0,302	0,581	0,923	1,142	1,299	1,375
3-Метилглюкоза	0,171	0,159	0,166	0,17	0,181	0,182
D-Фукоза	0,188	0,174	0,18	0,185	0,198	0,202
L-Фукоза	0,224	0,211	0,222	0,229	0,247	0,25
L-Рамноза	0,176	0,162	0,174	0,179	0,193	0,198
Инозин	0,295	0,474	0,649	0,774	0,988	1,059
1% Лактат натрия	0,89	1,695	1,732	1,565	1,48	1,486
Фузидовая кислота	0,161	0,167	0,19	0,2	0,254	0,26
D-Серин	0,124	0,14	0,168	0,23	0,395	0,458
D-Сорбит	0,206	0,188	0,192	0,195	0,199	0,203
D-Маннит	0,288	0,652	0,962	1,108	1,218	1,159
D-Арабит	0,332	0,621	1,006	1,219	1,257	1,298
Мио-инозит	0,179	0,164	0,17	0,175	0,188	0,192
Глицерин	0,256	0,444	0,618	0,809	1,239	1,315
D-Глюкозо-6-фосфат	0,209	0,234	0,299	0,361	0,508	0,517
D-Фруктозо-6-фосфат	0,307	0,333	0,376	0,412	0,523	0,552
D-Аспарагиновая кислота	0,137	0,143	0,149	0,147	0,155	0,156
D-Серин	0,101	0,132	0,148	0,16	0,183	0,169
Тролеандомицин	0,139	0,159	0,178	0,19	0,214	0,225
Рифамицин SV	0,15	1,286	1,652	1,646	1,722	1,699
Миноциклин	0,167	0,177	0,196	0,216	0,244	0,253
Желатин	0,506	0,638	0,723	0,776	0,84	0,829
Глицил-L-пролин	0,426	0,637	0,836	0,983	1,144	1,198
L-Аланин	0,246	0,342	0,447	0,539	0,727	0,807
L-Аргинин	0,186	0,178	0,191	0,202	0,222	0,225
L-Аспарагиновая кислота	0,271	0,464	0,761	0,81	0,796	0,801
L-Глутаминовая кислота	0,313	0,537	0,779	0,94	0,997	0,986
L-Гистидин	0,27	0,407	0,517	0,586	0,722	0,8
L-Пироглутаминовая кислота	0,196	0,181	0,193	0,194	0,202	0,21
L-Серин	0,215	0,288	0,369	0,438	0,636	0,688
Линкомицин	0,163	0,219	0,391	0,665	0,961	1,156
Гуанидина гидрохлорид	0,708	1,069	1,2	1,377	1,44	1,427
Ниапруф 4	0,15	0,169	0,17	0,179	0,187	0,193
Пектин	0,243	0,242	0,255	0,262	0,268	0,277

