

РАЗНООБРАЗИЕ ФОСФОРНЫХ РЕЗЕРВОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

©2014 г. Т. В. КУЛАКОВСКАЯ, Л. П. ЛИЧКО,
Л. П. РЯЗАНОВА

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН, Московская обл., Пушкино*

I. Введение. II. Разнообразие фосфорных резервов микроорганизмов. III. Образование фосфорных резервов микроорганизмов в модельных лимитированных условиях. IV. Роль микроорганизмов, резервирующих фосфаты, в природных и техногенных экологических нишах. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фосфорные соединения являются необходимыми компонентами земной биомассы и метаболизируются всеми живыми организмами. Фосфор входит в состав важнейших органических соединений, в том числе нуклеиновых кислот, АТФ и других нуклеозидфосфатов, фосфолипидов, фосфорилированных белков и углеводов. Многолетние исследования в области экспериментального и теоретического моделирования добиологических этапов возникновения биосферы привели к гипотезе о том, что АТФ, РНК, фосфорилированные сахара, неорганические полифосфаты возникли абиогенным путем, а затем были вовлечены в метаболические пути первичных клеток [1–15].

Недостаточное количество источников фосфора в среде обитания лимитирует рост и развитие микроорганизмов, а избыточное оказывает негативное влияние на регуляцию путей фосфорного метаболизма. Внутриклеточное содержание P_i в живых клетках строго регулируется. Эта регуляция обеспечивается изменениями активности специфических транспортных систем цитоплазматической мембраны,

Принятые сокращения: P_i – ортофосфат; полиР – неорганические полифосфаты.

Адрес для корреспонденции: alla@ibpm.pushchino.ru

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы».

а у эукариот еще и активности транспортных систем органелл. В гомеостазе P_i участвуют также ферменты, обеспечивающие перевод фосфата в осмотически инертные формы, специфически компартиментализованные в клетках. Микроорганизмы, вынужденные существовать в постоянно изменяющихся условиях среды, выработали разнообразные приспособления к недостатку и к избытку фосфата. Одним из таких приспособлений являются системы транспорта P_i с различным средством и механизмом действия.

Среди микроорганизмов имеются виды, которые обладают транспортными системами с высоким средством к P_i и могут выживать и размножаться при очень низкой его концентрации в среде. Такими свойствами обладает бактерия GFAJ-1, обитающая в водах с повышенным содержанием арсенатов и малым содержанием фосфатов [16]. Когда этот микроорганизм был обнаружен, возникла гипотеза о том, что он способен использовать мышьяк вместо фосфора [16]. Однако затем было установлено, что приспособительным механизмом, обеспечивающим существование его в указанных неблагоприятных условиях, является наличие системы транспорта P_i с экстремально высоким средством, позволяющим клеткам этой бактерии поглощать P_i при концентрации 1,7 мкмоль на 1 л [17].

У большинства бактерий имеется две транспортные системы для фосфата Pit и Pst [18–21]. Транспортёр Pit является конститутивным, обладает малым средством к P_i , способен как к поглощению, так и к выбросу P_i вместе с катионом двухвалентного металла в форме $MeHPO_4$ с затратой энергии протондвижущей силы [19, 20]. Pst-система индуцируется при концентрации P_i в среде ниже 20 мкМ и имеет высокое средство к P_i [18, 19].

Дрожжи также обладают несколькими системами транспорта фосфата с различным средством к P_i [22, 23]. Наличие множественных транспортных систем позволяет клеткам микроорганизмов обеспечивать поглощение фосфата из сред как с низким, так и с высоким содержанием фосфата.

Данный обзор посвящен другому способу приспособления микроорганизмов к изменению доступности фосфора из среды, а именно, образованию резервных фосфорных соединений, которые накапливаются в условиях избытка и расходуются в условиях недостатка источников фосфора в среде. Эти соединения разнообразны по химической природе и выполняют в микробной клетке не только роль относительно инертных резервов фосфора, но и структурные, шунтирующие и регуляторные функции.

II. РАЗНООБРАЗИЕ ФОСФОРНЫХ РЕЗЕРВОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

К числу резервных фосфорных соединений у микроорганизмов относятся вещества, которые накапливаются при избытке фосфата в среде и расходуются при его недостатке. Это могут быть как минеральные, так и органические фосфорные соединения, локализованные как внутри клетки, в разных клеточных компартментах, так и вне клеток. Внеклеточные фосфорные резервные соединения либо адсорбированы на поверхности клеток, либо находятся в среде. Накопление фосфорных резервных соединений у микроорганизмов характеризуется количественным и качественным разнообразием.

ОРТОФОСФАТ

Простейшими резервными фосфорными соединениями микроорганизмов являются малорастворимые фосфаты: $\text{MgPO}_4 \cdot \text{OH} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, образующийся у галофильных архей *Halobacterium salinarium* и *Halorubrum distributum* [24–26] и $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, образующийся у бактерий рода *Brevibacterium* [26] и *Acetobacter xylinum* [27].

Археи *H. salinarium* и *H. distributum* концентрируют фосфат из водных растворов в процессе роста [24–26]. Поглощение P_i подавляется FCCP, разобщителем, разрушающим трансмембранный протонный градиент на мембранах [25, 26]. При избыточной концентрации P_i значительная часть его не используется в процессах биосинтеза, а накапливается в биомассе (табл. 1).

Содержание P_i в биомассе обеих архей возрастает при увеличении начальной концентрации P_i в среде и значительно превышает содержание неорганических полифосфатов. Концентрирование

Таблица 1.
Содержание P_i и неорганических полифосфатов
(полиР) в биомассе (% от P_i , поглощенного из среды)
при культивировании на средах с избытком P_i (8–11 мМ) [25]

Микро- организм	<i>Halobacterium salinarium</i>	<i>Halorubrum distributum</i>	<i>Brevibacterium antiquum</i>
P_i	90	90	70
полиР	9,5	10	13

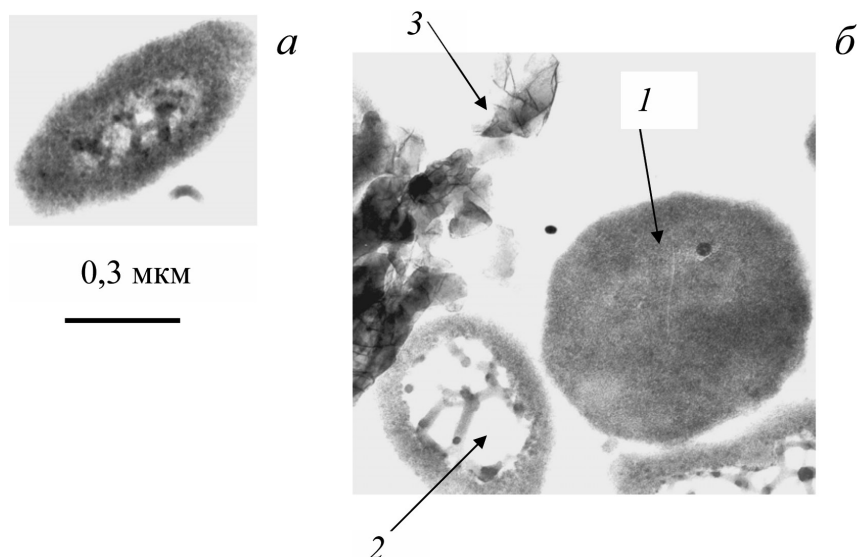


Рис. 1. Ультратонкие срезы клеток *Halorubrum distributum* [25].

а – клетки, выращенные на среде с 0,05 мМ P_i .

б – клетки, выращенные на среде с 11,5 мМ P_i : 1 – клетки с уплотненной цитоплазмой, 2 – увеличенная зона нуклеоида, 3 – внеклеточные кристаллы фосфата магния.

P_i из среды приводит к изменениям в состоянии клеток архей [24–26]. Лишь часть клеток в популяции сохраняет интактность в условиях избытка P_i . На тонких срезах обнаружено уплотнение цитоплазмы, накопление в клетках электроноплотного материала (при контрастировании цитратом свинца), значительное количество поврежденных клеток и внеклеточного кристаллического материала (рис. 1). При обработке биомассы этих архей, выращенных в условиях избытка P_i , дистиллированной водой, происходит лизис клеток и с помощью многократной отмывки водой и центрифугирования выделяется водонерастворимый осадок, представляющий собой ортофосфат.

