

ВИЯВЛЕННЯ ПРОДУЦЕНТІВ БІОГЕННИХ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК СЕРЕД ПРЕДСТАВНИКІВ ГРИБІВ ВІДДІЛІВ АСКОМІЦЕТИ (*ASCOMYCOTA*) І БАЗИДІОМІЦЕТИ (*BASIDIOMYCOTA*)

С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, І.А. Ковальчук*, Л.А. Євжик

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: kovalchuk.kpi@gmail.com

Received 11 November; Accepted 7 December 2018

Проблематика. Біогенні магнітні наночастинки (БМН) виявлено у представників усіх трьох надцарств живих організмів: бактерій, архей та еукаріотів. При цьому встановлено, що механізм біомінералізації БМН єдиний для всіх живих організмів. Експериментально БМН виявлено у водоростях і найпростіших, черв'яках, хітонах, равликах, мурахах і метеликах, медоносних бджолах, термітах, омарах, тритонах, мігруючих та немігруючих рибах, морських черепахах, птахах, кажанах, дельфінах і китах, у свині та в людини, у рослинах і грибах. Дослідження наявності БМН у представників царства Гриби нечисленні, так само як і уявлення про ті функції, які вони виконують. Зокрема, невеликий обсяг біоінформаційних досліджень був спричинений відсутністю в базах даних розшифрованих геномів грибів. Усього виділяють 10 відділів царства Гриби, з яких жоден відділ не проаналізовано повністю. Дослідження грибів, які є представниками різних відділів царства Гриби, має як фундаментальний, так і практичний інтерес. З фундаментальної точки зору, виявлення потенційних продуцентів БМН серед грибів сприятиме пошуку відповіді на відкрите питання про функціональне призначення БМН у різних організмах. З практичної точки зору, виявлення потенційних продуцентів БМН серед грибів є перспективним для виготовлення магнітокерowanego сорбенту на основі біомаси грибів. Для дослідження вибрано два найбільш численних відділи грибів – аскоміцети (*Ascomycota*) та базидіомицети (*Basidiomycota*), геноми яких є широко представленими в біоінформаційних базах даних.

Мета. Метою роботи є виявлення серед представників грибів відділів аскоміцети (*Ascomycota*) та базидіомицети (*Basidiomycota*) потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок методами порівняльної геноміки та експериментальне дослідження методами атомно-силової мікроскопії (АСМ) і магнітної силової мікроскопії (МСМ) зразків тканин грибів на предмет наявності в них БМН.

Методика реалізації. В роботі застосовано метод попарного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків грибів з білками *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 із використанням вільної в доступі програми “BLAST” Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI, США). Для експериментального дослідження зразків тканин грибів на предмет наявності в них БМН використовували методи АСМ і МСМ.

Результати. Проведено біоінформаційний аналіз 160 видів грибів відділу аскоміцети та 63 видів грибів відділу базидіомицети та вибрано для аналізу результатів вирівнювання по 15 представників, оскільки їх геном є в базі даних GenBank NCBI розшифрований більше ніж на 50 % та відомі функції гомологічних білків. Для аналізу результатів проведеного дослідження використано такі стандартні показники: значення *E*-числа (тобто кількості вирівнювань з такою або кращою вагою вирівнювання, яку можна знайти випадково в базі даних певного розміру), *Ident* – відсоток перекривання амінокислотних послідовностей, у межах яких проводиться вирівнювання, *Length* – кількість ідентичних амінокислотних залишків білків, що порівнюються, при оптимальному вирівнюванні та функції білків, що вирівнювались. При *Ident* > 18 %, *E*-число ≤ 0,05, *Length* > 100 можна стверджувати, що послідовності гомологічні, а досліджуваний грибок є потенційним продуцентом БМН.

Висновки. Методами порівняльної геноміки показано, що серед досліджених представників грибів відділів аскоміцети (*Ascomycota*) та базидіомицети (*Basidiomycota*), геноми яких розшифровані більш ніж на 50 % у базі даних GenBank NCBI, всі види є потенційними продуцентами БМН. При цьому експериментальні дослідження БМН у зразках грибів *A. bisporus* і *L. edodes* методами АСМ і МСМ показали, що БМН у грибах утворюють ланцюжки, які локалізовані на стінках гіфів досліджених зразків грибів.

Ключові слова: біогенні магнітні наночастинки; біомінералізація; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Мат-білки; атомно-силова мікроскопія; магнітна силова мікроскопія; методи порівняльної геноміки; *Agaricus bisporus*; *Lentinula edodes*.

Вступ

На сьогодні біогенні магнітні наночастинки (БМН) експериментально виявлено у водоростях і найпростіших [1], черв'яках [2], хітонах [3], равликах [4], мурахах і метеликах [5–7], медоносних бджолах [6, 8], термітах [9], омарах [10], тритонах [11], мігруючих та немігруючих рибах [12–15], морських черепахах [16, 17], птахів [18–21], кажанах [22], дельфінах і китах [23], у свині [24] та в людини [13, 25–29]. У людини БМН виявлено як у нормі, так і при патологіях. Наприклад, підвищена кількість БМН порівняно з нормою спостерігається при нейродегенеративних [30–32], онкологічних [25] захворюваннях, при аневризмі серця [33], атеросклерозі [34]. У людини в нормі БМН теоретично та експериментально виявлено практично у всіх органах і тканинах [35].

Методами порівняльної геноміки показано, що генетичний апарат біосинтезу БМН є єдиним у представників усіх царств живих організмів і ґрунтується на генах, які походять від спільного предка ще до появи багатоклітинних організмів [36–39].

Згідно з ідеєю праць [24, 37, 40], БМН – це магнітний нанопристрій, який є концентратом внутрішньоклітинних і/або позаклітинних феромагнітних, феритових, парамагнітних або ефективно парамагнітних компонент кластерного типу, і таким чином, БМН є складовою частиною транспортної, регуляторної та сенсорної систем організму.

Уперше БМН експериментально виявлено у грибів *Fusarium oxysporum* і *Verticillium spp.* [41], які утворюють БМН неправильної квазісферичної форми. Розмір частинок варіюється в діапазоні 20–50 нм, наночастинки добре відокремлені одна від одної [41]. На відміну від магнітотаксисних бактерій (МТБ), у грибів кристали синтезуються зовнішньоклітинно, що свідчить про участь у біомінералізації БМН у грибів *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.* іншого набору білків біомінералізації, ніж у МТБ.

У роботі [42] методами біоінформатики досліджено потенційних продуцентів БМН для представників 3 видів царства Гриби: *Agaricus bisporus*, *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.* Усі 3 види виявилися продуцентами зовнішньоклітинних кристалічних БМН.

