



ВЛИЯНИЕ МЕДИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ ЧЕРНОГО АСПЕРГИЛЛА К БЕЛОМУ ФОСФОРУ

А.З. Миндубаев^{1*}, Э.В. Бабынин², А.Д. Волошина¹, Е.К. Бадеева¹,
С.Т. Минзанова¹, Л.Г. Миронова¹, Й.А. Акосах²

¹ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр
«КазНЦ РАН», 420088, Казань, ул. Арбузова, д. 8. *e-mail: mindubaev-az@yandex.ru

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Резюме

Три штамма *Aspergillus niger*, присланные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), продемонстрировали более высокую устойчивость к белому фосфору, чем бактерии. Но у *A. niger* штамма AM1, выделенного нами ранее, 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. Проводилось исследование природы устойчивости к белому фосфору. По предварительным данным, устойчивость к белому фосфору у *A. niger* AM1 закреплена в геноме.

Ключевые слова: биодegradация, белый фосфор, *Aspergillus niger*, бактерии, минимальная ингибирующая концентрация, сульфат меди, культуральные среды

Цитирование: Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Влияние меди на устойчивость штаммов черного Аспергилла к белому фосфору // *Биомика*. 2019.Т.11(1). С. 7 – 13. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-02

EFFECT OF COPPER ON WHITE PHOSPHORUS RESISTANCE IN BLACK ASPERGILLS

A.Z. Mindubaev¹, E.V. Babynin², A.D. Voloshina¹, E.K. Badeeva¹, S.T. Minzanova¹, L.G. Mironova¹, Y.A. Akosah²

¹State Budgetary-Funded Institution of Science Arbutov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 8 Arbutov Str., 420088, Kazan, Russia, *e-mail: mindubaev@iopc.ru

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

Abstract

Though highest resistance was observed in *Aspergillus niger* strain AM1, the three strains of *A. niger*, received from All-Russian collection of microorganisms (ARCM), 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. The reasons of resistance to white phosphorus

were studied. According to the preliminary data, *A. niger* AM1's resistance to white phosphorus is anchored in its genome.

Key words: biodegradation, white phosphorus, *Aspergillus niger*, bacteria, minimal inhibitory concentration, culture media

Citation: Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. Effect of copper on white phosphorus resistance in black *Aspergillus*. *Biomics*. 2019. V.11(1). P. 7 – 13. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-02

Введение

Защита окружающей среды стала злободневной проблемой (Белюченко и др. (Belyuchenko et al.), 2014). В немалой степени кризис обусловлен накоплением токсичных отходов, устойчивость к которым у биосферы еще не выработалась. Чрезвычайно опасным в обращении отходом является белый фосфор. Его токсичность очень велика, что позволяет относить белый фосфор к веществам первого класса опасности. Тем не менее, белый фосфор на протяжении сотен лет находит применение. Причина этого – сравнительно низкая цена, доступность и многообразие химических превращений. Таким образом, белый фосфор это своего рода узловая точка, связывающая природные месторождения фосфатов и все многообразие фосфорсодержащих продуктов химической промышленности (рис.1).

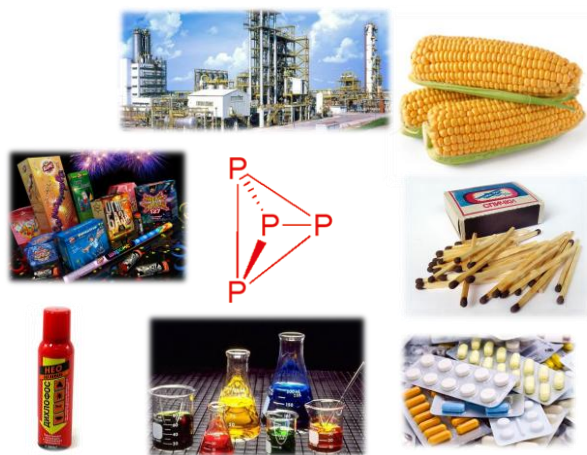


Рис. 1. Применение белого фосфора (коллаж А.З. Миндубаева).

Fig. 1. The use of white phosphorus (A.Z. Mindubaev's collage).

Следует особо указать на тот факт, 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.