С помощью рентгеноструктурного анализа данное соединение было идентифицировано как $Mg_2PO_4OH \cdot 4H_2O$ (International Centre for Diffraction Data, 1999, N 44-0774), а содержание H_2O было определено методом термогравиметрии [26]. Химический состав осадка согласуется с тем, что клетки галофильных архей нуждаются в ионах магния для удаления P_i из среды [26]. Избыточное образование

этой малорастворимой соли, приводит к деструктивным изменениям в части клеток популяций *H. salinarium* и *H. distributum*. При культивировании *H. salinarium* и *H. distributum* в P_i -дефицитной среде содержание фосфата магния в биомассе уменьшалось вчетверо [25]. При пересеве на P_i -дефицитную среду больший прирост биомассы наблюдали при использовании посевного материала, предварительно выращенного на среде с более высокой концентрацией P_i [25]. Это подтверждает предположение, что для популяции в целом как внутриклеточный, так и внеклеточный P_i в форме малорастворимой соли выполняет функцию фосфорного резерва.

Резервирование фосфата в виде малорастворимых солей также было обнаружено у нескольких видов бревибактерий, которые также в процессе роста почти полностью поглощали P_i из среды при его концентрации около 11 мМ (табл. 1) [26]. Анализ фосфорных соединений биомассы показал, что и в данном случае накапливается преимущественно ортофосфат (табл. 1). В отличие от архей, у бревибактерий наблюдали внутриклеточное накопление P_i . Из клеток *B. antiquum* запасное фосфорное соединение удалось извлечь с помощью экстракции при высоком давлении. Оно было идентифицировано методом рентгеноструктурного анализа как $NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$ (International Centre for Diffraction Data, 1999, N 15-0762) [26]. Присутствие ионов NH_4^+ было подтверждено с помощью инфракрасной спектроскопии, а содержание H_2O и NH_4 определено с помощью термогравиметрии [26].

При накоплении P_i в клетках бревибактерий происходило изменение формы клеток, появление электроноплотных зон в цитоплазме и клеточной стенке и утолщение клеточной стенки (рис. 2). По-видимому, утолщение клеточной стенки позволяет этим бактериям, в отличие от галофильных архей, сохранять свою интактность, несмотря на высокую степень минерализации.

У цианобактерии *Microcoleus chthonoplastes* при повышении концентрации P_i до 0,55 мМ в клетках накапливались полиР до 1,4% Р/г сухой биомассы, а при повышении ее до 1,2 мМ), происходило осаждение P_i на слизистые чехлы клеток и их минерализация [28]. Минеральные чехлы цианобактерий содержат фосфор и кальций [28]. Увеличение концентрации P_i до 2,5 мМ P_i приводило к минерализации и гибели трихомов. При разложении цианобактериального природного мата происходит разрушение этих структур и в среду выделяется P_i , которого достаточно для выживающих цианобактерий [29]. Этот процесс в общих чертах похож на минерализацию, происходящую в культуре галофильных архей, описанную выше. Накопление ортофосфата, в том числе и внеклеточного, характерно также для *Acetobacter xilinum* при дефиците источника углерода [27].

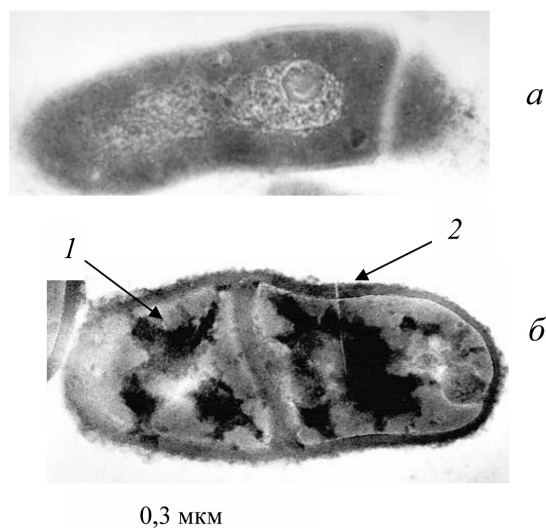


Рис. 2. Ультратонкие срезы клеток *Brevibacterium antiquum* [25].

a – клетки, выращенные на среде с 0,05 мМ P_i .

б – клетки, выращенные на среде с 11,5 мМ P_i : 1 – электроплотные области цитоплазмы; 2 – утолщенная клеточная стенка с электроплотными областями.

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ (полиР)

У большинства микроорганизмов роль резерва фосфата выполняют неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, содержащие от 3 до нескольких сотен фосфатных остатков (рис. 3а) [5]. ПолиР, являясь полимерами, не влияют на осмотическое давление, и одновременно являются резервом энергии, поскольку энергия фосфоэфирной связи у них такая же, как в молекуле АТФ. Согласно современным представлениям о роли полиР в клетках микроорганизмов, резервирование фосфата не является их единственной функцией, они вовлечены в регуляцию активности ферментов, уровня экспрессии многих генов и процессы, обеспечивающие адаптацию к стрессам [13, 30–32].

Роль полиР как резерва фосфата доказана для многих микроорганизмов, принадлежащих к разным таксонам, от архей до грибов [5, 33–35]. Количество этих полимеров уменьшается при фосфорном голодании и возрастает при достаточном количестве фосфата в среде. ПолиР быстро потребляют при фосфорном голодании даже у *E. coli*, которая не обладает большим запасом полиР [36].

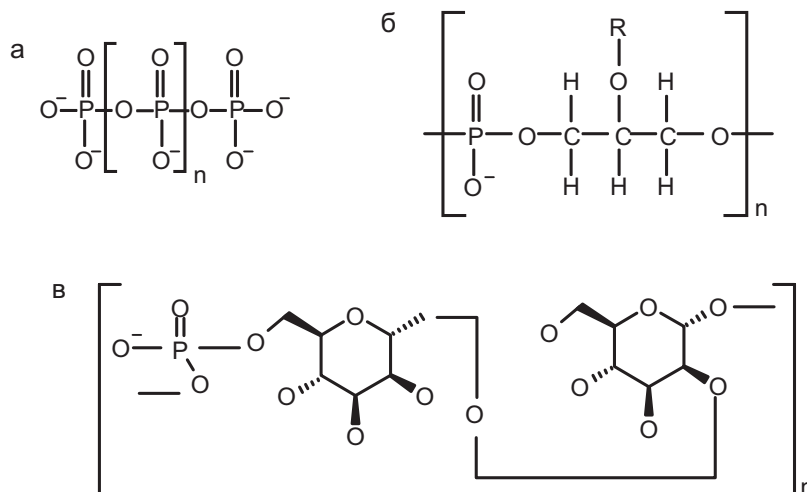


Рис. 3. Структура неорганических полифосфатов (а), глицерин-тейхоевой кислоты (б), фосфоманнана *Kuraishia capsulata* (в).

Среди бактерий есть своеобразные чемпионы по накоплению полифосфатов. Например, у бактерии *A. johnsonii* в условиях избытка P_i полиР составляли до 30% сухой биомассы [37]. *Corynebacterium glutamicum* накапливает до 600 мМ P_i в цитозоле в виде полиР, а гранулы полиР могут составлять до 37% объема клетки [38]. Представители родов *Mycobacteria* и *Corynebacteria* накапливают много полиР в виде цитоплазматических гранул [38, 5, 13]. По-видимому, высокая способность к накоплению полиР связана с тем, что у бактерий этой систематической группы наблюдается тесная связь между функцией полиР как фосфорного резерва и энергетической функцией этих полимеров. Кроме полифосфаткиназы, основного фермента синтеза полиР у прокариот [30], представители этой группы бактерий имеют ферменты, обеспечивающие непосредственное использование энергии полиР для субстратного фосфорилирования, такие как полифосфат-глюкокиназа [39, 40], НАД-киназа [41, 42], фруктозо- и маннозокиназы [43]. Значительное количество полиР накапливают бактерии, входящие в состав ассоциатов активированных илов очистных сооружений, когда стоки содержат избыток P_i [44–46].

У большинства исследованных в этом отношении видов дрожжей основным резервным фосфорным соединением являются неорганические полифосфаты [13]. В типичном случае культивирования на

полноценной среде с избытком P_i (20 мМ) в клетках *S. cerevisiae* накапливается мало P_i (~ 94 мкмоль P_i /г сухой биомассы) и много полиР (~ 658 мкмоль P_i /г сухой биомассы) [47]. Из клеток дрожжей получены полиР с длиной цепи от 3–8 до 200–260 фосфатных остатков [47]. ПолиР найдены у дрожжей в большинстве клеточных компартментов [48]. Недостаток P_i в среде вызывает уменьшение уровня полиР в клетках *S. cerevisiae* [5, 34, 49]. Однако даже в клетках, голодающих по фосфату, сохраняется небольшой, но вполне достоверный уровень полиР [49]. По-видимому, часть полиР в клетках дрожжей выполняет функцию резерва фосфата, тогда как другая, меньшая часть этих полимеров, ответственна за разнообразные регуляторные функции, например за регуляцию активности глюкозотрансферазы в клеточной стенке [50], поддержание отрицательного заряда клеточной стенки [51] или иные гипотетические функции, связанные с регуляцией экспрессии генов [13].

