

УДК 574; 574.9; 581.5; 613.1; 631.46

*Влияние белого фосфора на жизнеспособность, клеточную морфологию и протеом штаммов гриба *Aspergillus Niger**

А.З. Миндубаев^{а*}, С.В. Федосимова^б, А.Г. Даминова^б, В.А. Романова^б, В.М. Бабаев^с, Э.В. Бабынин^д, Е.К. Бадеева^с, С.Т. Минзанова^с, Й.А. Акосах^б, Ю.В. Караева^а

*e-mail: mindubaev-az@yandex.ru

^а *Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН*

^б *Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН.*

^с *ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет.*

^д *Татарский НИИХП ФИЦ КазНЦ РАН*

10.18522/2308-9709-2021-38-3

В предыдущих исследованиях нами впервые была продемонстрирована биodeградация белого фосфора штаммами плесневого гриба *Aspergillus niger*. Тем не менее, важной задачей является исследование механизмов устойчивости гриба к столь токсичному веществу. Таких механизмов может быть несколько, из них наиболее вероятны два. Клеточная стенка гриба является барьером на пути проникновения белого фосфора в клетку. В таком случае, в ответ на воздействие токсиканта должен наблюдаться рост толщины клеточной стенки. Второй механизм связан с экспрессией генов стресса и выработкой грибом белков, участвующих в обезвреживании токсикантов, в том числе белого фосфора. Проведенные в представленной работе микроскопические и протеомные исследования показали, что имеют место оба механизма устойчивости. Помимо этого, белый фосфор вызывает общую активацию метаболизма, сопровождающуюся ростом числа митохондрий в клетках. Показано, что белый фосфор мало влияет на соотношение живых и мертвых клеток в колониях грибов, т. е. устойчивость к нему очень высока.

Ключевые слова: биodeградация, белый фосфор, конфокальная микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, протеомный анализ, двумерный электрофорез, масс-спектрометрия, *Aspergillus niger*.

The Effect of White Phosphorus on the Vitality, Cellular Morphology and Proteome of Fungus *Aspergillus Niger* Strains

A.Z. Mindubaev^{а*}, S.V. Fedosimova^б, A.G. Daminova^б, V.A. Romanova^б, V.M. Babaev^с, E.V. Babynin^д, E.K. Badeeva^с, S.T. Minzanova^с, Y.A. Akosah^б, J.V. Karaeva^а

^а *Institute of Power Engineering and Advanced Technologies, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences*

^б *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. Russia.*

^с *Kazan (Volga Region) Federal University. University St., 18. Kazan, 420008. Russia.*

Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry and Soil Science – Subdivision of the Federal^д Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences

E-mail: mindubaev-az@yandex.ru

10.18522/2308-9709-2021-38-3

In previous studies, we demonstrated for the first time the biodegradation of white phosphorus by the molds *Aspergillus Niger*. However, studying the mechanisms of resistance of the fungus to such a toxic substance is essential. There may be several such mechanisms, of which two are most likely. The cell wall of the fungus is a barrier to the penetration of white phosphorus into the cell. In such a case, an increase in cell wall thickness should be observed in response to exposure to the toxicant. The second mechanism is associated with the expression of stress genes and the production of proteins by the fungus involved in the neutralization of toxicants, including white phosphorus. The microscopic and proteomic studies carried out in the present work have shown that both resistance mechanisms take place. In addition, white phosphorus causes a general activation of metabolism, accompanied by an increase in the number of mitochondria in the cells. It was shown that white phosphorus has little effect on the ratio of living and dead cells in the colonies of fungi, i.e. resistance to it is very high.

Keywords: biodegradation, white phosphorus, confocal microscopy, transmission electron microscopy, proteomic analysis, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, *Aspergillus Niger*.

ВВЕДЕНИЕ

Биодеградация является одним из наиболее популярных и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, в том числе высокотоксичных [2, 3]. Главное преимущество биодеградации, что при ее использовании в окружающую среду не вносятся новые химические загрязняющие агенты.

Схема метаболического обезвреживания бактериостатического препарата β -хлораланина, изображенная по литературным источникам [13], представляет удивительные возможности микробов (рис. 1).

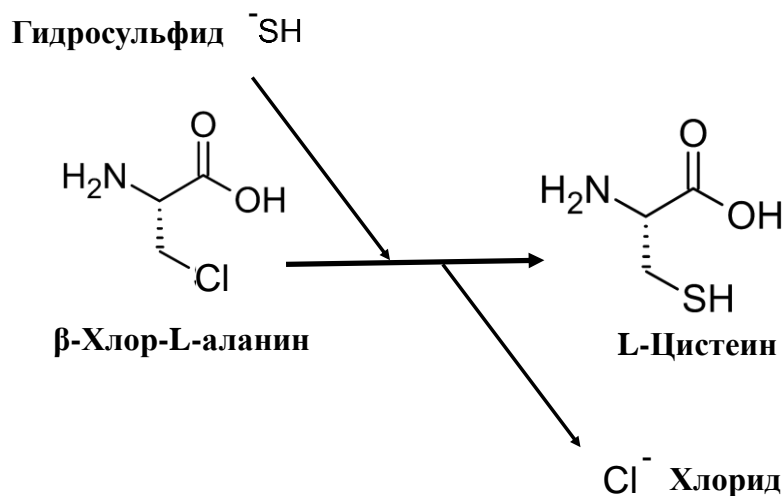


Рис. 1. Замечательным примером биодеградации является одностадийное превращение антимикробного соединения β -хлораланина в аминокислоту цистеин, входящую в состав белков при помощи фермента цистеиндесульфгидразы, бактерии *Enterobacter cloacae*. Рисунок А. З. Миндубаева, по [13].

