



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



РОСТ ШТАММА *ASPERGILLUS NIGER* AM1 В СРЕДЕ С ДВУМЯ ИСТОЧНИКАМИ ФОСФОРА

А.З. Миндубаев¹, Ш.З. Валидов², А.Д. Волошина¹, Н.В. Кулик¹, С.Т. Минзанова¹, Л.Г. Миронова¹

¹ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, Казань, ул. Арбузова 8. E-mail: mindubaev@iopc.ru; mindubaev-az@yandex.ru

² ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18.

Резюме

Посев *Aspergillus niger* AM1 в среду, содержащую сразу два источника фосфора (фосфат и белый фосфор), продемонстрировал, что P_4 в концентрации 0.2% не проявляет токсические свойства по отношению к этому микроорганизму. В присутствии белого фосфора он растет с такой же скоростью, как в его отсутствии. Сравнение последовательностей рибосомных генов гриба с последовательностями базы данных GenBank, позволило идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм *Aspergillus niger*, которому мы присвоили обозначение *A. niger* AM1. С целью сравнить превращения белого фосфора в присутствии и в отсутствие микробной культуры, посеяли *A. niger* AM1 в среду с белым фосфором, стерилизованным ацетоном. В опыте посев был произведен, в контроле среда с белым фосфором оставлена стерильной. В контрольных средах рост отсутствовал спустя 117 дней. Это указывает на то, что стерилизация навесок P_4 ацетоном эффективна.

Ключевые слова: Биодegradация, белый фосфор, токсичность, *Aspergillus niger* AM1, культуральные среды

Цитирование: Миндубаев А.З., Валидов Ш.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г. Рост штамма *Aspergillus niger* AM1 в среде с двумя источниками фосфора. Биомика. 2018. Т.10(3). С. 286-289. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-38

ASPERGILLUS NIGER AM1 STRAIN GROWTH IN MEDIUM WITH TWO PHOSPHORUS SOURCES.

A.Z. Mindubaev¹, Sh.Z. Validov², A.D. Voloshina¹, N.V. Kulik¹,
S.T. Minzanova¹, L.G. Mironova¹

¹ A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, 8 Arbuzov Str., 420088, Kazan, Russia, E-mail: mindubaev@iopc.ru; mindubaev-az@yandex.ru

² Kazan (Volga region) Federal University, 18 Kremlyovskaya str., 420008, Kazan, Russia

Resume

Inoculation of *A. niger* AM1 in medium containing just two sources of phosphorus (phosphate and white phosphorus) demonstrated that P_4 in a concentration of 0.2% does not exhibit toxic properties in relation to this microorganism. In the presence of white phosphorus it grows at the same rate as in the absence thereof. Comparison of sequences of ribosomal genes of fungi with those in the GenBank database, allowed us to identify this microorganism as a new strain of *Aspergillus niger*, which we assigned a designation *A. niger* AM1. To compare the conversion of white phosphorus in the presence and absence of microbial culture *A. niger* AM1 were sown in a medium with white phosphorus, sterilized with acetone. The sowing was performed in a test, the control medium with white phosphorus left sterile. In control media no growth was detected in 117 days. This indicates that the sterilization of P_4 weighs with acetone is effective.

Keywords: Biodegradation, detoxication, white phosphorus, toxicity, metabolism, *Aspergillus niger* AM1, culture medium, sterilization

Citation: Mindubaev A.Z., Validov Sh.Z., Voloshina A.D., Kulik N.V., Minzanova S.T., Mironova L.G. *Aspergillus niger* AM1 strain growth in medium with two phosphorus sources. *Biomics*. 2018. V.10(3). P. 286-289. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-38

Биодеградация – известный метод обезвреживания промышленных стоков, уже широко внедренный в практику. Она имеет глубокую фундаментальную основу, заключающуюся в громадном разнообразии видов и форм микроорганизмов, встречающихся в природе, и скорости их непрерывной эволюции [Миндубаев (Mindubaev), 2018].