Если клетки *S. cerevisiae*, предварительно голодавшие по P_i , поместить на полноценную по этому компоненту среду, то они накапливают больше полиР, чем при нормальном росте на полноценной среде, т.е. имеет место феномен гиперкомпенсации или «phosphate overplus» [49], известный также для бактерий [5, 13].

Из сточных вод с избытком фосфата выделены несколько видов дрожжей, накапливающих значительные количества полиР: *Candida humicola* [52, 53], *Hansenula fabiani* и *Hansenula anomala* [54].

ОРГАНИЧЕСКИЕ ФОСФОРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Тейхоевые кислоты, полимерные соединения клеточных стенок грамм-положительных бактерий, состоят из повторяющихся остатков полиолов или гликозилполиолов, связанных фосфодиэфирными связями (рис. 3б). Структуры этих полимеров разнообразны и представляют таксономический интерес [55]. Эти полимеры могут содержать до 30 % общего фосфора клеток и расходуются на P_i -дефицитной среде [56]. Добавление тейхоевой кислоты в среду культивирования, лимитированную по фосфату, приводило к стимуляции роста *Bacillus subtilis* [56]. На этом основании было предположено, что одной из функций тейхоевых кислот является резервирование фосфата. Показано, что штаммы *B. subtilis* с точечными мутациями в генах, кодирующих ферменты биосинтеза тейхоевых кислот, не жизнеспособны в условиях лимита по фосфату [57].

В настоящее время эта функция тейхоевых кислот редко обсуждается в литературе и считается вторичной, поскольку выявлено, что эти полимеры участвуют в морфогенезе бактериальной клетки,

регулируют активность автолизиннов, участвуют в процессах адгезии и регуляции ионного состава клеточной стенки [58]. Однако, следует иметь в виду, что полифункциональность является характерным качеством большинства биологических макромолекул. Можно напомнить, что неорганические полифосфаты, являясь в значительной степени резервом фосфора, выполняют и другие, не всегда связанные с фосфорным метаболизмом регуляторные функции.

Дрожжи *Kuraishia (Hansenula) capsulata* на среде с избытком фосфата накапливают внеклеточный фосфоманнан (рис. 3в) [59]. При снижении концентрации P_i в среде его количество уменьшается [60]. Дополнительным доказательством резервной роли этого полимера является способность данных дрожжей утилизировать фосфоманнан из среды при фосфорном голодании [61].

III. ОБРАЗОВАНИЕ ФОСФОРНЫХ РЕЗЕРВОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ В МОДЕЛЬНЫХ ЛИМИТИРОВАННЫХ УСЛОВИЯХ

Образование запасных соединений в клетках микроорганизмов обычно связано с лимитированием роста в несбалансированных средах, когда одни питательные компоненты присутствуют в избытке, а другие – в недостаточном количестве для обеспечения роста и размножения. Это характерно также и для накопления резервных фосфорных соединений. Так, клетки *Escherichia coli* накапливают неорганические полифосфаты в условиях дефицита аминокислот. В ответ на аминокислотное голодание возрастает уровень гуанозин пента- и тетрафосфата, (p)ppGpp, одного из субстратов полифосфатазы *gppA*, что приводит к конкурентному подавлению гидролиза полифосфатов этим ферментом [62]. Подавление роста и размножения клеток приводит также к увеличению уровня АТФ и усилению синтеза полифосфатов полифосфаткиназой [30].

Для сравнительного исследования разнообразия образования фосфорных резервов микроорганизмами, относящимися к разным таксономическим группам, мы использовали экспериментальную модель, в которой клетки помещали в унифицированные среды, не содержащие источников углерода или азота и не поддерживающие рост (табл. 2).

В этой системе проанализировали способность к поглощению фосфата трех видов бактерий, *E. coli*, *Brevibacterium casei* [63] и *A. xylinum* [27], и нескольких видов аскомицетных и бизидиомицетных дрожжей [64]. Эта способность была неодинаковой. Клетки *E. coli*

Таблица 2.
Поглощение фосфата микроорганизмами в лимитированных условиях (% от исходного содержания в среде)

Состав среды	Микроорганизм*				
	<i>Brevibacterium casei</i> [63]	<i>Acetobacter xylinum</i> [27]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [68]	<i>Cryptococcus humicola</i> [64]	<i>Kuraishia capsulata</i> [61]
P _i , Mg ²⁺	0	0	0	45	0
P _i , глюкоза	4	3	44	36	31
P _i , Mg ²⁺ , глюкоза	4	50	84	75	100
P _i , Mg ²⁺ , смесь аминокислот	95	86	13	55	н/д**

* – Время инкубации 15 ч для *B. casei* и *A. xylinum*, 5 ч для *S. cerevisiae* и *Cr. humicola* и 24 ч для *K. capsulata*. Концентрации компонентов среды: 5мМ КН₂РO₄, 5мМ MgSO₄, 30 мМ глюкозы, 5 г/л смеси аминокислот Difco.

** н/д – нет данных.

поглощали незначительное количество P_i, тогда как клетки *B. casei* и *A. xylinum* почти полностью удаляли P_i из среды с начальной концентрацией 5 мМ. *B. casei* и *A. xylinum* накапливали до 0.3–0.5 ммоль Р на 1 г сырой биомассы. Это близко к накоплению минеральных фосфорных соединений бактериями, выделенными из активированных илов сточных вод, загрязненным фосфатом: *Acinetobacter johnsonii* [65], *Microlunatus phosphovor* [66] и *Rhodocyclus sp.* [67].

Среди проанализированной выборки дрожжей были выявлены хорошо поглощающие фосфат виды и виды, которые поглощали P_i в небольшом количестве [64]. Никакой взаимосвязи между таксономическим положением вида и его фосфат-поглощающей способностью выявлено не было. Так, среди представителей рода *Cryptococcus*, относящегося к порядку *Sporidiales* выявлены виды, поглощающие мало P_i (*Cr. terreus*), и поглощающие его почти полностью при концентрации 5 мМ (*Cr. humicola*). *Ps. fusiformata*, представитель порядка *Ustilaginales*, также относящегося к базидиомицетам, поглощал P_i всего лишь вдвое хуже, чем *Cr. humicola*. Среди аскомицетов также наблюдалась значительная разница по способности поглощать P_i. При этом сравнимой с *Cr. humicola*

Таблица 3.
Состав резервных фосфорных соединений у представителей бактерий и дрожжей в лимитированных условиях [27, 61, 63, 64, 68]

Микроорганизм	Условия	Резервные фосфорные соединения	Содержание, % от фосфата, поглощенного из среды
<i>Brevibacteria</i>	Дефицит источника углерода	$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	68
		полиР	2
<i>Acetobacter xylinum</i>	Дефицит источника углерода	$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	56
		полиР	2
	Дефицит источника азота	полиР	70
		$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дефицит источника азота	полиР	70
		P_i	7
<i>Cryptococcus humicola</i>	Дефицит источника азота	полиР	63
		P_i	9
<i>Kuraishia capsulata</i>	Дефицит источника азота	полиР	14
		P_i	1,4
		внеклеточный фосфоманнан	66

поглощающей способностью обладали таксономически далекие от них *S. cerevisiae*. На полноценной среде эти дрожжи поглощали 0.7 и 0.4 ммоль P_i на 1 г сухой биомассы, а на среде с лимитированием по азоту и избытком P_i и Mg – 2.1 и 1.9 ммоль P_i на 1 г сухой биомассы.

