



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К БЕЛОМУ ФОСФОРУ ГРИБОВ И СТРЕПТОМИЦЕТОВ

А.З. Миндубаев¹, А.Д. Волошина¹, Н.В. Кулик¹, К.А. Сапармырадов²,
С.Т. Минзанова¹, Л.Г. Миронова¹, Х.Р. Хаяров²

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

Впервые произведены посевы микроорганизмов различных таксономических групп (грибов, стрептомицетов и бактерий) на синтетические культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорное голодание. Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора. Характер и состав продуктов окисления белого фосфора исследовался нами методом ³¹P ЯМР. По всей видимости, микроорганизмы потребляют растворенные продукты окисления белого фосфора (фосфат, фосфит и гипофосфит) и, тем самым, смещают химическое равновесие в сторону его дальнейшего окисления. Это заметно ускоряет процесс детоксикации белого фосфора. Показано, что устойчивость культур микроорганизмов к белому фосфору зависит от их таксономической принадлежности. Грибы из рода *Trichoderma* адаптируются к нему лучше, чем аспергиллы, аспергиллы лучше, чем стрептомицеты, а стрептомицеты, в свою очередь, лучше, чем бактерии рода *Pseudomonas*. Сравнивая две культуры стрептомицетов, мы показали, что устойчивость к белому фосфору – признак, который может усиливаться или ослабляться в зависимости от условий культивирования. Самая высокая концентрация в опытах соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз!

Ключевые слова: биодegradация, детоксикация, белый фосфор, *Streptomyces* sp., *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, культуральные среды, селекция.

Цитирование: 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

RESISTANCE TO WHITE PHOSPHORUS OF FUNGI AND STREPTOMYCETES

A.Z. Mindubaev¹, A.D. Voloshina¹, N.V. Kulik¹, K.A. Saparmyradov²,
S.T. Minzanova¹, L.G. Mironova¹, Kh.R. Khayarov²

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

For the first time different taxonomic groups of microorganisms are inoculated on culture medium containing white phosphorus as the single source of phosphorus. On these media microorganisms grew and have not experienced phosphorus starvation. It is the world's first example of the inclusion of white phosphorus in the biosphere cycle of elemental phosphorus. Obviously, bacteria consume dissolved products of white phosphorus oxidation (phosphate, phosphite and hypophosphite) and thus shift chemical

equilibrium towards its further oxidation. It noticeably accelerates the process of white phosphorus detoxification. The nature and contents of the white phosphorus oxidation products have been studied by ^{31}P NMR method. It is shown that the resistance of microorganisms cultures to white phosphorus depends on their taxonomic affiliation. Fungi of the *Trichoderma* genus are adapted to it better than *Aspergillus*, *Aspergillus* are adapted better than streptomycetes and streptomycetes, in turn, is better than the bacteria of the genus *Pseudomonas*. Comparing the two *Streptomyces* cultures, we have shown that resistance to white phosphorus is a sign that can be enhanced or weakened depending on culture conditions. The highest concentration in experiments corresponds to 5000 times excess of MPC of white phosphorus in wastewater!

Key words: biodegradation, detoxication, white phosphorus, *Streptomyces* sp., *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, culture medium, selection.

Citation: 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. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-31 [In Russian]

Биодеградация становится одним из наиболее популярных и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, зачастую очень токсичных [Mogensen et al., 2003]. Главное преимущество биодеградации, по сравнению с многочисленными иными методами обезвреживания стоков, заключается в том, что при ее использовании в окружающую среду не вносятся новые химические загрязняющие агенты.

Целью проведенного нами исследования являлось обезвреживание при помощи микроорганизмов белого фосфора – одного из самых опасных веществ, применяемых в крупнотоннажном химическом производстве. В литературных источниках не найдено сведений о доказанных примерах биологической деградации белого фосфора. Предыдущие работы нашего коллектива [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2018] позволили пролить свет на практически неизученный вопрос токсичности белого фосфора для прокариот. Нами впервые произведен посев устойчивой микрофлоры в искусственную культуральную среду, содержащую в качестве единственного источника фосфора белый фосфор, и наблюдался рост в этой среде. То есть наблюдалось включение белого фосфора в клеточный метаболизм фосфора у микроорганизмов. Кроме того, наблюдалась адаптация микрофлоры к возрастающим концентрациям белого фосфора в средах.

Посевы производились в модифицированную среду Придхем-Готлиба. Состав (в перерасчете на 1 л): глюкоза – 5 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.64 г, MgSO_4 – 0.49 г, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02 г, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.15 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.27 г, агар – 4 - 8 г (полужидкая), источник Р – белый фосфор (P_4). В модификацию среды, содержащей источники

фосфора, добавляли также фосфаты (в перерасчете на 1 л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 7.4 г, KH_2PO_4 – 2.38 г.

