

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

О биологической деградации белого фосфора

Миндубаев А.З.¹, Бабынин Э.В.², Волошина А. Д.¹, Акосах Йав Абайе², Сапармырадов К. А.², Минзанова С.Т.¹, Миронова Л.Г.¹, Бадеева Е.К.¹

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.

²ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия.

E-mail: mindubaev-az@yandex.ru

Аннотация

Впервые произведены посевы микроорганизмов различных таксономических групп (грибов, стрептомицетов и бактерий) на синтетические культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. На 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. Самая высокая концентрация соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз. Сравнение последовательностей рибосомных генов гриба, устойчиво метаболизирующего белый фосфор, с последовательностями базы данных GenBank, позволило идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм *Aspergillus niger*, которому мы присвоили номер *A.niger* AM1. Посев *A. niger* AM1 в среду, содержащую сразу два источника фосфора (фосфат и белый фосфор) продемонстрировал, что P₄ не проявляет токсические свойства по отношению к этому микроорганизму. В присутствии белого фосфора он растет с такой же скоростью, как в его отсутствие. Это единственный пример отсутствия токсичности белого фосфора для живого организма. Наши предыдущие исследования продемонстрировали отсутствие токсичности белого фосфора для *Aspergillus niger* AM1. Тем не менее, токсические свойства веществ имеют различную природу. Очень большой интерес представляет исследование генотоксичности – возможного источника мутаций. В представленной работе SOS-lux тест продемонстрировал генотоксичность белого фосфора. Несмотря на то, что

величина ДНК повреждающей активности оказалась низкой, этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у белого фосфора. Allium тест показал митотоксическое действие белого фосфора на клетки эукариот. Очень интересным и неожиданным результатом стало появление мутантной культуры *Aspergillus niger* AM1, более интенсивно растущей в среде с белым фосфором по сравнению с предковым штаммом, и обладающей необычной морфологией. Три штамма *A. niger*, присланные из Всероссийской коллекции микроорганизмов, так же продемонстрировали намного более высокую устойчивость к белому фосфору, чем бактерии. По предварительным данным, устойчивость к белому фосфору у *A.niger* закреплена в геноме.

Ключевые слова: биodeградация, белый фосфор, *Streptomyces* sp. A8, *Aspergillus niger* AM1, *Trichoderma asperellum* F-1087, культуральные среды, рост устойчивости, генотоксичность, морфологическое описание.

Mindubaev Anton Z., Babynin Edward V., Voloshina Alexandra D., Akosah Yaw Abayie, Saparmyradov Keremli A., Minzanova Salima T., Mironova Lubov' G., Badeeva Elena K.

On the biological degradation of white phosphorus

¹ *Institute of Organic and Physical Chemistry named after A.E. Arbuzov. Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Arbuzov St., 8. Kazan, 420088. Republic of Tatarstan. Russia.*

E-mail: mindubaev-az@yandex.ru

² *Kazan (Volga Region) Federal University. University St., 18. Kazan, 420008. Republic of Tatarstan. Russia.*

Abstract

For the first time different taxonomic groups of microorganisms (fungi, *Streptomyces* and bacteria) 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. The highest concentration corresponds to 5000 times excess of MPC

of white phosphorus in wastewater. The comparison of the sequences of ribosomal genes of the fungus, steadily metabolizing the white phosphorus, with sequences of the GenBank database, allowed us to identify this microorganism as a new strain of *Aspergillus niger*, to which we have assigned the number *A. niger* AM1. Inoculation of *A. niger* AM1 in medium containing just two sources of phosphorus (phosphate and white phosphorus) demonstrated that P₄ 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. This is the only example of the lack of white phosphorus toxicity to a living organism. Our previous studies have demonstrated the absence of white phosphorus toxicity for *Aspergillus niger* AM1. However, the toxic properties of the substances are of different nature. It is of great interest to study the genotoxicity – a possible source of mutations. In the present work SOS-lux test has demonstrated genotoxicity of white phosphorus. This result is obtained for the first time – all the available literature sources reported no genotoxic properties of white phosphorus. Allium test showed the mitotoxic effect of white phosphorus on eukaryotic cells. A very interesting and unexpected result was the discovery of a mutant *Aspergillus niger* AM1. In comparison with an ancestral strain this mutant possesses an unusual morphology and grows more intensively in culture medium with white phosphorus. Three strains of *A. niger*, sent from the All-Russian collection of microorganisms, also showed much higher resistance to white phosphorus than bacteria. According to preliminary data, resistance to white phosphorus the *A. niger* is fixed in the genome.

Key words: *Aspergillus niger* AM1, *Streptomyces* sp. A8, *Trichoderma asperellum* F-1087, white phosphorus, biodegradation, cultural mediums, selection, genotoxicity, morphological description.

Актуальность

Основанная на поразительных совершенстве и гибкости метаболических путей [25, 36] микробов, биодegradация является одним из наиболее значимых и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков [2, 35]. На рисунке 1 внизу продемонстрирована показательная схема усвоения сразу нескольких токсичных веществ в едином метаболическом пути, демонстрирующая совершенство биохимии микроорганизмов, изображенная на основе литературных источников [14, 15, 21, 23, 27-30, 33, 37, 38]. Включение сразу двух токсичных ксенобиотиков (формальдегид и синильная кислота) в состав сахаров и

аминокислот, является, пожалуй, наиболее показательным примером биодegradации. Это является весомым фундаментальным аргументом в пользу возможности биодegradации даже такого опасного ксенобиотика, как белый фосфор.