Данная публикация является продолжением цикла работ нашего коллектива [4–6, 14, 15], которые показали, что микроорганизмы выживают при контакте даже с таким губительным для всех форм жизни веществом, как белый фосфор, способны адаптироваться к его присутствию в окружающей среде и перерабатывать его в менее опасные соединения. Целью

настоящей работы являются структурно-морфологические и биохимические исследования микроорганизмов, обезвреживающих белый фосфор, с помощью конфокальной и электронной микроскопии, и исследования их протеома.

Конфокальная микроскопия показала, что белый фосфор в исследуемой концентрации (0,25 %) оказывает на смертность мицелия гриба незначительное влияние. Электронная микроскопия продемонстрировала, что в присутствии белого фосфора в септах мицелия грибов происходят морфологические изменения, направленные на усиление метаболических процессов и защищенность от внешней среды. Протеомные исследования указали на резкие различия в экспрессии генов у грибов, растущих в присутствии и в отсутствии белого фосфора. Идентифицированы три белка, вырабатываемые аспергиллом AM1 только в присутствии белого фосфора, и, вероятно, принимающие участие в росте устойчивости к нему.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка проб

Для протеомного анализа споры штаммов *Aspergillus Niger* AM1 и AM2 вносили в пробирки с 4 мл среды состава (г/л) NaCl 2.5, MgSO₄ 0.5, KNO₃ 2.0, глюкоза 8.0. В четырех пробирках в качестве источника фосфора был раствор фосфатов (контроль), а в четырех других 0,25 % эмульсия белого фосфора (опыт). Пробирки инкубировались 4 суток до достижения плотной грибницы на поверхности жидкой среды. Сходная схема посева и культивирования использовалась для микроскопии. Для конфокальной микроскопии посев производился в шестиугольный планшет. Образцы для микроскопии извлекались из лунок планшета, переносились в эппендорфы (пробирки Эппендорфа), окрашивались флуоресцентными красителями и рассматривались в микроскопе между покровными стеклами.

Для исследований по электронной микроскопии образцы были получены в виде биоматериала, выращенного в культуральной жидкости в фальконах. После пробоподготовки образцы были исследованы методом просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии. Данный метод позволил оценить морфологические и структурные изменения клеток после воздействия белого фосфора.

Было изучено воздействие белого фосфора на гифы *Aspergillus niger* с использованием конфокальной и просвечивающей электронной микроскопии. Для конфокальной микроскопии были отобраны небольшие участки образцов. Для просвечивающей электронной микроскопии после отбора биоматериала из жидкой среды культивирования, образцы были промыты фосфатным буфером 3 раза и зафиксированы по стандартному протоколу, основанному на процессах фиксирования, обезвоживания и полимеризации материала в смоле Epon 812 [1].

Конфокальная микроскопия

Визуализация и исследование образцов осуществлялось с помощью лазерного конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 780 (Германия). Для определения жизнеспособности грибных гиф в контрольном и опытном образцах двух штаммов нами использовался коммерческий набор витальных красителей LIVE/DEAD®BacLight™ (Thermo Fisher Scientific, США). Суспензии были окрашены смесью красителей пропидиум йодид и SYTO 9, флуоресцирующих при разных длинах волн. Для этих красителей длины возбуждения и эмиссии 480/500 nm (SYTO 9) и 490/635 nm (пропидиум йодид). В результате жизнеспособные гифы окрашиваются в зеленый цвет, а мертвые – в красный. Желтое окрашивание мицелия демонстрирует начальные стадии повреждений мицелия гриба. Также были получены результаты, свидетельствующие о наличии грибных спор на снимках контрольного и опытного образцов обоих штаммов [8]. Интенсивность флуоресценции оценивалась при помощи программы ZEN 3.0 (ZEN lite), разработанной Carl Zeiss, позволяющей вести на фотографиях подсчет пикселей

интересующих цветов. Пробный вариант исследования образцов без окрашивания красителями не дал результатов, так как образцы не обладают свойствами автофлуоресценции.

Электронная микроскопия

Трансмиссионная электронная микроскопия осуществлялась следующим образом. Гифы *Aspergillus niger* контрольного и опытного образцов двух штаммов фиксировали в 1 % растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (0.1 М, pH 7.2), в течение 12 часов. Далее переносили в 2.5 % раствор глутарового альдегида на 2 часа. Постфиксацию проводили в 1 % растворе четырехоксида осмия OsO₄ с добавлением 25 мг/мл сахарозы в течение 2 часов. Образцы последовательно обезвоживали в серии повышающихся концентраций водного этилового спирта, потом в окиси пропилена, после чего последовательно пропитывали в течение 24 часов эпоксидной смолой Epon 812 (Fluka, Швейцария) и окисью пропилена в соотношениях: 1:2; 1:1; 2:1. Образцы помещали в чистую смолу и поэтапно проводили полимеризацию при температурах 37 °С, 45 °С и 60 °С, каждый этап в течение 24 часов. После фиксирования, по протоколу для электронной микроскопии ультратонкие срезы клеток получали на микротоме Leica UC7 (Германия), помещали на 3 мм медные сеточки и окрашивали 20 минут насыщенным водным раствором уранилацетата и 5 минут цитратом свинца [16]. Срезы просматривали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT 7700 Exalens (Япония) при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0.144 нм. Споры не наблюдаются на срезах, поскольку имеют твердые оболочки и не разрезаются микротомом.