Было также проведено сравнение состава резервных фосфорных соединений у некоторых микроорганизмов, показавших высокий уровень удаления P_i из среды (табл. 3). Сравнение условий, способствующих образованию фосфорных резервов, привело к следующим заключениям. У бактерий *B. casei* и *A. xilinum* обнаружено образование малорастворимых солей ортофосфата, происходящее при лимитировании по источнику углерода и избытке азота [27, 63]. Необходимым компонентом для такой формы фосфорной минерализации являются ионы магния. Это согласуется с особенностями функционирования транспортной системы Pit , которая обеспечивает транспорт фосфата в форме MeHPO_4 в условиях избытка P_i . Необходимость в ионах магния также связана с химической структурой

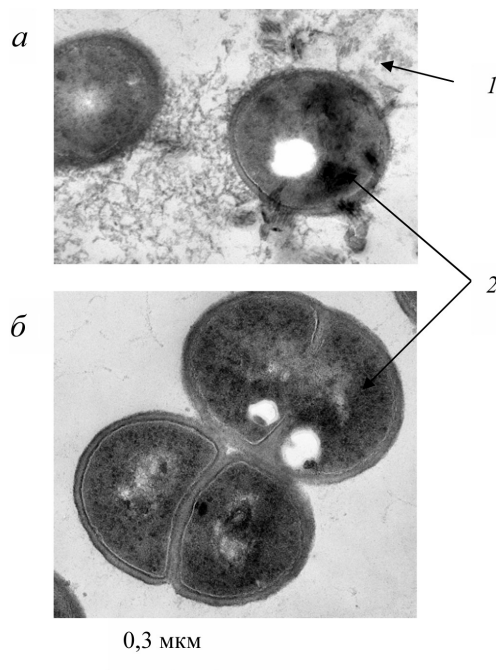


Рис. 4. Ультратонкие срезы клеток *Acetobacter xylinum* [27].

а – клетки инкубировали в среде, содержащей 5 мМ KH_2PO_4 и MgSO_4 , 5 г/л смеси аминокислот (Casamino acid, Difco) в течение 15 ч;

б – клетки инкубировали в среде, содержащей 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , 30 мМ глюкозы в течение 15 ч.

1 – внеклеточный электроноплотный материал, по-видимому, малорастворимая соль P_i ;

2 – внутриклеточный электроноплотный материал, по-видимому, полиР.

образующейся малорастворимой соли. Избыток азота в виде смеси аминокислот, по-видимому, приводит к активизации их катаболизма и высвобождению ионов аммония. В качестве источника азота взамен смеси аминокислот можно добавить гистидин, аргинин или глутамин, либо α -кетоглутарат и сульфат аммония [27, 63]. Сульфат аммония и магний сами по себе не стимулировали формирование этих фосфорных резервов, вероятно потому, что Pit -система зависит от градиента протонов на цитоплазматической мембране.

В отличие от *Brevibacteria* у *A. xylinum* наблюдали накопление фосфорных резервов не только при лимитировании по азоту, но и при дефиците азота в присутствии глюкозы. В последнем случае главным фосфорным резервом были уже полиР [27] (табл.3). С помощью электронной микроскопии обнаружено, что инкубация со смесью аминокислотами приводит к появлению большого количества электронноплотного материала, как связанного с поверхностью клеток этих бактерий, так и свободно лежащего в биомассе (рис. 4). Сопоставление с данными, полученными при экстракции фосфорных соединений из биомассы, позволяет считать, что этот материал является малорастворимым ортофосфатом. По-видимому, в процессе

катаболизма некоторых аминокислот и дефиците источников углерода, ацетобактерии не только поглощали P_i , но и защелачивали среду. При этом фосфат магния образует осадок, который сорбируется на поверхности клеток. У *A. xylinum* в зависимости от условий среды реализуются два способа запасаания фосфорных резервов: в виде малорастворимых солей P_i при недостатке источника энергии и избытке азота и в виде высокомолекулярных полиР при наличии источника энергии и недостатке азота.

Что касается дрожжей, то в использованной нами модельной системе большинство видов накапливали полиР, причем это накопление требовало присутствия источника углерода (глюкозы). Накопления ортофосфата отмечено не было (табл. 3). Ионы магния не являлись обязательным компонентом для такого накопления, однако стимулировали накопление полиР (вдвое для *S. cerevisiae* и *Cr. humicola*). В присутствии ионов магния у обоих видов дрожжей также увеличивалось содержание полифосфатов с длиной цепи от 70 и выше фосфатных остатков и снижалось содержание короткоцепочечных полиР с длиной цепи около 15–45 фосфатных остатков [64].

В клетках дрожжей, выращенных на среде бедной по P_i , содержание полиР было мало и характерных электроноплотных включений не обнаруживали [68]. Клетки *S. cerevisiae* и *Cr. humicola*, накопившие полиР в присутствии Mg^{2+} , содержали множество маленьких электроноплотных включений в цитоплазме, вакуолях и митохондриях (рис. 5). Особенностью локализации этих включений у *S. cerevisiae* была локализация их вблизи цитоплазматической мембраны, а также в ассоциации с крупными электронопрозрачными включениями, возможно липидной природы (рис. 5а). Клетки *Cr. humicola*, накопившие полиР в присутствии Mg^{2+} , также содержали множество маленьких электроноплотных включений в цитоплазме (рис. 5б), вакуолях, особенно вблизи вакуолярной мембраны и в митохондриях. Особенностью локализации полиР в клетках этого вида дрожжей были крупные скопления гранул полиР в цитоплазме, вблизи вакуолярной мембраны, и отдельные крупные гранулы вблизи клеточной стенки. *Cr. humicola* накапливали более длинноцепочечные полиР, чем *S. cerevisiae* [64].

Единственным исключением среди исследованной выборки, оказались дрожжи *K. capsulata*, которые не накапливали полиР в условиях избытка источника углерода и дефицита азота (табл. 3). Надо отметить, что если у большинства видов дрожжей почти полное поглощение P_i (при начальной концентрации 5 мМ) наблюдали за 5 ч, то у этого вида процесс занимал около суток. При этом содержание

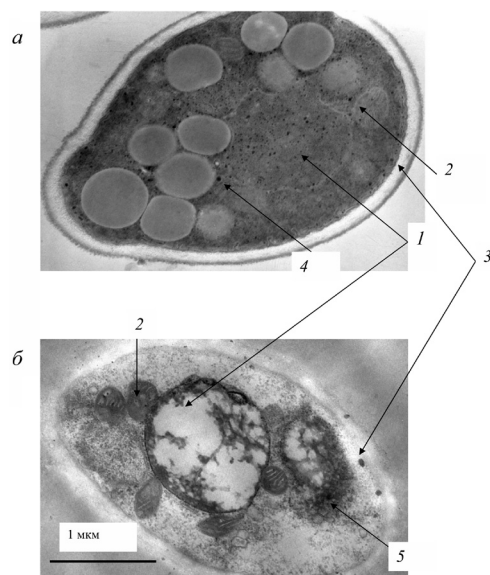


Рис. 5. Ультратонкие срезы клеток *S. cerevisiae* (а) и *Cr. humicola* (б) после 5 ч инкубации в минимальной среде, содержащей 5мМ KH_2PO_4 , 5мМ MgSO_4 , 30 мМ глюкозы.

1 – вакуоль,

2 – митохондрии,

3 – гранулы полиР, ассоциированные с клеточной оболочкой,

4 – гранулы полиР, ассоциированные с липидными включениями,

5 – скопления полиР в цитоплазме вблизи вакуолярной мембраны.

полиР оставалось низким. В инкубационной среде содержались органические соединения, фосфор которых определялся только после химической минерализации. Когда с помощью осаждения цетавлоном [61] из инкубационной среды получили препарат фосфоманнана, оказалось, что он содержит основную долю P_i , поглощенного из среды. Полученная фракция фосфоманнана содержала 3,35 мкмоль общего фосфора на 1 г препарата, что составило ~ 57% общего фосфора, присутствующего в инкубационной среде и не содержала ни P_i , ни лабильного фосфора. Полученные данные дают основания считать, что внеклеточный фосфоманнан *K. capsulata* является вторичным метаболитом, образующимся в условиях дефицита источника азота и избытка фосфора и углерода.

Опыты с использованием лимитированных модельных условий позволили оценить разнообразие структуры, локализации и особенностей формирования фосфорных резервных соединений у микроорганизмов, относящихся к разным таксонам.

