УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63
DOI: 10.34924/FRARC.2022.34.49.001

ВЛИЯНИЕ БЕЛОГО ФОСФОРА НА ПРОТЕОМ И КЛЕТОЧНУЮ МОРФОЛОГИЮ *ASPERGILLUS NIGER*

Акосах Й.А., аспирант[1], Миндубаев А.З., к.х.н., с.н.с.[2], Бабынин Э.В., к.б.н., с.н.с.[1], Караева Ю.В., к.т.н., в.н.с. [2], Бадеева Е.К., к.х.н., н.с. [3]

[1]ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.
[2]Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН, 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 261
[3] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 420088, ул. Арбузова 8, г. Казань, Россия.
E-mail: mindubaev-az@yandex.ru; a.mindubaev@knc.ru

Реферат. Проведенные в представленной работе микроскопические и протеомные исследования пролили свет на механизмы устойчивости *Aspergillus niger* к белому фосфору. Клеточная стенка гриба является барьером на пути проникновения белого фосфора в клетку. В ответ на воздействие токсиканта наблюдается рост толщины клеточной стенки. Второй механизм связан с экспрессией генов стресса и выработкой грибом белков, участвующих в обезвреживании токсикантов, в том числе белого фосфора. 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: белый фосфор, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия, протеомный анализ, электрофорез, *Aspergillus niger*.

THE EFFECT OF WHITE PHOSPHORUS ON THE CELLULAR MORPHOLOGY AND PROTEOME OF *ASPERGILLUS NIGER*

Akosah Y.A., Mindubaev A. Z., Babynin E.V., Karaeva J.V., Badeeva E.K.

Abstract. The microscopic and proteomic studies carried out in this work shed light on the mechanisms of white phosphorus resistance in Aspergillus niger.

The cell wall of the fungus is a barrier to white phosphorus penetration into the cell. An increase in cell wall thickness is observed in response to exposure to the toxicant. The second mechanism is associated with the expression of stress genes and the production by the fungus of proteins involved in the neutralization of toxicants, including white phosphorus. In addition, white phosphorus induces a general activation of metabolism, accompanied by an increase in the number of mitochondria in cells. White phosphorus has been shown to have little effect on the ratio of living to dead cells in fungal colonies, i.e., resistance to it is very high.

Keywords: white phosphorus, confocal microscopy, electron microscopy, proteomic analysis, electrophoresis, *Aspergillus niger*.

В своих исследованиях [1-3] мы применили метод биодеградации для обезвреживания соединений фосфора, ряд которых также относится к первому классу опасности. Дальнейшим развитием работы стало изучение механизмов устойчивости уникальных черных аспергиллов штаммов АМ1 и АМ2 к токсическому загрязнению культуральной среды белым фосфором. Выяснилось, что таких механизмов несколько, они имеют морфологическую и биохимическую природу.

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®BacLightTM (Thermo Fisher Scientific, США). Суспензии были окрашены смесью красителей пропидиум йодид и SYTO 9, флуоресцирующих при разных длинах волн. 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.

Трансмиссионная электронная микроскопия осуществлялась следующим образом. 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. 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.

Белки разделяли при помощи одномерного и двумерного гель электрофореза. Идентификацию белков проводили с помощью поисковой программы MASCOT против базы данных *Aspergillus*, которая включает в себя нуклеотидные последовательности рода *Aspergillus*.

Конфокальная микроскопия показала, что белый фосфор в исследуемой концентрации (0.2 %) оказывает на смертность мицелия гриба незначительное влияние. С ее помощью мы стремились определить влияние белого фосфора на жизнеспособность клеток *Aspergillus*. Можно было предполагать, что в присутствии этого токсичного вещества пропорциональное количество мертвых клеток должно быть выше по сравнению с контролем. Было установлено (рисунок 1), что соотношение живых и отмерших клеток грибов мало зависит от присутствия белого фосфора в среде. У штамма АМ1 в контроле интенсивность красной флуоресценции составила 17.620 единиц, а зеленой 27.493. В опыте у АМ1 величины составили 24.707 и 34,022, соответственно. Для штамма АМ2 в контроле интенсивность красной флуоресценции составила 24.172, зеленой 26.980. В опыте у АМ2 величины составили 26.855 и 27.589. То есть, как в отсутствии, так и в присутствии P_4 у обоих исследуемых штаммов *A. niger* живые клетки преобладают над погибшими. Таким образом, белый фосфор в концентрации 0.2% оказывает незначительное влияние на выживаемость мицелия аспергилла, что является поразительным результатом.

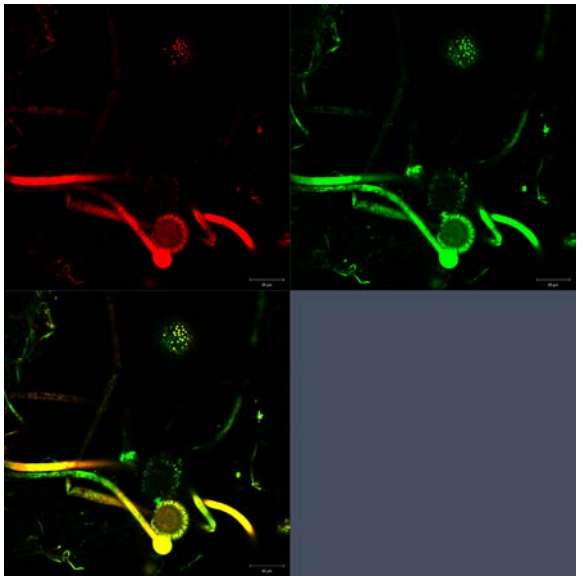

Рисунок 1. CLSM 3 D изображение мицелия A. niger.
Красная флюоресценция пропидиум йодида, окрашивающего мертвые ткани;
зеленая флуоресценция SYTO 9, окрашивающего живые ткани.
Желтое свечение – результат наложения флуоресценции обоих красителей.