D-Галактуроновая кислота	0,226	0,212	0,221	0,228	0,236	0,242
L- Лактон галактуроновой кислоты	0,175	0,155	0,156	0,158	0,16	0,161
D-Глюконовая кислота	0,403	0,921	1,177	1,23	1,066	1,073
D-Глюкуроновая кислота	0,206	0,203	0,214	0,228	0,236	0,247
Глюкуроновая кислота	0,257	0,271	0,31	0,333	0,373	0,386
Слизевая кислота	0,199	0,177	0,18	0,184	0,199	0,2
Хинная кислота	0,165	0,156	0,167	0,169	0,185	0,187
D-Глюкоаровая кислота	0,184	0,167	0,18	0,183	0,202	0,201
Ванкомицин	0,146	0,162	0,181	0,196	0,227	0,245
Тетразолий фиолетовый	0,39	0,42	0,405	0,392	0,471	0,425
Тетразолий синий	0,298	0,324	0,33	0,336	0,283	0,265
П-Гидроксифенилуксусная кислота	0,184	0,154	0,154	0,156	0,161	0,162
Метилпируват	0,352	0,608	0,624	0,61	0,619	0,622
Метил-D-лактат	0,211	0,194	0,199	0,207	0,219	0,221
L-Молочная кислота	0,342	1,062	1,165	1,211	1,188	1,128
Лимонная кислота	0,241	0,532	0,88	0,976	0,999	0,997
α -Кетоглутаровая кислота	0,2	0,218	0,245	0,251	0,271	0,28
D-Яблочная кислота	0,24	0,255	0,281	0,285	0,304	0,306
L-Яблочная кислота	0,498	1,025	1,024	0,967	0,977	0,972
Бромантарная кислота	0,433	0,436	0,497	0,515	0,564	0,55
Налидиксовая кислота	0,975	1,712	1,66	1,534	1,52	1,591
Хлорид лития	0,927	1,798	2,087	2,118	1,918	1,792
Теллурид калия	0,172	0,188	0,219	0,241	0,267	0,266
Твин 40	0,395	0,566	0,617	0,643	0,69	0,694
γ -Аминомасляная кислота	0,25	0,266	0,297	0,314	0,328	0,334
α -Гидроксимасляная кислота	0,347	0,919	1,141	1,213	1,35	1,399
β -Гидрокси-D,L-масляная кислота	0,263	0,41	0,511	0,592	0,684	0,713
α -Кетомасляная кислота	0,396	0,627	0,791	0,936	1,143	1,216
Ацетоуксусная кислота	0,27	0,265	0,277	0,282	0,289	0,292
Пропионовая кислота	0,29	0,442	0,474	0,523	0,631	0,703
Уксусная кислота	0,25	0,432	0,657	0,835	1,099	1,078
Муравьиная кислота	0,209	0,222	0,245	0,264	0,306	0,335
Азтреонам	0,865	1,12	1,107	1,141	1,501	1,558
Бутират натрия	0,74	1,608	1,705	1,496	1,397	1,397
Бромат натрия	1,142	1,874	1,721	1,564	1,326	1,309

Примечание: таблица взята из работы [22] и дополнена цветными обозначениями. Цвета ячеек таблицы коррелируют с величиной значений – чем больше величина, тем ближе к зеленой полосе спектра.

Изучение селекции и генетическая идентификация A. niger

Результаты, наблюдаемые на 12 сутки после посева *A. niger* AM1 в четыре различных варианта среды, показаны на рис. 3 [23]. В средах без источников фосфора рост практически не наблюдался (одна-две крошечные колонии без спороношения на чашку) (рис. 3, вариант 1). В средах с фосфатом гриб хорошо рос и образовывал споры, однако культура была не чистая. В ней, помимо

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

черных колоний *A. niger*, присутствовали колонии других микроорганизмов кремового и зеленого цветов (вариант 2). В средах с 0,2% белого фосфора колонии гриба имели бледно-серый цвет (пониженная фертильность) (вариант 3). Интересный результат показал четвертый вариант посева – с белым фосфором и фосфатом (вариант 4). Колонии росли очень хорошо, и были более развитые, чем в среде с фосфатом, причем в двух случаях из трех выросла чистая культура (в одном появилась кремовая колония неизвестного вида). По-видимому, медленный рост гриба в среде с белым фосфором можно объяснить не токсичностью последнего для данного штамма, а исключительно его труднодоступностью как источника фосфора. Возможно, играют роль и буферные свойства фосфата. Соли фосфорной кислоты в культуральных средах выполняют не только роль источника фосфора, но и роль буфера, гасящего колебания pH. Водные растворы дигидрофосфатов имеют кислую реакцию ($pK_{a1} = 2,1$), гидрофосфатов – близкую к нейтральной ($pK_{a2} = 7,2$), незамещенных фосфатов – сильнощелочную ($pK_{a3} = 12,7$) [24]. Именно поэтому фосфорная подкормка во все применяемые в настоящее время культуральные среды вносится в виде точно рассчитанного соотношения гидрофосфата и дигидрофосфата.