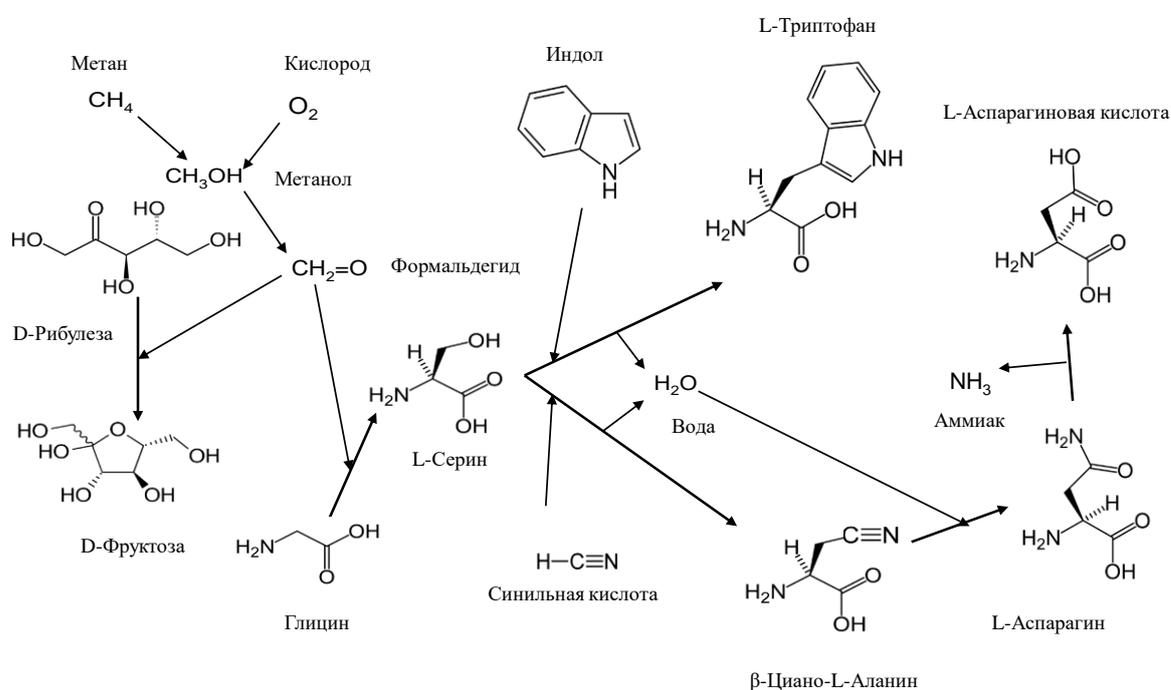


Рис. 1. Вверху. Многоликость фосфора. Слева вверху: взрыв фосфорного боеприпаса (изображение с сайта <http://cubasi.com>). Справа вверху: предельно окисленная форма фосфора – фосфат – является подкормкой для растений и играет важнейшую роль в существовании абсолютно всех форм жизни. Изображение с сайта <https://www.namastekisan.com> Внизу. Включение формальдегида, цианида и индола в состав сахаров и аминокислот – убедительный пример биодegradации. Синтез метанола из метана (который сам является продуктом микробного метаболизма [2, 8, 34]) осуществляется метанотрофными бактериями, серина и фруктозы из метанола – некоторыми метилотрофными бактериями и дрожжами, триптофана из индола – бактериями, растениями и грибами, β -циано-L-аланина из

синильной кислоты и серина – бактериями Chromobacterium violaceum, аспарагина из цианоаланина – рядом растений. Рисунок А.З. Миндубаева.

Белый фосфор P_4 – одно из самых опасных веществ, применяемых в крупнотоннажном химическом производстве [18]. Вместе с тем, он широко применяется в промышленности и является ключевым соединением при производстве фосфорных удобрений, лекарств, полимеров и ряда других практически значимых веществ и материалов. Несмотря на официальный запрет, применяется белый фосфор и в военных целях (рис. 1, вверху слева) [11]. Поэтому существует возможность попадания этого вещества в окружающую среду.

В то же время, у элемента фосфора есть уникальное качество – будучи сильнейшим ядом в виде простого вещества, в окисленном состоянии он абсолютно необходим для всех форм жизни (рис. 1, вверху справа). Таким образом, представляется целесообразным использовать это свойство для полной детоксикации исходного P_4 . Целью проведенного нами исследования являлась переработка загрязнителя окружающей среды белого фосфора при помощи микроорганизмов. В литературных источниках не найдено сведений о доказанных примерах биологической деградации элементного фосфора. Предыдущие работы нашего коллектива [3-5, 9-12] 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 природный круговорот этого элемента. Кроме того, наблюдалась адаптация микроорганизмов к возрастающим концентрациям белого фосфора в средах.

Материалы и методы исследования

Штамм *S. sp.* А8 выделен в среде Гаузе 1 с минеральным азотом, из осадка сточных вод Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани, после предварительного добавления в него эмульсии белого фосфора [5]. Штамм *Aspergillus niger* АМ1 выделен из культуральной среды с добавлением нестерильной эмульсии белого фосфора. Белый фосфор приобретен в ПАО «Химпром» (г. Новочебоксарск). Имеет техническую чистоту. Куски этого вещества хранились в банке из темного стекла, заполненной водой. *Trichoderma asperellum* F-1087 любезно предоставлена из коллекции кафедры биохимии ИФМиБ КФУ.

Посевы производились в модифицированную среду Придхем-Готлиба. 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 *A. niger* AM1, *T. asperellum* F-1087 и *Streptomyces* sp. A8 осуществляли в виде спор, бактерии в виде вегетативных клеток. Взвесь спор содержала 10^8 грибковых тел в мл, вносилась по 0.2 мл на 20 мл среды. Культуры выращивали в колбах в 20 мл питательной среды без перемешивания и чашках Петри. Культивирование производилось в термостате, при 25°C.