Измерения толщины клеточных стенок на микрофотографиях проводились при помощи программы XaraXtremePro 5, позволяющей наносить на изображения линии с указанием их точной длины. На каждой фотографии измерение толщины проводилось не менее чем в десяти местах по окружности. Измерение размеров митохондрий проводилось в этой же программе. Поскольку митохондрии на срезах имеют форму, приближающуюся к эллипсу, измерялся их максимальный диаметр.

Анализ и статистическая обработка данных проведены в программе GraphPadPrism 8.4.0. Результаты представлены в виде диаграмм. Общее межгрупповое сравнение проводили по критерию однофакторного дисперсионного анализа, а затем попарное сравнение – по критерию Тьюки с учетом статистического значимого различия при $P \leq 0.05$. На диаграммах обозначения ns, *, **, ***, **** равны $P > 0.05$; $P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$; $P \leq 0.001$, и $P \leq 0.0001$ соответственно. Данные были проверены на нормальность и однородность дисперсии с использованием критерия Д'Агостино – Пирсона. На основе полученных результатов проверки на нормальность был использован критерий однофакторного дисперсионного анализа для дальнейшей обработки данных. Данные представлены в виде $M \pm SEM$.

Разделение и анализ белков

Фактически, описанная экстракция белков из мицелия аспергилла была разработана специально для данного исследования. Использовали метод экстракции, описанный ранее в статье [7], с изменениями, адаптирующими к нашему объекту исследований. Другие методы экстракции белка не подходили для нашего объекта, потому что требовалось нарушить целостность прочной хитиновой клеточной стенки аспергилла, препятствующей экстракции.

Одномерный электрофорез в полиакриламидном геле проводился следующим образом. Для извлечения белков из образцов, представляющих собой гриб *Aspergillus niger*, были применены разные растворы для экстракции белков из образцов. Белковые экстракты были разделены по массе в 10 % полиакриламидном геле при напряжении 200 V. Состав экстрагируемых растворов: 1 - 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3); 2% w/v Chaps; 20 mM MgCl₂; 2 % w/v DTT; 1 mM PMSF; 2 – 8 М мочевины, 3 % CHAPS, 2 % NP40, 10 mM трис, pH 8.5; 3 – 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3); 2 % w/v Chaps; 20 mM MgCl₂; 2 % w/v DTT; 1 mM PMSF; 2.5 % Igepal. Наиболее эффективным для экстракции белков признан раствор 3, он и использовался в дальнейшем.

Двумерный электрофорез с дифференциальным окрашиванием осуществлялся по следующей методике. Для извлечения белков из грибов *Aspergillus niger*, биомассу предварительно промывали водой и растирали в ступке с жидким азотом. Навеску растертого мицелия массой 50 мг переносили в эппендорф, добавляли 400 мкл экстрагирующего раствора (0.5 М Tris-HCl (pH 8.3); 2 % w/v Chaps; 20 mM MgCl₂; 2 % w/v DTT; 1 mM PMSF; 2.5 % Igepal). Затем к раствору добавляли сверхтвердые мелющие шарики из оксида циркония ZrO₂ диаметром 0.1 мм и 0.5 мм для разрушения на гомогенизаторе «Fast Prep» (MP Biomedicals, США) в течение 30 сек, с охлаждением на льду в течение 2 мин между повторами. Общее время гомогенизации составляло 3 мин. Раствор центрифугировали 15 минут при 12 тыс. g при 4 °С. Надосадочную жидкость переносили в новый эппендорф. Белки из раствора осаждали добавлением 4 объемов холодного раствора 10 % w/v трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в ацетоне с 0.007 % дитиотреитолом (DTT). Образцы инкубировали на льду 30 минут и центрифугировали при 5000 g 20 минут при 4 °С. Осадок промывали от ТХУ охлажденным раствором 0.007 % w/v DTT в ацетоне трижды. Затем осадок белков растворяли в 50 мкл буфера (7 М мочевины, 2М тиомочевина, 3 % CHAPS, 2 % NP40, 10 mM трис HCl (pH 8.5)). Концентрацию белка измеряли по модифицированному методу Лоури с бицинхониновой кислотой.

Отбирали аликвоты образцов, содержащие по 150 мкг белка, и проводили окрашивание 3 мкл 0.4 mM флуоресцентными красками Cy3 и Cy5 (Lumiprobe, Россия), после чего выдерживали образцы в течение 1 часа на льду в темноте. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл 10 mM раствора лизина. Затем смешивали контрольный и опытный образцы, доводили объем смеси до 300 мкл растворителем белка (8 М мочевины, 3 % CHAPS, 2 % NP40, 0.2 % амфолитов pH 4–7, 50 mM дитиотреитола, 10 mM HCl (pH 8.5)).