В рамках наших предыдущих исследований биодegradации белого фосфора [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018b; Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018c; Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018d], были достигнуты определенные успехи. Тем не менее, некоторые важные проблемы оставались нерешенными. Например, вопрос о влиянии солей меди на биодegradацию белого фосфора.

Поскольку белый фосфор при комнатной температуре активно реагирует с сульфатом меди, до последнего времени не был подтвержден факт биодegradации белого фосфора: его трансформацию можно было объяснить химической реакцией. Мы впервые провели дальнейшую модификацию среды Придхем-Готлиба, исключив из ее состава не только фосфат в качестве источника фосфора, но и сульфат меди. Только исключив из состава CuSO_4 , и наблюдая, тем не менее, рост микроорганизмов, мы можем получить более обоснованные доводы в пользу биодegradации белого фосфора.

Безусловно, очень важной задачей являлось исследование устойчивости к белому фосфору ряда штаммов микроорганизмов, как таксономически близких к *Aspergillus niger* AM1, так и удаленных (например, бактерий). Это исследование позволяет понять, насколько устойчивость к белому фосфору распространена в природе и сделать первые выводы о ее механизмах, и возможном практическом применении.

Методы

Мы исследовали рост пяти штаммов *A. niger*, из них два (AM1 и AM2) выделены нами: AM1 из реактива белого фосфора, а AM2 является мутантной формой AM1, отличающейся скоростью роста и морфологическими характеристиками. Еще три штамма любезно предоставлены нам Всероссийской коллекцией микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрыбина (Пушино) (Табл. 1).

Таблица 1.

Штаммы *Aspergillus niger* из Всероссийской коллекции микроорганизмов, с которыми велась работа

Вид	Штамм	Субстрат выделения	Место выделения
<i>Aspergillus niger</i>	ВКМ FW-650	Многолетнемерзлые отложения, возраст - 170 лет, глубина 20.50-20.55 м	Таглу, Канада
<i>Aspergillus niger</i>	ВКМ FW-2664	Пепел вулканический мерзлый, глубина 1.8-1.85 м	Полуостров Камчатка, Россия
<i>Aspergillus niger</i>	ВКМ FW-2731	Мерзлота, пепел вулканический, глубина 14.5 м	Полуостров Камчатка, Россия

Table 1. *Aspergillus niger* strains from the All-Russian collection of microorganisms (ARCM), with which the study was conducted

Species	Strain	Substrate of isolation	Place of isolation
<i>Aspergillus niger</i>	ВКМ FW-650	Permafrost deposits, 170 years old, Depth: 20.50-20.55 m deep	Taglu, Canada
<i>Aspergillus niger</i>	ВКМ FW-2664	Frozen volcanic ash, Depth: 1.8-1.85m	Kamchatka Peninsula, Russia
<i>Aspergillus niger</i>	ВКМ FW-2731	Permafrost, volcanic ash, Depth: 14.5 m	Kamchatka Peninsula, Russia

Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия) по интенсивности поглощения света λ 550 нм (в некоторых случаях, когда колонии аспергилла продуцировали в культуральную среду желтый пигмент, использовалась λ 405 нм). В наших экспериментах максимальная концентрация белого фосфора в лунках планшетов достигала 1%. Использование планшетов и планшетного ридера позволило нам производить параллельные посеы разных штаммов и сравнивать скорость их роста в средах с различными концентрациями белого фосфора.

Посев производился в модифицированную среду Придхем-Готлиба (ПГ). В модификацию среды

без двухвалентной меди не вносили компонент $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (пятиводный сульфат меди, медный купорос).

Штаммы высевались в три варианта сред Придхем-Готлиба: в среду с белым фосфором в качестве единственного источника фосфора, содержащую сульфат меди; в среду с белым фосфором в качестве единственного источника фосфора, не содержащую сульфат меди, а также в среду с белым фосфором и фосфатом в качестве источника фосфора.

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) белого фосфора штаммы аспергиллов и бактерий *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus firmus* и *Salmonella*

typhimurium BA13 высевались в полноценную среду из мясо-пептонного бульона (МПБ).

С целью установления природы устойчивости аспергилла к P_4 произведен посев в среду с фосфатом в качестве источника фосфора. Подростшую культуру снова пересекали в среду с 0,2% белого фосфора. В качестве контроля посеяли также *A. niger* AM1, ранее росший в среде с белым фосфором.