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 К (+) вносился фосфат. В контрольные среды К (-) источники фосфора не вносились. Произвели посев выросших *A. niger* в контрольные среды К (+) и К (-). 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. A8. 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 *T. asperellum* F-1087. Посев проводился в среды с концентрацией белого фосфора: 0.05, 0.1 и 0.2% по массе. 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. Однако эксперимент был усложнен по сравнению с предыдущими. Культура *A. niger* AM1 выращивалась в чашках Петри. 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 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.

Генетический анализ проводился следующим образом. Образцы ДНК из культуры гриба *A. niger* AM1 выделялись по методике, описанной в [31]. 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 [32]. Полученную последовательность сравнивали с аналогичными последовательностями в базе данных GenBank с помощью программы BLAST. Для штамма A8 оценивалось сходство по нуклеотидным последовательностям 16S рДНК (амплификация праймерами fD1 и rP2) сравниваемых фрагментов стрептомицетов, выбранных из базы данных NCBI [20].

Пересев культуры *A. niger* AM1 произведен по стандартной схеме, в трех повторах. Через 49 суток во всех повторах колонии были покрыты черной россыпью спор. Это доказывает, что и в среде с белым фосфором аспергилл может сохранять нормальную фертильность. Обращает на себя

внимание тот факт, что в одном повторе колония стала развиваться быстрее, чем в других, хотя условия были совершенно идентичны. Возможно, это следствие мутации, обеспечившей лучшую приспособленность к необычным (и экстремальным) условиям существования.

Для сравнения устойчивости к белому фосфору нескольких культур черного аспергилла, применялся наш штамм *A. niger* AM1, а также три штамма из Всероссийской коллекции микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрыбина: FW-650, FW-2664 и FW-2731, выделенные из арктических вечномерзлых грунтов. Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия) по интенсивности поглощения света λ 550 нм. Максимальная концентрация белого фосфора достигала 1%. Для сравнения высевались культуры бактерий *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus firmus* и *Salmonella typhimurium*. Целью данных исследований являлось обнаружение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) белого фосфора для перечисленных микроорганизмов.

SOS-тест на генотоксичность был выполнен, как описано в работе [17]. Делали серию разведений среды, содержащей вначале 0.2% белого фосфора (2000 мкг/мл). 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 доводили концентрацию P_4 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 P_4 в различных концентрациях. В качестве позитивного контроля использовали митомицин С. Определяли интенсивность билюминесценции с помощью микропланшетного ридера Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Для каждой концентрации в каждой точке времени брали три пробы. Интенсивность билюминесценции измеряли в относительных световых единицах (ОСЕ) рассчитанных как число световых единиц в секунду, деленное на оптическую плотность клеточной культуры (OD) при 550 нм.

С целью оценки цитогенетического действия фосфора использовали тест-систему *Allium cepa*. На каждом препарате учитывали общее количество клеток, количество делящихся клеток, 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.

Для установления природы устойчивости аспергилла к P_4 произведен посев в среду с фосфатом в качестве источника фосфора. Подростшую культуру снова пересеяли в среду с 0.2% белого фосфора. В качестве

контроля посеяли также *A. niger* AM1, до этого росший в среде с белым фосфором.

Одной из серьезнейших проблем, с которой мы до сих пор сталкивались, производя посевы микроорганизмов в среды с белым фосфором, было отсутствие эффективного метода стерилизации последнего от присутствующих в нем спор *A. niger*. Был предложен метод стерилизации Р₄ в мягких условиях, без применения высоких температур. Для этого навеска ксенобиотика должна погружаться на 15 минут в липофильный органический растворитель, который легко проникает через гидрофобные оболочки микробных спор и умерщвляет их. Мы предпочли пользоваться ацетоном [18] по причине сравнительно низкой растворимости в нем белого фосфора. 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, влили в шленк 50 мл дистиллированной воды, стерилизованной автоклавированием. Затем приготовили 2% эмульсию белого фосфора в этой воде.

Очень интересно спонтанное появление в среде с белым фосфором культуры *A. niger* AM1 с измененной морфологией и окраской, быстрее растущей в среде с исследуемым ксенобиотиком. Возможно, это результат мутации и дальнейший этап адаптации микроорганизма к среде, содержащей белый фосфор.

Результаты исследований

В посевах с *A. 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 [16, 24]. По всей видимости, споры плесневого гриба попали в среды с навесками белого фосфора: перед внесением в среды он не подвергался стерилизации в автоклаве при 120 °С 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 переселили культуру *A. niger*, выросшую при 0.05% белого фосфора, в контрольные среды К (+) и К (–). Через шесть суток после посева наблюдалась следующая картина (табл. 1). В среде К (+) с фосфатом выросло значительное число сравнительно мелких колоний: это означает, что большинство спор проросло, что естественно в благоприятных условиях. В среде К (–) 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. Известно, что растения и микроорганизмы в природных условиях часто испытывают фосфорное голодание, и вырабатывают к нему ряд адаптаций. Причем, согласно [22], 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 P₄, объясняется менее жесткой конкуренцией между немногими адаптировавшимися культурами.

Таблица 1 – Рост грибов A. niger в средах с различными источниками фосфора через шесть суток после посева

Источник фосфора	Количество колоний A. niger	Внешний вид колоний
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O – 7.4 г, KH ₂ PO ₄ – 2.38 г	49	Мелкие спорообразующие
P ₄ 0.05% масс	11	Крупные спорообразующие
Нет	33	Крупные, спорообразование снижено

После второго посева, 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% P₄ 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 P₄.

