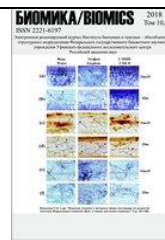




БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomics.ru>



ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БЕЛОГО ФОСФОРА

А.З. Миндубаев^{1*}, Э.В. Бабынин², Е.К. Бадеева¹, С.Т. Минзанова¹,
Л.Г. Миронова¹, А.Д. Волошина¹, Д.Б. Пискунов³, А.Н. Махиянов³

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 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

³ Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, Казань, ул.К.Маркса, 68

Резюме

В представленной работе проведена оценка генотоксичности белого фосфора. Для этой цели используется целая серия тестов. SOS-lux тест продемонстрировал генотоксичность. Этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у данного вещества. 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, генотоксичность

Цитирование: 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.2018-44

GENOTOXIC EFFECT OF WHITE PHOSPHORUS

A.Z. Mindubaev^{1*}, E.V. Babynin², E.K. Badeeva¹, S.T. Minzanova¹,
L.G. Mironova¹, A.D. Voloshina¹, D.B. Piskunov³, A.N. Makhiyanov³.

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

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

³ Kazan National Research Technological University, 68 Karl Marx street, 420015, Kazan, Russia

Resume

In the present study the genotoxicity of white phosphorus is evaluated using the Ames test, which demonstrated the absence of toxicity. In the present work SOS-lux test has demonstrated genotoxicity. This result is obtained for the first time – all the available literature sources reported no genotoxic properties of this substance. 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, genotoxicity

Citation: Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Voloshina A.D., Piskunov D.B., Makhyanov A.N. Genotoxic effect of white phosphorus. *Biomics*. 2018. V.10(4). P. 344-350. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-44 (In Russian)

Наши предыдущие исследования [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018a; Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018b] посвящены микробиологическому превращению белого фосфора в биогенный фосфат. Тем не менее, одним из показателей опасности вещества является его генотоксичность, т.е. повреждающее действие на ДНК, увеличивающее частоту мутагенеза и канцерогенеза. Одной из целей представленной работы стало исследование генотоксичности культуральной среды, содержащей белый фосфор и его метаболиты для более углубленного изучения их токсичности вообще.

Генотоксичность белого фосфора определялась при помощи теста Эймса, по методике, описанной в работе [Mortelmans, Zeiger, 2000]. В тесте были использованы индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA1535 (генотип hisG46 rfa uvrB), TA1538 (генотип hisD3052 rfa uvrB). Все эксперименты проводили в трех повторностях. Штаммы имеют мутации в генах гистидинового оперона, в результате чего бактерии не могут расти на среде без гистидина. Однако, если мутагенный агент присутствует, он может вызвать обратные мутации, что приводит к появлению прототрофных ревертантов. Тест Эймса: ночную культуру *Salmonella typhimurium* (10^9 клеток/мл) в 0.015 М фосфатном буфере (рН 7.4) инкубировали с тестируемым соединением в диапазоне концентраций при 37°C 90 мин без встряхивания. После инкубации 2.5 мл расплавленного верхнего агара (0.6% агара, 0.6% NaCl, 0.05 мМ L-гистидина, 0.05 мМ биотина, рН 7,4 при 45° С) добавляли в пробирки, и смесь наносили на минимальную агаризованную среду (1.5% агар, среда Фогеля-Боннера, содержащая 2% глюкозы) и инкубировали при 37°C в течение 66 ч. После этого срока подсчитывали число колоний His+ ревертантов, выросших на поверхности агара. В качестве позитивного контроля использовали 2,4-динитрофенилгидразин (ДНФГ) для штамма TA1538, и этилметансульфонат (ЭМС) для TA1535 соответственно. Согласно методике, мутагенной считается та концентрация тестируемого вещества, если число ревертантов в опыте будет выше контрольных значений более чем в два раза. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Для проведения SOS-lux теста на генотоксичность использовалась среда из работы [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2016]. SOS-тест позволяет напрямую определять ДНК-

повреждающую активность веществ, т.е. служит дополнением к тесту Эймса, уточняющим оценку генотоксичности. Об активности SOS-регулона в SOS-lux тесте судят по степени биолюминесценции. Для оценки индукции SOS-ответа использовали индикаторный штамм *S. typhimurium* TA1535/pDEW238, способный к биолюминесценции, в ответ на ДНК-повреждающие агенты. Штамм получен в результате трансформации штамма *S. typhimurium* TA1535 плазмидой pDEW238, которая содержит luxCDABE – оперон под контролем recA промотора. Плазмида предоставлена Rachel Rozen (The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel).