IV. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, РЕЗЕРВИРУЮЩИХ ФОСФАТЫ, В ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШАХ

ВОДОЕМЫ И ДОННЫЕ ОТЛОЖЕНИЯ

Концентрация P_i в природных водоемах, в том числе и в океане, обычно слишком мала, для того, чтобы обеспечить первичное образование фосфатов кальция из раствора (нуклеацию) [69]. Однако образование таких минералов в водоемах происходит. Получено много данных, свидетельствующих в пользу того, что в океане именно микроорганизмы в первую очередь ответственны за ассимиляцию и реминерализацию фосфора [69–71]. Многие микроорганизмы, обитающие в океане, способны к концентрированию P_i в виде внутриклеточных полиР в условиях, где доступен кислород (в поверхностных слоях вод). Затем в анаэробных условиях (в донных отложениях) происходит использование этих полиР в качестве источника энергии, высвобождение P_i , повышение его локальной концентрации и преципитация апатита в богатой кальцием морской воде [69–71]. Также высвобождение и гидролиз полиР может происходить после гибели клеток в донных отложениях [69–71]. Предполагается, что в такой процесс вовлечены морские бактерии, относящиеся к родам *Pseudomonas* и *Acinetobacter* [69], а также сульфид-окисляющие бактерии *Beggiatoa* и *Thiomargarita* [72–74], образующие бактериальные маты. Показано, что в донных океанических отложениях, содержащих до 25% гидроксиапатита и населенных *Thiomargarita*, концентрация P_i возросла до 300 мкМ, тогда как в океанических водах она обычно меньше 1 мкМ [71]. Было показано, что эти бактерии накапливают фосфаты в аэробных условиях, а в анаэробных условиях наблюдается выход фосфатов из клеток и формирование апатита [73]. *Beggiatoa* и *Thiomargarita* накапливают полиР в присутствии серы и нитрата [74]. В лабораторных условиях полиР в клетках *Beggiatoa* деполимеризовались при увеличении концентрации сульфидов и недостатке кислорода, а P_i высвобождался в среду [74].

К накоплению полиР способны также диатомеи [75]. В донных отложениях были найдены гранулы полиР, которые по размерам похожи на обнаруживаемые у диатомей. Предполагается, что после гибели клеток диатомей и разрушения их силикатных клеточных стенок, накопленные полиР попадают в донные отложения, где из них высвобождается P_i с помощью щелочной фосфатазы, связанной с клеточной поверхностью [75].

Новые генетические и биоинформатические подходы позволили установить широкое распространение генов *ppk1* и *ppk2*, кодирующих полифосфаткиназы и *ppx*, кодирующего полифосфатазу, среди морских олиготрофных микроорганизмов, живущих у условиях недостатка P_i [76]. Эти данные свидетельствуют в пользу глобального распространения процесса концентрирования фосфора микроорганизмами в виде полиР в мировом океане.

АКТИВИРОВАННЫЕ ИЛЫ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

В недавнем прошлом во всем мире полиР использовали в качестве компонента моющих средств. Гидролиз этих полиР ферментами микроорганизмов, приводил к избыточному содержанию P_i в стоках и к эвтрофикации водоемов. В настоящее время в Европе и США использование полиР в составе моющих средств запрещено, однако стоки по имеющимся в литературе оценкам содержат 4–12 мг Р на 1 л, чаще всего в виде P_i , легко потребляемого микроорганизмами, в том числе цианобактериями [77]. Поэтому задача очистки стоков от избытка P_i по-прежнему остается актуальной. Основным микробиологическим подходом к очистке сточных вод от избытка P_i является так называемый процесс усовершенствованного биологического удаления фосфата (EBPR – Enhanced Biological Phosphorus Removal). Описанию микробиоты активированных илов, механизмов поглощения P_i и накопления резервных фосфорных соединений микроорганизмами, осуществляющими EBPR, посвящены многочисленные исследования, обобщенные в ряде обзоров. Ввиду их многочисленности, приведем лишь несколько ссылок на относительно недавние обзоры [77–80]. Роль накопления полиР бактериями илов в процессе очистки стоков от избытка фосфатов доказана относительно давно [81–86]. Инженерные основы этого процесса были созданы еще раньше. В ряде стран успешно работают очистные сооружения, в которых благодаря микроорганизмам активированных илов содержание P_i в стоках становится минимальным. Разрабатываются технологии использования накапливаемых в илах фосфатов в качестве фосфорных удобрений [78]. Основной проблемой в этом отношении является высокое содержание в илах очистных сооружений тяжелых металлов и ксенобиотиков.

В связи с тем, что микробиота илов очистных сооружений сложна, а процесс поглощения фосфата зависит от многих факторов, включая состав микробных ассоциаций и состав самих стоков, изучение механизмов удаления P_i из растворенной фазы остается актуальной задачей. Для очистки сточных вод от фосфата необходимо чередо-

вание анаэробных и аэробных условий, что достигается чаще всего с помощью последовательного расположения анаэробной и аэробной зон в серии проточных систем с возвращением ила в оборот. На анаэробной стадии бактерии активированного ила потребляют органические субстраты сточных вод. В качестве источника энергии расходуются внутриклеточные полиР, а Р_i высвобождается в среду. В таких условиях происходит накопление полигидроксibuтирата (PHB) и других полигидроксиаканоатов (РНА). Существует мнение, что бактерии, накапливающие большое количество полиР, имеют селекционное преимущество в анаэробной зоне. В аэробной зоне гидролизуются РНА, синтезируется АТФ, ил поглощает больше Р_i, чем было высвобождено на предыдущей аэробной стадии. Р_i, удаленный из сточных вод, накапливается в клетках бактерий в виде большого количества полиР. Некоторое количество фосфата удерживается также и внеклеточными полимерами, ассоциированными со скоплениями микробных клеток [87]. Обогащенный фосфором ил в дальнейшем удаляется из системы.

Первой чистой культурой, выделенной из установок с EBPR и накапливающей много полиР, были различные штаммы *Acinetobacter* sp. [81]. В дальнейшем из активированных илов были выделены бактерии, принадлежащие к многочисленным систематическим группам, описаны новые виды и роды. К их числу относятся *Micrococcus phosphovorans* [88], *Rhodocyclus* sp. [46], *Corynebacteria* [89], *Microthrix parvicella* [90], *Tetracoccus cecii* [91], *Tetrasphaera* [92–93], *Gemmatimonas aurantiaca* [94] и *Accumulibacter phosphatis* [95]. В активированных илах были также найдены несколько видов дрожжей [52–54]. В илах также обнаружено много некультивируемых видов, которые идентифицируют с помощью молекулярно-биологических и флуоресцентных методов [80]. Использование специфических красителей для полиР и РНА дает возможность оценивать способность к накоплению указанных биополимеров непосредственно в препаратах илов.

Моделирование EBPR в лабораторных реакторах привело к мнению, что ни один из отдельных видов микроорганизмов не способен осуществлять процесс полностью. В настоящее время считается, что EBPR реализуется микробными сообществами, состав которых определяется особенностями химического состава сточных вод, температурой, рН и другими факторами. Очистные сооружения с EBPR являются уникальной техногенной экологической нишей, особенности которой обусловлены именно наличием анаэробной и аэробной зон, в каждой из которых селективное преимущество

получают разные виды бактерий или их ассоциации [77–80]. По биохимическим особенностям среди них выделяют РАО (Polyphosphate-accumulating microorganisms) – бактерии, накапливающие много полиР. Считалось, что в условиях избытка нитрата у них происходит подавление транспорта фосфата. Позднее в илах были обнаружены DPAO (Denitrifying Polyphosphate accumulating organisms), которые способны одновременно поглощать фосфат и восстанавливать нитрат в отсутствие кислорода, используя нитрат как акцептор электронов. Следующая группа – это так называемые GAO (glycogen-accumulating microorganisms), которые накапливают гликоген в аэробных условиях и конкурируют с РАО за источник углерода [77–80]. Конкуренция между РАО и GAO и ее зависимость от температуры, pH, доступности источника углерода и соотношения P_i и ацетата в стоках, подробно описаны в обзоре [80]. Однако проблема стабильного EBPR пока еще далека от решения.

Среди основных проблем, связанных с использованием микроорганизмов, накапливающих полиР, для биоремедиации стоков следует отметить, во-первых, проблему направленного создания наиболее продуктивных консорциумов микроорганизмов для удаления фосфата из стоков, во-вторых, значительную зависимость эффективности поглощения фосфата от состава сточных вод, и в-третьих, проблему дальнейшего использования отработанных активированных илов. Очевидно, что микроорганизмы, накапливающие полиР, являются ключевым звеном в поглощении избытка фосфата из стоков, и дальнейшие исследования метаболизма полиР важны для разработки улучшенных вариантов биотехнологий их очистки.

