

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ НА СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ БЕЛЫЙ ФОСФОР. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СТРЕПТОМИЦЕТА А8

Сапармырадов К.А.¹, Миндубаев А.З.²

¹ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

² ФГБУН Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Арбузова, д. 8

e-mail: mindubaev@iopc.ru

Аннотация

Впервые произведены посевы микроорганизмов различных таксономических групп (грибов 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. Самая высокая концентрация соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в 2500 раз! Также проведен молекулярно-генетический анализ гена 16S РНК с целью определить видовую принадлежность штамма *Streptomyces* sp. А8.

Ключевые слова: детоксикация, белый фосфор, осадки сточных вод, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Streptomyces* sp. А8, культуральные среды.

Введение. Метод биодegradации [1] заключается в том, чтобы ускорить процесс адаптации биосферы к новым химическим веществам и максимально увеличить эффективность переработки ксенобиотиков в безвредные природные вещества, беспрепятственно включаемые в круговорот химических элементов. Тем более, что (и этот факт следует подчеркнуть) большинство ксенобиотиков состоят из биогенных элементов – водорода, углерода, азота, кислорода, серы, железа и проч. То есть основа биодegradации – метаболическое превращение химических элементов из одних форм в другие, более доступные для живых организмов и менее опасные. Пожалуй, в случае биодegradации белого фосфора данный тезис особенно справедлив, поскольку это крайне опасное вещество на 100% состоит из биогенного элемента фосфора [2]. Проблема обезвреживания белого фосфора (например, содержащих его шламов) в окружающей среде состоит в отсутствии эффективных и безвредных способов превращения его в безопасную форму, представляющую собой остаток фосфорной кислоты. Только на первый взгляд это превращение кажется легким. Тем не менее, успехи в разработке методов биодegradации других веществ самых разнообразных классов и степеней токсичности позволяют предполагать и возможность биодegradации белого фосфора.

Вот и биодegradацию белого фосфора удалось осуществить в наших работах [3-7]. Несмотря на значительные успехи, для наглядного доказательства биотрансформации белого фосфора и включения его в природный круговорот необходим был важный шаг. До сих пор биодegradация Р₄ наблюдалась в осадках сточных вод. Данный субстрат имеет важное преимущество – богатое видовое разнообразие микробного сообщества [8], позволяющее добиться биодegradации даже такого «трудного» ксенобиотика, как белый фосфор. Однако, ОСВ имеет и ряд недостатков – в первую очередь, непостоянство состава и свойств, а также сложнейший химический состав. ОСВ практически не поддается стандартизации, поэтому наблюдения за ним затруднительны. Следовательно, дальнейшую работу было необходимо вести в искусственных культуральных средах, имеющих стандартный, постоянный состав. Только в таких средах можно выращивать чистые культуры устойчивых микроорганизмов, устанавливать их таксономическую принадлежность, выводить новые штаммы, наконец (и это важнейшая задача), вести селекцию микроорганизмов на способность обезвреживать все возрастающие концентрации белого фосфора.

Представленная публикация является продолжением цикла работ нашего коллектива. В нем нами впервые произведен посев устойчивой микрофлоры на искусственную культуральную среду, содержащую в качестве единственного источника фосфора белый фосфор, и наблюдался рост на 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. Также осуществлено частичное секвенирование генома *Streptomyces* sp. A8 – штамма актиномицетов, выделенного из ОСВ с белым фосфором [7].

Материалы и методы исследования. Секвенирование фрагмента гена 16S РНК *S.* sp. A8 с целью установления его видовой принадлежности, проводили в ЗАО Евроген (г. Москва).

Минеральная обедненная среда представляет собой модифицированную среду Придхем-Готлиба для биодegradации нефтепродуктов. 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). 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, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.15 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.27 г, источник Р – белый фосфор, агар – 0.4- 0.8% (полужидкая). 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.