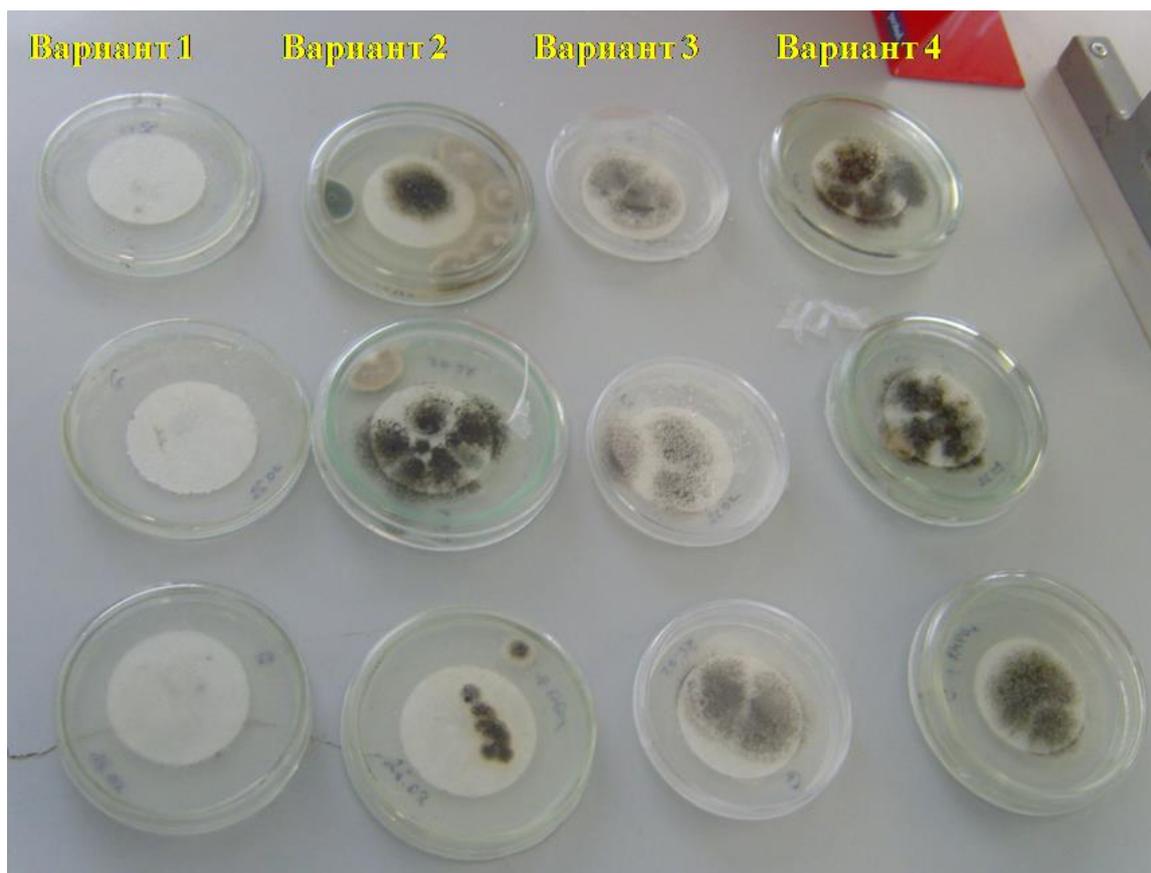


Рис. 3. Результаты первого пересева колоний *A. niger* AM1, устойчивых к белому фосфору, в четыре варианта среды. Варианты: 1 – среда без источников фосфора; 2 – с фосфатом; 3 – с белым фосфором (0,2%); 4 – с 0,2% P_4 и фосфатом. Пояснения в тексте. Снимок сделан через 11 суток после посева.

Полученные данные свидетельствуют, что P_4 нетоксичен для данного гриба. А конкуренция с другими видами сильнее тормозит рост (как видно на рис. 3), чем присутствие белого фосфора. Следует отметить, что на 14 сутки после посева стал наблюдаться рост *A. niger* и в среде без источников фосфора, за счет очень незначительного количества фосфата, присутствовавшего в фильтровальной бумаге и агаре.