Відомо, що низка грибів є природними і безпечними сорбентами відносно іонів важких металів [43–46], барвників [47–49] та пестицидів [50], здатні накопичувати високі концен-

трації важких металів [51–54]. Так, для плодів грибів-макроміцетів *Boletus edulis* (білий гриб), *Canoderma lucidum* (трутовик), *Calvatia excipuliformis* (головач), *Paxillus involutus* (свиноушка), *Tricholoma terreum* (рядовка земляна), *Armillaria mellea* (опеньок), *Lentinula edodes* (шиїтаке) в [55–60] показано, що вони є ефективними сорбентами іонів важких металів, але обмежене використання цих грибів як біосорбентів пов'язане з проблемами їх вилучення з відпрацьованого робочого середовища. Відомий метод – фільтрування через паперовий фільтр – є досить тривалим і неефективним [45, 60]. Тож важливо знайти більш ефективний спосіб вилучення відпрацьованого біосорбента з робочого середовища. Таким дешевим та ефективним методом є високоградієнтна магнітна сепарація (ВГМС), яка проходить у швидкісному режимі.

Тому метою роботи є пошук потенційних продуцентів БМН серед грибів відділів аскоміцети (*Ascomycota*) і базидіоміцети (*Basidiomycota*) та їх класифікація за типом внутрішньої структури (кристалічна чи аморфна) і місцем локалізації БМН (зовнішньоклітинна чи внутрішньоклітинна) з використанням методів порівняльної геноміки, а також експериментальне дослідження методами АСМ та МСМ зразків грибів *A. bisporus* та *L. edodes* на предмет наявності БМН.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували геноми і протеоми представників царства Гриби, геноми яких розшифровано на 50 % і більше в базі даних GenBank NCBI. Проводили вирівнювання геномів грибів із геномом магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, для якої процес біомінералізації БМН найбільш докладно вивчено на генетичному рівні [61]. У дослідженні використано метод парного вирівнювання амінокислотних послідовностей із використанням вільної в доступі програми “BLAST” NCBI. Для аналізу результатів проведеного дослідження використано такі показники: значення *E*-числа (тобто кількості вирівнювань з такою або кращою вагою вирівнювання, яку можна знайти випадково в базі даних певного розміру), *Ident* – відсоток перекривання амінокислотних послідовностей, у межах яких проводиться вирівнювання, *Length* – кількість ідентичних амінокислотних залишків білків, що порівнюються, при оптимальному вирівнюванні та функції білків, що вирівнювались [61].

Проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mam, без яких неможлива біомінералізація БМН у *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 [61], з геномами грибів.

Для експериментального підтвердження наявності БМН досліджували зразки печериці двоспорової *Agaricus bisporus* та шиїтаке *Lentinula edodes* методами атомно-силової (АСМ) [62] та магнітної силової мікроскопії (МСМ) [63]. Підготовка грибів до дослідження за допомогою методів скануючої зондової мікроскопії (СЗМ) включає такі етапи.

1. Одержання матеріалу вирізанням шматочків досліджуваних грибів розміром близько 1 см³.

2. Фіксація матеріалу 10 %-ним розчином формаліну протягом 24 год для закріплення структури гіфів гриба в тому місці й стані, в якому вони були у живому об'єкті, з подальшою промивкою зразків дистильованою водою.

3. Зневоднення фіксованого матеріалу спиртами зростаючої концентрації (від 50 до 100 %).

4. Ущільнення об'єктів у парафіні. Ущільнення матеріалу дає змогу виготовити з нього тонкі (завтовшки 3–7 мкм) зрізи.

5. Виготовлення зрізів на мікротомі. Після отримання зрізів їх поміщають на предметні скельця, далі звільняють від парафіну та досліджують методами СЗМ.

Результати

У табл. 1, 2 наведено результати порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mam, без яких неможлива біомінералізація БМН у *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, з геномами грибів відділів аскоміцети (*Ascomycota*) та базидіоміцети (*Basidiomycota*). У табл. 1, 2 наведено гриби, геном яких розшифровано більш ніж на 50 % та для яких відомі функції гомологічних білків.

Таблиця 1: Порівняння білків магнітосомного острівця МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків – представників аскоміцетів (*Ascomycota*)

Організм	Повнота геному	E-число					
		Ident, %					
		Length					
		Білок					
		Білки <i>Magneto-spirillum gryphiswal-dense</i> MSR-1					
		mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK
<i>Aspergillus</i>							
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	●	2·10 ⁻⁹	9·10 ⁻¹⁵	3·10 ⁻¹⁴	0,27	0,66	0,002
		22	25	24	28	36	22
		165	307	313	141	39	171
		20S cyclosome subunit	Cation efflux family protein		Bifunctional tryptophan synthase TRPB	Inositol 5-phosphatase	Actin
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357	●	2·10 ⁻⁷	1·10 ⁻¹⁶	3·10 ⁻¹³	0,53	0,78	0,003
		24	28	25	28	32	22
		155	287	306	141	59	171
		20S cyclosome subunit	Cation efflux family protein		Bifunctional tryptophan synthase TRPB	Nuclear serine protease	Actin
<i>Aspergillus fischeri</i> NRRL 181	●	1·10 ⁻⁹	5·10 ⁻¹⁷	1·10 ⁻¹⁴	0,28	0,41	0,002
		23	25	23	41	26	22
		165	306	303	41	92	171
		20S cyclosome subunit	Cation efflux family protein		Histidine kinase G2	Mannosyltransferase	Actin

Продовження таблиці 1

Організм	Повнота геному	<i>E</i> -число					
		Ident, %					
		Length					
		Блок					
		Білки <i>Magneto-spirillum gryphiswal-dense</i> MSR-1					
		mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK
<i>Aspergillus candidus</i> CBS 102.13	●	5·10⁻⁹	2·10⁻¹¹	9·10⁻⁸	0,013	0,14	0,001
		23	36	27	30	26	23
		156	118	205	60	102	172
		DNA-binding cell division cycle control protein	Cation efflux family-domain-containing protein		Ubiquitin-protein ligase	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein	Actin, gamma
		22	26	25	30	27	32
		163	305	303	60	85	81
		TPR-like protein	Hypothetical protein				
<i>Aspergillus brunneo-violaceus</i> CBS 621.78	●	1·10⁻⁸	1·10⁻⁹	2·10⁻¹³	0,1	0,9	0,003
		22	25	26	30	32	22
		165	303	303	60	59	171
		TPR-like protein	Cation efflux protein		E3 ubiquitin protein ligase	Pro-apoptotic serine protease	Actin, gamma
<i>Aspergillus welwitschiae</i> CBS 139.54b	●	1·10⁻⁸	3·10⁻¹⁴	5·10⁻¹⁴	0,036	0,17	0,003
		21	24	24	28	27	22
		165	304	303	92	102	171
		TPR-like protein	Cation efflux family-domain-containing protein		Hypothetical protein	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein	Actin
<i>Penicillium</i>							
<i>Penicillium roqueforti</i> FM164	●●	4·10⁻⁹	7·10⁻²¹	8·10⁻¹¹	0,47	1,3	0,003
		23	26	25	31	40	23
		154	317	327	70	47	172
		Protein bimA	Cation efflux protein		Beta-ketoacyl synthase	Mitochondrial carrier domain	Actin, gamma
<i>Penicillium chrysogenum</i> P2niaD18	●	8·10⁻¹⁰	6·10⁻²²	4·10⁻¹²	1,3	0,4	0,005
		23	26	24	28	38	30
		154	318	330	122	50	69
		Protein bimA	Mitochondrial metal transporter		Argonaute-family protein PcAgo2	Hypothetical protein	Actin, gamma
<i>Penicillium camemberti</i> FM 013	●	6·10⁻⁹	2·10⁻²¹	1·10⁻¹¹	1,4	0,47	0,003
		23	27	24	43	32	23
		154	304	301	40	38	172
		Tetratricopeptide-like helical	Cation efflux protein		Unnamed protein product	Sphingomyelin phosphodiesterase	Actin/actin-like