Полученную смесь наносили на IPG стрип (Bio-Rad, 17 см, pH 3–10), далее проводили активную регидратацию (13 ч.) и изоэлектрофокусировку (8 ч.) на приборе «Protean i12 IEF cell» в соответствии с рекомендациями производителя. После изоэлектрофокусировки стрипы инкубировали 10 мин в растворе, содержащем 6 М мочевины, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 % глицерин, 2 % SDS и 30 mM дитиотреитола с последующей инкубацией в растворе, содержащем 6М мочевины, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 % глицерин, 2 % SDS и 5 % йодацетамид в течение 10 мин. Затем проводили электрофорез в градиентном полиакриламидном геле (от 9 до 16 %), 20×18 см, в денатурирующих условиях в течение 5 часов при температуре 10 °С. Программа источника напряжения, на 1 гель: 20 минут – 20 МА, 3 ч. – 40 МА, 2 ч. – 35 МА. Гели фиксировали в растворе 20 % изопропанола и 10 % уксусной кислоты.

Флуоресцентно окрашенные белковые пятна визуализировали с помощью сканера гелей «Turboon FLA 9500» («GE Healthcare», Швейцария). На следующем этапе получения пептидов и идентификации белков все гели были окрашены серебром по стандартной методике [12]. После чего из гелей было вырезано 30 белковых точек. Гели с белком были отмыты от серебра раствором 30 mM раствора ферроцианида калия и 100 mM раствора тиосульфата натрия. Гидролиз белков проводили с использованием трипсина (Promega, США), который добавляли к гелю в количестве 0.1 мкг на одно пятно белка, инкубацию проводили при 37 °С в течении 16 ч. Реакцию останавливали добавлением 0.1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ), экстракцию полученных пептидов проводили на ультразвуковой бане. Полученные экстракты высушивали на центрифужном концентраторе при 45 °С.

Масс-спектрометрия пептидов

Пептиды разводили в растворе 0.1 % ТФУ в воде. Масс-спектры были получены на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия), оснащенном лазером Nd:YAG ($\lambda=355$ нм, частота 100 Гц), в режиме рефлектрона с регистрацией положительно заряженных ионов. Масс-спектр был получен с ускоряющим напряжением 25 кВ и временем задержки экстракции ионов 30 нс. Итоговый масс-спектр был сформирован за счет многократного облучения лазером кристалла (50 лазерных импульсов). Использовалась

5

металлическая мишень MTP target plate ground steel. На мишень последовательно наносили и упаривали 0.5 мкл полунасыщенного раствора матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB)) в смеси ацетонитрил-0.1 % водный раствор трифторуксусной кислоты (7:3 об.) и 2 мкл раствора образца в 0.1 % водном растворе трифторуксусной кислоты. После полного высушивания получали спектры пептидов в диапазоне от 700 до 3500 Да. Проводили внутреннюю калибровку спектров по пикам пептидов – продуктов самогидролиза трипсина. Для построения масс-листов использовали моноизотопные массы, идентификацию белков проводили с помощью поисковой программы MASCOT против базы данных *Aspergillus*, которая включает в себя нуклеотидные последовательности рода *Aspergillus*. В параметрах поиска указывали 1 возможный пропущенный сайт трипсинолиза, ошибка MS –0.3 Да, вероятная модификация – окисление метионина.

Данные были получены с помощью программы FlexControl (Bruker Daltonik GmbH, Германия) и обработаны с помощью программы FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью конфокальной микроскопии мы стремились определить влияние белого фосфора на жизнеспособность клеток аспергилла. Можно было предполагать, что в присутствии этого токсичного вещества пропорциональное количество мертвых клеток должно быть выше по сравнению с контролем. Было установлено (табл. 1, рис. 2), что соотношение живых и отмерших клеток грибов мало зависит от присутствия белого фосфора в среде. То есть, как в отсутствии, так и в присутствии P₄ у обоих исследуемых штаммов *A. niger* живые клетки преобладают над погибшими. Таким образом, белый фосфор в концентрации 0.25 % оказывает незначительное влияние на выживаемость мицелия аспергилла, что является неординарным результатом.

Таблица 1. Соотношение живых и мертвых тканей у исследуемых культур аспергиллов в контроле и опыте, выраженное через интенсивность красной и зеленой флуоресценции. Отображает влияние белого фосфора в концентрации 0.25% на гибель клеток.

Штамм	Контроль (среда с фосфатом)		Опыт (среда с белым фосфором)	
	Интенсивность красной флуоресценции (условные единицы)	Интенсивность зеленой флуоресценции (условные единицы)	Интенсивность красной флуоресценции (условные единицы)	Интенсивность зеленой флуоресценции (условные единицы)
AM1	17.620	27.493	24.707	34.022
AM2	24.172	26.980	26.855	27.589