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% P₄. Последняя, самая высокая, концентрация ранее нами никогда не использовалась. Согласно [26], 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% P₄ 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 P₄ 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 [26], концентрация белого фосфора 0.5% соответствует 2500 ПДК. Кроме того, был посеян гриб *T. 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% P₄ 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 бóльшую 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. А ПДК элементного фосфора в водных объектах хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования составляет всего 0.0001 мг/л, т.е. концентрация 1% превышает ее уже в сто миллионов ($1 \cdot 10^8$) раз [1]!

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 *S.* 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 бóльшую устойчивость по сравнению с изначальной. Итак, наилучшую приспособляемость к белому фосфору проявили именно стрептомицеты. Через пять последовательных посевов их устойчивость возросла пятикратно (рис. 2). 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.

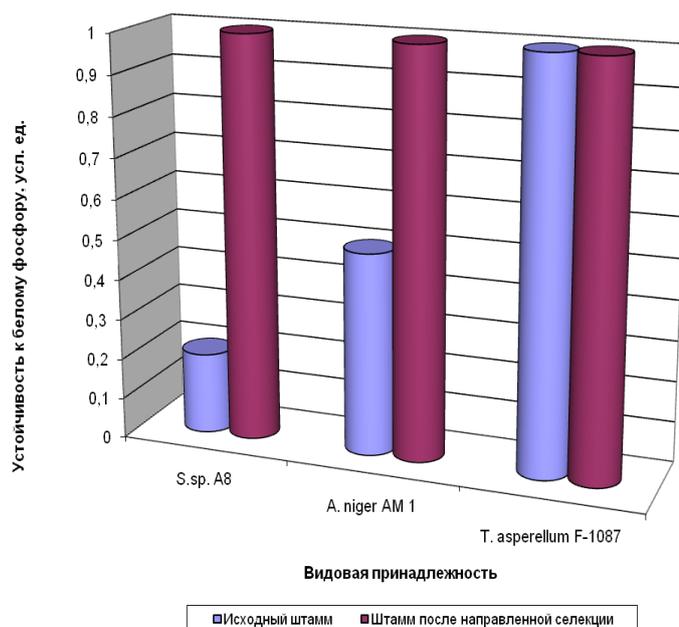


Рис. 2 – Адаптация и рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору после направленной селекции

Для генетической идентификации гриба, 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 [11], выявила 99% гомологию с ITS1 и ITS2 регионами описанных штаммов *Aspergillus niger* NJA-1 (Acc. KJ365316.1) и KAML02 (KC119204.1), что позволяет идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм *Aspergillus niger*. Ему мы присвоили номер *A. niger* AM1 [9]. Нуклеотидная последовательность штамма опубликована в базе данных GenBank, где ей присвоен номер KT805426. Для штамма A8 сходство по нуклеотидным последовательностям составляло 94–99.7%. В частности, наибольшее сходство – 99.74% – было установлено между изолятом A8 и *Streptomyces sampsonii*. К данному виду и предложено относить наш штамм.

На 12 сутки после посева *A. niger* AM1 в четыре варианта среды, наблюдалась следующая картина (рис. 3). В средах без источников фосфора рост практически не наблюдается (одна-две крошечные колонии без спороншения на чашку) (рис. 3, вариант 1). В средах с фосфатом аспергилл хорошо растет и споронсит, однако культура не чистая. В ней, помимо черных колоний аспергилла, присутствуют колонии других

микроорганизмов кремового и зеленого цветов (рис. 3, вариант 2). В средах с 0.2% белого фосфора колонии аспергилла имеют бледно-серый цвет (пониженная фертильность) (рис. 3, вариант 3). Очень интересный результат показал четвертый вариант посева – с белым фосфором и фосфатом (рис. 3, вариант 4). Колонии растут очень хорошо, даже более развитые, чем в среде с фосфатом, причем в двух случаях из трех выросла чистая культура (в одном появилась кремовая 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.



Рис.3. Первый пересев устойчивых *A. niger* AM1
Варианты: 1 – среда без источников фосфора; 2 – с фосфатом;
3 – с белым фосфором (0.2%); 4 – с 0.2% P_4 и фосфатом

Судя по всему, 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 аспергилла и в среде без источников фосфора, за счет очень незначительного количества фосфата, присутствовавшего в агаре.

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. Это служит доказательством того, что обнаруженные соединения действительно

являются метаболитами белого фосфора. Ниже мы приводим предполагаемую схему метаболизма белого фосфора (рис. 4). 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.

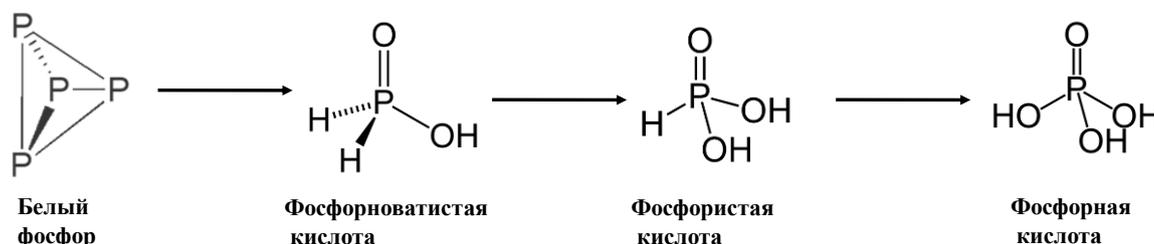


Рис. 4 – Предполагаемый метаболический путь белого фосфора.