Закінчення таблиці 1

Організм	Повнота геному	<i>E</i> -число					
		Ident, %					
		Length					
		Білок					
		Білки <i>Magneto-spirillum gryphiswal-dense</i> MSR-1					
		mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK
<i>Penicillium brasilianum</i> LaBioMMi 136	●	$3 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-20}$	$4 \cdot 10^{-11}$	1,2	0,13	0,003
		21	26	24	40	27	22
		165	309	332	47	94	171
		Protein bimA	Cation efflux family protein	MMT1	60S ribosomal protein L23-B	Zn(II)2Cys6 transcription factor	Actin, gamma
<i>Penicillium digitatum</i> Pd1	●	$8 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-21}$	$1 \cdot 10^{-12}$	0,53	0,3	0,002
		23	26	25	42	23	23
		154	317	324	36	100	172
		20S cyclosome subunit	Cation efflux family protein		Hypothetical protein		Actin, gamma
<i>Trichoderma</i>							
<i>Trichoderma guizhouense</i> NJAU 4742	●	$4 \cdot 10^{-12}$	$6 \cdot 10^{-13}$	$7 \cdot 10^{-11}$	0,46	1,5	0,002
		25	23	24	25	62	22
		165	303	309	163	21	171
		bimA	Cation efflux family protein		Beta-lactamase-like protein	Hypothetical protein	Actin
<i>Trichoderma arundinaceum</i> IBT 40837	●	$2 \cdot 10^{-12}$	$8 \cdot 10^{-12}$	$2 \cdot 10^{-7}$	0,28	0,2	0,002
		25	24	24	22	53	22
		165	224	238	158	40	168
		Tetratricopeptide-like helical	Cation efflux	Cation efflux	Progesterone binding	Hypothetical protein	Actin, beta, gamma 1
<i>Alternaria</i>							
<i>Alternaria alternata</i> B2a	●	$5 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-16}$	$9 \cdot 10^{-17}$	1,4	0,42	0,004
		22	22	26	31	28	21
		165	297	320	58	88	173
		TPR-like protein	Mitochondrial metal transporter 2	Mitochondrial metal transporter 2	PNTB-domain-containing protein	Trypsin-like serine protease	Actin, gamma
<i>Fusarium</i>							
<i>Fusarium oxysporum</i> MOD1-FUNGI9	●	$2 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-9}$	18	1,5	0,02
		23	22	25	33	35	23
		165	311	237	48	46	172
		Anaphase-promoting complex subunit 3	Mitochondrial metal transporter 2	Mitochondrial metal transporter 2	Hypothetical protein		Actin, gamma

Таблиця 2: Порівняння білків магнітосомного острівця МТБ *Magnetospirillumgryphiswaldense* MSR-1 та білків – представників базидіоміцетів (*Basidiomycota*)

Організм	Повнота геному	<i>E</i> -число					
		Ident, %					
		Length					
		Білки <i>Magnetospirillumgryphiswaldense</i> MSR-1					
		mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK
<i>Agaricusbisporus</i>	●	3·10⁻⁸	9·10⁻¹⁷	9·10⁻²¹	1,4	1,7	0,003
		23	26	28	23	29	27
		194	334	319	84	59	172
		Hypothetical protein					
<i>Armillariagallica</i>	●	6·10⁻⁸	8·10⁻²⁴	2·10⁻¹¹	0,26	0,20	0,001
		28	6	23	38	30	22
		102	311	310	40	99	171
		TPR-like protein	Mitochondrial iron ion transporter		Hypothetical protein		Actin 1
<i>Calocercornea</i>	●	2·10⁻⁸	2·10⁻¹⁸	4·10⁻¹⁵	0,60	1	0,004
		35	24	26	48	27	21
		89	307	309	29	82	171
		TPR-like protein		Cation efflux protein	Hypothetical protein	Cytochrome P450	Actin/actin-like protein
<i>Coniophora puteana</i>	●	1·10⁻⁶	1·10⁻¹⁶	3·10⁻⁶	0,58	1,8	9·10⁻⁵
		25	29	23	29	34	23
		13	228	145	90	58	141
		TPR-like protein	Cation efflux protein		Bud site Selection protein 16	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein	Actin actin-like protein
<i>Cryptococcus neoformans</i>	●	3·10⁻⁶	9·10⁻⁴	6·10⁻⁹	20	94	0,009
		21	29	26	24	27	21
		162	166	186	126	101	173
		Anaphase-promoting complex subunit 3	Mitochondrial protein with role in iron accumulation		Hypothetical protein	2-Oxoisovalerate dehydrogenase E2 component	Actin
<i>Daedaleaquercina</i>	●	1·10⁻⁷	2·10⁻¹⁴	6·10⁻¹²	0,10	5	0,003
		27	30	27	43	37	32
		158	227	213	35	43	92
		TPR-like protein	Hypothetical protein				Heatshockprotein 70
<i>Exidia glandulosa</i>	●	6·10⁻⁸	2·10⁻⁸	2·10⁻⁵	1,6	2	0,001
		24	31	31	31	27	21
		167	101	75	61	44	179
		TPR-like protein	Cation efflux protein		Hypothetical protein		Actin/actin-like protein

Продовження таблиці 2

Організм	Повнота геному	E-число					
		Ident, %					
		Length					
		Білки <i>Magnetospirillumgryphiswaldense</i> MSR-1					
		mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK
<i>Fistulina hepatica</i>	●	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-4}$	0,27	0,032	$9 \cdot 10^{-4}$
		27	31	27	30	37	21
		138	83	104	57	71	199
		TPR-like protein	Hypothetical protein		Glycoside hydrolase family 79 protein	Hypothetical protein	Actin 1
<i>Grifola frondosa</i>	●	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-9}$	$9 \cdot 10^{-6}$	0,069	1,30	0,002
		21	25	27	28	55	21
		190	316	113	114	25	171
		General transcriptional corepressor ssn6	Mitochondrial metal transporter 2		Hypothetical protein	Putative 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Actin-1
<i>Laetiporus sulphureus</i>	●	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^{-8}$	1,20	0,990	0,008
		23	38	29	29	37	21
		128	78	106	65	71	171
		TPR-like protein	Hypothetical protein		Cyanamide hydratase	Di-copper centre-containing protein	Actin 1
<i>Lentinula edodes</i>	●	$3 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-20}$	$1 \cdot 10^{-20}$	1,80	0,44	0,002
		29	26	24	19	38	20
		97	324	336	277	69	171
		TPR-like protein	Cation efflux family		Hypothetical protein	26s Proteasome non-atpase regulatory subunit 9	Actin 1
<i>Ustilago bromivora</i>	●	$1 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-17}$	$8 \cdot 10^{-11}$	0,78	0,08	0,002
		25	29	30	45,00	45,00	23
		130	167	171	31	40	172
		Related to CDC23-cell division control protein	Related to MMT1-Mitochondrial iron transport protein		Probable acyl transferase-like protein	Related to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Actin
<i>Sporisorium scitamineum</i>	●	$1 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-16}$	$4 \cdot 10^{-14}$	1	0,042	0,005
		25	28	32	40	33	23
		182	167	176	40	66	172
		Related to PEX5-peroxisomal targeting signal receptor	Hypothetical protein				Actin