Результаты и их обсуждение

Все исследованные нами штаммы *A. niger* выдерживают концентрацию белого фосфора 1%. МИК для них до сих пор не найдена, т.е. находится при значениях концентраций P_4 выше 1%. По-видимому, высокая устойчивость к белому фосфору – признак, характеризующий все черные аспергиллы, или большинство из них. Для бактерий МИК была найдена и составила для *A. xylooxidans* 0.125%, *B. firmus* 0.25%, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. typhimurium* BA13 0.5%. Из этого следует вывод, что черные аспергиллы более устойчивы к белому фосфору по сравнению с бактериями [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018a].

Среда Придхем-Готлиба имеет заведомо обедненный состав по сравнению с МПБ, и аспергиллы в ней растут хуже. В данной среде МИК для аспергиллов уже составляет 1% (рис. 2). Тем не менее, при высоких концентрациях белого фосфора, в диапазоне концентраций от 0.5 до 0.007%, штамм AM1 рос быстрее, т.е. оказался более устойчивым.

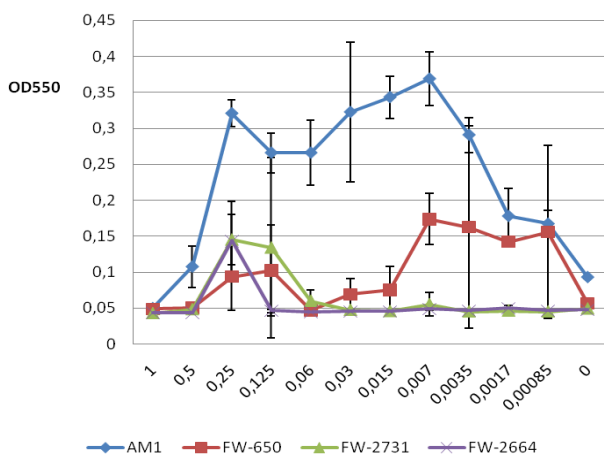


Рис. 2. Рост штаммов *A. niger* в среде с белым фосфором без фосфата, на третьи сутки после посева. Ось абсцисс – концентрация белого фосфора, %. Ось ординат – оптическое поглощение при λ 550 нм. Обращает внимание скорость роста штамма AM1.
Fig. 2. The growth of *A. niger* strains in a phosphate deficient medium containing white phosphorus, on the third day of cultivation. X- axis: concentration (%) of

white phosphorus. Y-axis: optical density at $\lambda=550$ nm. The growth rate of strain AM1 is emphasized.

В среде с белым фосфором в качестве единственного источника фосфора (рис. 2) наиболее интенсивный рост аспергиллов наблюдается в диапазоне концентраций от 0.25 до 0.0017%. Замедление роста при более высоких концентрациях белого фосфора объясняется токсическим действием последнего. А замедление роста при более низких концентрациях белого фосфора объясняется нехваткой биогенного элемента фосфора, необходимого для жизнедеятельности. В целом, рост в среде с белым фосфором в качестве единственного источника фосфора свидетельствует о метаболическом превращении токсичного белого фосфора в биогенный и нетоксичный фосфат. В среде с белым фосфором и фосфатом в качестве источника фосфора интенсивность роста аспергиллов возрастает пропорционально снижению концентрации белого фосфора (рис. 3). Оптическое поглощение в данном случае измерялось не при λ 550 нм, а при λ 405 нм, поскольку колонии окрасились в желтый цвет.