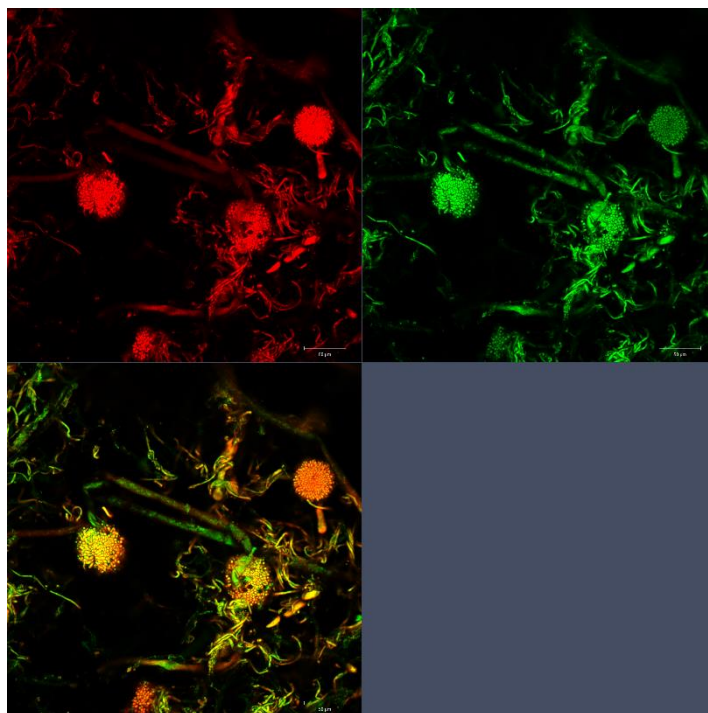
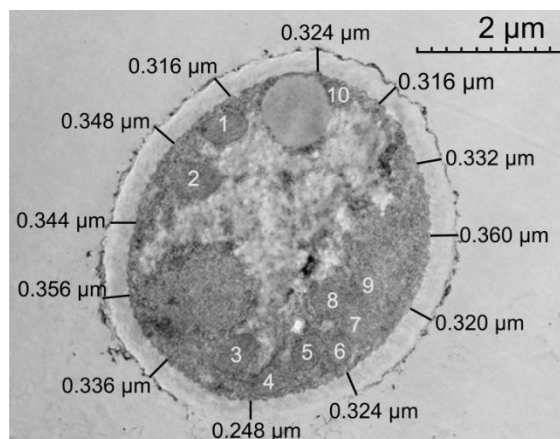
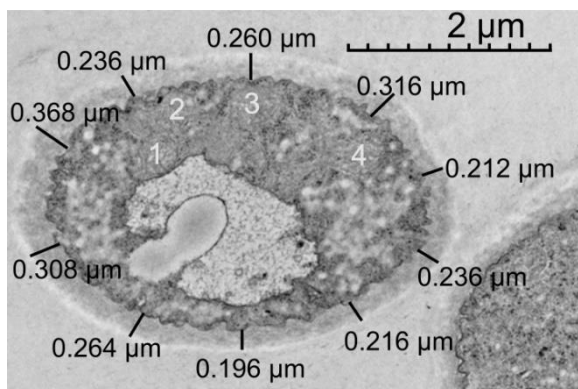


Рис. 2. CLSM 3 D изображение мицелия опытного образца *A. niger* AM1, инкубированного в среде с белым фосфором. Красная флюоресценция пропидиум йодида, окрашивающего мертвые ткани; зеленая флюоресценция SYTO 9, окрашивающего живые ткани; желтое свечение – результат наложения флюоресценции обоих красителей.

При помощи электронной микроскопии было выявлено, что клетки гриба в контроле имели электронноплотную цитоплазму с хорошо выявляемыми органеллами, такими как митохондрии с кристами, шероховатый эндоплазматический ретикулум с рибосомами, вакуоли с электронно-прозрачным содержимым. Наблюдались гифы в продольных сечениях с септами и в поперечных сечениях, клетки были обрамлены клеточной стенкой. Цитоплазматическая мембрана имела целостную структуру, без разрывов и повреждений. Также в части клеток наблюдались электронно-плотные включения запасных веществ (рис. 3).



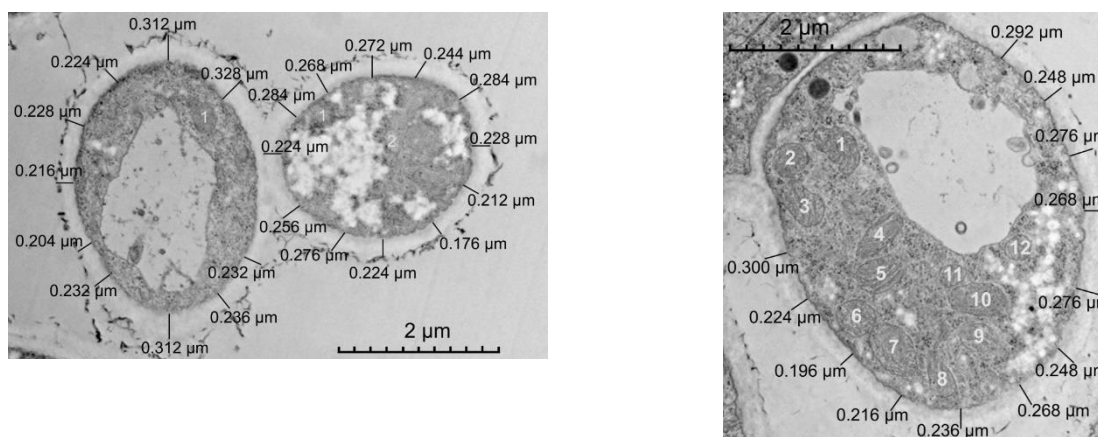


Рис. 3. ТЭМ изображения поперечных срезов гиф *A. niger*. Указана толщина клеточной стенки в нанометрах. Белыми цифрами обозначены митохондрии. Слева сверху: AM1, инкубированного в среде с фосфатом. Справа сверху: AM1, инкубированного в среде с белым фосфором. Слева внизу: AM2, инкубированного в среде с фосфатом. Справа внизу: AM2, инкубированного в среде с белым фосфором.

В опыте при воздействии белого фосфора наблюдается изменение электронной плотности и толщины клеточной стенки. Также значительно увеличивается число митохондрий в клетках гиф (рис. 3). Кроме, того, на поверхности клеточной стенки появляется дополнительный волокнистый слой, состоящий из протеогликанов [11, 17] – поверхность гифов становится ворсистой, чего не наблюдается в контроле (рис. 3). В структуре клеточного содержимого изменений выявлено не было, никаких разрушений органелл, нарушений в цитоплазматической мембране и цитоплазме не наблюдалось.