Посев *Aspergillus niger*, споры которого были внесены вместе с белым фосфором, производили на среду указанного состава. Источник фосфора в среде – белый фосфор в концентрации 0.01 и 0.05% по массе, агар 2%. Готовились по две чашки Петри, по 20 мл среды в каждую. В контрольные среды К (+) вносился фосфат: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 7.4 г, KH_2PO_4 – 2.38 г (в перерасчете на 1 л). В контрольные среды К (-) источники фосфора не вносились. Изначально планировался посев устойчивых бацилл, описанных в работе [6] однако в среды попали споры *A. niger*, вероятно, с белым фосфором, который не подвергся стерилизации. Через пять суток произвели посев выросших *A. niger* на контрольные среды К (+) и К (-).

Через 63 дня был произведен второй пересев аспергилла на среды аналогичного состава, содержащие 0.01 и 0.05% белого фосфора. Через 84 дня после первого посева был произведен третий пересев *A. niger* на среды с увеличенной концентрацией белого фосфора: 0.05, 0.1 и 0.2% по массе. Через 112 дней после первого посева был произведен четвертый пересев *A. niger* на среды с еще более увеличенной концентрацией белого фосфора: 0.5, и 1% по массе.

Бактерии *Pseudomonas alcaliphila*, выделенные на кафедре биохимии КФУ [9] высевали на среды идентичного состава, содержащие 0.01 и 0.05% белого фосфора, на чашки Петри и в плоскодонные колбы на 50 мл. Контролем служил посев на среду с фосфатом ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 7.4 г, KH_2PO_4 – 2.38 г (в перерасчете на 1 л)). Рост культур отслеживался по изменению оптической плотности сред. Оптическая плотность измерялась на фотоэлектроколориметре AP-101 (Arel, Япония) при длине волны 540 нм. Второй посев той же культуры *P. alcaliphila* был произведен через 42 дня.

Результаты исследования и их обсуждение.

Генетическая последовательность гена 16S РНК штамма *Streptomyces* sp. A8. Генетическая последовательность гена 16S РНК позволяет приблизительно определить видовую принадлежность штамма A8 (рисунки 1 и 2). Ранее вид определялся при помощи микроскопии, но без молекулярно-генетического анализа нельзя утверждать видовую принадлежность. Сочетая два данных метода, можно определить вид, с точностью около 97-98%. Для 100% уверенности нужно просеквенировать полную геномику.

На основании полученных данных по морфологии, видовая принадлежность штамма A8 была определена как *Streptomyces xanthocidicus*, но данные по геномике ее не подтвердили. Поэтому правильно продолжать называть штамм *S.* sp. A8.

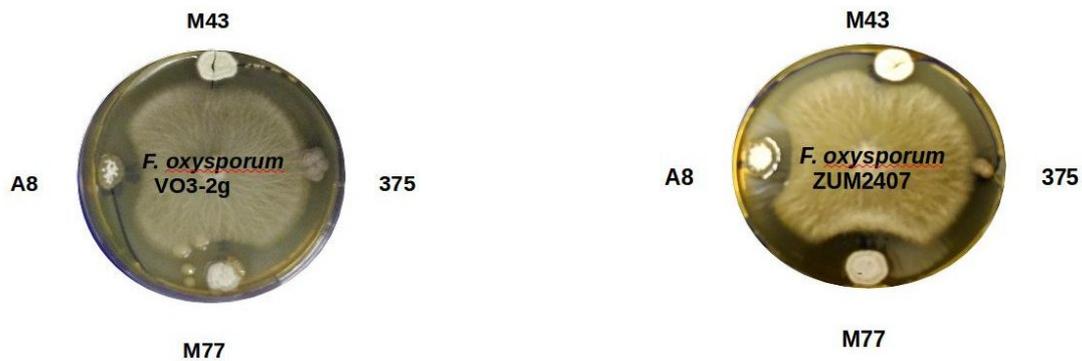


Рисунок 1. – *Streptomyces* sp. A8, внешний вид колоний; на снимках присутствуют штаммы *S. sp.* M43, 375, M77, в качестве тестовых организмов – штаммы *Fusarium oxysporum*. A8 подавляет рост тестовых организмов.

CGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCC
 GAACTGAGACCGGCTTTTGGAGATTCGCTCCACSTCACGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATGTAGCACGTGTGCAGCC
 CAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCGCCACSTTCTCCGAGTTGACCCCGGGCGGTCTCCCGTGAGTCCCCAGCA
 CCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
 ACAGCCATGCACACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGT
 TCTTCGCGTTGCGTCAATTAAGCCACATGCTCCGCGGCTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCSTTTGAGTTTTCAGCCTTGCGGC
 CGTACTCCCCAGGCGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTGCCACCGTT
 TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGATCCG
 CCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATCCGATCTCCCTACCGAATCTAGCCT
 GCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCTACGAGCTCTTTACGCC
 AATAATTCGGACAACGCTTGGCGCCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCG
 TCACTTTCGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTACGCGGCGTGCATCAGGCTTTC
 GCCATGTGCAATATTCCTCCTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCCGCCCTC
 AGGCCGCTACCCGTCGCTGCGCTTGGTGAGCCACTACSTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGG
 AGCTTACACCATCCACCGCAGACGGTCAATCCGGTATTAGACCC

Рисунок 2. – Нуклеотидная последовательность участка гена 16S РНК штамма *S. sp.* A8, установленная секвенированием

Посевы грибов и бактерий на культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В посеве с *Aspergillus niger* на следующие сутки также 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 [10]. Рост аспергилла стал неожиданностью, поскольку сеяли культуры устойчивых бактерий. 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. На средах с 0.01% белого фосфора выросло множество мелких колоний *A. niger*, а на средах с 0.05% - меньшее число колоний, но более крупных. По всей видимости, это означает, что на среде с большей концентрацией ксенобиотика не все споры смогли прорасти.

На пятые сутки пересеяли культуру *A. niger*, выросшую на 0.05% белого фосфора, на контрольные среды К (+) и К (-). Через шесть суток после посева наблюдалась следующая картина. На среде К (+) с фосфатом выросло значительное число сравнительно мелких колоний: это означает, что большинство спор проросло, что естественно в благоприятных условиях. На 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 (рисунок 3). Известно, что растения и микроорганизмы в природных условиях часто испытывают фосфорное голодание, и вырабатывают к нему ряд

адаптаций. Причем, согласно [11], микроорганизмы выдерживают более жесткий дефицит фосфора, что и наблюдалось нами. Любопытно, что на среде с 0.05% белого фосфора колоний выросло меньше, чем на K(+), однако они производят впечатление совершенно нормальных, не испытывающих дефицит питательных веществ. Отсюда следует вывод, что на 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.



Рисунок 3. – Первый пересев устойчивых аспергиллов. Слева – среда без источника фосфора: на ней наблюдается рост слабых колоний аспергилла. Вверху – среда с фосфатом: наблюдается рост множества колоний *A. niger*. Справа – среда с 0.05% белого фосфора: наблюдается рост нескольких крупных колоний *A. niger*. Чашки сфотографированы через шесть суток после повторного посева.

После второго посева, произведенного через 63 дня после первого посева, наблюдается интенсивный рост аспергилла на 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. На среде с 0.05% P_4 колонии на четвертый день еще только приступают к размножению и имеют светлую окраску. Отставание в развитии для них продолжало наблюдаться и на 19 сутки после посева: колонии грибов хотя и потемнели, но все же остались более светлыми, чем колонии на 0.01% белого фосфора. Поскольку черный цвет *A. niger* придает конидии – споры бесполого размножения – светлая окраска свидетельствует о пониженной фертильности плесневого гриба, растущего на высокой концентрации P_4 .