Классическая среда Придхем-Готлиба не содержит источники углерода: в качестве таковых выступают нефтепродукты. Наша модификация включает глюкозу, но не содержит источники фосфора (в качестве такового выступает белый фосфор). Посев *Aspergillus niger*, споры которого были внесены вместе с белым фосфором, производили в среду, содержащую белый фосфор в концентрации 0.01 и 0.05% по массе. В контрольные среды $\text{K}(+)$ вносился фосфат. В контрольные среды $\text{K}(-)$ источники фосфора не вносились. Произвели посев выросших *A. niger* в контрольные среды $\text{K}(+)$ и $\text{K}(-)$. Второй пересев *A. niger* произведен в среды аналогичного состава, третий – в среды с увеличенной концентрацией белого фосфора: 0.05, 0.1 и 0.2% по массе. Аналогично был произведен посев *Streptomyces* sp. А8. Четвертый пересев проводился в среды с концентрацией белого фосфора 0.1, 0.5 и 1% по массе. В этом посеве, помимо аспергилла и стрептомицета, высевался гриб *Trichoderma asperellum* F-1087, любезно предоставленный кафедрой биохимии ИФМиБ КФУ. Посев проводился в среды с концентрацией белого фосфора: 0.05, 0.1 и 0.2% по массе. Пересев *Streptomyces* sp. был произведен через 28 суток (одновременно с четвертым посевом аспергилла) в среды с концентрацией белого фосфора: 0.5, и 1% по массе. Пятый и шестой пересевы были произведены в среды с теми же самыми концентрациями P_4 . Одновременно с шестым пересевом был произведен третий пересев *Streptomyces* sp. А8. Посев проводился в среды с концентрацией белого фосфора 0.2%, а также 0.5% по массе, при которой стрептомицет ранее не рос. Также, одновременно с ними, был произведен третий пересев *Trichoderma asperellum* F-1087. Тем не менее, аспергилл был

также посеян в среду с 1% белого фосфора, на которой ранее не рос. Седьмой пересев *A. niger* был произведен в среды с теми же самыми концентрациями P_4 , что и в предыдущем. Одновременно был произведен четвертый пересев *Streptomyces* sp. A8. Посев проводился в среды с концентрацией белого фосфора 0.5% по массе, а также 1% по массе, при которой стрептомицет ранее не рос. Также, одновременно с ними, был произведен четвертый пересев *T. asperellum* F-1087.

В посеве с *Aspergillus niger* на следующие сутки отмечалось образование черного осадка, предположительно, фосфидов, который на пятые сутки полностью исчез. Следует учесть, что среда Придхем-Готлиба богата ионами переходных металлов, в присутствии которых белый фосфор неустойчив и легко диспропорционирует до нерастворимых фосфидов и водорастворимых солей кислородсодержащих кислот фосфора [Prabusankar et al., 2010]. По всей видимости, споры плесневого гриба попали в среды с навесками белого фосфора: перед внесением в среду он не подвергался стерилизации в автоклаве при 120°C по причине высокого риска работы с этим веществом, особенно при нагреве. В средах с 0.01% белого фосфора выросло множество мелких колоний *A. niger*, а в средах с 0.05% - меньшее число колоний, но более крупных. По всей видимости, это означает, что в среде с большей концентрацией ксенобиотика не все споры смогли прорасти.

На пятые сутки пересевали культуру *A. niger*, выросшую при 0.05% белого фосфора, в контрольные среды K(+) и K(-). Через шесть суток после посева наблюдалась следующая картина. В среде K(+) с фосфатом выросло значительное число сравнительно мелких колоний: это означает, что большинство спор проросло, что естественно в благоприятных условиях. В среде K(-) без источников фосфора колонии выросли немногочисленные, занимающие сравнительно большую площадь, но очень слабые (практически прозрачные, с неразвитым мицелием и отдельными конидиеносцами, выглядящими, как россыпь черных точек, а не сплошное черное поле). По всей видимости, сказалась нехватка фосфора: агар, используемый для приготовления среды, содержит примесь фосфата, но недостаточную для полноценного роста грибов (рис. 1). Известно, что растения и микроорганизмы в природных условиях часто испытывают фосфорное голодание, и вырабатывают к нему ряд адаптаций. Причем, согласно [Киселева, Котлова (Kiseleva, Kotlova), 2008], микроорганизмы выдерживают более жесткий дефицит фосфора, что и наблюдалось нами. Любопытно, что в среде с 0.05% белого фосфора колоний выросло меньше, чем в K(+), однако они

производят впечатление совершенно нормальных, не испытывающих дефицит питательных веществ. Отсюда следует вывод, что в среде с белым фосфором выживают не все споры гриба, но выжившие обладают способностью использовать в качестве источника фосфора либо сам белый фосфор, либо продукты его химических превращений. Значительный размер колоний, выросших в присутствии P_4 , объясняется менее жесткой конкуренцией между немногими адаптировавшимися культурами.