Закінчення таблиці 2

Організм	Повнота геному	E-число					
		Ident, %					
		Length					
		Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
		mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK
<i>Malassezia restricta</i>	●	$3 \cdot 10^{-7}$	0,002	0,026	16	0,036	$2 \cdot 10^{-04}$
		27	22	20	30	29	22
		106	76	91	43	90	171
		PEX5-related protein	Zinc transporter 5	Zinc transporter 5	3-iso-propylmalate dehydratase	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain protein	Actin
<i>Malassezia sympodialis</i>	●	$6 \cdot 10^{-07}$	$2 \cdot 10^{-11}$	$8 \cdot 10^{-07}$	0,62	0,21	$2 \cdot 10^{-04}$
		23	21	24	33	38	22
		167	228	195	57	89	171
		PEX5, CYC8	MMT1	MMT1, MSC2	Uncharacterized protein	NAS2 Proteasome-interacting protein	Uncharacterized protein

Для експериментального дослідження зразків тканин грибів на предмет наявності в них БМН використовували методи атомно-силової та магнітної силової мікроскопії. Дослідження БМН у грибах здійснено на прикладі печериці двоспорової *Agaricus bisporus* і шиїтаке *Lentinula edodes*.

На основі результатів АСМ та МСМ оцінено максимальний розмір БМН (як середню відстань між сусідніми чорними або білими областями на рис. 1, 2), кількість БМН у ланцюжку досліджених грибів та *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (табл. 3).

Таблиця 3: Кількість і розмір БМН у грибах та *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1

Організм	Оцінка максимального розміру БМН, нм	Кількість частинок у ланцюжках, шт
Магнітотаксисні бактерії <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	10–40, 35–120 [65]	4–200 [65]
Шапочка печериці <i>Agaricus bisporus</i>	70 ± 15 [66]	4 ± 3 [66]
Шапочка шиїтаке <i>Lentinula edodes</i>	144 ± 12	5 ± 4

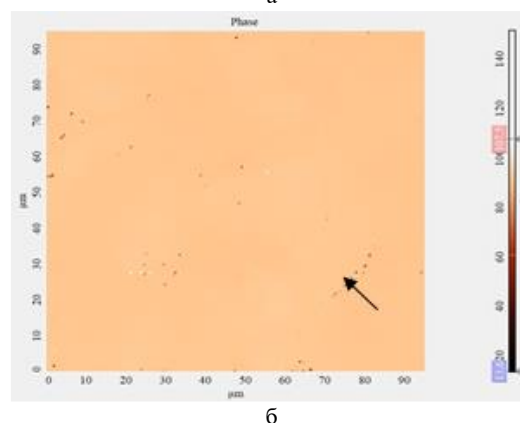
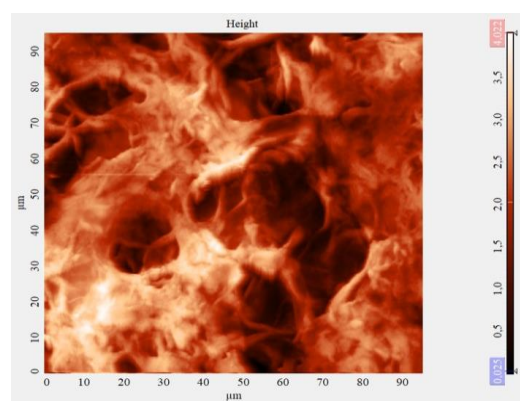


Рисунок 1: Зображення, отримані методами скануючої зондової мікроскопії плодового тіла *Agaricus bisporus*: (а) АСМ-зображення, (б) МСМ-зображення (фрагмент, що містить БМН (показані стрілками))

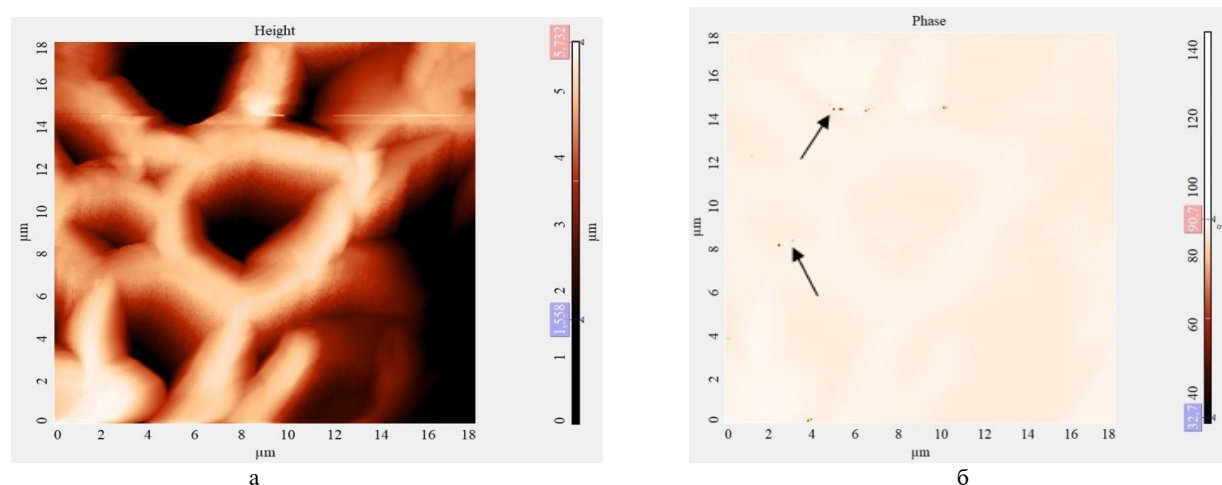


Рисунок 2: Зображення, отримані методами скануючої зондової мікроскопії плодового тіла *Lentinula edodes*: (а) АСМ-зображення, (б) МСМ-зображення (фрагмент, що містить БМН (показані стрілками))

Обговорення

Проведений біоінформаційний аналіз показав, що в усіх перерахованих вище досліджених грибів, геноми яких розшифровано на 50 % і більше в базі даних GenBank NCBI, виявлено гени біомінералізації БМН, тобто всі досліджені гриби є потенційними продуцентами БМН. При цьому значення статистичних чисел вирівнювань (*E*-число, Ident, Length), які використовувалися для оцінки гомології білків та порівняння функцій білків біомінералізації у грибів і МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, знаходяться в тому ж діапазоні значень, що й у вирівнюваннях, отриманих для білків біомінералізації людини, тварин [37, 39], немагнітотаксисних бактерій і білків МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1.

Гомологію підтверджують не тільки *E*-число, кількість ідентичних амінокислотних залишків білків (Ident) та довжина вирівнювання (Length), а й функції білків грибів, гомологічних білкам МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, без яких неможлива біомінералізація БМН (табл. 4).