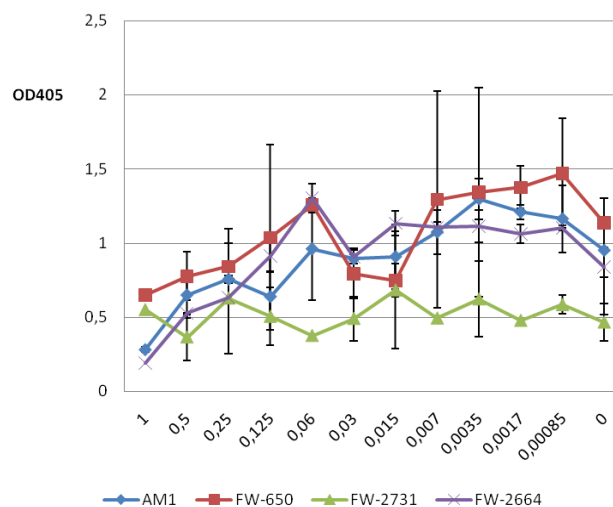


Рис. 3. Рост штаммов *A. niger* в среде с белым фосфором и фосфатом, на третьи сутки после посева. Ось абсцисс – концентрация белого фосфора, %. Ось ординат – оптическое поглощение при λ 405 нм.
Fig. 3. The growth of *A. niger* strains in a medium containing white phosphorus and phosphate, on the third day of cultivation. X- axis: concentration (%) of white phosphorus. Y-axis: optical density at $\lambda=405$ nm.

Исключая из состава питательной среды сульфат меди, мы опасались, что это сделает ее непригодной для роста микроорганизмов. Известно,

какую колоссальную роль играют соли переходных металлов в жизнедеятельности [Hughes, 1981 (Хьюз, 1983)]. Но на практике выяснилось, что в культуральной среде, не содержащей сульфат меди, рост грибов, тем не менее, наблюдается (рис. 4). Следует отметить, что при внесении эмульсии белого фосфора в среду, не содержащую медь, не наблюдалось выпадение черного осадка, отмеченное нами в более ранних работах. Значит, P_4 не вступает в химическую реакцию и сохраняется в среде более длительное время. Этот факт является дополнительным аргументом в пользу того, что имеет место биодegradация белого фосфора, а не химическая нейтрализация ионами меди. Исключив из состава сред $CuSO_4$, и наблюдая, тем не менее, рост микроорганизмов, мы получили более обоснованные доводы в пользу биодegradации белого фосфора. Рост четырех штаммов черного аспергилла отображен на диаграмме (рис. 4).

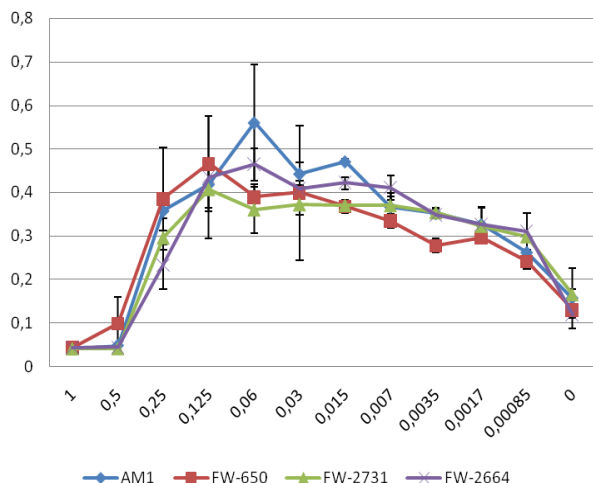


Рис. 4. Рост штаммов *A. niger* в среде с белым фосфором без фосфата и без меди, на четвертые сутки после посева. Ось абсцисс – концентрация белого фосфора, %. Ось ординат – оптическое поглощение при λ 550 нм. Следует обратить внимание на то, что в отсутствии меди рост *A. niger* AM1 слабо отличается от роста штаммов из ВКМ.

Fig. 4. The growth of *A. niger* strains in a phosphate and copper deficient medium, containing white phosphorus, on the fourth day of cultivation. X-axis: concentration (%) of white phosphorus. Y-axis: optical density at $\lambda=550$ nm. It should be noted that in the absence of copper, the growth of *A. niger* AM1 slightly differs from the growth of the ARCM strains.

Кривые роста всех штаммов имеют классическую форму - максимальная скорость роста наблюдается при средних значениях концентрации белого фосфора. Следует обратить внимание на то,

что в среде без меди скорость роста AM1 ненамного превосходит таковую у остальных штаммов аспергиллов. Создается впечатление, что AM1 устойчив не столько к самому белому фосфору, сколько к продуктам его реакции с Cu^{2+} .

Кривые роста штаммов имеют характерную для наших исследований форму гауссовой кривой - максимальная скорость роста наблюдается при средних значениях концентрации белого фосфора.