Рис. 1. Первый пересев устойчивых грибов *A. niger*. Слева – среда без источника фосфора: в ней наблюдался рост 33 ослабленных колоний. Вверху – среда с фосфатом: наблюдался рост 49 спорообразующих колоний *A. niger*. Справа – среда с 0.05% белого фосфора: наблюдался рост 11 крупных спорообразующих колоний *A. niger*. Чашки сфотографированы через шесть суток после пересева.

Fig. 1. The first re-inoculation of resistant fungi *A. niger*. To the left is the medium without a source of phosphorus: in it, 33 weakened colonies observed. Above is a medium, containing phosphate: growth of 49 spore-forming colonies of *A. niger* was observed. On the right is a medium with 0.05% white phosphorus: there were 11 large spore-forming colonies of *A. niger*. Photographs were taken six days after the inoculation.

После второго пересева, произведенного через 63 дня после первого посева, наблюдается интенсивный рост аспергилла в среде, содержащей 0.01 и 0.05% белого фосфора. Судя по всему, среда с 0.01% белого фосфора более благоприятна для роста грибов: на четвертый день после посева колонии уже приобрели характерную черную окраску, свидетельствующую о спороношении. В среде с 0.05% P_4 колонии на четвертый день еще только приступают к размножению и имеют светлую окраску. Поскольку черный цвет *A. niger* придают споры, светлая окраска свидетельствует о пониженной фертильности

плесневого гриба, растущего при высокой концентрации P_4 .

Очередной (третий) пересев на 84 день после первого посева, был произведен в среды с более высокой концентрацией белого фосфора, с целью адаптации гриба к ней. Были выбраны концентрации 0.05, 0.1 и 0.2% P_4 . Последняя, самая высокая, концентрация ранее нами никогда не использовалась. Согласно [Barber, 1996], она соответствует тысячекратному превышению ПДК белого фосфора в сточных водах! Тем не менее, даже при столь высоком содержании белого фосфора в среде наблюдался интенсивный рост колоний гриба. На четвертый день после посева при всех трех концентрациях белого фосфора наблюдалось начало спороношения, но при 0.1 и 0.2% P_4 грибы отставали в развитии по сравнению с 0.05%. Возможно, использованные концентрации исследуемого токсиканта отрицательно сказываются на фертильности грибов, хотя полностью не подавляют ее. Тем не менее, результаты посева позволяют заключить, что черный аспергилл легко переносит присутствие белого фосфора в среде даже в концентрации 0.2%.

Четвертый пересев аспергилла (и второй стрептомицетов) был произведен через 112 суток после первого посева. Концентрацию белого фосфора в среде снова увеличили до 0.5 и 1% по массе. При внесении столь большого количества P_4 густой черный осадок в средах выпадает моментально. Среда издает сильный специфический запах белого фосфора даже спустя несколько суток после посева. Через сутки рост посеянных микроорганизмов еще не наблюдался. Через четверо суток в среде с содержанием белого фосфора 0.5% наблюдался рост мелких колоний аспергилла, имеющих еще белый цвет (то есть рост сильно замедлен). В средах с 1% белого фосфора через четверо суток после посева рост не наблюдался. По-видимому, выпавший черный осадок фосфидов перевел в нерастворимую форму микроэлементы, присутствующие в среде и необходимые для роста микроорганизмов. Следует отметить, что по [Barber, 1996], концентрация белого фосфора 0.5% соответствует 2500 ПДК! Кроме того, был посеян гриб *Trichoderma asperellum* F-1087 при концентрации 0.1, 0.5 и 1%. Через четверо суток в среде с самой малой концентрацией выросла одна крупная колония триходермы, т.е. данный гриб тоже способен усваивать белый фосфор. Грибы развиваются очень медленно. По-видимому, данные концентрации белого фосфора близки к предельным, при которых еще возможен рост грибов. Рост стрептомицетов при 0.5% не наблюдается и спустя 19 суток после посева. На восьмые сутки на поверхности колоний аспергилла наблюдается

россыпь спор, т.е. гриб сохранил способность к размножению! На восьмые же сутки наблюдается рост колонии триходермы на белом фосфоре в концентрации 0.5%. В средах с 1% P_4 рост триходермы стал наблюдаться только на 11 сутки после посева. В случае триходермы прослеживается четкая зависимость: чем выше концентрация белого фосфора в субстрате, тем медленнее растет гриб. На 12 сутки после посева при 0.1% белого фосфора гриб уже сформировал воздушный мицелий и имеет розовую окраску, при 0.5% колония еще бесцветная, но уже всплыла на поверхность субстрата и имеет форму, близкую к правильному кругу, а при 1% колония состоит из субстратного мицелия.