З роботи [66] відомо, що аналіз результатів вирівнювань білків Mam МТБ і білків немагнітотаксисних магнітосомного острівця (МО), які синтезують магнітні наночастинки, дав змогу виділити 4 групи МО, що відрізняються за властивостями і локалізацією синтезованих магнітних частинок (табл. 5).

Було проаналізовано 160 видів грибів відділу аскоміцети та 63 види грибів відділу базидіоміцети, проте для аналізу результатів вирівнювання вибрано по 15 представників,

Таблиця 4: Порівняння функцій білків біомінералізації у магнітотаксисних бактерій і гомологічних білків у грибів

Назва та функції білка МТБ	Назва і функції гомологічного білка грибів
MamA – містить домен TPR, який є консенсусною послідовністю. TPR-домен залучений у різноманітні функції, включаючи білок-білкові взаємодії, функції шаперонів, клітинний цикл, транскрипцію, транспорт білків	TPR-like protein; APC/C (anaphase-promoting complex) – білок, що грає ключову роль у розмноженні еукаріотичних клітин. Бере участь у видаленні пошкоджених білків із клітини
MamB – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni	(CDF) Cation efflux family protein – інтегральні мембранні білки, які підвищують толерантність до іонів двовалентних металів, таких як кадмій, цинк і кобальт. (MMT1) Mitochondrial iron transport protein – мітохондріальний переносник іонів заліза
MamM – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni	(CDF) Cation efflux family protein – інтегральні мембранні білки, які підвищують толерантність до іонів двовалентних металів, таких як кадмій, цинк і кобальт. (MMT1) Mitochondrial iron transport protein – мітохондріальний переносник іонів заліза
MamK – актин-подібні білки	Актин-подібні білки

Таблиця 5: Класифікація біогенних магнітних наночастинок за місцем локалізації та властивостями [66]

Гомологи білків МО МТБ у неМТБ	Зовнішньоклітинні аморфні БМН (1 група)	Зовнішньоклітинні кристалічні БМН (2 група)	Внутрішньоклітинні аморфні БМН (3 група)	Внутрішньоклітинні кристалічні БМН (4 група)
MamA	–	+	–	+
MamB	+	+	+	+
MamM	+	+	+	+
MamO	–	–	+	+
MamE	–	–	+	+
MamK	–	–	+	+

оскільки їх геном розшифрований більш ніж на 50 % та відомі функції гомологічних білків.

Так, лише 4 види базидіоміцетів – *Ustilago bromivora*, *Sporisorium scitamineum*, *Malassezia restricta* та *Malassezia sympodialis* – мають повністю розшифрований геном, тож можна зробити висновок, що ці гриби є продуцентами зовнішньоклітинних кристалічних БМН, оскільки містять гомологи білків MamA, MamB і MamM. По решті 11 грибах неможливо зробити висновки щодо типу внутрішньої структури (кристалічна чи аморфна) та локалізації (внутрішньо- чи зовнішньоклітинна) БМН, оскільки їх геном розшифровано не повністю та, крім MamA, MamB і MamM, зустрічаються і продуценти MamK, що свідчить про те, що вони можуть бути продуцентами як зовнішньо-, так і внутрішньоклітинних БМН.

Проте жоден із представників аскоміцетів не має повністю розшифрованого геному, але за статистичними значеннями вирівнювання можна зробити висновок, що ці гриби є продуцентами БМН, оскільки містять гомологи білків MamA, MamB, MamM і MamK. Але неможливо зробити висновки щодо типу внутрішньої структури та локалізації БМН, оскільки їх геном розшифровано не повністю.

Експериментальні дослідження БМН у зразках грибів *A. bisporus* та *L. edodes*, виконані методами АСМ та МСМ, показали, що БМН у грибах утворюють ланцюжки, які локалізовані в стінках гіфів.

На основі порівняння результатів АСМ та МСМ відомих продуцентів БМН було зроблено оцінку максимального розміру БМН та кількості БМН у ланцюжку досліджених організмів для порівняння з відповідними даними для модельного організму, а саме з магнітотаксисною

бактерією *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (див. табл. 3).

Спираючись на експериментальні й теоретичні дані [37, 67], можна стверджувати, що градієнтних магнітних сил в околі БМН достатньо для накопичення везикул, гранул та інших кластерних компонентів. За розмірів БМН від 20 до 150 нм та розміру везикул більше 100 нм енергія магнітодипольної взаємодії БМН із везикулами в клітині є достатньою, щоб утримувати везикули в околі ланцюжка БМН, тобто біля мембрани [67]. Оскільки розміри везикул і БМН у грибах знаходяться в цьому діапазоні (див. табл. 5), то можна свідчити, що БМН у грибах виконують таку ж саму функцію, як і в людини і тварин, а саме функцію концентраторів везикул і гранул у везикулярному транспорті, а також концентраторів інших компонентів із розмірами від 100 нм і більше.

Висновки

Методами порівняльної геноміки показано, що серед досліджених грибів представників грибів відділів аскоміцети (*Ascomycota*) та базидіоміцети (*Basidiomycota*), геноми яких розшифровані більш ніж на 50 %, всі види є потенційними продуцентами БМН. Тільки 4 види базидіоміцетів – *Ustilago bromivora*, *Sporisorium scitamineum*, *Malassezia restricta* та *Malassezia sympodialis* – мають повністю розшифрований геном, тому можна стверджувати, що вони є продуцентами зовнішньоклітинних кристалічних БМН.

При цьому експериментальні дослідження БМН у зразках грибів *A. bisporus* та *L. edodes*, виконані методами АСМ та МСМ, показали, що БМН у грибах утворюють ланцюжки, які локалізовані в стінках гіфів.