Выполнено сравнение роста штаммов AM1 и AM2. Показано, что AM2 в первые дни после посева растет медленнее, чем AM1. Однако, со временем (примерно через 7 суток после посева) в средах с белым фосфором AM2 обгоняет в росте предковый штамм AM1, т.е. он способен более эффективно использовать ресурсы среды, и, возможно, лучше адаптирован к существованию в присутствии белого фосфора. Кроме этого, мицелий у AM2 имеет более плотную структуру, чем у AM1, в связи с чем его колонии в планшете дают более выраженное оптическое поглощение.

Сравнение пересева культур *A. niger* AM1, росших до этого в средах с фосфатом, и в средах с белым фосфором, показало интересную картину. Ожидалось, что после роста в благоприятных условиях – в среде с фосфатом – микроорганизм мог утратить устойчивость к белому фосфору и не расти, или расти медленнее, чем та же культура, росшая до пересева в среде с P_4 . В действительности, гриб, росший до пересева на фосфате, рос быстрее! Уже через трое суток после посева субстратный мицелий гриба, росшего на фосфате, покрыл дно чашек Петри. Гриб, росший до этого на белом фосфоре, через 3 суток тоже уже рос, но колонии имели меньший размер. Через 10 суток после посева, когда колонии уже покрылись спорами, некоторое отставание в росте (хотя уже менее выраженное) у грибов, росших в среде с белым фосфором, все еще наблюдалось (рис. 5). Из этой картины можно сделать вывод, что резистентность к белому фосфору у исследуемого нами штамма черного аспергилла закреплена в геноме, и является наследуемым признаком, передающимся в ряду поколений даже в отсутствие P_4 . Более быстрый рост гриба, пересеянного со среды с фосфатом, можно объяснить предшествующим накоплением фосфата в мицелии. Т.е., начиная расти, культура гриба уже содержала в себе некоторое количество биогенного фосфора, необходимого для роста.

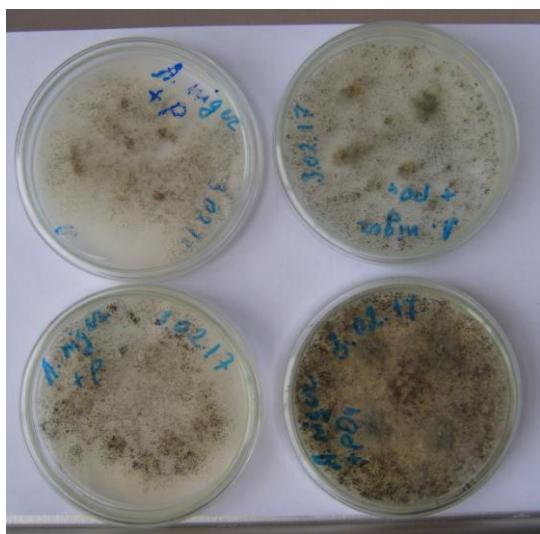


Рис. 5. Пересев в среду с 0.2% белого фосфора *A. niger* AM1, росшего до пересева в среде с белым фосфором (ряд слева) и в среде с фосфатом (ряд справа). Гриб, росший на фосфате, развивается несколько быстрее. Снимок сделан через 10 суток после посева.

Fig. 5. Re-inoculation of *A. niger* AM1 in to the medium with 0.2% white phosphorus, which grew in the medium with white phosphorus before transfer (row on the left) and in a medium with phosphate (row on the right). Fungi growing on phosphate, develops a bit faster. The picture was taken 10 days after inoculation.

Заключение

Исследование показало, что все изучаемые нами штаммы черного аспергилла (*A. niger*) обладают устойчивостью к белому фосфору. Минимальная ингибирующая концентрация для них не была найдена. Тем не менее, штамм *A. niger* AM1, впервые выделенный из реактива белого фосфора, проявляет заметно большую устойчивость к данному веществу, по сравнению с штаммами из арктических вечномерзлых грунтов.

В отличие от грибов, представители четырех родов бактерий угнетаются белым фосфором, МИК составляет для них величины от 0.125% до 0.5%. Из этих результатов 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 морфологией грибов, в первую очередь со строением клеточной стенки. Дальнейшие исследования, должны подтвердить или опровергнуть данное предположение.