Для дальнейшей, более углубленной работы с выделенным устойчивым к белому фосфору штаммом гриба, была выполнена его идентификация с привлечением методов генетического анализа. в международной базе нуклеотидных последовательностей GenBank [20]. Для генетической идентификации гриба, устойчиво метаболизирующего белый фосфор и по морфологическим признакам отнесенного к виду *A. niger*, была определена нуклеотидная последовательность его регионов ITS1 и ITS2 (Internal Transcribed Spacer), между 18S и 25S рибосомальными генами, включающий 5.8S ген): транскрибируемые спейсеры между генами 18S – 5,8S, и 5,8S – 28S генами рРНК, соответственно. Сравнение полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank с помощью системы BLAST [21, 22], выявила 99% гомологию с ITS1 и ITS2 регионами описанных штаммов *Aspergillus niger* NJA-1(Асс. KJ365316.1) и KAML02 (KC119204.1), что позволяет идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм *Aspergillus niger*. Штамму был присвоен номер *A. niger* AM1. Нуклеотидная последовательность штамма опубликована в базе данных GenBank, где ей присвоен номер KT805426 [25].

Разработка методики стерилизации белого фосфора

Одной из серьезнейших проблем, с которой мы до сих пор сталкивались, производя посевы микроорганизмов в среды с белым фосфором, было отсутствие эффективного метода стерилизации. Как выяснилось [3, 10], даже такой токсичный и агрессивный реактив, как белый фосфор, содержит жизнеспособные споры микроорганизмов (в первую очередь, плесневых грибов), подавляющих рост и вытесняющих высеянные культуры, т.е. его стерилизация необходима.

Стерилизация автоклавированием при 120°C белого фосфора и содержащих его сред слишком опасна по причине агрессивности данного вещества. Стерилизация ультрафиолетом не годится из-за превращения белого фосфора в красный фосфор под действием высокоэнергетических квантов света. Мы предположили, что для стерилизации P_4 в мягких условиях, без применения высоких температур, можно применять органические растворители. Белый фосфор растворим в ряде органических растворителей (этанол, ацетон, хлороформ и др.). С другой стороны, известно, что ацетон является бактерицидным средством и может быть использован для дезинфекции [26]. Поэтому для разработки методики стерилизации P_4 нами был выбран ацетон, учитывая также сравнительно низкую растворимость в нем белого фосфора: при 25°C в литре ацетона растворяется всего 1,4 г P_4 [27], тогда как в 1 литре значительно менее полярного хлороформа при той же

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

температуре растворяется 25 г данного вещества [28]. К тому же, ацетон не нужно смешивать с водой до нужной концентрации, как этанол. Встряхивая навеску белого фосфора в ацетоне при комнатной температуре, визуально мы не наблюдали ее растворения (подробное описание методики дано в экспериментальной части). Поскольку в низких концентрациях ацетон легко усваивается микроорганизмами в качестве источника углерода [29], переходя далее к процедуре эмульгирования белого фосфора ультразвуком, мы не стремились удалять остатки ацетона из колбы Шленка с навеской (рис. 4).



Рис. 4. Две колбы слева - посев *A. niger* AM1, две колбы справа – контрольная среда с белым фосфором, без посева. Свидетельство эффективности стерилизации белого фосфора ацетоном – в контрольных колбах отсутствует рост микрофлоры. Снимок сделан через 39 суток после пересева культуры.