References

- [1] De Barros L. *Cienciae Congervacaona Serrados Orgaos*. Anais da Academia Brasileira de Ciências; 1981. 258 p.
- [2] Cranfield CG, Dawe A, Karloukovski V, Dunin-Borkowski RE, de Pomerai D, Dobson J. Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci*. 2004;271(6):436-9. DOI: 10.1098/rsbl.2004.0209
- [3] Lowenstam HA. Magnetite in denticle capping in recent chitons. *GSA Bull*. 1973;73(4):435-8. DOI: 10.1130/0016-7606(1962)73[435:MIDCIR]2.0.CO;2
- [4] Suzuki Y, Kopp RE, Kogure T, Suga A, Takai K, Tsuchida S, et al. Sclerite formation in the hydrothermal vent "scaly-foot" gastropod-possible control of iron sulfide biomineralization by the animal. *Earth Planet Sci Lett*. 2006;242(1-2):39-50. DOI: 10.1016/j.epsl.2005.11.029
- [5] Oliveira JF, Wajnberg E, de Souza Esquivel DM, Weinkauff S, Winklhofer M, Hanzlik M. Ant antennae: are they sites for magnetoreception? *J R Soc Interface*. 2010;7(42):143-52. DOI: 10.1098/rsif.2009.0102
- [6] Gould JL, Kirschvink JL, Deffeyes KS. Bees have magnetic remanence. *Science*. 1978;201(4360):1026-8. DOI: 10.1126/science.201.4360.1026
- [7] Acosta-Avalos D, Wajnberg E, Oliveira PS, Leal II, Farina M, Esquivel DM. Isolation of magnetic nanoparticles from *pachycondyla marginata* ants. *J Exp Biol*. 1999 Oct;202(Pt 19):2687-92.
- [8] Hsu CY, Ko FY, Li CW, Fann K, Lue JT. Magnetoreception system in honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS One*. 2007;2(4):1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0000395
- [9] Maher BA. Magnetite biomineralization in termites. *Proc Biol Sci*. 1988;265(1397):733-7. DOI: 10.1098/rspb.1998.0354
- [10] Lohmann KJ. Magnetic remanence in the western atlantic spiny lobster, *Panulirus Argus*. *J Exp Biol*. 1984;113:29-41.
- [11] Brassart J, Kirschvink JL, Phillips JB, Borland SC. Ferromagnetic material in the eastern red-spotted newt *notophthalmus viridescens*. *J Exp Biol*. 1999;202(22):3155-60.
- [12] Mann S, Sparks NH, Walker MM, Kirschvink JL. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from *Sockeye salmon*, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J Exp Biol*. 1988;140:35-49.
- [13] Kirschvink JL. Magnetite biomineralization and geomagnetic sensitivity in higher animals: an update and recommendations for future study. *Bioelectromagnetics*. 1989;10(3):239-59. DOI: 10.1002/bem.2250100304
- [14] Diebel CE, Proksch R, Greenk CR. Magnetite denses a vertebrate magnetoreceptor. *Nature*. 2000;406:299-302. DOI: 10.1038/35018561
- [15] Walker MM, Kirschvink JL, Chang SB, Dizon AE. A candidate magnetic sense organ in the Yellowfin Tuna, *Thunnus albacares*. *Science*. 1984;224(4650):751-3. DOI: 10.1126/science.224.4650.751
- [16] Walcott C, Gould JL, Kirschvink JL. Pigeons have magnets. *Science*. 1979;205(4410):1027-9. DOI: 10.1126/science.472725
- [17] Irwin WP, Lohmann KJ. Disruption of magnetic orientation in hatchling loggerhead sea turtles by pulsed magnetic fields. *J Comp Physiol A*. 2005;191(5):475-80. DOI: 10.1007/s00359-005-0609-9
- [18] Falkenberg G, Fleissner G, Schuchardt K, Kuehbachner M, Thalau P, Mouritsen H, et al. Avian magnetoreception: elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds. *PLoS One*. 2010 Feb 16;5(2):e9231. DOI: 10.1371/journal.pone.0009231
- [19] Cadiou H, McNaughton PA. Avian magnetite-based magnetoreception: a physiologist's perspective. *J R Soc Interface*. 2010;7(2):193-205. DOI: 10.1098/rsif.2009.0423.focus
- [20] Edwards HH, Schnell GD, Dubois RL, Hutchison VH. Natural and induced remanent magnetism in birds. *Auk*. 1992;109(1):43-56.
- [21] Edelman NB, Fritz T, Nimpf S, Pichler P, Lauwers M, Hickman RW, et al. No evidence for intracellular magnetite in putative vertebrate magnetoreceptors identified by magnetic screening. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(1):262-7. DOI: 10.1073/pnas.1407915112
- [22] Holland RA, Kirschvink TG, Doak M. Wikelski bats use magnetite to detect the Earth's magnetic field. *PLoS ONE*. 2008;3(2):e1676. DOI: 10.1371/journal.pone.0001676
- [23] Zoeger J, Dunn JR, Fuller M. Magnetic material in the head of the common pacific dolphin. *PLoS ONE*. 1981;213(4510):892-4. DOI: 10.1126/science.7256282
- [24] Gorobets SV, Gorobets OYu, Medvediev OV, Golub VO, Kuzminykh LV. Biogenic magnetic nanoparticles in lung, heart and liver. *Functional Mater*. 2017;24(3):405-8. DOI: 10.15407/fm24.03.405
- [25] Brem F, Hirt AM, Winklhofer M. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumor and hippocampal tissue. *J R Soc Interface*. 2006;3:833-41. DOI: 10.1098/rsif.2006.0133
- [26] Fukumori Y, Oyanagi H, Yoshimatsu K. Enzymatic iron oxidation and reduction in magnetite synthesizing *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J Phys IV France*. 1997;7(1):659-62. DOI: 10.1051/jp4:19971270
- [27] Quintana C, Cowley JM, Marhic C. Electron nanodiffraction and high-resolution electron microscopy studies of the structure and composition of physiological and pathological ferritin. *J Structur Biol*. 2004;147(2):166-78. DOI: 10.1016/j.jsb.2004.03.001