Очередной (третий) пересев на 84 день после первого посева, был произведен на 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 [12], 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 на всех трех концентрациях белого фосфора наблюдалось начало спороношения, хотя на 0.1 и 0.2% P_4 грибы отставали в развитии по сравнению с 0.05% (рисунок 4). Отставание в развитии у *A. niger* при концентрации белого фосфора 0.1 и 0.2%, по сравнению с 0.05%, наблюдалось и через 18 суток после посева. На самой малой концентрации P_4 колонии к этому времени стали практически черными, тогда как на более

высоких имели серую окраску. 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%.



Рисунок 4. – Внешний вид *A. niger* на четвертые сутки после третьего посева. Справа – среда с содержанием белого фосфора 0.05%, в центре 0.1%, слева – 0.2%. Видно, что при больших концентрациях ксенобиотика грибы отстают в развитии (что выражается в более светлой окраске) и приступают к спороношению позже. Тем не менее, даже максимальная концентрация белого фосфора не стала для них губительной, и, более того, не лишила фертильности.

Четвертый посев аспергилла 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 на среде с содержанием белого фосфора 0.5% наблюдался рост мелких колоний аспергилла, имеющих еще белый цвет (то есть рост сильно замедлен). По-видимому, выпавший черный осадок фосфидов перевел в нерастворимую форму микроэлементы, присутствующие в среде и необходимые для роста микроорганизмов. Следует отметить, что по [12], концентрация белого фосфора 0.5% соответствует 2500 ПДК!

По-видимому, данные концентрации белого фосфора близки к предельным, на которых еще возможен рост грибов. На восьмые сутки на поверхности колоний аспергилла наблюдается россыпь спор, т.е. гриб сохранил способность к размножению! В средах с 1% P_4 грибы не растут: через 8 суток мы наблюдаем исходные, взятые для посева, колонии аспергиллов, лежащие на дне колб со средой. По всей видимости, они погибли.

Бактерии *Pseudomonas alcaliphila*, выделенные на кафедре биохимии КФУ [9] высевали на те же самые среды, на которые был произведен второй посев аспергилла, содержащие 0.01 и 0.05% белого фосфора, в двух повторах. Контролем служил посев на среду с фосфатом. Рост культур отслеживался по изменению оптической плотности сред. В контроле (среда с фосфатом) наблюдался интенсивный рост бактерий. Данные по изменению оптической плотности культур показали, что меньшую концентрацию белого фосфора бактерии переносят легче – в первые шесть дней после посева наблюдается медленное нарастание оптической плотности в обоих повторах, отражающее рост количества микробных клеток в единице объема среды. На седьмые сутки рост оптической плотности остановился, а на восьмые наблюдалось ее снижение. После этого дальнейшие замеры были прекращены. При большей концентрации в обоих повторах наблюдается снижение оптической плотности культур на протяжении всех восьми суток наблюдений, указывающее на отсутствие адаптации. Внешне все культуральные среды остались бесцветными и прозрачными, т.е. количество бактерий продолжало оставаться очень малым. Второй посев *P. alcaliphila* был произведен через 42 дня. Поскольку на средах с белым фосфором бактерии росли

недостаточно интенсивно, посев производили снова из исходной культуры, т.е. пересев, как в случае с аспергиллами, не был осуществлен. Результаты можно видеть в таблице 1.

Таблица 1. – Кинетики изменения оптической плотности культур *P. alcaliphila* по дням, в зависимости от концентрации белого фосфора в средах (в одном повторе). Второй посев.

Конц. P ₄ , %	Изменение оптической плотности (λ_{540}) по дням после посева			
	1	2	3	5
0.01	0.248	0.299	0.309	0.311
0.05	0.309	0.296	0.290	0.292

Результаты для второго посева, представленные в таблице 1, хорошо коррелируют с данными для первого. При меньшей концентрации белого фосфора снова наблюдается незначительный рост оптической плотности в первые дни эксперимента. К пятому дню рост фактически вышел на плато. При большей концентрации наблюдается снижение оптической плотности по сравнению с исходной.