МИКОРИЗА

Ряд наблюдений свидетельствуют о том, что в микоризе содержится много P_i и полиР. Значительное количество полиР было найдено методом рентгеновского микроанализа в вакуолях гриба *Pisolithus tinctorius* в эктомикоризе, образованной с корнями *Eucalyptus pilularis* [96]. Микросклеротии гриба *Phialocephala fortinii* накапливали полиР на ранней стадии взаимодействия с корнями *Asparagus officinalis* [97]. Исследования полиР у облигатных микоризных грибов показали, что в клетках грибов накапливаются полиР, а затем происходит их локальный гидролиз для обеспечения фосфатом растения, находящегося с ними в симбиозе [98]. Содержание полиР у гриба изменяется в процессе развития микоризы и может быть использовано в качестве индикатора активности гриба, как поставщика фосфата для растения [98]. У облигатных микоризных грибов недавно была

обнаружена полиР-синтетазная активность в присутствии АТФ [99]. Грибы, образующие микоризу, играют важную роль в обеспечении фосфором растений, находящихся с ними в симбиозе. Это связано со способностью клеток грибов к концентрированию P_i из почв, растворению малорастворимых минеральных фосфорных соединений за счет выделения в среду органических кислот и накоплению полиР [100].

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные о разнообразии фосфорных резервов микроорганизмов на сегодня позволяют полагать, что наиболее распространены в таком качестве именно минеральные соединения. Органические запасные фосфорные соединения встречаются реже. Образование минеральных фосфорных соединений относится к явлению, называемому биологической минерализацией, или биоминерализацией. При этом биологические молекулы служат матрицами или катализаторами для образования минеральных соединений, которые в результате сохраняют структурные особенности по сравнению с минералами, образующимися неорганическим путем. В литературе принят также термин «фосфатная минеральная нуклеация», когда локальное увеличение концентрации фосфата и катионов металлов (в первую очередь кальция) приводит к первоначальному формированию кристаллов апатита, а дальнейшее формирование этого биоминерала контролируется специфическими белками [70].

Некоторые пути фосфорной биоминерализации сохранились в ходе эволюции от прокариот к высшим эукариотам. В первую очередь они наблюдаются в митохондриях, которые согласно эндосимбиотической теории, произошли от древних бактерий. В митохондриях печени крысы еще в 1964 году были обнаружены электроноплотные гранулы (так называемые «dense granules»), содержавшие высокую концентрацию Са и Р [70]. Было неясно, почему в них не наблюдается образования кристаллического апатита. Однако затем было установлено, что такие гранулы содержат не P_i , а полиР [70]. Они были найдены у простейших, в особых клеточных органеллах, ацидокальцисомах [101], и у млекопитающих, в тромбоцитах [102] и митохондриях клеток костной ткани [103]. Обнаружено также участие полиР в гомеостазе кальция и транспорте через мембрану в митохондриях других тканей млекопитающих [104].

На сегодня представления о роли полиР в костной ткани вкратце сводятся к следующему [103, 105–107]. В остеокластах митохондрии

накапливают кальций и полиР, образуя плотные гранулы. В результате экзоцитоза они выходят во внеклеточное пространство в месте, где идет рост или репарация кости. Здесь гранулы разрушаются, щелочная фосфатаза гидролизует полиР и высвобождает P_i . При участии специфических белков остеобластов из высвобождающегося P_i и кальция формируется структурированный апатит кости. В этом процессе остается еще много неясного. Неизвестно, какие ферменты ответственны за синтез полиР в митохондриях, поскольку ген типичной полифосфаткиназы, ответственной за синтез полиР у бактерий, у млекопитающих не найден [32]. Неизвестно, какие именно сигналы вызывают выход полиР-гранул из остеокластов.

Богатые полиР гранулы найдены также в тромбоцитах [102]. При разрушении тромбоцитов полиР выходят в кровь, где участвуют в каскаде свертывания, связываясь фактором XII и активируя его, а затем полиР и ионы кальция входят в состав тромба, увеличивая его стабильность [108–112].

Просматривается эволюционно значимая аналогия между фосфорной минерализацией у микроорганизмов, и формированием апатита кости и отдельными стадиями образования тромбов у млекопитающих. Наиболее выражено сходство между образованием апатитов донных отложений в водоемах при участии микроорганизмов и формированием апатита костной ткани млекопитающих:

- на отдельных стадиях этих процессов преобладает либо поглощение фосфорных минеральных соединений из среды, либо выброс их из клеток (и/или высвобождение из клеток в случае гибели);
- концентрирование фосфата из среды сопровождается локальным накоплением в клетках неорганических полифосфатов;
- при изменении условий среды или при гибели клеток полиР выходят во внеклеточную среду и гидролизуются фосфатазами; из высвобождающегося P_i в присутствии ионов кальция образуется апатит.

Изучение фосфорных резервов микроорганизмов, их структуры, условий образования и разрушения значимо не только для понимания круговорота фосфора в биосфере, но и для моделирования нормальных и патологических процессов в организме человека, которые связаны с фосфорным обменом.

Благодарности

Авторы благодарят к.б.н. Н.Е. Сузину (ИБФМ РАН) за электронные микрофотографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller, S.L., Parris, M. (1964) Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions, *Nature*, **204**, 1248–1249.
2. Beck, A., Orgel, L.E. (1965) The formation of condensed phosphate in aqueous solution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **54**, 664–669.
3. Lohmann, R., Orgel, L.E. (1968) Prebiotic synthesis: phosphorylation in aqueous solution, *Science*, **161**, 64–66.
4. Osterberg, R., Orgel, L.E. (1972) Polyphosphate and trimetaphosphate formation under potentially perbiotic conditions, *Journal of Molecular Evolution*, **1**, 241–252.
5. Кулаев И.С. Биохимия неорганических полифосфатов. М: Изд. МГУ, 1975. 246 стр.
6. Miller, S.L. (1986) Current status of the prebiotic synthesis of small molecules, *Chemical Scripta*, **26B**, 5–11.
7. Oro, J., Miller, S.L., Lazcano, A. (1990) The origin and early evolution of life on Earth, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **18**, 317–356.
8. Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable, *Journal of Bacteriology*, **177**, 491–496.
9. Arrhenius, G., Sales, B., Mojzsis, S., Lee, T. (1997) Entropy and charge in molecular evolution: the case of phosphate, *Journal of Theoretical Biology*, **187**, 503–522.
10. Baltscheffsky, H. (1997) Major «Anastrophes» in the origin and early evolution of biological energy conversion, *Journal of Theoretical Biology*, **187**, 495–501.
11. De Graaf, R.M., Schwartz, A.W. (2000) Reduction and activation of phosphate on the primitive earth, *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, **30**, 405–410.
12. Спирин А.С. (2001) Биосинтез белка, мир РНК и происхождение жизни, *Вестник РАН*, **71**, 146–153.
13. Кулаев И.С., Варабов В.М., Кулаковская Т.В. (2005) Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М: Научный мир. 215 стр.
14. Галимов Э.М. (2006) Феномен жизни. Между равновесием и нелинейностью. Происхождение и принципы эволюции. М: Изд. УРСС. XX стр.
15. Cavalier-Smith, T. (2006) Cell evolution and Earth history: stasis and revolution, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **361**, 969–1006.
16. Wolfe-Simon, F., Switzer Blum, J., Kulp, T.R., Gordon, G.W., Hoefft, S.E., Pett-Ridge, J., Stolz, J.F., Webb, S.M., Weber, P.K., Davies, P.C., Anbar, A.D., Oremland, R.S. (2011) A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus, *Science*, **332**, 1163–1166.
17. Erb, T.J., Kiefer, P., Hattendorf, B., Günther, D., Vorholt, J.A. (2012) GFAJ-1 is an arsenate-resistant, phosphate-dependent organism, *Science*, **337**, 467–470.
18. Rao, N.N., Torriani, A. (1990) Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, **4**, 1083–1090.
19. Van Veen, H.W., Abee, T., Korts-tee, G.J.J., Konings, W.N., Zehnder, A.J.B. (1994) Translocation of metal phosphate via the phosphate inorga-