Для оценки индукции SOS-ответа использовали индикаторный штамм *S. typhimurium* TA1535/pDEW238, способный к биолюминесценции, в ответ на ДНК-повреждающие агенты.

Эксперимент был выполнен, как описано в работе [Cooper, Lovett, 2011]. Делали серию разведений среды, содержащей вначале 0.2% белого фосфора (2000 мкг/мл). В качестве позитивного контроля использовали митомицин С. Сначала смешивали пополам с культурой сальмонелл, при этом концентрация падала до 1000 мкг/мл. С этой концентрации начинали измерение общей токсичности и генотоксичности. В конце серии разведений довели концентрацию P₄ до 1 мкг/мл (0.0001%). Ночную культуру штамма, выращенную в питательном бульоне с ампициллином (100,0 мкг/мл), вносили в планшеты по 0,1 мл в лунку и добавляли в каждую раствор среды с P₄ в различных концентрациях. Планшеты Greiner GR-675090. Определяли интенсивность биолюминесценции с помощью микропланшетного ридера Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Для каждой концентрации в каждой точке времени брали три пробы. Интенсивность биолюминесценции измеряли в относительных световых единицах (ОСЕ) (Relative Light Units, RLU), рассчитанных как число световых единиц в секунду, деленное на оптическую плотность клеточной культуры (OD) при 550 нм.

Определяли интенсивность биолюминесценции с помощью микропланшетного ридера Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Для каждой концентрации в каждой точке времени брали три пробы. Интенсивность биолюминесценции при 550 нм измеряли в относительных световых единицах (ОСЕ).

Повторный SOS-lux тест провели по аналогичной методике, но в качестве позитивного контроля использовали, помимо митомицина С, пероксид водорода в концентрации, в которой наблюдается наиболее выраженный мутагенный эффект (около 0.03%).

Также, для оценки генотоксического действия белого фосфора использовали тест-систему *Allium cepa*. Анализ клеток корневой меристемы проводили на микроскопе Axio Observer.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) на временных давленных препаратах после окрашивания ацетокармином [Fiskesjo, 1997]. Предварительно отобранные стандартные луковицы репчатого лука *A. cepa* проращивали в течение 2-3 дней в стеклянных стаканах. Когда длина корешков достигала 1 см (это условие выполняется для проверки способности луковиц к прорастанию), опытные луковицы на 48 часов помещали в стаканчики объемом 50 мл с белым фосфором в различной концентрации. В качестве контроля использовали отстоянную отфильтрованную водопроводную воду. Затем корешки отрезали ножницами на 1 см от кончика и фиксировали корешки в фиксаторе Кларка (смесь этилового спирта (95%) и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). Фиксатор мгновенно останавливает жизнедеятельность, в т.ч. клеточные циклы. Материал хранили при температуре +4°C. Окрашивание проводили оранжевым красителем кармином или красно-фиолетовым орсеином. В каждом препарате учитывали общее количество клеток, количество делящихся клеток из зоны деления корешка, находящихся в той или иной стадии митоза. На основании полученных данных определили митотический индекс (MI), распределение клеток по стадиям митоза. Митотический индекс показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на препарате изучаемой ткани. Расчет MI был сделан в соответствии с формулой, приведенной ниже:

$$MI, \% = \frac{[P+M+A+T]}{N} \times 100,$$

где [P+M+A+T] – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Частота хромосомных aberrаций определялась как отношение суммы мутантных клеток с мостами, фрагментами и отстаиваниями хромосом в опытном варианте к общему количеству ана- и телофаз, выраженное в процентах (анателофазный метод учета хромосомных aberrаций).