Наша предыдущая публикация [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018] как раз посвящена микробиологическому превращению высоко токсичного элементного (белого) фосфора в биогенный фосфат. Фактически, выполненная нашим коллективом работа является первым задокументированным примером усвоения искусственного ксенобиотика белого фосфора биосферой. До сих пор мы сравнивали рост микроорганизмов в двух вариантах культуральных сред - с белым фосфором в качестве источника биогенного элемента фосфора, или с фосфатом.

Целью данной работы стало исследование роста черного аспергилла в среде, содержащей оба источника фосфора одновременно. Данное исследование проведено для того, чтобы отделить эффект токсичности белого фосфора от эффекта нехватки фосфора. Помимо этого, проведена генетическая идентификация выделенного нами *Aspergillus niger* и найден способ стерилизации навесок белого фосфора.

Посев был произведен аналогично описанным ранее [Миндубаев и др., 2018 (Mindubaev et al., 2018)]. Однако в этот раз эксперимент был усложнен. Культура *A. niger* AM1 выращивалась в чашках Петри с подложкой из фильтровальной бумаги на поверхности агаризованной среды, как описано в работе [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2016]. При этом посев производился не в трех, а в четырех вариантах: модифицированная среда Придхем-Готлиба без источников фосфора; с фосфатом; с 0.2% белого фосфора; с 0.2% P_4 ; с фосфатом (в тех же концентрациях, что и во втором варианте - 0.0475 М или 0.15% в пересчете на чистый фосфор). Такая схема посева позволяет получить больше информации об экспрессии генов при росте в разных условиях. Все четыре варианта посева произведены в трех повторях.

Генетический анализ проводился следующим образом. Образцы ДНК из культуры гриба *A. niger* AM1 выделялись по методике, описанной в [Sambrook, Russell, 2001]. Далее проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) полученных фрагментов ДНК.

Мы впервые применили стерилизацию белого фосфора ацетоном. В шленк 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 шленк 50 мл дистиллированной воды, стерилизованной автоклавированием. Затем приготовили 2% эмульсию белого фосфора в этой воде (ультразвуковая ванна Сапфир (Россия), 30 мин, 50°C, аргон). Поскольку в низких концентрациях ацетон легко усваивается микроорганизмами в качестве источника углерода [Hausinger, 2007], переходя далее к процедуре эмульгирования белого фосфора ультразвуком, мы не стремились удалять остатки ацетона из шленка с навеской.

Чрезвычайно интересный результат показал посев *A. niger* AM1 в среду, содержащую одновременно фосфат и белый фосфор. Ранее нами не проводились подобные эксперименты. Результат этого посева показал, что данный штамм не только устойчив к высоким концентрациям белого фосфора. Белый фосфор, по крайней мере, в концентрации 0.2%, для него вообще нетоксичен! Используя в качестве источника фосфора легкодоступный растворенный фосфат, гриб растет в присутствии белого фосфора с такой же скоростью, как и в его отсутствии. Это не артефакт, не ошибка эксперимента, поскольку рост колоний других видов в тех же условиях белый фосфор подавляет.

Если вспомнить о том, что *A. niger* AM1 изначально был выделен из химического реактива белого фосфора, вместе с которым он был случайно внесен в среду, то вполне возможно, что устойчивость у него возникла длительное время назад, еще до начала наших работ. Исследуя рост микроорганизмов в средах, содержащих белый фосфор, но лишенных фосфата, мы непременно сталкивались с вопросом изменения pH данных сред в процессе развития микроорганизмов и детоксикации P_4 . Окисление белого фосфора неизбежно приводит к образованию кислот и росту кислотности, особенно заметному в отсутствии фосфатного буфера. 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 ($pK_{a3} = 12,7$) [Engelking, 2015]. Именно поэтому фосфорная подкормка во все применяемые в настоящее время культуральные среды вносится в виде точно рассчитанного соотношения гидрофосфата и дигидрофосфата. Даже с этой точки зрения посев в среду, содержащую сразу два источника фосфора – классическая смесь гидрофосфата и дигидрофосфата, и белый фосфор, вызывает большой интерес.