Интересно, что штамм *A. niger* AM2, более адаптированный к существованию в присутствии белого фосфора по сравнению с предковым штаммом AM1 [5], имеет утолщенную клеточную стенку и развитый волокнистый слой даже в контроле, в отсутствие белого фосфора. То есть, признаки реакции на стресс в результате отбора стали для этого специализированного штамма постоянными, типовыми морфологическими признаками.

По данным статистической обработки результатов, у AM1 толщина клеточной стенки сильно различается в опыте и контроле ($F\{3, 44\} = 11.86, P < 0.0001$), а у AM2 данного различия нет. Размер митохондрий статистически отличается в опыте и контроле для каждого штамма. Между контролями разных штаммов различия размеров митохондрий статистически не выражены. Проверка на нормальность и однородность по критерию Д'Агостино-Пирсона выявила, что наборы данных всех экспериментальных и контрольных образцов имеют нормальное распределение (табл. 2). Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего (SEM).

Таблица 2. Результаты проверки на нормальность по критерию Д'Агостино-Пирсона

Образец	Толщина клеточной стенки		Диаметр митохондрий	
	K2-значение	P-значение	K2-значение	P-значение
P ₄ -AM1	1.21	0.1812	1.614	0.4461
PO ₄ -AM1	2.491	0.2877	4.464	0.1073

P ₄ -AM2	0.5517	0.7589	1.97	0.3734
PO ₄ -AM2	1.705	0.4264	4.468	0.1071

То есть, разброс значений в пределах допустимого, а различия толщины клеточных стенок и размеров митохондрий имеют высокую достоверность.

В процессе исследований был разработан метод экстракции белков из мицелия аспергилла. Одномерный электрофорез подтвердил присутствие белков, т. е. эффективность данного метода.

Исследования протеома продемонстрировали резкие различия экспрессии генов и белкового профиля при росте аспергилла в отсутствии и присутствии белого фосфора. Данное предположение подтверждается изменением белкового профиля в контрольном и опытном образцах после проведения двумерного электрофореза. Белковые профили контроля и опыта после двумерного электрофореза не совпадают. Пятна, каждое из которых соответствует отдельному белку, накладываются и дают желтое свечение очень редко (рис. 4).

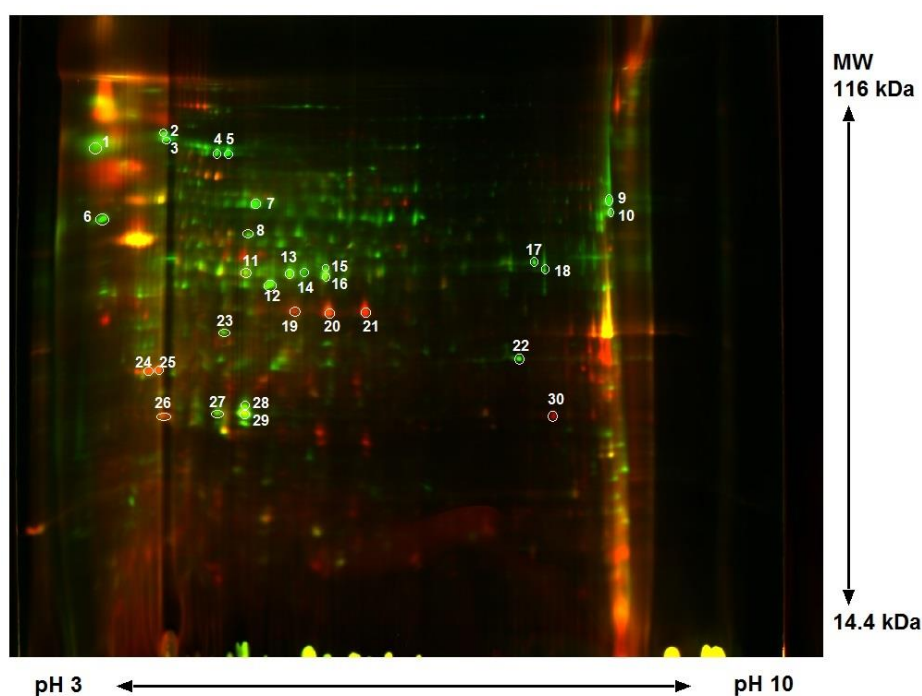


Рис. 4. Сканированное изображение двумерного геля протеома *A. niger*. Белки контроля (без белого фосфора) окрашены красной флуоресцентной краской, белки образца, обработанного белым фосфором – зеленой флуоресцентной краской. Желтая флуоресценция наблюдается при наложении белков контроля и опыта. Белым цветом выделены белковые пятна, впоследствии вырезанные для дальнейших исследований.