20 мл модифицированной культуральной среды Придхем-Готлиба с концентрацией белого фосфора 0.2% для проведения *Allium* теста готовили

так же, как описано в [Миндубаев и др., 2016 (Mindubaev et al., 2016)].

В «Токсикологическом профиле белого фосфора» за 1997 год [Toxicological profile for white phosphorus, 1997] сообщается об отсутствии генотоксичности данного вещества. Тест проводился на пяти ауксотрофных штаммах сальмонеллы и не выявил увеличение частоты мутаций. Мы решили проверить эти данные, начав с проведения спот-теста (от англ. spot - пятно) – варианта теста Эймса для качественного определения генотоксичности.

Тестирования показали, что среда очень токсична для *S. typhimurium* TA1535 и TA1538. Они погибают в этой среде даже при ее разбавлении питательным мясным бульоном до 90%. В течение 1 часа плотность популяции падает с 2.47×10^8 клеток/50 мкл до 10 клеток/50 мкл. Это высокий показатель токсичности. При разбавлении бульоном до 50% через час исходная плотность популяции упала до 4×10^5 клеток/50 мкл.

Но при внесении капли среды объемом 10 мкл в чашку Петри с посевом сальмонеллы, генотоксичность не проявляется. При разбавлении среды бульоном до концентрации 10% снижение жизнеспособности сальмонелл не наблюдается, т.е. достигнута субвитаальная концентрация. При инкубировании в среде штамма TA1535 в течение 1 часа число мутантов изменилось с 1.19 ± 0.29 , до 1.310 ± 0.28 . Различия недостоверны. При инкубировании в ней штамма TA1538 в течение 1 часа число мутантов не выросло, а упало с 10.09 ± 0.81 до 9.0 ± 0.72 . В позитивном контроле с мутагеном 2,4-динитрофенилгидразином их число выросло до 22.5 ± 3.1 . То есть, генотоксичность у нашей культуральной среды с белым фосфором и его метаболитами, отсутствует.

При внесении в чашку с посевом капли большего объема (50 мкл), в месте падения капли образуется пятно мертвых клеток. Несмотря на то, что капля растекается по дну чашки в круг диаметром 1 см, гибель клеток наблюдается только в месте ее падения. Круги из мутантных клеток, специфичные для теста Эймса, в нашем случае вокруг капли не образовались.

Предположительно, такая картина наблюдается потому, что белый фосфор при нанесении на поверхность агаризованной среды быстро окисляется кислородом воздуха и теряет токсические свойства. Он попадает в среду вместе с каплей локально, но не успевает растекаться по чашке вместе с ней. В норме, в случае более стабильных веществ, вокруг упавшей капли образуется круговая зона подавления, в которой бактерии не растут. Она тем шире, чем токсичнее вещество.

Спустя еще 45 суток провели второй повтор спот-теста. В качестве положительного контроля выступал известный мутаген этилметансульфонат. В этом опыте использовался штамм *S. typhimurium* TA1535 (у *S. typhimurium* TA1538 другой тип мутации гистидинового оперона, и реакция на присутствие этилметансульфоната иная). Спот-тест на генотоксичность не показал мутагенной активности препарата белого фосфора, в то время как этилметансульфонат дал характерный рисунок распределения мутантных колоний вокруг точки нанесения мутагена.

В оценке мутагенных и антимутагенных свойств белого фосфора с помощью SOS-lux теста, в качестве контроля использовался противоопухолевый антибиотик митомицин С. Помимо митомицина С, в качестве позитивного контроля использовался другой сильный ДНК повреждающий агент – пероксид водорода. Несмотря на сходный эффект, механизмы мутагенного действия этих веществ различны. Если митомицин С образует аддукты с азотистыми основаниями ДНК, то перекись водорода является окислителем и оказывает разрушительное воздействие на большинство органических веществ, в том числе и нуклеиновые кислоты.