Триходерма *T. asperellum* F-1087 проявила большую устойчивость к белому фосфору, чем *A. niger* и тем более стрептомицеты. На восемнадцатые сутки после посева приобрела окраску и начала спороносить триходерма при 0.5% белого фосфора. Следует особо подчеркнуть, что триходерма адаптировалась к таким высоким концентрациям белого фосфора сразу, без предварительного культивирования с рядом пересевов. Ранее данный штамм гриба никогда не выращивался в присутствии белого фосфора. Напомним о том, что концентрация белого фосфора 1% это превышение ПДК в сточных водах в 5000 раз!

Третий пересев *Streptomyces* sp. впервые продемонстрировал рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору в процессе селекции. На 22 сутки после посева наблюдался рост стрептомицета в среде, содержащей 0.5% белого фосфора! В предыдущих посевах *Streptomyces* sp. рос при концентрациях не более 0.2%. Разумеется, рост начался после длительной задержки. Даже на 20 сутки после посева признаки роста были неочевидными. На 22 сутки стрептомицет представлял собой субстратный мицелий.

На 27 сутки после шестого посева *A. niger* наблюдается начало роста гриба в среде с 1% белого фосфора. В предыдущих посевах максимальная концентрация белого фосфора, при которой рос аспергилл, составляла 0.5%. То есть, *A. niger*, как и стрептомицет, после нескольких пересевов выработал значительно большую устойчивость по сравнению с изначальной. Итак, наилучшую приспособляемость к белому фосфору проявили именно стрептомицеты. Через пять последовательных посевов их устойчивость возросла пятикратно. Грибы растут и адаптируются медленнее (у аспергилла после восьми посевов устойчивость выросла вдвое), однако их устойчивость изначально была выше, чем у актиномицетов, особенно у триходермы [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2015].

В опытном спектре ^{31}P ЯМР, снятом с водной фазы, проявились сигналы в области 0.3, 3.7 и 6.2 ppm, соответствующие фосфиту и гипофосфиту. Таким образом, он соответствует соединениям, которые, предположительно, являются метаболитами белого фосфора, т.е., является подтверждением предполагаемого нами метаболического пути. Спектр, снятый с контрольного образца одновременно с опытным, на том же приборе и в тех же условиях, не содержит аналогичные сигналы [Миндубаев и др. (Mindubaev et al.), 2017]. Это служит доказательством того, что обнаруженные

соединения действительно являются метаболитами белого фосфора. Ниже мы приводим предполагаемую схему метаболизма белого фосфора (рис. 2). Разумеется, она достаточно упрощена. Нам еще ничего не известно о задействованных в метаболизме элементарного фосфора ферментных системах, поэтому они не указаны. Со временем, без сомнения, схема будет дополняться.

Поскольку мы не нашли в литературе сведения о микроорганизмах, устойчивых к P_4 , представленная работа обладает новизной.

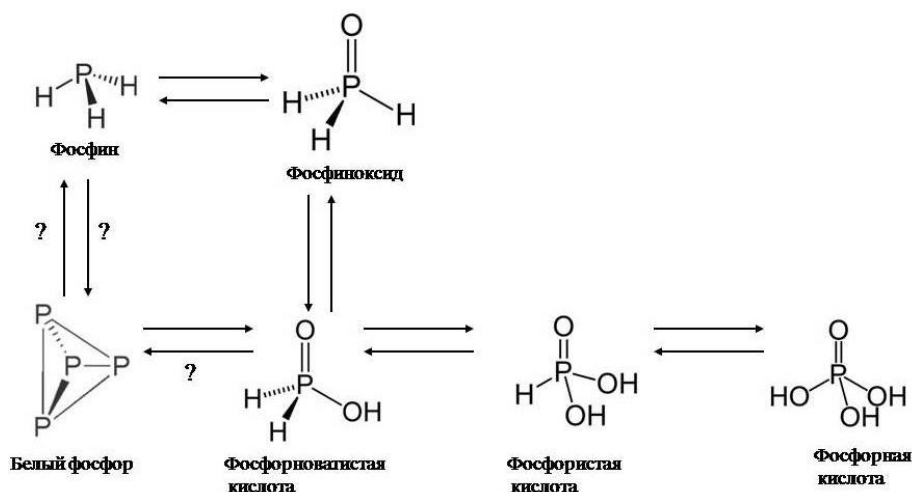


Рис. 2. Предполагаемый метаболический путь белого фосфора (знаком вопроса обозначены еще не обнаруженные превращения).

