

Получение штаммов *Aspergillus niger*, компетентных к биодegradации белого фосфора

Р. С. Речицкий (ГБОУ лицей 64)

Научный руководитель – п. д. о., Д. В. Смутин (ЭБЦ “Крестовский остров”, г. Санкт-Петербург)

Фосфор - один из важнейших химических элементов для живых организмов. Элементарный фосфор имеет несколько аллотропных модификаций, самым активным и токсичным из них является белый фосфор (P_4), в связи с этим он способен долгое время оставаться в водных эмульсиях с сохранением токсичных свойств. Существуют несколько способов очистить водоемы от белого фосфора, но все они подразумевают внесению других химических веществ, кроме одного – биодegradация. Биодegradация – это разрушение веществ под действием биологических организмов. Это свойство позволяет очищать среду не внося новые загрязняющие химические агенты.

Цель работы: получить организм, использование которого возможно для биодegradации белого фосфора. Для выполнения данной цели мы поставили следующие задачи:

1. Получить из окружающей среды изолят, резистентный к белому фосфору
2. Провести анализ эффективности биодegradации белого фосфора, полученных в результате пассирований изолята
3. Методами направленной селекции получить линию организмов, наиболее подходящую для использования в биодegradации белого фосфора.

Материалы и методы. В ходе экспериментов использовалось 8 типов сред. Все среды стерилизовались кипячением и ультрафиолетом. Для получения изолятов, резистентных к белому фосфору твердая среда Чапека с концентрацией P_4 0.01 г/л помещалась в течение недели на открытый воздух в лаборатории. Для сравнения скорости роста различных штаммов на среде с белым фосфором нами был поставлен эксперимент. Сто тысяч клеток, семи штаммов *A. niger*, выделенными нами, сеялось на среды с концентрацией P_4 0, 0,01 и 0,1 г/л в пробирки. Для сравнения скорости адаптации различных штаммов к среде с белым фосфором также был поставлен эксперимент. 1000 клеток 3 штаммов *A. niger* - первичный, средний и конечный сеялись на среды с концентрацией P_4 0, 0.01 и 0.1 г/л в трёх повторностях. Так же ставился контроль без клеток в тех же концентрациях белого фосфора. Через время отбирались пробы для подсчета концентрации клеток. После подсчета все концентрации клеток переводилась в кл/мл по формуле и значения заносились в общую таблицу. Также проводилась статистическая обработка данных с постройкой регрессионных кривых.

Результаты и обсуждения. Из воздуха нами был получен изолят *A. niger*, резистентный к белому фосфору. В результате был получен набор изолятов, из которых в дальнейшей работе использовался только один штамм, наиболее устойчивый к высоким концентрациям P_4 , названный нами *A. niger* WP. Далее проводилось пассирование изучаемого штамма на средах с высокими концентрациями белого фосфора. Штаммы, получаемые в ходе пассажей, назывались *A. niger* А–Е. Они сильно разнятся по характеристикам из-за того, белый фосфор обладает сильной генотоксичностью. Наибольшая скорость образования вторичных колоний среди штаммов WP-С характерна для *A. niger* В. *A. niger* С обладает меньшей скоростью роста по сравнению с *A. niger* В на средах с концентрацией P_4 0.1 г/л. Наибольшей скоростью роста среди штаммов *A. niger* WP-С на среде с концентрацией P_4 1 г/л обладает штамм С. На таких концентрациях белого фосфора колонии не переходят к спороношению, вторичные колонии не образуются. Высокие концентрации белого фосфора сильно подавляют скорость роста всех изучаемых линий, и было выдвинуто предположение, что один из механизмов приспособления к белому фосфору является уменьшение скорости деления. Для подтверждения или опровержения данной гипотезы были поставлены модельные

эксперименты по определению скорости роста полученных штаммов на средах с белым фосфором. Для культур на всех средах характерен экспоненциальный рост. Ближе к концу эксперимента рост замедлился, так как емкость среды исчерпывается, накапливаются продукты обмена. В ходе эксперимента были выявлены достоверные различия в скорости роста между культурами, растущими на среде с концентрацией P_4 0,1 г/л, и всеми остальными. Эти различия наблюдаются только в конце эксперимента, что говорит о высокой приспособленности к белому фосфору. Из первого эксперимента, можно отметить, что рост всех штаммов пропорционален. Медленнее всего рост происходил на среде с концентрацией P_4 0,1 г/л, а быстрее всего на среде с 0 и 0,01 г/л. Регрессионные модели тестировались с использованием Байесовского информационного критерия. В первом эксперименте оптимальную модель регрессии для данных дает формула, учитывающая только день и концентрацию белого фосфора. Именно она характеризуется наименьшим значением ВИС. Таким образом, в длительном эксперименте скорость роста достоверно не зависит от поколения пассирования на белом фосфоре. Таким образом, этот эксперимент показывает, что различий в скорости деления между исследуемыми штаммами не наблюдается. Для сравнения скорости адаптации к среде у некоторых штаммов, *A. niger* WP, С, Е, был поставлен второй эксперимент по определению скорости роста на средах с белым фосфором. Во всех линиях наблюдается некоторая лаг-фаза и медленный переход к линейному росту. Однако лаг-фаза незначительная. Это говорит о некотором периоде адаптации к условиям среды у исследуемых штаммов. Более устойчивые штаммы, С и Е, показывали большую концентрацию клеток на средах с более высокими концентрациями белого фосфора. Достоверные различия между ними наблюдаются только к концу эксперимента. Этот эксперимент показывает, что, возможно, штамм Е более адаптирован к биодegradации белого фосфора и быстрее накапливает достаточное количество метаболитов для его деградации. Таким образом, различия между штаммами в скорости адаптации к средам не были выявлены. Однако, эти различия не подтверждаются регрессионными прямыми и требуют дополнительных проверок. Возможно, большая адаптированность к белому фосфору скорее всего связана не со скоростью роста на среде, а со скоростью биодegradации. Выяснение ее механизмов – дальнейшая тема для исследований. Был получен штамм *Aspergillus niger*, устойчивый к белому фосфору, и произведено его пассирование на средах с P_4 целью увеличения его резистентности. Полученные штаммы различаются по скорости роста на агаризированных средах с белым фосфором и скорости перехода к спорообразованию.

Выводы:

1. Был получен штамм *Aspergillus niger*, устойчивый к белому фосфору, и произведено его пассирование на средах белым фосфором целью увеличения его резистентности.
2. Было выявлено, что различий в скорости и адаптации к среде и роста на ней у разных штаммов не значителен, это может говорить о том, что все штаммы биодegradируют белый фосфор, но с разной скоростью.
3. С высокой вероятностью, более лучшая адаптированность к высоким концентрациям белого фосфора у штаммов, большее количество раз пассированных на соответствующих средах, не связаны со скоростью адаптации к среде или непосредственно скоростью роста на ней. Значит, они могут быть связаны именно с эффективностью биодegradации белого фосфора.

Список литературы

1. Toxicological profile for white phosphorus. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1997. — 248 p.;
2. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В. Биологическая деградация белого и красного фосфора // Академический вестник ЭЛПИТ, том No4. - 2019. - №4(10). - С. 28-43.
3. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Рост черного аспергилла на ряде соединений фосфора / А. З. Миндубаев.
4. Миндубаев А.З., Федосимова С.В., Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба *Aspergillus niger* / А. З. Миндубаев.