Таким образом, результаты двух посевов псевдомонад продемонстрировали, что эти бактерии, в отличие от грибов, не растут на средах, содержащих белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В работе [6] мы уже сообщали о том, что бактерии из рода *Bacillus* выживают при концентрации белого фосфора в ОСВ 0.1%, но только за счет сильного замедления метаболизма и темпа размножения, а не за счет эффективной деструкции этого вещества. Возможно, это справедливо и для *P. alcaliphila*. Если справедлива гипотеза о том, что организмы из разных таксономических групп имеют различную устойчивость к белому фосфору, то это является серьезным аргументом в пользу того, что он разлагается под воздействием ферментных систем, а не только за счет абиотического окисления. Очень интересен ответ на вопрос о роли микроорганизмов в самом первом этапе превращений, затрагивающем непосредственно белый фосфор: подвергается ли он ферментативным реакциям, или его деградация обусловлена сдвигом химического равновесия микроорганизмами, потребляющими продукты абиотического распада белого фосфора? Если верен первый вариант, то это – обнаружение нового вида ферментативной активности.

Интереснейшим результатом работы стал полноценный рост плесневого гриба на 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. Но к практическому аспекту, бесспорно важнейшему, добавляется и фундаментальный. Мы впервые стали свидетелями того, что опаснейший белый фосфор может служить пищей живым организмам. Данный факт, безусловно, пополняет копилку знаний о живой природе и в очередной раз доказывает невероятную жизнеспособность биосферы.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-08-31091 мол_а. Авторы выражают искреннюю признательность Александре Дмитриевне Волошиной, Наталье Владимировне Кулик, Ане Панковой, Фариде Кашифовне Алимовой, Лене Горбачук и Дмитрию Григорьевичу Яхварову за неоценимую помощь в работе.

Список литературы

- 1) Зиганшин А.М. Герлах Р., Науменко Е.А., Наумова Р.П. Аэробная деградация 2,4,6-тринитротолуола штаммом дрожжей *Geotrichum candidum* AN_Z4 // Микробиология. 2010. Т. 79. №2. С.199-205.
- 2) Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Фосфор: свойства и применение // Бутлеровские сообщения. 2014. Т.39. №7. С.1-24.
- 3) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Белый фосфор как новый объект биodeградации // Грани науки. 2013. Т.1. №1. С.65-68.

- 4) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Зависимость скорости деструкции белого фосфора в осадке сточных вод от интенсивности микробного метаболизма // Грани науки». 2013. Т.1. №2. С.58-62.
- 5) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Поиск метаболитов белого фосфора // Грани науки. 2014. Т.2. №1. С.82-87.
- 6) Горбачук Е.В., Миндубаев А.З. Исследование субстратов с концентрацией белого фосфора 0.1% на предмет метаболитов и устойчивой микрофлоры // Грани науки. 2014. Т.2. №2. С.33-39.
- 7) Сапармырадов К.А., Миндубаев А.З. Фитотоксичность, фунгицидная и бактерицидная активность *Streptomyces* из разных биотопов // Грани науки. 2015. Т.3. №1. С.26-31.
- 8) Seviour R.J., Nielsen P.H. *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing. 2010. 667 p.
- 9) Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Болормаа Ч., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Панкова А.В., Яхваров Д.Г. Обезвреживание промышленных стоков, содержащих белый фосфор, при помощи микрофлоры ОСВ // Журнал экологии и промышленной безопасности. 2014. №1-2. С.68-72.
- 10) Peruzzini M., Gonsalvi L., Romerosa A. Coordination chemistry and functionalization of white phosphorus via transition metal complexes // *Chem. Soc. Rev.* 2005. V.34. N.12. P.1038-1047.
- 11) Киселева М.А. Метаболизм мембранных липидов у свободноживущих и симбиотических зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* в условиях дефицита фосфора. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 – «Физиология и биохимия растений». 2008. 23 с.
- 12) Barber J.C. Processes for the disposal and recovery of phosphy water. Номер патента: US5549878, заявлен: 24 мая 1995, выдан: 27 августа 1996.