После получения спектров MALDI и обработки данных были идентифицированы белки № 6, 9 и 22, по нумерации окрашенных пятен белков на геле. Белок №6 является дигидронеоптеринальдолазой, участвующей в биосинтезе фолиевой кислоты и близких к ней птерино-вых коферментов. Вероятно, их присутствие стимулирует метаболические процессы и способствует детоксикации белого фосфора и его токсичных производных [10]. Белок №9 является поверхностной оксидоредуктазой, возможно, принимающей участие в окислении белого фосфора и его производных [9]. №22 оказался белком с неизвестной функцией. Его

появление в ответ на действие белого фосфора дает основание предполагать, что данный белок имеет отношение к защите от стрессовых воздействий. Например, он может оказаться ферментом, обезвреживающим белый фосфор, или его транспортером внутрь клетки. Или одним из белков, инициирующих каскадный механизм реакции на стресс. Ответ дадут будущие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более ранние наши исследования показали, что все изучаемые нами штаммы черного аспергилла (*A. niger*) обладают устойчивостью к белому фосфору [4, 5, 14]. Результат обладает новизной и очень интересен. Из него следует вывод о наличии у черных аспергиллов защитных механизмов, позволяющих им быть устойчивыми к токсичному загрязнителю окружающей среды – белому фосфору. Эти механизмы слабо выражены у бактерий и наиболее ярко проявляются у штамма *A. niger* AM1. Возникло предположение, что этот механизм устойчивости связан с морфологией грибов, в первую очередь со строением клеточной стенки. Дальнейшие исследования, с применением оптической и электронной микроскопии, блестяще подтвердили данное предположение.

Метод конфокальной микроскопии показал, что белый фосфор в исследуемой концентрации (0.25 %) оказывает на жизнеспособность мицелия гриба незначительное влияние. Микрофотографии, сделанные в электронном микроскопе, продемонстрировали утолщение клеточных стенок в опыте, увеличение их электронной плотности, появление на их поверхности волокнистого слоя и увеличение числа митохондрий в гифах. Данные признаки наверняка связаны с защитой от внешних воздействий – клеточная стенка служит барьером, а митохондрии осуществляют энергетический обмен, поддерживают метаболическую активность. Интересно, что для штамма *A. niger* AM2 эти признаки стали типовыми.

Другое предположение гласило, что механизм устойчивости связан с наличием ферментов (вероятно, оксидаз), обезвреживающих белый фосфор. Результатом исследования протеома стало то, что эта гипотеза тоже имеет под собой реальное основание. Стоит отметить большую разницу генной экспрессии у грибов в контроле и опыте, и появление в присутствии белого фосфора белков, нехарактерных для контроля. Причем один из них обладает неизвестной функцией.

ВЫВОДЫ

1. Присутствие белого фосфора в культуральной среде оказывает влияние на морфологию гриба *Aspergillus niger* AM1: происходит утолщение и усложнение структуры клеточной стенки, увеличивается число митохондрий. У штамма *A. niger* AM2 данные признаки стали нормой.
2. Белый фосфор практически не влияет на соотношение живых и мертвых клеток в культуре гриба.
3. Реакцией на белый фосфор является существенное изменение экспрессии генов и белкового профиля черного аспергилла.
4. Вероятно, перечисленные изменения морфологических и биохимических признаков являются специфической защитной реакцией, позволяющей аспергиллам адаптироваться к токсическому действию белого фосфора.

Авторы выражают благодарность Фонду содействия инновациям за финансовую поддержку проекта № С1-34299. Лазерная конфокальная микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия проводились на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ. Масс-спектрометрические исследования проведены в ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

Список литературы

1. Бисерова Н.М. Методы визуализации биологических ультраструктур: Практическое руководство для биологов // Москва: Изд-во КМК 2013.
2. Миндубаев А.З. Биодegradация? Нет, биосинтез // Национальные приоритеты России, 2021. №4(41). С.89–102.
3. Миндубаев А.З. Микроорганизмы деструкторы и их роль в очистке природных сред (обзор) // Живые и биокосные системы, 2020. № 31. С. 1–20.
4. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Биологическая деградация желтого (белого) фосфора – вещества первого класса опасности // Журнал неорганической химии, 2021. Т.66. №8. С.1137–1142.
5. Миндубаев А.З., Сапармырадов К.А., Акосах Й.А., Бабынин Э.В., Минзанова С.Т., Волошина А.Д. Характеристика штаммов микроорганизмов, устойчивых к присутствию в среде белого фосфора // Живые и биокосные системы, 2020. № 33. С. 1–17.
6. Миндубаев А.З., Федосимова С.В., Григорьева Т.В., Романова В.А., Бабаев В.М., Бузюрова Д.Н., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Караева Ю.В. Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба *Aspergillus niger* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2021. Т.11. №1. С.69–79.
7. Bhaduria V., Peng Y.-L. Optimization of a protein extraction technique for fungal proteomics // Indian J Microbiol., 2010. V. 50. №.1. P.S127–S131.
8. Gorshkov V., Petrova O., Gogoleva N., Gogolev Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 during adaptation to stress conditions // FEMS Immunol Med Microbiol., 2010. Vol.59. No.3. P.378–385.
9. Harriff M.J., Danelishvili L., Wu M., Wilder C., McNamara M., Kent M.L., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* Genes MAV_5138 and MAV_3679 Are Transcriptional Regulators That Play a Role in Invasion of Epithelial Cells, in Part by Their Regulation of CipA, a Putative Surface Protein Interacting with Host Cell Signaling Pathways // Journal Of Bacteriology, 2009. Vol. 191. No. 4. P. 1132–1142.
10. Haussmann C., Rohdich F., Lottspeich F., Eberhardt S., Scheuring J., Mackamul S., Bacher A. Dihydroneopterin Triphosphate Epimerase of *Escherichia coli*: Purification, Genetic Cloning, and Expression // J Bacteriol., 1997. Vol. 179, No. 3. P. 949–951. doi: 10.1128/jb.179.3.949–951.
11. Kang X., Kirui A., Muszyński A., Widanage M.C.D., Chen A., Azadi P., Wang P., Mentink-Vigier F., Wang T. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR // Nature Communications, 2018. Vol. 9. No. 2747. P. 1–12.
12. Lelong C., Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. Silver Staining of Proteins in 2DE Gels // Methods Mol Biol., 2009. Vol. 519. P. 339–350.
13. Nagasawa T., Yamada H. Enzymatic Transformations of 3-Chloroalanine into Useful Amino Acids // Applied Biochemistry and Biotechnology, 1986. Vol 13. No. 2. P.147–165.
14. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Bedeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. Biological Degradation of Yellow (White) Phosphorus, a Compound of First Class Hazard // Russian Journal of Inorganic Chemistry, 2021. Vol.66. No.8. P. 1239–1244.
15. Mindubaev A., Babynin E., Minzanova S., Badeeva E., Akosah Y. White phosphorus genotoxicity // Bio web of conference, 2021. Vol.31. No.00018. P.1–3.
16. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy // J Cell Biol., 1963. Vol. 17. P. 208–213.
17. Willger S.D., Puttikamonkul S., Kim K.-H., Burritt J.B., Grahl N., Metzler L.J., Barbuch R., Bard M., Lawrence C.B., Cramer R. A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity, Hypoxia Adaptation, Azole Drug Resistance, and Virulence in *Aspergillus fumigatus* // PLoS Pathog., 2008. Vol.4. No.11. e1000200. P. 1–18.