На 12 сутки после посева *A. niger* AM1 в четырех вариантах среды наблюдалась следующая картина (рис. 1). В средах без источников фосфора рост

практически не наблюдается (одна-две крошечные колонии без спороношения на чашку) (рис. 1, ряд крайний справа). В средах с фосфатом аспергилл хорошо растет и спороносит, однако культура не чистая, помимо черных колоний аспергилла присутствуют колонии других микроорганизмов (рис. 1, ряд второй справа). В средах с 0.2% белого фосфора колонии аспергилла имеют бледно-серый цвет (пониженная фертильность) (рис. 1, ряд второй слева). Очень интересный результат показал четвертый вариант посева – с белым фосфором и фосфатом (рис. 1, ряд крайний слева). Колонии растут очень хорошо, даже более развитые, чем в среде с фосфатом, причем в двух случаях из трех выросла чистая культура (в одном появилась колония неизвестного вида). То есть медленный рост аспергилла в среде с белым фосфором объясняется не токсичностью последнего для данного штамма, а исключительно его труднодоступностью как источника фосфора! Возможно, играют роль и упомянутые выше буферные свойства фосфата. P_4 , судя по всему, нетоксичен для данного гриба [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2016]. А конкуренция с другими видами сильнее тормозит рост (как видно на рис. 1), чем присутствие белого фосфора.

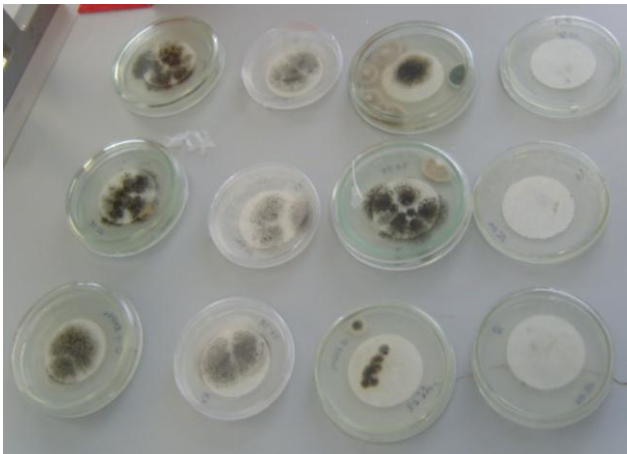


Рис. 1. Первый пересев устойчивых *A. niger* AM1 на четыре варианта среды. Ряд крайний справа – среда без источников фосфора; второй справа – с фосфатом; второй слева – с белым фосфором (0.2%) и крайний слева – с 0.2% P_4 и фосфатом. Пояснения в тексте. Снимок сделан через 11 суток после посева.

Fig. 1. First reinoculation of resistant *A. niger* AM1 in four different mediums. The vertical row far right is a medium without phosphorus sources; second row from the right – with the phosphate; second from the left – with white phosphorus (0.2%) and far left – with 0.2% phosphate and P_4 . Explanations in the text.

The picture was taken 11 days after inoculation

Следует отметить, что на 14 сутки после посева стал наблюдаться рост аспергилла и в среде без источников фосфора, за счет очень незначительного количества фосфата, присутствовавшего в агаре.

В процессе отмывания бумажных фильтров с биомассой аспергиллов в деионизованной воде через 34 суток после посева, стало ясно, что *A. niger* AM1 интенсивно разлагает целлюлозу, по всей видимости, являясь продуцентом целлюлаз [Kassim, 1982]. Фильтры легко крошатся (особенно в тех случаях, когда гриб на них интенсивно рос), в некоторых случаях даже наблюдалось частичное растворение в воде с образованием студнеобразной массы, нехарактерное для нативной целлюлозы.