В опыте со стерильной средой стерилизация навески белого фосфора ацетоном в колбе Шленка показала, что навеска растворяется мало, т.е., агент стерилизации выбран удачно. Тем не менее, частичное растворение наблюдалось. Так при вливании ацетона после стерилизации в раствор медного купороса наблюдалось выпадение густого черного осадка (реакция на P_4). При испарении этого ацетона наблюдались вспышки белого фосфора с выделением белого дыма. Соответственно, масса навески после стерилизации несколько уменьшалась. Также, в данном посеве мы впервые готовили эмульсию белого фосфора не в дистиллированной воде, а в физиологическом растворе, изотоничном внутренней среде живых клеток и создающем более благоприятные условия для роста микроорганизма. Культура *A. niger* AM1, взятая для посева, до него росла в среде идентичного состава в присутствии 0,2% P_4 . Через 20 суток на поверхности сред наблюдался воздушный мицелий (колонии диаметром 1-3 мм, покрывающие всю поверхность сред) желтоватого цвета; наблюдалось появление первых конидиеносцев со спорами черного цвета. В контрольных средах рост отсутствовал даже спустя 117 дней, они остались прозрачными без опалесценции и взвесей (рис. 4). Это указывает на то, что стерилизация навесок P_4 ацетоном эффективна.

Следует отметить еще один важный момент, касающийся взаимодействия белого фосфора с ионами меди, наблюдаемого нами в ходе исследований. Это явление может говорить в пользу обоснованного опасения, что «метаболизм» и

«биодegradация» белого фосфора на самом деле представляют собой абиотическое диспропорционирование в присутствии ионов переходных металлов. Их соли всегда присутствуют в средах для культивирования микроорганизмов, поскольку металлы являются биогенными микроэлементами и входят в активные центры многих ферментов [30]. Тем более, что внесение эмульсии P_4 в культуральные среды всегда сопровождается образованием взвеси черного цвета, оседающей на дно, подобно реакции белого фосфора с медным купоросом. Однако проведенный нами расчет показал, что в используемых культуральных средах белый фосфор присутствует в избытке относительно переходных металлов (избыток составляет от одного до четырех порядков по отношению к металлу). Белый фосфор реагирует с ионами меди в молярном соотношении 9 : 40 (т.е., при избытке меди), а содержание пятиводного сульфата меди в среде Придхем-Готлиба настолько мало (0,1 г/л, при среднем объеме среды в чашке Петри 20 мл), что даже при минимальной использованной нами концентрации белого фосфора 0,001% по массе, его молярное содержание в 25 раз выше. Поэтому он не может целиком прореагировать с ними, по крайней мере, за короткий срок. Следовательно, большая часть его взаимодействует с клетками микроорганизмов. Этот факт, наряду с аргументами, полученными нами ранее, свидетельствует в пользу метаболизма белого фосфора.

При максимальной концентрации P_4 , используемой в наших исследованиях (1%), его содержание в молях превышает содержание медного купороса в 25000 раз, т.е. белый фосфор не может полностью прореагировать с двухвалентной медью [18]:



Содержание остальных перечисленных металлов в среде также пренебрежительно мало, т.е. белый фосфор присутствует в явном избытке. К тому же, при комнатной температуре P_4 реагирует только с ионами меди. Поэтому значительная его часть обезвреживается все-таки микроорганизмами.

Практические рекомендации по обезвреживанию загрязнений P_4

Полученные результаты исследований позволяют рассмотреть возможность практического применения метода биодegradации для детоксикации белого фосфора в реальных условиях. Масштабирование любого процесса от лабораторного до промышленного масштаба представляет собой сложное явление, иногда требующее внесения радикальных изменений в сам процесс. Для обезвреживания утечек и разливов белого и желтого фосфора в природных средах (в первую очередь, в почве) можно предложить следующую схему практического использования штаммов грибов (на примере *T. asperellum*), разработанную авторами в патенте [31]. Обработку загрязненной белым фосфором почвы можно выполнить с помощью порошкообразного препарата (представляющего собой высушенную культуру гриба на зерне) с титром не менее 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г препарата. Для

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

обработки почвы при температуре почвы от + 10°C, следует взять препарат из расчета 80 г/л и развести в воде технической чистоты при температуре + 25°C, дать постоять 0,5-1,0 час, получить суспензию (взвесь) микробного препарата в воде.