- nic transport system of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **33**, 1766–1770.
20. Harris, R.M., Webb, D.C., Howitt, S.M., Cox, G.B. (2001) Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **183**, 5008–5014.
 21. Spira, B., Agüena, M., de Castro Oliveira, J.V., Yagil, E. (2010) Alternative promoters in the pst operon of *Escherichia coli*, *Molecular Genetics and Genomics*, **284**, 489–498.
 22. Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., Lundh, F. (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics*, **43**, 225–244.
 23. Dick, C.F., Dos-Santos, A.L., Meyer-Fernandes, J.R. (2014) Inorganic phosphate uptake in unicellular eukaryotes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1840**, 2123–2127.
 24. Смирнов А.В., Сузина Н.Е., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2002) Ортофосфат магния - новая форма резервирования фосфата у галофильной археи *Halobacterium salinarum*, *Микробиология*, **71**, 786–793.
 25. Смирнов А.В. (2003) Поглощение и резервирование фосфата некоторыми археями и бактериями : Дис. канд. биол. наук. Пушино.
 26. Smirnov, A., Suzina, N., Chudinova, N., Kulakovskaya, T., Kulaev, I. (2005) Formation of insoluble phosphate during growth of the archae *Haloarubrum distributum* and *Halobacterium salinarum* and the bacterium *Brevibacterium antiquum*, *FEMS Microbiology Ecology*, **52**, 129–137.
 27. Ryazanova, L.P., Suzina, N.E., Kulakovskaya, T.V., Kulaev I.S. (2009) Phosphate accumulation of *Acetobacter xylinum*, *Archives of Microbiology*, **191**, 467–471.
 28. Герасименко Л.М., Гончарова И.В., Зайцева Л.В. (1998). Влияние содержания фосфора в среде на рост и минерализацию цианобактерий, *Микробиология*, **67**, 249–254.
 29. Гончарова И.В., Герасименко Л.М. (1993) Динамика потребления неорганического фосфора клетками *Microcoleus chthonoplastes*, *Микробиология*, **62**, 1048–1055.
 30. Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riché, D. (1999) Inorganic Polyphosphate: a molecule with many functions, *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 89–125.
 31. Рош Р. (2000) Транспорт ионов через мембрану посредством полифосфат-поли-(β)-гидроксibuтиратных комплексов, *Биохимия*, **65**, 335–353.
 32. Rao, N.N., Gómez-García, M.R., Kornberg, A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival, *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 605–647.
 33. Harold, F.M. (1966) Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and functions, *Bacteriological Reviews*, **30**, 772–794.
 34. Kulaev, I. S., Vagabov V.M. (1983) Polyphosphate metabolism in microorganisms, *Advances in Microbial Physiology*, **24**, 83–171.
 35. Wood, H.G., Clark J.E. (1988) Biological aspects of inorganic polyphosphates, *Annual Review of Biochemistry*, **57**, 235–260.
 36. Несмеянова М.А. (2000) Полифосфаты и ферменты полифосфатного обмена у *Escherichia coli*, *Биохимия*, **65**, 368–374.
 37. Deinema, M.H., Habers, L.H.A., Scholten, J., Turkstra, E., Webers, H.A.A.M. (1980) The accumulation of polyphosphate in *Acinetobacter* spp., *FEMS Microbiology Letters*, **9**, 275–279.

38. Lindner, S.N., Knebel, S., Pallerla, S.R., Schoberth, S.M., Wendisch, V.F. (2010) Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 703–713.
39. Szymona, M. (1957) Utilization of inorganic polyphosphates for phosphorylation of glucose in *Micobacterium phlei*, *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences*, **5**, 379–381.
40. Hsieh, P.C., Shenoy, B.C., Samols, D., Phillips, N.F.B. (1996) Cloning, expression and characterization of polyphosphate glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 4909–4915.
41. Kawai, S., Mori, S., Mukai, T., Suzuki, S., Yamada, T., Hashimoto, W., Murata, K. (2000) Inorganic Polyphosphate/ATP-NAD kinase of *Micrococcus flavus* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **276**, 57–63.
42. Mori, S., Yamasaki, M., Maruyama, Y., Momma, K., Kawai, S., Hashimoto, W., Mikami, B., Murata, K. (2004) Crystallographic studies of *Mycobacterium tuberculosis* polyphosphate/ATP-NAD kinase complexed with NAD, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **98**, 391–393.
43. Mukai, T., Kawai, S., Matsukawa, H., Matuo, Y., Murata, K. (2003) Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase, of *Arthrobacter* sp. Strain KM, *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 3849–3857.
44. Кортеги Г., Аппельдорн Л., Бонтинг К.Ф.С., Ван Нил Дж., Ван Вин Х.Дж. (2000) Биохимия и экология усовершенствованного биологического удаления фосфора, *Биохимия*, **65**, 394–405.
45. Мино Т. (2000) Селекция полифосфат-аккумулирующих бактерий для усовершенствованного биологического удаления фосфата в активированных илах при технологических процессах удаления сточных вод, *Биохимия*, **65**, 405–414.
46. Кислинг Дж.Д., Вэн Дайен С. Дж., Трелстэд П., Ренниджер Н., МакМахон К. (2000) Метаболизм полифосфатов и проблемы биотехнологии и защиты окружающей среды, *Биохимия*, **65**, 385–394.
47. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Щипанова И.Н., Сибельдина Л.А., Кулаев И.С. (1998) Изменение длины цепи неорганических полифосфатов в зависимости от стадии роста *Saccharomyces cerevisiae*, *Микробиология*, **67**, 193–198.
48. Lichko, L., Kulakovskaya, T., Pestov, N., Kulaev, I. (2006) Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes, *Bioscience Reports*, **26**, 45–54.
49. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаев И.С. (2000) Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей, *Биохимия*, **65**, 414–420.
50. Калеева Т.С., Егоров, С.Н., Арбатский, Н.П., Безсонов, Е.Е., Горковский, А.А., Кулаев И.С. (2008) О роли высокомолекулярных полифосфатов в активации глюкан-трансферазы Bgl2p из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Доклады Академии Наук*, **420**, 695–698.
51. Иванов А.Ю., Вагабов В.М., Фомченков В.М., Кулаев И.С. (1996) Исследование влияния полифосфатов клеточной оболочки на чув-

- ствительность дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* к повреждающему действию цетилтриметил аммоний бромида, *Микробиология*, **65**, 611–616.
52. McGrath, J.W., Quinn, J.P. (2000) Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4068–4073.
53. McGrath, J.W., Kulakova, A.N., Kulakov, L.A., Quinn, J.P. (2005) In vitro detection and characterisation of a polyphosphate synthesising activity in the yeast *Candida humicola* G-1, *Research in Microbiology*, **156**, 485–491.
54. Watanabe, T., Ozaki, N., Iwashita, K., Fujii, T., Lefuji, H. (2008). Breeding of wastewater treatment yeasts that accumulate high concentration of phosphorus, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**, 331–338.
55. Потехина Н.В., Стрешинская Г.М., Тульская Е.М., Козлова Ю.И., Сенченкова С.Н., Шашков А.С. (2011) Фосфатсодержащие полимеры клеточных стенок бацилл, *Биохимия*, **76**, 914–924.
56. Grant, W.D. (1979) Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, **137**, 35–43.
57. Bhavsar, A.P., Erdman, L.K., Schertzer, J.W., Brown, E.D. (2004) Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid, *Journal of Bacteriology*, **186**, 7865–7873.
58. Brown, S., Santa Maria, J.P.Jr., Walker, S. (2013) Wall teichoic acids of gram-positive bacteria, *Annual Review of Microbiology*, **67**, 313–336.
59. Slodki, M.E. (1963) Structure of *Hansenula capsulata* NRRL Y-1842 phosphomannan, *Biochimica et Biophysica Acta*, **69**, 96–102.
60. Avigad, G., Kalina, M. (1979) Effect of orthophosphate limitation on the production of phosphomannan by *Hansenula capsulata*, *FEMS Microbiology Letters*, **6**, 111–114.
61. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2013) Внеклеточный фосфоманнан – фосфорный резерв дрожжей *Kuraishia capsulata*, *Биохимия*, **78**, 767–771.
62. Kuroda, A. (2006) A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **70**, 325–331.
63. Рязанова Л.П., Смирнов А.В., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2007) Снижение концентрации фосфата в среде клетками *Brevibacterium casei*, *Микробиология*, **76**, 752–758.
64. Breus, N.A., Ryazanova, L.P., Dmitriev, V.V., Kulakovskaya, T.V., Kulakov, I.S. (2012) Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen, *FEMS Yeast Research*, **12**, 617–624.
65. Van Niel, E.W.J., De Best, J.H., Kets, E.P.W., Bonting, C.F.C., Kortstee, G.J.J. (1999) Polyphosphate formation by *Acinetobacter johnsonii* 210A: effect of cellular energy status and phosphate-specific transport system, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 639–46.
66. Santos, M.M., Lemos, P.C., Reis, M.A.M., Santos, H. (1999) Glucose metabolism and kinetics of phosphorus removal by the fermentative bacterium *Microbacterium phosphovorans*, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3920–3928.
67. Zilles, J.L., Peccia, J., Kim, M.W., Hung, C.H., Noguera, D.R. (2002) Involvement of *Rhodocyclus* – related organisms in phosphorus removal in full scale wastewater treatment