На 53 день между лидирующей в росте культурой и остальными накопилось еще больше различий. Через 55 суток после посева лидирующая культура стала вырабатывать пигмент и приобретать более насыщенную желтую окраску (рис. 5). Колонии в остальных двух повторах растут медленнее, и имеют гораздо более светлую окраску. Окрасилась не только колония, но и культуральная среда, т.е. пигмент хорошо растворим в воде.



Рис. 5 – Второй посев *A. niger* AM1. Крайняя справа колба - стерильная среда. Крайняя слева – культура аспергилла, отличающаяся от прочих усиленным ростом («рыжий гриб»). Обращает на себя внимание необычно яркая окраска этой культуры. Две колбы в центре – остальные повторы посева, растущие медленнее. Снимок сделан через 73 суток после посева.

Культура, судя по виду и окраске спор, безусловно, является черным аспергиллом, но морфология колонии необычная. Воздушный мицелий низкий, споры формируются почти на поверхности среды. В первые двое суток культура отличалась от предковой выделением в среду желтого пигмента, но после созревания спор становилась такой же черной и неотличимой. Это является еще одним свидетельством того, что в культуре

произошла мутация. Детальное изучение морфологии этого аспергилла продемонстрировало его сходство с предковым АМ1. А судя по тому, что морфологически измененный гриб эффективнее набирал биомассу в среде с белым фосфором, эта мутация повышает его приспособленность к существованию в данной среде. Мы назвали этот штамм АМ2.

Оказалось, что все четыре штамма *A. niger* выдерживают концентрацию белого фосфора 1%. МИК для них так и не была найдена. По-видимому, высокая устойчивость к белому фосфору – признак, характеризующий все или многие черные аспергиллы. Тем не менее, при концентрациях 0.5 и 0.25% штамм АМ1 рос быстрее, т.е. оказался более устойчивым (рис. 6). Для бактерий МИК была найдена и составила для *A. xylosoxidans* 0.125%, *B. firmus* 0.25%, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. typhimurium* 0.5%. Из этого следует вывод, что черные аспергиллы более устойчивы к белому фосфору по сравнению с бактериями.

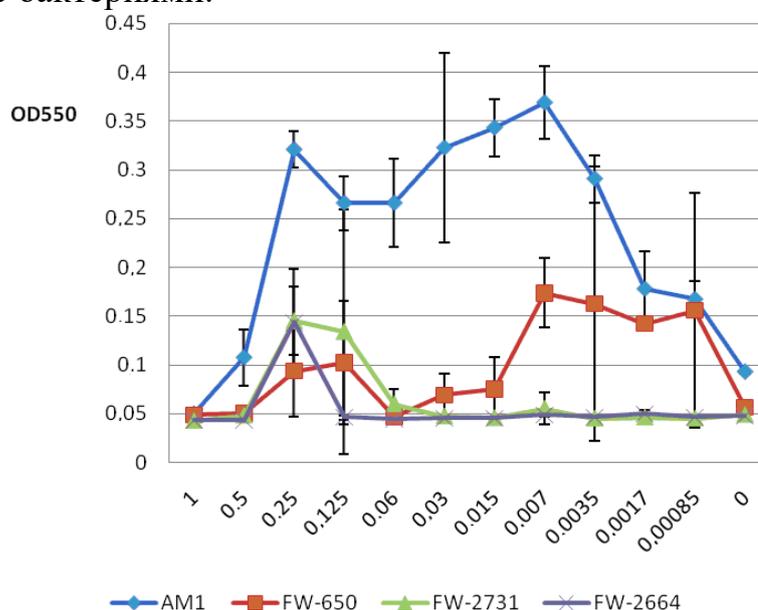


Рис. 6 – Сравнение роста четырех штаммов *A. niger* в присутствии белого фосфора. На оси абсцисс указаны концентрации P_4 в %, на оси ординат оптическое поглощение при λ 550 нм. Заметно, что штамм АМ1 намного более устойчив к белому фосфору по сравнению со штаммами из ВКМ.

Ожидалось, что после роста в благоприятных условиях – в среде с фосфатом – *A. niger* АМ1 мог утратить устойчивость к белому фосфору. В действительности, гриб, росший до пересева на фосфате, продолжал расти. 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 .

В стерильных средах рост отсутствовал даже спустя 117 дней, они остались прозрачными без опалесценции и взвесей. Это указывает на то, что стерилизация навесок P_4 ацетоном эффективна.

В представленной работе SOS-lux тест продемонстрировал генотоксичность белого фосфора [7]. Несмотря на то, что величина ДНК повреждающей активности оказалась низкой (рис. 7), этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у белого фосфора. Показано, что у смеси белого фосфора и перекиси водорода генотоксичность резко возрастает по сравнению с одним белым фосфором, т.е. продукты окисления P_4 пероксидом, по-видимому, обладают большей генотоксичностью по сравнению с исходным веществом. Наибольшую ДНК повреждающую активность белый фосфор проявляет в диапазоне концентраций 25-250 мкг/мл.

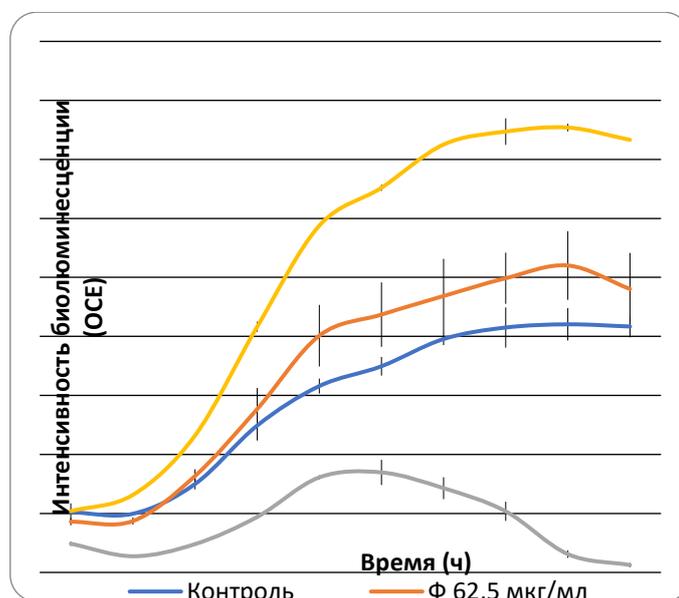


Рис. 7 – Влияние белого фосфора на SOS-индукцию с перекисью водорода и негативным контролем (среда без мутагена)