При помощи опрыскивателя, применяемого для защитной химической обработки сельскохозяйственных культур, загрязненные белым фосфором участки почвы опрыскивать суспензией препарата гриба, исходя из расхода 300 л/га (обязательно использование соответствующей защитной одежды). По завершении опрыскивания выполнить взрыхление поверхностного слоя почвы, на глубину до 5 см. Обрабатываемый участок требуется дополнительно увлажнить. На обработанном участке через некоторое время прорастут споры, и начнется процесс биологической детоксикации белого фосфора. Опрыскивание повторять по мере необходимости, в среднем 1 раз в месяц. Оптимальная температура обрабатываемой почвы должна быть в диапазоне от + 10 до + 30°C. Ход процесса детоксикации и его итоги следует контролировать путем отбора и анализа проб почвы на наличие белого фосфора. Срок годности сухого препарата – до 5 лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предыдущие работы нашего коллектива впервые продемонстрировали возможность ассимиляции микроорганизмами элементарного фосфора. В представленной работе продемонстрирован рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору в результате направленной селекции.

Показано, что наилучшую приспособляемость к белому фосфору проявили стрептомицеты. Это неудивительно, поскольку, будучи прокариотами, стрептомицеты имеют более быстрый цикл развития. Грибы росли и адаптировались медленнее, хотя их изначальная устойчивость была выше, чем у актиномицетов (особенно у *Trichoderma asperellum* F-1087, которая изначально имела очень высокую устойчивость и росла в среде с концентрацией P₄ 1%, поэтому для нее дальнейший рост устойчивости мы продемонстрировать не смогли, так как не экспериментировали с более высокими концентрациями белого фосфора).

Вполне возможно, что использованная нами концентрация P₄, равная 1%, не предельная для роста устойчивости, и после продолжительной селекции возможно получить рост и в средах с более высокими концентрациями данного ксенобиотика. Работы в этом направлении сдерживаются исключительно соображениями техники безопасности – с ростом концентрации горячие эмульсии белого фосфора становятся все более опасными в обращении. Следовательно, для приготовления культуральных сред с содержанием P₄ более 1% по массе, требуется разработка новых методов внесения данного ксенобиотика в среды. Одновременно с селекцией была продолжена работа со штаммом стрептомицетов *Streptomyces* sp. A8. При помощи системы Biolog установлены оптимальные условия культивирования для данного микроорганизма, в частности, состав культуральной среды.

Чрезвычайно интересный результат показал посев *A. niger* AM1 в среду, содержащую одновременно фосфат и белый фосфор. Данный штамм не только устойчив к высоким концентрациям белого фосфора, но, по-видимому, белый

фосфор для него вообще нетоксичен (по крайней мере, в концентрации 0,2%). Используя в качестве источника фосфора легкодоступный растворенный фосфат, гриб растет в присутствии белого фосфора с такой же скоростью, как и в его отсутствии. При этом рост колоний других видов в тех же условиях белый фосфор подавляет. Возможно, замедленное развитие устойчивого штамма в средах с белым фосфором без фосфата объясняется не токсическим действием, а сравнительно малой доступностью белого фосфора в качестве источника биогенного элемента.

Важным результатом работы является также разработка эффективного способа стерилизации навесок белого фосфора ацетоном. До сих пор невозможность стерилизации сред с P_4 была серьезным фактором, сдерживавшим дальнейшее развитие исследований.