Диаграмма (рис. 1) демонстрирует, что по сравнению с перекисью белый фосфор является слабым ДНК повреждающим агентом. Здесь, однако, следует внести поправку. Концентрация H_2O_2 в эксперименте составляла 0.03%, а концентрация белого фосфора 62.5 мкг/мл соответствует 0.00625%. То есть, концентрация P_4 была меньше в 4.8 раза по сравнению с концентрацией перекиси. Поскольку более высокие концентрации белого фосфора оказывают губительное влияние на сальмонелл, достоверно оценивать их генотоксичность сложно. Хотя можно предполагать, что с ростом концентрации ДНК повреждающая активность P_4 должна только возрастать. То есть, следует говорить не о низкой генотоксичности белого фосфора, а о том, что его общая токсичность для клеток намного выше, чем его генотоксичность [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2017]. Наибольшей силы SOS ответ достигает через 6-8 часов после начала эксперимента, поэтому все последующие измерения мы проводили через это время (6 часов после внесения культуры сальмонелл в лунку планшета).

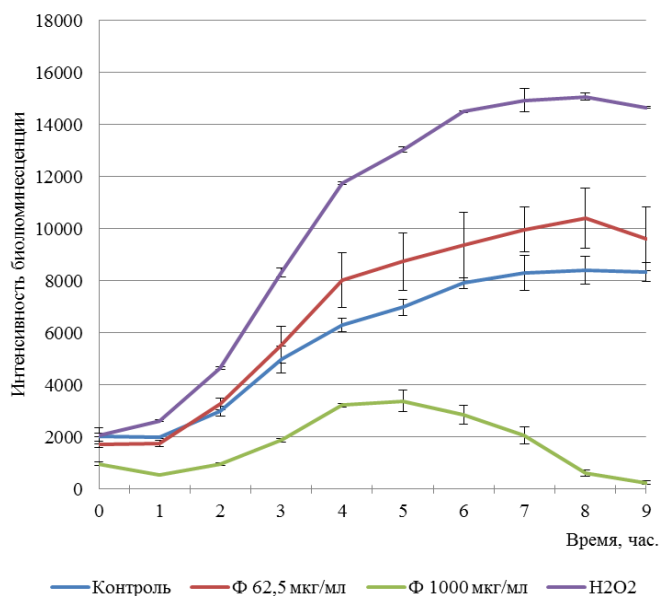


Рис. 1. Сравнение влияния белого фосфора на SOS-индукцию с перекисью водорода и негативным контролем (среда без мутагена). P_4 в концентрации 62.5 мкг/мл является слабым мутагеном, по сравнению с пероксидом.

P_4 в концентрации 1000 мкг/мл убивает культуру за 9 часов эксперимента. В контроле SOS-индукция также незначительно возрастает, что связано с ростом культуры и накоплением ДНК (соответственно, растет и число ее повреждений даже в отсутствие мутагена).

Fig.1. Comparison of the influence of white phosphorus on SOS-induction with hydrogen peroxide and negative control (medium without mutagen). P_4 at a concentration of 62.5 µg / ml is a weak mutagen as compared to the peroxide. P_4 at a concentration of 1000 µg / ml kills the culture in 9 hours of the experiment. In the control, SOS-induction also increases insignificantly, which is due to culture growth and accumulation of DNA (accordingly, the number of its damages grows even in the absence of a mutagen).

В контроле интенсивность люминесценции составила 10026 ОСЕ, в присутствии белого фосфора (100 мкг/мл) до 12590, а в позитивном контроле с антибиотиком составила 45186 ОСЕ. То есть, ДНК повреждающая активность белого фосфора оказалась слабой, но достоверной, и это при разбавлении среды (изначально содержащей 0.2% P₄) до 5%. При более высоких концентрациях белого фосфора его токсические свойства проявляются сильнее.

Эксперимент с H₂O₂ ставился с целью определить антимуtagenные свойства белого фосфора. Судя по результатам, антимуtagenным действием белый фосфор не обладает. Напротив, наблюдается значительное усиление SOS ответа у смеси белого фосфора с пероксидом по сравнению с одним белым фосфором. Возможно, продукты окисления белого фосфора H₂O₂ обладают более выраженной генотоксичностью, чем у исходного P₄.