- [28] Collingwood JF, Chong RK, Kasama T, Cervera-Gontard L, Dunin-Borkowski RE, Perry G, et al. Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J Alzheimers Dis.* 2008;14(2):235-45. DOI: 10.3233/JAD-2008-14211
- [29] Grassi-Schultheiss PP, Heller F, Dobson J. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. *Biometals.* 1997;10(4):351-5. DOI: 10.1023/A:1018340920329
- [30] Hautot D, Pankhurst A, Khan N, Dobson JP. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue. *Proc Biol Sci.* 2003;270:62-4. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0012
- [31] Hautot D, Pankhurst QA, Morris CM, Curtis A, Burn J, Dobson J. Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(1):21-5. DOI: 10.1016/j.bbadis.2006.09.011
- [32] Dobson JP. Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease. *FEBS Lett.* 2001;496(1):1-5. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02386-9
- [33] Darmenko YA, Gorobets OY, Gorobets SV, Sharay IV, Lazarenko OM. Detection of biogenic magnetic nanoparticles in human's aortic aneurysms. *Acta Physica Polonica A.* 2018;133:738-41. DOI: 10.12693/APhysPolA.133.738
- [34] Alexeeva TA, Gorobets SV, Gorobets OY, Demianenko IV, Lazarenko OM. Magnetic force microscopy of atherosclerotic plaques. *Med Perspectives.* 2014;1:4-10. DOI: 10.26641/2307-0404.2014.1.23707
- [35] Gorobets SV, Medvediev O, Gorobets, OY, Ivanchenko A. Biogenic magnetic nanoparticles in human organs and tissues. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018;135:49-57. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.01.010
- [36] Gorobets YI, Gorobets SV. Stationary flows of electrolytes in the vicinity of ferromagnetic particles in a constant magnetic field. *Bulletin of Herson State Technical University.* 2000;3(9):276-81.
- [37] Gorobets SV, Gorobets OYu. Biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles and their possible functions in cells of prokaryotes and eukaryotes. In: *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.* 3rd ed. Taylor&Francis; 2014. p. 300-6.
- [38] Gorobets SV, Gorobets OYu. Function of biogenic magnetic nanoparticles in organisms. *Functional Mater.* 2012;19(1):18-26.
- [39] Gorobets OY, Gorobets SV, Gorobets YI. Biomineralization of intracellular biogenic magnetic nanoparticles and their possible functions. *Naukovi Visti NTUU KPI.* 2013;3:28-33.
- [40] Gorobets O, Gorobets S, Koralewski M. Physiological origin of biogenic magnetic nanoparticles in health and disease: from bacteria to humans. *Int J Nanomed.* 2017;12:4371-95. DOI: 10.2147/IJN.S130565
- [41] Bharde A, Rautaray D, Sarkar I, Sastry M. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. *Small.* 2006;2(1):135-41. DOI: 10.1002/sml.200500180
- [42] Chyzh YM. *Biotechnologies-based on magnetically labeling of microorganisms [dissertation].* Kyiv; 2017. 126 p.
- [43] Say R, Yilmaz N, Denizli A. Removal of heavy metal ions using the fungus *Penicillium canescens*. *Adsorp Sci Technol.* 2003;21(7):643-50. DOI: 10.1260/026361703772776420
- [44] Ezzouhria L, Ruizb E, Castrob E. Mechanisms of lead uptake by fungal biomass isolated from heavy metals habitats. *Afinidad.* 2010;LXVII:39-44.
- [45] Iram S, Shabbir R, Zafar H, Javaid M. Biosorption of copper and lead by heavy metal resistant fungal isolates. *Arab J Sci Eng.* 2015;40:1867. DOI: 10.1007/s13369-015-1702-1
- [46] Liang X, Hillier S, Pendrowski H, Gray N, Ceci A, Gadd GM. Uranium phosphate biomineralization by fungi. *Environ Microbiol.* 2015;17(6):2064-75. DOI: 10.1111/1462-2920.12771
- [47] Romero MC, Reinoso EH, Urrutia MI, Kiernan AM. Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: a trained fungus for copper and biphenyl detoxification. *Electron J Biotechnol.* 2006;3:221-6. DOI: 10.2225/vol9-issue3-fulltext-11
- [48] Gupta VK, Suhas. Application of low-cost adsorbents for dye removal – a review. *J Environm Manage.* 2009;90(8):2313-42. DOI: 10.1016/j.jenvman.2008.11.017
- [49] Patel SJ. Review on biosorption of dyes by fungi. *Int J Innov Res Sci Eng Technol.* 2016;5(1):1115-18. DOI: 10.15680/IJIRSET.2015.0501071
- [50] Nannikova GG, Komissarchik CM, Vasemenova MA. Sorption properties of the fungus *Rhizopus oryzae*. *Chemistry and Chemical Technology.* 2015;29:61-5.
- [51] Dhawale SS, Lane AC, Dhawale SW. Effects of mercury on the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1996;56(5):825-32. DOI: 10.1007/s001289900120
- [52] Gabriel J, Kofroňová O, Rychlovský P, Krenželok M. Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycete *Daedalea quercina*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1996;57(3):383-90. DOI: 10.1007/s001289900202
- [53] Melgar MJ, Alonso J, Pérez-López M, García MA. Influence of some factors in toxicity and accumulation of cadmium from edible wild macrofungi in nw Spain. *J Environ Sci Health B.* 1998;33(4):439-55. DOI: 10.1080/03601239809373156

- [54] Cihangir N, Saglam N. Removal of cadmium by *Pleurotus sajor-caju* basidiomycetes. *Acta Biotechnol.* 1999;19(2):171-7. DOI: 10.1002/abio.370190212
- [55] Abdul-Talib S, Tay CC, Abdullah-Suhaimi A, Liew HH. Fungal *pleurotus ostreatus* biosorbent for Cadmium (II) removal in industrial wastewater. *J Life Sci Technol.* 2013;1(1):65-8. DOI: 10.12720/jolst.1.1.65-68
- [56] Markova ME, Uriash VF, Stepanova EA, Gruzdeva AE, Hrishatova NV, Demarin VT, et al. Sorption of heavy metals by higher fungi and chitin of different origin in *in vitro* experiments. *Bulletin of Nizhny Novgorod University.* 2008;6:118-24.
- [57] Wang C, Liu H, Liu Z, Gao Y, Wu B, Xu H. Fe₃O₄ nanoparticle-coated mushroom source biomaterial for Cr(VI) polluted liquid treatment and mechanism research. *R Soc Open Sci.* 2018;5(5):1717-76. DOI: 10.1098/rsos.171776
- [58] Zhang D, Zhang Y, Shen F, Wang J, Li W, Enxia Li, et al. Removal of cadmium and lead from heavy metals loaded PVA-SA immobilized *Lentinus edodes*. *Desalin Water Treat.* 2014;52(25-27):4792-801. DOI: 10.1080/19443994.2013.809936
- [59] Das N. Heavy metals biosorption by mushrooms. *Natural Product Radiance.* 2005;4(6):454-9.
- [60] Gulich MP, Antonov MY, Yemchenko NL, Bisco NA, Yashchenko OV, Ermolenko VP. Sorption biometal mushroom mycelium from the culture medium, enriched with quotations. *Trace Elements in Medicine.* 2014;15(2):9-17.
- [61] Schuler D, Baeuerlein E. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch Microbiol.* 1996;166(5):301-7. DOI: 10.1007/s002030050387
- [62] Wilson RA, Bullen AH. Basic theory of atomic force microscopy (AFM) [Internet]. Asdlib.org. 2018 [cited 2018 Oct 28]. Available from: https://asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule_BasicTheoryAFM.pdf
- [63] Magnetic Force Microscopy (MFM) High Resolution and High Sensitivity Imaging of Magnetic Properties [Internet]. Parkafm.com. 2018 [cited 2018 Sept 7]. Available from: [http://www.parkafm.com/images/spmmodes/magnetic/Magnetic-Force-Microscopy-\(MFM\).pdf](http://www.parkafm.com/images/spmmodes/magnetic/Magnetic-Force-Microscopy-(MFM).pdf)
- [64] Gorobets OY, Gorobets SV, Sorokina LV. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi. *Functional Mater.* 2014;21(4):427-36. DOI: 10.15407/fm21.04.427
- [65] Richter M, Kube M, Bazylinski D, Lombardot T, Glöckner FO, Reinhardt R, et al. Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function. *J Bacteriol.* 2007;189(13):4899-910. DOI: 10.1128/jb.00119-07
- [66] Gorobets S, Gorobets O, Bulaievska M, Valverde Mendosa V, Hetmanenko K, Sharay I. Biogenic magnetic nanoparticles in representatives of kingdom Fungi. In: *Proc IEEE AIM Conf; 2018 Feb 4-7; La Thuile, Italy.*
- [67] Mikesheyna H, Darmenko Y, Gorobets O, Gorobets S, Sharay I, Lazarenko O. Influence of biogenic magnetic nanoparticles on the vesicular transport. *Acta Physica Polonica A.* 2018;133(3):731-33. DOI: 10.12693/APhysPolA.133.731

Горобец, О.Ю. Горобец, В.А. Ковальчук, Л.А. Евжик

ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ БИОГЕННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГРИБОВ ОТДЕЛОВ АСКОМИЦЕТЫ (*ASCOMYCOTA*) И БАЗИДИОМИЦЕТЫ (*BASIDIOMYCOTA*)