Показано, что корешки лука в присутствии белого фосфора отставали в росте. Установлено также, что присутствие P_4 существенно снижает митотическую активность тканей по сравнению с контролем и, следовательно, обладает митотоксической активностью. Анализ соотношений фаз митоза показал увеличение доли клеток на стадии профазы с соответствующим уменьшением процентного отношения других стадий (табл. 2). Это может быть связано с блокировкой деления клеток в конце стадии профазы.

Таблица 2 – Митотический индекс при различных концентрациях белого фосфора

Характер митозов в клетках корешка лука	Контроль	Белый фосфор в концентрации, %		
		0.008	0.012	0.016
Число проанализированных клеток	6181	3378	4483	5426
Митотический индекс (MI)	7.25±1.15	3.31±0.88	2.35±0.65	1.35±0.25
М/Р (соотношение метафаза/профаза)	0.77	0.72	0.64	0.42
Процент aberrantных клеток (тип aberrаций)	0.78 (мост)	1.79 (отставание)	5 (отставание, фрагмент)	7.69 (мост)

Обнаружение у белого фосфора генотоксических свойств не является неожиданностью [6]. Тем не менее, в более ранних работах генотоксичность у P₄ обнаружена не была. Возможно, это результат недостаточной глубины исследования. Судя по всему, мы первые применили для этой цели Allium тест, и этим методом генотоксичность белого фосфора была продемонстрирована впервые.

Поскольку в литературе отсутствуют сведения о микроорганизмах, устойчивых к P₄, представленная работа имеет бесспорную новизну.

Заключение

Впервые показана возможность роста микроорганизмов из различных, далеких друг от друга таксономических групп, в культуральных средах, содержащих белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. Результатом стал полноценный рост плесневого гриба и актиномицета в среде, содержащей белый фосфор в концентрации, более, чем тысячекратно превышающей предельно допустимую концентрацию в сточных водах. Это открывает возможности селекции в сторону дальнейшего роста устойчивости и более эффективной утилизации отходов белого фосфора микроорганизмами. Вполне возможно, что концентрация 1% – это не предел, и после продолжительной селекции возможен рост организмов 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.

Но помимо практического аспекта данного исследования, бесспорно важнейшего, большое значение имеет и фундаментальный. Это первое наблюдение того, что опаснейший белый фосфор может служить пищей живым организмам, т.е. расширяются представления о приспособляемости живых организмов.

Литература

Миндубаев А. З., Бабынин Э. В., Волошина А. Д., Акосах Й. А., Сапармырадов К. А., Минзанова С. Т., Миронова Л. Г., Бадеева Е. К., О биологической деградации белого фосфора // «Живые и биокосные системы». – 2019. – № 28; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-28/article-1>

1. Алексеенко В.А., Бузмаков С.А., Панин М.С. Геохимия окружающей среды // Издательство Пермского государственного национального исследовательского университета, 2013. – 359 с.
2. Караева Ю.В., Тимофеева С.С., Миндубаев А.З. Исследование коферментации органических отходов и фитомассы щиряцы запрокинутой // Энергосбережение и водоподготовка, 2019. №1(117). – С. 50-53.
3. Миндубаев А.З. Кто съел полиэтилен? // Наука и жизнь, 2018. Т. 4. – С. 32-38.
4. Миндубаев А.З. От яда к удобрению // Наука и жизнь, 2019. №3. – С. 46-47.
5. Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордоаньи Д.М., Болормаа Ч., Кагиров Р.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. О разложении белого фосфора осадком сточных вод // Учен.зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки, 2011. Т.153. № 2. – С.110-119.
6. Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г. Фосфиноксид как предполагаемый интермедиат биологических процессов // Бутлеровские сообщения . 2018. Т. 53. №3. – С. 1-34.
7. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д. Генотоксичность и цитогенетическое действие белого фосфора // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2019. Т.9. №1. – С. 81-94.
8. Миндубаев А.З., Белостоцкий Д.Е., Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Алимова Ф.К., Миронова Л.Г., Коновалов А.И. Метаногенез: Биохимия, Технология, Применение // Ученые записки КГУ, Серия естественные науки, 2010. Т.152. Кн.2. – С.178-191.
9. 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.
10. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Яхваров Д.Г. Биодegradация белого фосфора // Природа, 2017. № 5. – С. 29-43.
11. Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Фосфор: свойства и применение // Бутлеровские сообщения, 2014. Т.39. №7. – С.1-24.
12. Способ детоксикации белого фосфора с применением штамма микроорганизмов *Trichoderma asperellum* ВКПМ F-1087: патент на изобретение 2603259 Рос. Федерация № 2015131380 (048333) Заявлен