Другое предположение гласит, что этот механизм устойчивости связан наличием ферментов (вероятно, оксидаз), обезвреживающих белый фосфор. Наблюдение роста грибов в среде с белым фосфором, но не содержащей сульфат меди, свидетельствует о том, что ферменты лакказы, характерные для многих грибов, по-видимому, не задействованы в обезвреживании белого фосфора, поскольку для их активности требуется наличие в культуральной среде меди.

Известно, что микроорганизмы в процессе эволюции выработали многообразные способы аккумуляции фосфата и обитания в условиях нехватки фосфора (Kulakovskaya, 2015). Тем не менее, потребление живыми организмами белого фосфора в качестве источника биогенного элемента является удивительным и загадочным явлением, неоспоримо требующего дальнейшего и более глубокого изучения.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность зав. лабораторией мицелиальных грибов Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН д.б.н. Озерской С.М. и с.н.с. лаборатории мицелиальных грибов к.б.н., Иванушкиной Н.Е. за предоставленные штаммы грибов, ценные рекомендации и советы.

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

Литература

1. Белюченко И.С., Федоненко Е.В., Смагин А.В., Славгородская Д.А., Ткаченко Л.Н., Корунчикова В.В., Никифорова Ю.Ю., Высоцкая И.Ф., Зеленская О.В., Мамась Н.Н., Мельник О.А., Скрипка Л.Ф., Садовникова Н.Б., Миндубаев А.З., Шарамок Т.С., Маренков О.Н. Биологический контроль состояния окружающей среды. Учебное пособие для бакалавров и магистров. Краснодар, КубГАУ. 2014. 153с.
2. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Кабинова Г.К., Синичина А.А., Шайхутдинов Р.К.-У., Шарипов А.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Устойчивость штаммов *Aspergillus niger* и бактерий к белому фосфору. Влияние двухвалентной меди на биodeградацию. Бутлеровские сообщения. 2018. Т. 56. №11. С. 1-24. doi: jbc-01/18-56-11-1
3. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н. Генотоксическое действие белого фосфора. Биомика. 2018. Т.10.

- № 4. С. 344-350. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-45
4. 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
5. 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. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-31
6. Хьюз М. Неорганическая химия биологических процессов. М.: Муп. 1983. 416 с.
7. Kulakovskaya T. Phosphorus storage in Microorganisms: Diversity and Evolutionary Insight. *Biochem Physiol*. 2015. Vol. 4. No 1. e130. P. 1-4. doi:10.4172/2168-9652.1000e130
3. Kulakovskaya T. Phosphorus storage in Microorganisms: Diversity and Evolutionary Insight. *Biochem Physiol*. 2015. Vol. 4. No 1. e130. P. 1-4. doi:10.4172/2168-9652.1000e130
4. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Kabirova G.G., Sinitsina A.A., Shaykhutdinov R.K.U., Sharipov A.A., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. The resistance of *Aspergillus niger* strains and bacteria to white phosphorus. The impact of divalent copper on biodegradation. *Butlerov Communications*. 2018. Vol. 56. No.11. P. 1-24 (In Russian)
5. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Voloshina, A.D. Piskunov D.B., Makhiyanov A.N. Genotoxic effect of white phosphorus. *Biomics*. 2018. Vol.10. No. 4. P. 344-350. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-45 (In Russian)
6. 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. Vol.10. No3. P. 286-289 doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-38 (In Russian)
7. 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. Vol.10. No. 2. P. 214- 219. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-31 (In Russian)
- References**
1. Belyuchenko I.S., Fedonenko E.V., Smagin A.V., Slavgorodskaya D.A., Tkachenko L.N., Korunchikova V.V., Nikiforenko Yu.Yu., Vysotskaya I.F., Zelenskaya O.V., Mamas' N.N., Mel'nik O.A., Skripka L.F., Sadovnikova N.B., Mindubaev A.Z., Sharamok T.S., Marenkov O.N. Biological Control of the Environment. *Textbook for bachelors and masters. Krasnodar, Kuban State Agrarian University*. 2014. 153 P. (In Russian).
2. Hughes M. Inorganic chemistry of biological processes. *Wiley. N-Y. Second Edition*. 1981. 348 P.