- plants, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2763–2769.
68. Бреус Н.А., Рязанова Л.П., Сузина Н.Е., Кулаковская Т.В., Валиахметов А.Я., Яшин В.А., Сорокин В.В., Кулаев И.С. (2010) Накопление неорганических полифосфатов у *Saccharomyces cerevisiae* при дефиците азота: стимуляция ионами магния и особенности локализации, *Микробиология*, **80**, 612–618.
69. Diaz, J., Ingall, E., Benitez-Nelson, C., Paterson, D., de Jonge, M.D., McNulty, I., Brandes, J.A. (2008) Marine polyphosphate: a key player in geologic phosphorus sequestration, *Science*, **320**, 652–655.
70. Omelon, S., Ariganello, M., Bonucci, E., Grynpas, M., Nanci, A. (2013) A review of phosphate mineral nucleation in biology and geobiology, *Calcified Tissue International*, **93**, 382–396.
71. Karl, D.M. (2014) Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: new views of an old cycle, *Annual Review of Marine Science*, **6**, 279–337.
72. Schulz, H. N., Schulz, H.D. (2005) Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite, *Science*, **307**, 416–418.
73. Goldhammer, T., Bruchert, V., Firdelman, T.G., Zabel, M. (2010) Microbial sequestration of phosphorus in anoxic upwelling sediments, *Nature Geoscience*, **3**, 557–561.
74. Brock, J., Schulz-Vogt, H.N. (2011) Sulfide induced phosphate release from polyphosphate in cultures of marine *Beggiatoa* strain, *The ISME Journal*, **5**, 497–506.
75. Dyhrman, S.T., Jenkins, B.D., Rynearson, T.A., Saito, M.A., Mercier, M.L., Alexander, H., Whitney, L.P., Drzewianowski, A., Bulygin, V.V., Bertrand, E.M., Wu, Z., Benitez-Nelson, C., Heithoff, A. (2012) The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response, *PLoS One*, **7**(3):e33768. doi: 10.1371/journal.pone.0033768.
76. Temperton, B., Gilbert J.A., Quinn, J.P., McGrath, J.W. (2011) Novel analysis of oceanic surface water metagenomes suggests importance of polyphosphate metabolism in oligotrophic environments. *PLoS One*, **6**(1):e16499. doi: 10.1371/journal.pone.0016499.
77. McMahon, K.D., Read, E.K. (2013) Microbial contribution to phosphorus cycling in eutrophic lakes and wastewater, *Annual Review of Microbiology*, **67**, 199–219.
78. Hirota, R., Kuroda, A., Kato, J., Ohtake, H. (2010) Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **109**, 423–432.
79. Yuan, Z., Pratt, S., Batstone, D.J. (2012) Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes, *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 878–883.
80. Gebremariam, S.Y., Beutel, M.W., Christian, D., Hess, T.F. (2011) Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal—a critical review, *Water Environment Research*, **83**, 195–219.
81. Fuhs, G.W., Chen M. (1975) Microbiological basis of phosphorus removal in the activated sludge process for the treatment of wastewaters, *Microbial Ecology*, **2**, 119–138.
82. Mino, T., Kawakami, T., Matsuo, T. (1985) Location of phosphorus in activated sludge and function of intracellular polyphosphates in biological phosphorus removal process, *Water Science and Technology*, **17**, 93–106.

83. Toerien, D.F., Gerber, A., Lötter, L.H., Cloete, T.E. (1990) Enhanced phosphorus removal systems in activated sludge systems, *Advances in Microbial Ecology*, **11**, 173–230.
84. Seviour, R.J., Blackall, L.L. (Eds.) *The Microbiology of Activated Sludge*. Kluwer Academic Publishing, Boston, 1999.
85. Blackall, L.L., Crocetti, G.R., Saunders, A.M., Bond, P.L. (2002) A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**, 681–691.
87. Cloete, T.E., Oosthuizen, D.J. (2001) The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge, *Water Research*, **35**, 3595–3598.
88. Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., Kamagata, Y. (1995). *Microbunus phosphovorius* gen. nov. sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**, 17–22.
89. Bark, K., Kampfer, P., Sponner, A., Dott, W. (1993) Polyphosphate-dependent enzymes in some coryneform bacteria isolated from sewage sludge, *FEMS Microbiology Letters*, **107**, 133–138.
90. Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R.J., Amann, R., Blackall, L.L. (1997) Development and use of fluorescent *in situ* hybridisation probes for the detection and identification of *Microbunus parvicella* in activated sludge, *Systematic and Applied Microbiology*, **20**, 310–318.
91. Blackall, L.L., Crocetti, G.R., Saunders, A.M., Bond, P.L. (2002) A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**, 681–691.
92. Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K., Schumann, P., Burghardt, J., Tokiwa, Y., Stratton H.M. (2000) Three isolates of novel polyphosphate-accumulating gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 593–603.
93. Hanada, S., Liu, W.T., Shintani, T., Kamagata, Y., Nakamura K. (2002) *Tetrasphaera elongata* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 883–887.
94. Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura, K. (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 1155–1163.
95. Liu, W.T., Nielsen, A.T., Wu, J.H., Tsai, C.S., Matsuo, Y., Molin, S. (2001) *In situ* identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process, *Environmental Microbiology*, **3**, 110–122.
96. Ashford, A. E., Vesk, P.A., Orlovich, D.A., Markovina, A.L., Allaway, W.G. (1999) Dispersed polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis*/*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas, *Fungal Genetisc and Biology*, **28**, 21–33.

97. Yu, T., Nassuth, A., Peterson, R.L. (2001) Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots, *Canadian Journal of Microbiology*, **47**, 741–753.
98. Ohtomo, R., Saito, M. (2005) Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus, *New Phytologist*, **167**, 571–578.
99. Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M., Kuga, Y., Ezawa, T. (2009) ATP-dependent but proton gradient-independent polyphosphate-synthesizing activity in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 7044–7050.
100. Plassard, C., Dell, B. (2010) Phosphorus nutrition of mycorrhiza; trees, *Tree Physiology*, **30**, 1129–1139.
101. Docampo, R., Moreno, S.N. (2001) The acidocalcisome, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**, 151–159.
102. Ruiz, F.A., Lea, C.R., Oldfield, E., Docampo, R. (2004) Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes, *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 44250–44257.
103. Omelon, S., Georgiou, J., Henne-man, Z.J., Wise, L.M., Sukhu, B., Hant, T., Wynnyckyj, S., Holmyard, D., Bielecki, R., Grynpas, M.D. (2009) Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates, *PLoS ONE*, **4**(5):e5634.
104. Pavlov, E., Aschar-Sobbi, R., Campanella, M., Turner, R.J., Gómez-García, M.R., Abramov, A.Y. (2010) Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells, *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 9420–9428.
105. Morimoto, D., Tomita, T., Kuroda, S., Higuchi, C., Rato, S., Shiba, T., Nakagami, H., Morishita, R., Yoshikawa, H. (2010) Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **28**, 418–423.
106. Usui, Y., Uematsu, T., Uchihashi, T., Takahashi, M., Takahashi, M., Ishizuka, M., Doto, R., Tanaka, H., Komazaki, Y., Osawa, M., Yamada, K., Yamaoka, M., Furusawa, K. (2010) Inorganic polyphosphate induces osteoblastic differentiation, *Journal of Dental Research*, **89**, 504–509.
107. Müller, W.E., Wang, X., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schloßmacher, U., Lieberwirth, I., Glasser, G., Wiens, M., Schröder, H.C. (2011) Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca(2+) level in osteoblasts (SaOS-2 cells) *in vitro*, *Acta Biomaterials*, **7**, 2661–2671.
108. Smith, S.A., Mutch, N.J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R., Morrissey, J.H. (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 903–908.
109. Smith, S.A., Morrissey, J.H. (2008) Polyphosphate as a general procoagulant agent, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 1750–1756.
110. Smith, S.A., Choi, S.H., Davis-Harrison, R., Huyck, J., Boettcher, J., Reinstra, C.M., Morrissey, J.H. (2010) Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size, *Blood*, **116**, 4353–4359.
111. Van der Meijden, P.E., Heemskerk, J.W. (2010) Polyphosphates: a link

between platelet activation, intrinsic coagulation and inflammation?, *Expert Review of Hematology*, **3**, 269–272.

112. Mackman, N., Gruber, A. (2010) Platelet polyphosphate: an endogenous activator of coagulation factor XII, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **8**, 865–867.