28. 07. 2015 г. Опубликовано 27.11.2016. Бюл. 33. – 9 с.
13. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.*, 1990. Vol. 215. No. 3. – P. 403-410.
14. Brysk M.M., Corpe W.A., Hankes L.V. β -Cyanoalanine Formation by *Chromobacterium violaceum* // *J Bacteriol.*, 1969. Vol. 97. No. 1. – P. 322-327.
15. Buller A.R., Brinkmann-Chen S., Romney D.K., Herger M., Murciano-Calles J., Arnold F.H. Directed evolution of the tryptophan synthase β -subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation // *PNAS*, 2015. Vol. 112. No. 47. – P. 14599-14604.
16. Caporali M., Gonsalvi L., Rossin A., Peruzzini M. P_4 activation by late-transition metal complexes // *Chem.Rev.*, 2010. Vol.110. No.7. – P. 4178-4235.
17. 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.
18. Drews R.C. Acetone sterilization in ophthalmic surgery // *Ann. Ophthalmol.*, 1977. V. 9(6). – P. 781.
19. Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff I., Thampi S., Donkin S. Toxicological profile for white phosphorus // U.S. Department of health and human services. USA, 1997. – 248 p.
20. James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.-H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C., Wang Z., Wilson A.W., Schübler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G.W., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W.A., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny // *Nature*, 2006. Vol. 443. – P. 818-822.
21. Knowles K.J. Microorganisms and Cyanide // *Bacteriological Reviews*, 1976. Vol.40. No.3. – P.652-680.

22. Kulakovskaya T. Phosphorus storage in Microorganisms: Diversity and Evolutionary Insight // *Biochem Physiol.*, 2015. Vol. 4. No 1. e130. – P. 1-4.
23. Ma Q., Zhang X. Qu Y. Biodegradation and Biotransformation of Indole: Advances and Perspectives // *Frontiers in Microbiology*, 2018. Vol.9. No.2625. – P. 1-18.
24. Peruzzini M., de los Rios I., Vizza F., Romerosa A. Metal-assisted P-H bond formation: a step towards the hydrogenation of white phosphorus // *Eur J Inorg Chem.*, 2001. Vol.3. – P. 593-608.
25. Pietra F. Biodiversity and Natural Product Diversity // *Tetrahedron Organic Chemistry*, 2002. Vol.21. – 366 p.
26. Processes for the disposal and recovery of phosphy water. Patent USA US5549878. Reciprocity date: 24 05 1995. Published: 27 08 1996.
27. Raybuck S.A. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation // *Biodegradation*, 1992. Vol.3. No.1. – P. 3-18.
28. Rodgers P.B. Cyanide Metabolism and β -Cyanoalanine Formation by Washed, Non-proliferating Cultures of *Chromobacterium violaceum*: Studies with Radiolabelled Cyanide // *Journal of General Microbiology*, 1982. Vol. 128. No. 12. – P. 2983-2989.
29. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environmental Microbiology*, 2009. Vol. 11. No.10. – P. 2477-2490.
30. Sadeghiyan-Rizi T., Fooladi J., Sadrai S. Preliminary Study on Cost-Effective L-Tryptophan Production from Indole and L-Serine by *E. coli* Cells // *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2016. Vol. 8. No.4. – P. 188-192.
31. 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. – P. 2001 - 2344.
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1977. Vol. 74. No. 12. – P. 5463-5467.
33. Shima S., Warkentin E., Thauer R.K., Ermler U. Structure and Function of Enzymes Involved in the Methanogenic Pathway Utilizing Carbon Dioxide and Molecular Hydrogen // *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002. Vol. 93. N 6. – P. 519-530.
34. Van der Klei I.J. Yurimoto H., Sakai Y., Veenhuis M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006. Vol.1763. No.12. – P. 1453-1462.

35. Wackett L.P. The Metabolic Pathways of Biodegradation // The Prokaryotes, 2013. Vol.2. – P. 383-393.
36. Walsh C. Enabling the chemistry of life // Nature, 2001. Vol.409. No.6817. – P.226-231.
37. Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, Dissimilation, and Detoxification of Formaldehyde, a Central Metabolic Intermediate of Methylophilic Metabolism // The Chemical Record, 2005. Vol. 5. No.6. – P. 367-375.
38. Zagrobelny M., de Castro É.C.P., Møller B.L., Bak S. Cyanogenesis in Arthropods: From Chemical Warfare to Nuptial Gifts // Insects., 2018. Vol. 9. No. 51. – P. 1-39.

Literature

1. Alekseenko V.A., Buzmakov S.A., Panin M.S. Geochemistry of the environment // Publishing house of the Perm State National Research University. - 2013. - P. 359. (In Russian).
2. Karaeva J.V., Timofeeva S.S., Mindubaev A.Z. A study of cofermentation of organic wastes and *Amaranthus retroflexus* L. phytomass // Energysaving and watertreatment. - 2019. - No.1(117). P. 207 - 216. (In Russian).
3. Mindubaev A.Z. Who ate the polyethylene? // Nauka i Zhizn. 2018. - Vol. 4. - P. 32-38. (In Russian).
4. Mindubaev A.Z. From a poison to a fertilizer // Nauka I Zhizn. - 2019. - No.3. - P. 46-47 (In Russian).
5. Mindubaev A.Z., Akosah Y.A., Alimova F.K., Afordoanyi D.M., Kagirov R.M., Minzanova S.T., Mironova L.G., Yakhvarov D.G. On the White Phosphorus Degradation by Wastewater Mud // Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. - 2011. - Vol. 153. - No. 2. - P. 110-119. (In Russian).
6. Mindubaev A.Z., Akosah Y.A., Abaye A.Y., Yakhvarov D.G. Phosphine oxide as a prospective intermediate of biological processes // Butlerov Communications. - 2018. - Vol. 53. - No.3. - P. 1-34. (In Russian).
7. Mindubaev A. Z., Babynin E.V., Piskunov D.B., Makhyanov A.N., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Voloshina A.D. Genotoxicity and cytogenetic effect of white phosphorus // Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. - 2019. - Vol.9. - No.1. - P.81-94. (In Russian).