References

1. Biserova N.M. Methods for Visualization of Biological Ultrastructures: A Practical Guide for Biologists // Moscow: KMK. 2013. 110 p (In Russian).
2. Mindubaev A.Z. Biodegradation? No, biosynthesis // Natsional'nye priorityety Rossii. 2021. No.4(41). P. 89-102. (In Russian).
3. Mindubaev A.Z. Microorganisms destructors and their role in the purification of natural environments (review) // Living and bio-inert systems. 2020. No.31. P.1-20. (In Russian).
4. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Bedeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. Biological Degradation of Yellow (White) Phosphorus, a Compound of First Class Hazard // Zhurnal Neorganicheskoi Khimii. 2021. Vol. 66. No. 8. P.1137-1142. (In Russian).
5. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Akosah Y.A., Saparmyradov K.A., Minzanova S.T., Mironova L.G., Badeeva E.K. Characteristic of microbial strains resistant to white phosphorus // Living and bio-inert systems. 2020. No.33. P. 1-17. (In Russian).
6. Mindubaev A.Z., Fedosimova S.V., Grigoryeva T.V., Romanova V.A., Babaev V.M., Buzyurova D.N., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A., Karaeva J.V. Effects of white phosphorus on the cellular morphology and protein profile of *Aspergillus niger* // Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2021. Vol.11. No.1. P.69-79. (In Russian).
7. Bhaduria V., Peng Y.-L. Optimization of a protein extraction technique for fungal proteomics // Indian J Microbiol. 2010. V. 50. №.1. P.S127–S131.
8. Gorshkov V., Petrova O., Gogoleva N., Gogolev Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 during adaptation to stress conditions // FEMS Immunol Med Microbiol. 2010. Vol.59.No.3. P.378-385.
9. Harriff M.J., Danelishvili L., Wu M., Wilder C., McNamara M., Kent M.L., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* Genes MAV_5138 and MAV_3679 Are Transcriptional Regulators That Play a Role in Invasion of Epithelial Cells, in Part by Their Regulation of CipA, a Putative Surface Protein Interacting with Host Cell Signaling Pathways // Journal Of Bacteriology. 2009. Vol. 191. No. 4. P. 1132-1142.
10. Haussmann C., Rohdich F., Lottspeich F., Eberhardt S., Scheuring J., Mackamul S., Bacher A. Dihydroneopterin Triphosphate Epimerase of *Escherichia coli*: Purification, Genetic Cloning, and Expression // J Bacteriol 1997. Vol. 179, No. 3. P. 949-951.
11. Kang X., Kirui A., Muszyński A., Widanage M.C.D., Chen A., Azadi P., Wang P., Mentink-Vigier F., Wang T. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR // Nature Communications. 2018. Vol. 9. No. 2747. P. 1-12.
12. Lelong C., Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. Silver Staining of Proteins in 2DE Gels // Methods Mol Biol. 2009. Vol. 519. P. 339-350.
13. Nagasawa T., Yamada H. Enzymatic Transformations of 3-Chloroalanine into Useful Amino Acids // Applied Biochemistry and Biotechnology. 1986. Vol 13. No. 2. P.147-165.
14. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Bedeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. Biological Degradation of Yellow (White) Phosphorus, a Compound of First Class Hazard. Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2021. Vol.66. No.8. P. 1239-1244.
15. Mindubaev, A. White phosphorus genotoxicity / A. Mindubaev, E. Babynin, S. Minzanova, E. Badeeva, Y. Akosah // Bio web of conference. 2021. Vol.31. No.00018. P.1-3.
16. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J Cell Biol. 1963. Vol. 17. P. 208-213.
17. Willger S.D., Puttikamonkul S., Kim K.-H., Burritt J.B., Grahl N., Metzler L.J., Barbuch R., Bard M., Lawrence C.B., Cramer R. A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity, Hypoxia Adaptation, Azole Drug Resistance, and Virulence in *Aspergillus fumigatus* // PLoS Pathog. 2008. Vol.4. No.11. e1000200. P. 1-18.