Для генетической идентификации гриба, устойчиво метаболизирующего белый фосфор и по морфологическим признакам отнесенного к виду *A. niger*, была определена нуклеотидная последовательность регионов ITS1 и ITS2 Сравнение полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank с помощью системы BLAST, выявила 99% гомологию с ITS1 и ITS2 регионами описанных штаммов *Aspergillus niger*, что позволяет идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм *Aspergillus niger*. Ему мы присвоили номер *A. niger* AM1. Нуклеотидная последовательность штамма зарегистрирована в международной базе данных GenBank, где ей присвоен номер KT805426 [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2015].

Одной из серьезнейших проблем, с которой мы до сих пор сталкивались, производя посевы микроорганизмов на среды с белым фосфором, было отсутствие эффективного метода стерилизации. 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. В опыте по стерилизации навески белого фосфора ацетоном в контрольных, стерильных средах рост микробиоты отсутствовал даже спустя 117 дней, они остались прозрачными без опалесценции и взвесей. Это указывает на то, что выбранный метод стерилизации эффективен.

Литература

1. Миндубаев А.З. Кто съел полиэтилен? *Наука и жизнь*. 2018. № 4. С. 32-38.
2. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Сапармырадов К.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Хаяров Х.Р. Резистентность к белому фосфору грибов и стрептомицетов. *Биомика*. 2018. Т.10. № 2. С. 214-219.

3. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Валидов Ш.З., Кулик Н.В., Алимова Ф.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Белостоцкий Д.Е., Сапармырадов К.А., Тухбатова Р.И., Яхваров Д.Г. Адаптация микроорганизмов к белому фосфору, как результат направленной селекции. Генетическая идентификация устойчивого аспергилла и метаболическое профилирование стрептомицета А8. *Бутлеровские сообщения*. 2015. Т. 44. № 12. С.1-28.
4. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г., Аккизов А.Ю. Рост культуры *Aspergillus niger* AM1 в среде с двумя источниками фосфора. Обоснованность определения «биodeградация» в отношении белого фосфора. *Бутлеровские сообщения*. 2016. Т. 46. № 5. С. 1-20.
5. Engelking L.R. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition). Academic Press. 2015. 786 p. Chapter 85 – Bicarbonate, Phosphate, and Ammonia Buffer Systems. P.549-554.
6. Hausinger R.P. New Insights into Acetone metabolism. *J Bacteriol.* 2007. Vol.189. No.3. P.671-673.
7. Kassim E.-S.A. Cellulase Enzyme from *Aspergillus niger*. *Microbiol. Immunol.* 1982. Vol. 26. No.6. 449-454.
8. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1, 2, 3. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York*. 2001. 2344 p.
9. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Kulik N.V., Saparmyradov K.A., Minzanova S.T., Mironova L.G., Khayarov Kh.R. Resistance to white phosphorus of fungi and streptomycetes. *Biomics*. 2018. V.10(2). P. 214- 219. (In Russian)
10. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Gorbachuk E.V., Validov S.Z., Kulik N.V., Alimova F.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Belostotskiy D.E., Saparmyradov K.A., Tukhbatova R.I., Yakhvarov D.G. Adaptation of microorganisms to white phosphorus as a result of directed selection. Genetic identification of sustainable *Aspergillus* and metabolic profiling of *Streptomyces* A8. *Butlerov Communications*. 2015. V. 44(12). P. 1-28. (In Russian).
11. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Validov S.Z., Kulik N.V., Minzanova S.T., Mironova L.G., Yakhvarov D.G., Akkizov A.Y.. *Aspergillus niger* AM1 culture growth in medium with two phosphorus sources. The validity of the definition "biodegradation" with respect to white phosphorus. *Butlerov Communications*. 2016. V. 46(5). P. 1-20. (In Russian).
12. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1, 2, 3. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. 2001. 2344 p.

References

1. Engelking L.R. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition). Academic Press. 2015. 786