Тем не менее, исследование генотоксических свойств на том этапе не было завершено. Дело в том, что в качестве тест-объектов применялись прокариоты – бактерии *Salmonella typhimurium*. Но для оценки генотоксического воздействия вещества на организм человека следует изучать его на эукариотах, к которым относимся мы сами. Идеальными кандидатами на роль тест-объектов являются растения, генетический материал которых устроен так же, как у животных и человека. А одним из самых удобных в этой роли растений является лук репчатый *Allium cepa* L. (семейство луковые Alliaceae) – растение небольших размеров, неприхотливое, с быстрым жизненным циклом и легкодоступное. Кроме того, у лука репчатого всего 16 хромосом, что облегчает их подсчет, и быстрый клеточный цикл (менее 18 часов у интенсивно делящихся клеток корешков). На основании этих преимуществ был разработан Allium тест на

генотоксичность веществ для эукариот. Он позволяет оценивать не столько повреждения отдельных генов (как тест Эймса) или произвольных фрагментов ДНК (как SOS lux тест), сколько повреждения хромосом (хромосомные аберрации) и нарушения расхождения хромосом в ходе клеточного цикла у многоклеточных эукариот (геномные нарушения).

Проведена оценка цитогенетического действия белого фосфора на клетки меристемы корешков лука с помощью Allium-теста. Учитывалась динамика роста корней репчатого лука, то есть оценивалось не только генотоксическое, но и фитотоксическое действие P₄. Кроме этого, оценивался также показатель митозмодифицирующего действия – митотический индекс. Корешки лука в опыте с белым фосфором отставали в росте по сравнению с контролем [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018c].

Показателем уровня митотической активности тканей является митотический индекс (МИ). Индекс указывает на нормальное протекание митоза, на угнетение процесса деления клеток или на усиление митотической активности тканей. На основании этого можно сделать заключение о митотическом или митозстимулирующем действии изучаемого фактора. Зависимое от концентрации ингибирование митотического индекса, наблюдаемое нами, демонстрирует цитотоксический потенциал белого фосфора (Табл. 1). Эти данные были статистически значимыми по сравнению с контролем (p < 0,001).

Установлено также, что препарат белого фосфора существенно снижает митотическую активность тканей по сравнению с контролем и, следовательно, обладает митотоксической активностью (Табл. 1).

Таблица 1.

Митотический индекс при различных концентрациях белого фосфора

	Контроль	0.008%	0.012%	0.016%
Общее число проанализированных клеток	6181	3378	4483	5426
МИ	7,25±1,15	3,31±0,88	2,35±0,65	1,35±0,25
М/Р-метафаза/профаза отношение	0,77	0,72	0,64	0,42
% aberrантных клеток (тип aberrаций)	0,78 (мост)	1,79 (отставание)	5 (отставание, фрагмент)	7,69 (мост)

Table 1. Mitotic index (MI) at different concentrations of white phosphorus

	Control	0.008%	0.012%	0.016%
Total number of analyzed cells	6181	3378	4483	5426
MI	7,25±1,15	3,31±0,88	2,35±0,65	1,35±0,25
M/P-Metaphase/Prophase ratio	0,77	0,72	0,64	0,42
% of aberrant cells (type of aberration)	0,78 (bridge)	1,79 (lagging)	5 (lagging, fragment)	7,69 (bridge)

Анализ соотношений фаз митоза показал увеличение доли клеток на стадии профазы с соответствующим уменьшением процентного отношения других стадий. Это может быть связано с блокировкой деления клеток в конце стадии профазы в результате накопления повреждений генома. Подобное накопление профазных клеток наблюдалось ранее, например, в экспериментах с применением пестицидов [Lamsal et al., 2010]. Поскольку на этой стадии формируется веретено деления, возможно, белый фосфор угнетает его образование.

Данные по частоте клеток с хромосомными aberrациями приведены в таблице 1. Показано, что обработка препаратом белого фосфора при всех тестируемых концентрациях увеличивала процент aberrаций хромосом в митотических клетках. При этом, частота митотических аномалий увеличиваются с увеличением концентрации белого фосфора. Обработка белым фосфором при концентрации 0.008 - 0.016%, увеличивала примерно в 10 раз процент клеток с aberrациями по сравнению с контролем. То есть, негативное влияние белого фосфора на расхождение хромосом при митозе очень велико.