Fig. 2. Alleged scheme of white phosphorus metabolism (the question sign indicates not yet detected transformations)

Литература

1. Киселева М.А., Котлова Е.Р. Влияние длительного фосфорного голодания на мембранные липиды свободноживущего и симбиотических видов *Pseudococcolithus* (Chlorophyta). *Ботанический журнал*. 2008. Т. 93. №2. С. 88-97.
2. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Яхваров Д.Г. Микробиологическая деградация белого фосфора. *Экология и промышленность России*. 2018. Т. 22(1). С. 33-37. doi: 10.18412/1816-0395-2018-1-33-37
3. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Валидов Ш.З., Сапармырадов К.А., Хаяров Х.Р., Бадеева Е.К., Барсукова Т.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г. Обезвреживание белого фосфора посредством микробиологического разложения. *Бутлеровские сообщения*. 2017. Т. 52(12). С. 87-118. doi: jbc-01/17-52-12-87
4. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Кулик Н.В., Алимова Ф.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Сапармырадов К.А., Хаяров Х.Р., Яхваров Д.Г. Включение белого фосфора в природный круговорот веществ. *Культивирование устойчивой микрофлоры. Бутлеровские сообщения*. 2015. Т. 41(3). С. 54-81. doi: jbc-01/15-41-3-54
5. Barber J.C. Processes for the disposal and recovery of phosphy water. *United States Patent No US5549878*. August 27, 1996.
6. Mogensen A.S., Dolfing J., Haagensen F., Ahring B.K. Advances in biochemical engineering potential for anaerobic conversion of xenobiotics. *Biotechnology*. 2003. V. 82. P. 69-134. doi: 10.1007/3-540-45838-7_3
7. Prabusankar G., Doddi A., Gemel C., Winter M., Fischer R.A. P-P Bond activation of P_4 tetrahedron by group 13 carbenoid and its bis molybdenum pentacarbonyl adduct. *Inorg. Chem.* 2010. V.49(17). P.7976-7980. doi: 10.1021/ic1010743

References

1. Barber J.C. Processes for the disposal and recovery of phosphy water. *United States Patent No US5549878*. August 27, 1996.
2. Kiseleva M.A., Kotlova E.R. The effect of long-term phosphate starvation on the membrane lipids of free-living and symbiotic *Pseudococcomyxa (Chlorophyta)*. *Botanicheskiy Zhurnal*. 2008. V.93(2). P. 88-97. (In Russian).
3. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Babynin E.V., Badeeva E.K., Khayarov Kh.R., Minzanova S. T., Yakhvarov D.G. Microbiological degradation of white phosphorus. *Ecology and Industry of Russia*. 2018. V. 22(1) P. 33-37. doi: 10.18412/1816-0395-2018-1-33-37 (In Russian).
4. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Babynin E.V., Validov Sh.Z., Saparmyradov K.A., Khayarov Kh.R., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A., Yakhvarov D.G. Neutralization of white phosphorus by means of microbiological decomposition. *Butlerov Communications*. 2017. V. 52(12). P. 87-118. roi: jbc-01/17-52-12-87 (In Russian).
5. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Gorbachuk E.V., Kulik N.V., Alimova F.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Saparmyradov K.A., Khayarov K.R., Yakhvarov D.G. The inclusion white phosphorus in the natural cycle of matter. Cultivation of resistant microorganisms. *Butlerov Communications*. 2015. V. 41(3). P. 54-81. roi: jbc-01/15-41-3-54 (In Russian).
6. Mogensen A.S., Dolfing J., Haagensen F., Ahring B.K. Advances in biochemical engineering potential for anaerobic conversion of xenobiotics. *Biotechnology*. 2003. V. 82. P. 69-134. doi: 10.1007/3-540-45838-7_3
7. Prabusankar G., Doddi A., Gemel C., Winter M., Fischer R.A. P-P Bond activation of P₄ tetrahedron by group 13 carbenoid and its bis molybdenum pentacarbonyl adduct. *Inorg. Chem*. 2010. V.49(17). P.7976-7980. doi: 10.1021/ic1010743