8. Mindubaev A.Z., Minzanova S.T., Mironov V.F., Zobov V.V., Alimova F.K., Mironova L.G., Belostotskii D.E., Konovalov A.I. The methanogenesis: biochemistry, technology, using // Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. - 2010. - Vol. 152. - No. 2. - P. 178-191. (In Russian).
9. 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. - Vol. 22. - Iss. 1. - P. 33-37. (In Russian).
10. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Validov Sh.Z., Yakhvarov D.G. Biodegradation of white phosphorus // Priroda. - 2017. - No. 5. - P. 29-43. (In Russian).
11. Mindubaev A.Z., Yakhvarov D.G. Phosphorus: properties and application // Butlerov Communications. - 2014. - Vol. 39. - No. 7. - P. 1-24. (In Russian).
12. Method for detoxification of white phosphorus using microorganism strain *Trichoderma asperellum* VKPM F-1087 Patent RF 2603259 Reciprocity date 28. 07. 2015. Registration number 2015131380 (048333). Published 27.11.2016. Bul. 33. - 9 p. (In Russian).
13. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. - 1990. - Vol. 215. - No. 3. - P. 403-410.
14. Brysk M.M., Corpe W.A., Hankes L.V. β -Cyanoalanine Formation by *Chromobacterium violaceum* // J Bacteriol. - 1969. - Vol. 97. - No. 1. - P. 322-327.
15. Buller A.R., Brinkmann-Chen S., Romney D.K., Herger M., Murciano-Calles J., Arnold F.H. Directed evolution of the tryptophan synthase β -subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation // PNAS. - 2015. - Vol. 112. - No. 47. - P. 14599–14604.
16. Caporali M., Gonsalvi L., Rossin A., Peruzzini M. P_4 activation by late-transition metal complexes // Chem.Rev. - 2010. - Vol.110. - No.7. - P. 4178-4235.
17. 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.
18. Drews R.C. Acetone sterilization in ophthalmic surgery // Ann. Ophthalmol. - 1977. - V. 9(6). - P. 781.

19. Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff I., Thampi S., Donkin S. Toxicological profile for white phosphorus // U.S. Department of health and human services. - USA. - 1997. - 248 p.
20. James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.-H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C., Wang Z., Wilson A.W., Schübler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G.W., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W.A., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny // Nature. - 2006. - Vol. 443. - P. 818-822.
21. Knowles K.J. Microorganisms and Cyanide // Bacteriological Reviews. - 1976. - Vol.40. - No.3. - P.652-680.
22. Kulakovskaya T. Phosphorus storage in Microorganisms: Diversity and Evolutionary Insight // Biochem Physiol. - 2015. - Vol. 4. - No 1. - e130. - P. 1-4.
23. Ma Q., Zhang X. Qu Y. Biodegradation and Biotransformation of Indole: Advances and Perspectives // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol.9. – No.2625. - P. 1-18.
24. Peruzzini M., de los Rios I., Vizza F., Romerosa A. Metal-assisted P-H bond formation: a step towards the hydrogenation of white phosphorus // Eur J Inorg Chem. – 2001. – Vol.3. – P. 593-608.
25. Pietra F. Biodiversity and Natural Product Diversity // Tetrahedron Organic Chemistry. - 2002. - Vol.21. - 366p.
26. Processes for the disposal and recovery of phosphy water. Patent USA US5549878. Reciprocity date: 24 05 1995. Published: 27 08 1996.
27. Raybuck S.A. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation // Biodegradation. - 1992. – Vol.3. – No.1. - P. 3-18.
28. Rodgers P.B. Cyanide Metabolism and β -Cyanoalanine Formation by Washed, Non-proliferating Cultures of *Chromobacterium violaceum*: Studies with Radiolabelled Cyanide // Journal of General Microbiology. - 1982. - Vol. 128. - No. 12. - P. 2983-2989.

29. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environmental Microbiology*. - 2009. - Vol. 11. - No.10. - P. 2477-2490.
30. Sadeghiyan-Rizi T., Fooladi J., Sadrai S. Preliminary Study on Cost-Effective L-Tryptophan Production from Indole and L-Serine by *E. coli* Cells // *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. - 2016. - Vol. 8. - No.4. - P. 188-192.
31. 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. - P. 2001 - 2344.
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. - 1977. - Vol. 74. - No. 12. - P. 5463-5467.
33. Shima S., Warkentin E., Thauer R.K., Ermler U. Structure and Function of Enzymes Involved in the Methanogenic Pathway Utilizing Carbon Dioxide and Molecular Hydrogen // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. - 2002. - Vol. 93. - N 6. - P. 519-530.
34. Van der Klei I.J., Yurimoto H., Sakai Y., Veenhuis M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2006. - Vol.1763. - No.12. - P. 1453-1462.
35. Wackett L.P. *The Metabolic Pathways of Biodegradation // The Prokaryotes*. - 2013. - Vol.2. - P. 383-393.
36. Walsh C. Enabling the chemistry of life // *Nature*. - 2001. - Vol.409. - No.6817. - P.226-231.
37. Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, Dissimilation, and Detoxification of Formaldehyde, a Central Metabolic Intermediate of Methylotrophic Metabolism // *The Chemical Record*. 2005. - Vol. 5. - No.6. - P. 367-375.
38. Zagrobelny M., de Castro É.C.P., Møller B.L., Bak S. Cyanogenesis in Arthropods: From Chemical Warfare to Nuptial Gifts // *Insects*. - 2018. - Vol. 9. - No. 51. - P. 1-39.