Все концентрации были способны индуцировать различные типы хромосомных аномалий. Не было обнаружено какого-либо пропорционального или значительного увеличения или уменьшения количества определенных типов aberrаций.

Литература

Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Аккизов А.Ю., Яхваров Д.Г. Оценка генотоксичности белого фосфора. Развитие бактериальной культуры в среде с фосфитом калия в качестве единственного источника фосфора. *Бутлеровские сообщения*. 2016. Т. 47. №7. С. 1-20.
Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Сахапов И.Ф., Кулик Н.В., Валидов Ш.З., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Аккизов А.Ю., Яхваров Д.Г.

Генотоксичность белого фосфора. *Бутлеровские сообщения*. 2017. Т.49. №1. С. 1-20.

Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Волошина А.Д. Цитогенетическое действие белого фосфора. *Бутлеровские сообщения*. 2018. Т.55. №9. С. 1-21.

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

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

Cooper D.L., Lovett S.T. Toxicity and tolerance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)*. 2011. Vol. 10. No. 3. P. 260-270. DOI: 10.1016/j.dnarep.2010.11.007

Fiskesjo G. Allium test for screening chemical evaluation of cytological parameters. in Wang W., Gorsuch J.W., Hughes J.S. 6005 J.S. (Eds), New York, NY: CRC Lewis Publishers. 1997. P. 307-333.

Lamsal K., Ghimire B.K., Sharma P., Ghimiray A.K., Kim S.W., Yu C.Y., Chung I.M., Lee Y.S., Kim J.-S., Shakya S.R. Genotoxicity evaluation of the insecticide ethion in root of *Allium cepa* L. *Afr. J. Biotechnol.* 2010. Vol. 9. No. 27. P. 4204-4210.

Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. 2000. Vol. 455. No. 1-2. P. 29-60. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00064-6

Toxicological profile for white phosphorus. *U.S. Department of health and human services. USA*. 1997. 248 p.

References

1. Cooper D.L., Lovett S.T. Toxicity and tolerance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)*. 2011. V. 10. No. 3. P. 260-270.

2. Fiskesjo G. Allium test for screening chemical evaluation of cytological parameters. In Wang W., Gorsuch J.W., Hughes J.S. 6005 J.S. (Eds), New York, NY: CRC Lewis Publishers. 1997. P. 307-333.
3. Lamsal K., Ghimire B.K., Sharma P., Ghimiray A.K., Kim S.W., Yu C.Y., Chung I.M., Lee Y.S., Kim J.-S., Shakya S.R. Genotoxicity evaluation of the insecticide ethion in root of *Allium cepa* L. *Afr. J. Biotechnol.* 2010. V. 9. No. 27. P. 4204-4210.
4. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Sakhapov I.F., Kulik N.V., Validov S.Z., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akkizov A.Y., Yakhvarov D.G. Genotoxicity of white phosphorus. *Butlerov Communications.* 2017. V. 49. No. 1. P. 1-20. (In Russian).
5. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Validov S.Z., Kulik N.V., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akkizov A.Y., Yakhvarov D.G. Evaluation of white phosphorus genotoxicity. Growth of bacterial culture in a medium with potassium phosphite as a sole source of phosphorus. *Butlerov Communications.* 2016. V. 47. No. 7. P. 1-20. (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. V.10. No3. C. 286-289 (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. V.10. No. 2. P. 214-219. (In Russian).
8. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Piskunov D.B., Makhyanov A.N., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Abayie A.Y., Voloshina A.D. Cytogenetic effect of white phosphorus. *Butlerov Communications.* 2018. V. 55. No.9. P. 1-21. (In Russian).
9. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research.* 2000. V. 455. No. 1-2. P. 29-60.
10. Toxicological profile for white phosphorus. *U.S. Department of health and human services. USA.* 1997. 248 p.