Исследования протеома, описанные в работе [4], продемонстрировали четкие различия белкового профиля при росте аспергилла в отсутствии и в присутствии белого фосфора. Белковый профиль в свою очередь определяется экспрессией генов, следовательно, есть основания говорить об ответе на загрязнение белым фосфором на этом уровне.

При воздействии белого фосфора наблюдается изменение электронной плотности и толщины клеточной стенки. Также значительно увеличивается число митохондрий в клетках гиф [4]. Кроме, того, на поверхности клеточной стенки появляется дополнительный волокнистый слой, состоящий из протеогликанов – поверхность гифов становится ворсистой, чего не наблюдается в контроле. Данные признаки наверняка связаны с защитой от внешних воздействий – клеточная стенка служит барьером, а митохондрии осуществляют энергетический обмен, поддерживают метаболическую активность (рисунок 2).

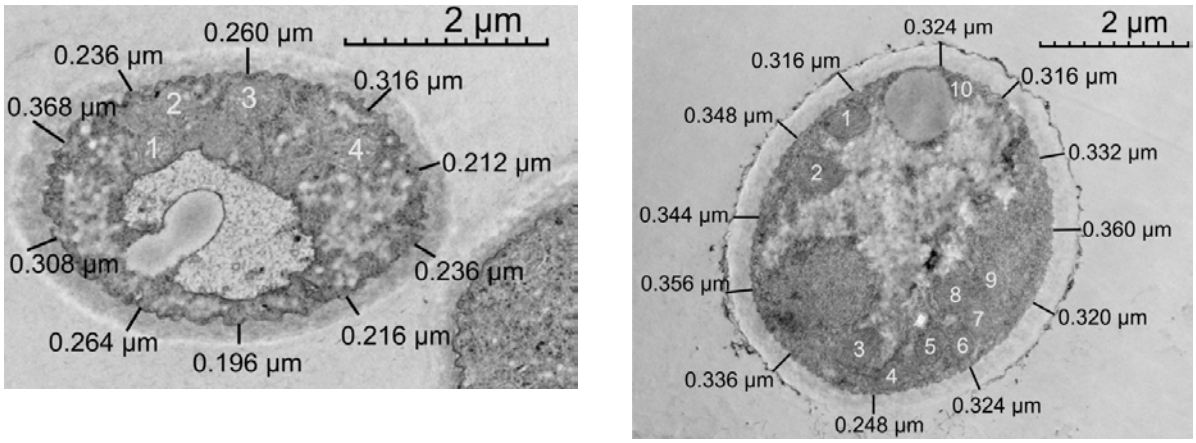

Рисунок 2. ТЭМ изображения поперечного среза гифы АМ1, инкубированного в среде с фосфатом (слева) и с белым фосфором (справа). Указана толщина клеточной стенки в нанометрах. Белыми цифрами обозначены митохондрии.

Литература

1. Акосах Й.А., Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Минзанова С.Т., Бадеева Е.К. Филогенетическое исследование грибов *Aspergillus niger* АМ1 // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых АПК «Актуальные вопросы развития отраслей сельского хозяйства: теория и практика». – Рассвет, 14-15 мая 2021 г. С.8-12. DOI: 10.34924/FRARC.2021.26.77.001
2. 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. DOI: 10.1134/S0036023621080155
3. 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. DOI: 10.1051/bioconf/20213100018
4. 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. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-1-69-79

УДК 582.739:632,51:582.231
DOI: 10.34924/FRARC.2022.45.15.001

ВЛИЯНИЕ МЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА БИОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ СОИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ОСНОВНОЙ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ

Антипова А.Н., аспирант, Коржов С.И., докт. с/х наук, профессор

Воронежский государственный аграрный университет
имени Императора Петра I, 394087, г. Воронеж, ул. Мичурина, 1
e-mail: anastasiya.antipova048@ya.ru

Реферат. Метеорологические условия оказали значительное влияние на биометрические показатели растений сои. Потенциал культуры более полно раскрывался при условиях окружающей среды, близким к оптимальным. На стрессовые климатические условия – недостаточное количество тепла и влаги, отмечена негативная реакция. На каждом из исследуемых способов основной обработки почвы полученные биометрические показатели отличались: самые высокие растения с наибольшей площадью листовой поверхности были на варианте со вспашкой, средние значения зафиксированы на варианте с безотвальным рыхлением и самые низкие показатели отмечены на дисковании.

Ключевые слова: соя, основная обработка, вспашка, безотвальное рыхление, дискование, метеорологические условия, высота растений, площадь листовой поверхности

THE INFLUENCE OF METEOROLOGICAL CONDITIONS ON THE BIOMETRIC INDICATORS OF SOYBEAN PLANTS IN VARIOUS METHODS OF BASIC TILLAGE

Antipova A.N., Korzhov S.I.

Report. Meteorological conditions had a significant impact on the biometric indicators of soybean plants. The potential of culture was more fully re-