

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 *Aspergillus 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 [11]. 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 митомидин С. 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) рассчитанных как число световых единиц в секунду, деленное на оптическую плотность клеточной культуры (OD) при 550 нм.

Для установления природы устойчивости аспергилла к P_4 произведен посев в среду с фосфатом в качестве источника фосфора. Подросшую 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.

Мы впервые применили стерилизацию белого фосфора ацетоном. В шленк с навеской белого фосфора (0.95 г.) влили 20 мл ацетона и выдержали 15 мин при перемешивании (ручное взбалтывание) без нагрева. Слив ацетон, влили в шленк 50 мл дистиллированной воды, стерилизованной автоклавированием. Затем приготовили 2% эмульсию белого фосфора в этой воде.

С целью оценки цитогенетического действия фосфора использовали тест-систему Allium сера. На каждом препарате учитывали общее количество клеток, количество делящихся клеток, находящихся в той или иной стадии митоза. На основании полученных данных определили митотический индекс (МИ), распределение клеток по стадиям митоза. Митотический индекс показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на препарате изучаемой ткани [12].

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.

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 [13]. Колонии в остальных двух повторах растут медленнее и имеют гораздо более светлую окраску (рис. 2). Окрасилась не только колония, но и культуральная среда, т. е. пигмент хорошо растворим в воде. Примерно в это время мы дали этому аспергиллу неофициальное название «рыжий гриб».



Рис. 2. 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 AM1. А судя по тому, что «рыжий» гриб эффективнее набирал биомассу в среде с белым фосфором, эта мутация повышает его приспособленность к существованию в данной среде. Мы назвали этот штамм AM2.

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 AM1 рос быстрее, т. е. оказался более устойчивым (рис. 3). 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.

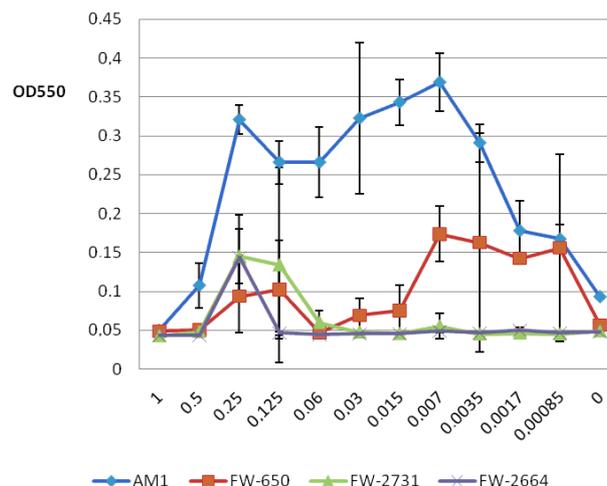


Рис. 3. Сравнение роста четырех штаммов *A. niger* в присутствии белого фосфора. На оси абсцисс указаны концентрации P4 в %, на оси ординат оптическое поглощение при λ 550 нм. Заметно, что штамм AM1 намного более устойчив к белому фосфору по сравнению со штаммами из ВКМ

Ожидалось, что после роста в благоприятных условиях – в среде с фосфатом – *A. niger* AM1 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 P₄.

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 P₄ 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 [14] по причине сравнительно низкой растворимости в нем белого фосфора. В стерильных средах рост отсутствовал даже спустя 117 дней, они остались прозрачными без опалесценции и взвесей. Это указывает на то, что стерилизация навесок P₄ ацетоном эффективна.

В представленной работе SOS-lux тест продемонстрировал генотоксичность белого фосфора [15]. Несмотря на то, что величина ДНК повреждающей активности оказалась низкой (рис. 4), 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 P₄ 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.

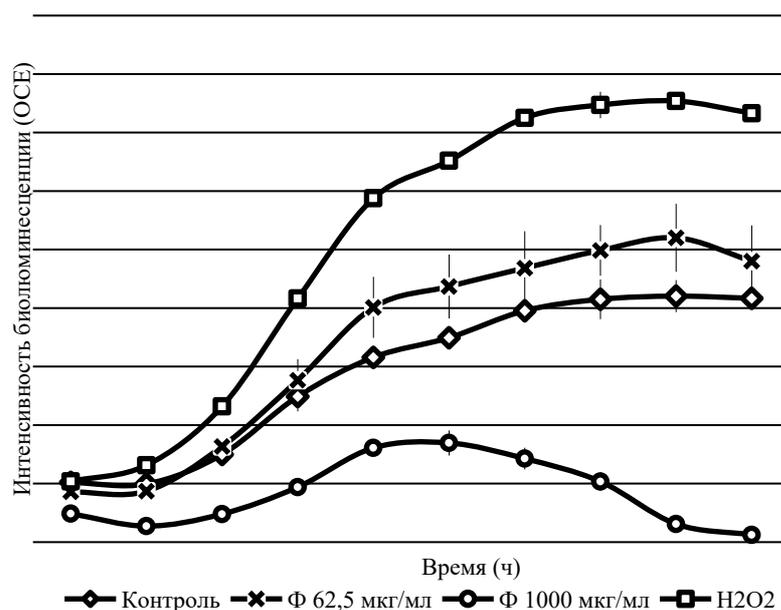


Рис. 4. Влияние белого фосфора на SOS-индукцию с перекисью водорода и негативным контролем (среда без мутагена)

Показано, что корешки лука в присутствии белого фосфора отставали в росте. Установлено также, что присутствие P₄ 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. 1). Это может быть связано с блокировкой деления клеток в конце стадии профазы.

Таблица. 1. 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 (МИ)	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. Тем не менее, в более ранних работах генотоксичность у Р₄ 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 впервые была продемонстрирована.

ЛИТЕРАТУРА

- Walsh C. Enabling the chemistry of life // Nature. 2001. Vol.409. No.6817. P.226–231.
- Wackett L.P. The Metabolic Pathways of Biodegradation // The Prokaryotes. 2013. Vol.2. P.383-393.
- Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // Metabolic Engineering. 2015. Vol.29. P.142–152.
- 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.
- 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.
- Machingura M., Salomon E., Jez J.M., Ebbs S.D. The β -cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification // Plant, Cell and Environment. 2016. Vol. 39. No.10. P. 2329–2341.
- Dunn M.F., Nicks D., Ngo H., Barends T.R.M., Schlichting I. Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine // Trends in Biochemical Sciences. 2008. Vol.33. No.6. P. 254–264.
- 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.
- Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Сапармырадов К.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Хаяров Х.Р., Бадеева Е.К. Селекция на рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору // Актуальная биотехнология. 2018. № 3 (26). С. 201–205.
- Миндубаев А.З. От яда к удобрению // Наука и жизнь. 2019. № 3. С. 46–47.
- 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.
- Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. Ярослав. гос. ун-т им. П.Г. Демидова. Ярославль. 2005. 132 с.
- Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Хаяров Х.Р., Сахапов И.Ф., Бадеева Е.К., Стробыкина А.С., Валидов Ш.З., Бабаев В.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Аюсаян И.А., Яхваров Д.Г. Динамика превращений белого фосфора культурой черного аспергила // Бутлеровские сообщения. 2017. Т. 51. № 8. С. 1–26.
- Drews R.C. Acetone sterilization in ophthalmic surgery // Ann. Ophthalmol. 1977. V. 9(6). P. 781.
- 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.