Список литературы

1. *Белюченко И.С., Федоненко Е.В., Смагин А.В. и др.* Биологический контроль состояния окружающей среды. Учебное пособие для бакалавров и магистров. Краснодар: КубГАУ, 2014.
2. *Петросян В.С., Шувалова Е.А.* Химия, человек и окружающая среда. М.: ООО «Буки Веди», 2017.
3. *Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 34. № 4. С. 1.
4. *Vanellander B., Paul C., Grueneberg J. et al.* // PNAS. 2012. V. 109. P. 2412.
5. Patent 0011891 US, 2013.
6. *Tarafdar J.C., Raliya R., Rathore I.* // Journal of Bionanoscience. 2012. V. 6. No. 2. P. 1.
7. *Gleason W.* // JOM. 2007. V. 59. No. 6. P. 17.
8. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В. и др.* // Химическая безопасность. 2017. Т. 1. № 1. С. 177.
1. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В. и др.* // Химическая безопасность. 2017. Т. 1. № 2. С. 205.
1. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В. и др.* // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41. № 3. С. 54.
2. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В. и др.* // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22. № 1. С. 33.
3. *Алексеев В.А., Бузмаков С.А., Панин М.С.* Геохимия окружающей среды. Пермь: Издательство Пермского гос. нац. исследоват. унив-та, 2013.
4. *Teeling H., Sypionka H.* // Appl Microbiol Biotechnol. 1997. V. 48. No. 2. P. 275.
5. *Kweon O., Kim S.-J., Holland R.D. et al.* // Journal of Bacteriology. 2011. V. 193. No. 17. P. 4326.
1. www.ezbiocloud.net (дата обращения 20.12.2017).
2. *Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С.* Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983.
3. *Garland J.L., Mills A.L.* // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. No. 8. P. 2351.
4. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001. P. 2001.
5. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 1977. V. 74. No. 12. P. 5463.
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (дата обращения 20.12.2017).
7. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 20.12.2017).
8. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В. и др.* // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 44. № 12. С. 1.

23. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Валидов Ш.З. и др. // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 46. № 5. С. 1.
 24. Engelking L.R. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition). Burlington, USA: Academic Press, 2015. Chapter 85 – Bicarbonate, Phosphate, and Ammonia Buffer Systems. P. 549.
 25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/КТ805426> (дата обращения 20.12.2017).
 26. Drews R.C. Acetone sterilization in ophthalmic surgery // Ann. Ophthalmol. 1977. V. 9(6). P. 781.
 27. Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 39. № 7. С. 1.
 28. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Яхваров Д.Г. // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 2. С. 1.
 29. Hausinger R.P. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. No. 3. P. 671.
 30. Бертини И., Грей Г., Стифель Э., Валентине Дж. Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность. В 2-х томах. Пер. с английского. М.: БИНОМ, 2013.
 31. Патент 2603259 РФ, 2016.
-

EFFECT OF SELECTION UPON RESISTANCE OF MICROORGANISMS TO WHITE PHOSPHORUS

A. Z. Mindubaev^{1}, A. D. Voloshina¹, N. V. Kulik¹, Sh. Z. Validov²,
K. A. Saparmyradov², S. T. Minzanova¹, L. G. Mironova¹,
and D. G. Yakhvarov¹*

¹State Budgetary-Funded Institution of Science Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan', Russia, *e-mail: mindubaev@iopc.ru

²Kazan (Volga region) Federal university, Kazan', Russia

Received December 26, 2017

Abstract – Aiming at detoxification of dangerous technogenic pollutant – white phosphorus – an effect of controlled selection of a series of microorganisms (*Aspergillus niger* AM1, *Streptomyces* sp. A8, *Trichoderma asperellum* F-1087) on their resistance to white phosphorus was studied in synthetic culture media containing P₄ as the sole phosphorus source at concentration level of up to 1%. The selection resulted in increasing resistance of the studied organisms. The best adaptability to white phosphorus was demonstrated by streptomycete strain *Streptomyces* sp. A8, which was further investigated using biochemical analysis and metabolic profiling. A procedure for sterilizing P₄ with acetone treatment under mild conditions was developed. Practical recommendations for neutralizing soil contaminated with white phosphorus were proposed, as exemplified by soil treatment with a powdered formulation of the fungus *T. asperellum* F-1087.

Keywords: detoxication, white phosphorus, culture media, *Aspergillus niger* AM1, *Streptomyces* sp. A8, *Trichoderma asperellum* F-1087.