Проблематика. Биогенные магнитные наночастицы (БМН) обнаружены у представителей всех трех надцарств живых организмов: бактерий, архей и эукариот. При этом известно, что механизм биоминерализации БМН единый для всех живых организмов. Экспериментально БМН обнаружены в водорослях и простейших, червях, хитонах, улитках, муравьях и бабочках, медоносных пчелах, термитах, омарах, тритонах, мигрирующих и немигрирующих рыбах, морских черепахах, птицах, летучих мышах, дельфинах и китах, у свиньи и у человека, в растениях и грибах. Исследование наличия БМН у представителей царства Грибы немногочисленные, так же как и представление о тех функциях, которые они выполняют. В частности, небольшой объем биоинформационных исследований был вызван отсутствием в базах данных расшифрованных геномов грибов. Всего выделяют 10 отделов царства Грибы, из которых ни один отдел не был проанализирован полностью. Исследования грибов, которые являются представителями разных отделов царства Грибы, имеет как фундаментальный, так и практический интерес. С фундаментальной точки зрения выявление потенциальных продуцентов БМН среди грибов может способствовать поиску ответа на открытый вопрос о функциональном назначении БМН в различных организмах. С практической точки зрения, выявление потенциальных продуцентов БМН среди грибов является перспективным для изготовления магнитоуправляемого сорбента на основе биомассы грибов. Для исследования выбраны два наиболее многочисленных отдела грибов – аскомицеты (*Ascomycota*) и базидиомицеты (*Basidiomycota*), геномы которых широко представлены в биоинформационных базах данных.

Цель. Целью работы является выявление среди представителей высших грибов потенциальных продуцентов биогенных магнитных наночастиц методами сравнительной геномики и экспериментальное исследование методами микроскопии (АСМ) и магнитной силовой микроскопии (МСМ) образцов тканей высших грибов на предмет наличия в них БМН.

Методика реализации. В работе применен метод парного выравнивания аминокислотных последовательностей белков грибов с белками *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 с использованием свободной в доступе программы "BLAST" Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США). Для экспериментального исследования образцов тканей грибов на предмет наличия в них БМН использовали методы АСМ и МСМ.

Результаты. Проведен биоинформационный анализ 160 видов грибов отдела аскомицеты и 63 видов грибов отдела базидиомицеты, и выделено для анализа результатов выравнивания по 15 представителей, поскольку их геном в базе данных GenBank NCBI расшифрован более чем на 50 % и известны функции гомологичных белков. Для анализа результатов проведенного исследования использованы следующие стандартные показатели: значения *E*-числа (то есть количества выравниваний с таким

или лучшим весом выравнивания, которое можно найти случайно в базе данных определенного размера), Ident – процент перекрытия аминокислотных последовательностей, в рамках которых производится выравнивание, Length – количество идентичных аминокислотных остатков белков, которые сравнивают, при оптимальном выравнивании и функции белков, которые выравнивались. При Ident > 18 %, E-число $\leq 0,05$, Length > 100 можно утверждать, что последовательности гомологичны, а исследуемый гриб является потенциальным продуцентом БМН.

Выводы. Методами сравнительной геномики показано, что среди исследованных представителей высших грибов отделов аскомицеты (*Ascomycota*) и базидиомицеты (*Basidiomycota*), геномы которых расшифрованы более чем на 50 % в базе данных GenBank NCBI, все виды являются потенциальными продуцентами БМН. При этом экспериментальные исследования БМН в образцах грибов *A. bisporus* и *L. edodes* методами АСМ и МСМ показали, что БМН в грибах образуют цепочки, которые локализованы на стенках гифов исследованных образцов грибов.

Ключевые слова: биогенные магнитные наночастицы; биоминерализация; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Мам-белки; атомно-силовая микроскопия; магнитная силовая микроскопия; методы сравнительной геномики; *Agaricus bisporus*; *Lentinula edodes*.

S.V. Gorobets, O.Iu. Gorobets, I.A. Kovalchuk, L.A. Yevzhyk

DETERMINATION OF POTENTIAL PRODUCERS OF BIOGENIC MAGNETIC NANOPARTICLES AMONG THE FUNGI REPRESENTATIVES OF ASCOMYCOTA AND BASIDIOMYCOTA DIVISIONS

Background. Biogenic magnetic nanoparticles (BMNs) were found in organisms that belong to all three domains: prokaryotes, archaea, and eukaryotes. And it was found that the mechanism of biomineralization of BMN is the same for all living organisms. BMNs have been experimentally detected in algae and protozoa, worms, chitons, snails, ants and butterflies, honey bees, termites, lobsters, tritons, migratory and non-migratory fish, turtles, birds, bats, dolphins and whales, humans, plants and mushrooms. The study of the presence of BMNs in representatives of the kingdom of the Fungi is not numerous, as well as an idea of the functions they perform. In particular, a small amount of bioinformatic research was caused by the absence of decrypted fungi genomes in databases. In total, there are 10 divisions of the kingdom Fungi, of which not a single division has been analyzed completely. The study of fungi, which are representatives of different parts of the kingdom Fungi has fundamental and practical interest. From a fundamental point of view, identifying potential producers of BMNs among fungi can help find an answer to an open-ended question about the functional purpose of BMNs in various organisms. From a practical point of view, the identification of potential producers of BMNs among fungi is promising for the manufacture of magnetically controlled sorbent based on the biomass of fungi. Two of the most abundant sections of fungi – Ascomycetes (*Ascomycota*) and Basidiomycetes (*Basidiomycota*), which genomes are widely represented in bioinformatic databases were selected to the study.

Objective. The aim of the is to identify potential producers of BMNs among the representatives of higher fungi by methods of comparative genomics and experimental research using atomic force microscopy (AFM) and magnetic force microscopy (MFM) of samples of higher fungi tissue for the presence of BMN in them.

Methods. The method of pairwise alignment of the amino acid sequences of the fungi proteins with *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 proteins by using BLAST program of National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). Methods for AFM and MFM were used to study the fruiting bodies of fungi for the presence of BMNs.

Results. Bioinformatic analysis of 160 species of fungi of the *Ascomycota* division and 63 species of fungi of the *Basidiomycota* division was carried out and selected to analyze the alignment results for 15 representatives each, since their genome was deciphered by more than 50% in the database of the GenBank NCBI and functions of homologous proteins are known. For the analysis of the conducted research results, the following indicators were used: the value of the E-number (the number of alignments with the same or better alignment weight that can be found by chance in a database of a certain size), Ident – the percentage of amino acid sequence overlapping within which the alignment is made, Length – the number of identical amino acid residues of the proteins, compared at optimal alignment and the function of the aligned proteins. When Ident > 18%, E-number ≤ 0.05 , Length > 100, it can be argued that the sequences are homologous, and the fungus is a potential producer of BMN.

Conclusions. Using the methods of comparative genomics, it is shown that among the studied representatives of higher fungi of the *Ascomycota* and *Basidiomycota* division, which genomes are decoded by more than 50% in the GenBank NCBI database, all species are potential producers of BMNs. At the same time, experimental studies of BMNs in *A. bisporus* and *L. edodes* fungi using the methods of AFM and MSM showed that BMNs in fungi form chains localized on the walls of the hyphae of the investigated fungi samples.

Keywords: biogenic magnetic nanoparticles; biomineralization; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Mam-proteins; atomic force microscopy; magnetic force microscopy; methods of comparative genomics; *Agaricus bisporus*; *Lentinula edodes*.