

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Балабанова Лариса Анатольевна

**ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МОРСКИХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
ПРОДУЦЕНТОВ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ.
СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ СЕМЕЙСТВА PhoA**

1.5.4 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Владивосток – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ.....	5
2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	21
2.1 Эколого-географическая характеристика местообитаний и структура сообществ морских микроорганизмов	21
2.2 Фенотипическая и геномная дивергенция как основа современной систематики морских микроорганизмов	28
2.3 Кластеры нуклеотидных и аминокислотных последовательностей как молекулярные маркеры в систематике и экологии микроорганизмов	32
2.4 Метаболическая специфика и трофическая дифференциация морских гетеротрофных бактерий	45
2.5 Психрофильные и галофильные ферменты морских микроорганизмов: молекулярные основы адаптации.....	58
2.6 Биогеохимическая роль щелочных фосфатаз морских микроорганизмов в циклах трансформации фосфора	68
3 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	108
3.1 Выделение и культивирование морских бактерий	108
3.2 Фенотипирование и хемотаксономия морских бактерий	109
3.3 Секвенирование генов и филогения таксономических маркеров	110
3.4 Секвенирование геномов и филогеномный анализ	111
3.5 Геномный анализ биосинтетических кластеров и генов	115
3.6 Получение рекомбинантных белков	117
3.7 Исследование свойств рекомбинантных белков.....	121
3.7.1 Определение физико-химических и ферментативных свойств	121
3.7.2 Определение лиганд-связывающих свойств.....	123
3.7.3 Гомологичное моделирование 3D-структуры и молекулярный докинг	125
3.7.4 Структурно-функциональные исследования рекомбинантных белков	127
3.8 Исследование свойств щелочной фосфатазы SmAP семейства PhoA.....	127
3.8.1 Получение и очистка рекомбинантной ЩФ SmAP из клеток <i>E. coli</i>	127
3.8.2 Определение ЛПС-дефосфорилирующей активности ЩФ SmAP.....	130
3.8.3 Определение антибиопленочной активности ЩФ SmAP и других рекомбинантных ферментов морских бактерий.....	131
3.8.4 Сканирующая электронная микроскопия биопленок	133
3.8.5 Определение цитотоксической активности ЩФ SmAP	134
3.8.6 Ингибиторный анализ ЩФ SmAP	134
3.8.7 Определение противовоспалительной активности ЩФ SmAP	136
3.8.8 Получение и очистка рекомбинантной ЩФ SmAP из растений табака	139
3.8.9 Определение влияния гетерологичной экспрессии гена ЩФ SmAP на фенотип растений в условиях абиотического стресса	142
3.9. Статистический анализ.....	143
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	144
4.1 Геномный, пангеномный и фенотипический анализ штаммов морских гетеротрофных гамма-протеобактерий рода <i>Cobetia</i>	145

4.1.1 Морфологическая, биохимическая и физиологическая характеристика штамма KMM 296 и <i>Cobetia amphilecti</i> NRIC 0815 ^T	147
4.1.2 Клеточный состав жирных кислот, полярных липидов и дыхательных хинонов штамма KMM 296 и <i>Cobetia amphilecti</i> NRIC 0815 ^T	149
4.1.3 Филогенетический анализ генов 16S рНК штаммов KMM 296, <i>Cobetia marina</i> JCM 21022 ^T и <i>Cobetia amphilecti</i> NRIC 0815 ^T	150
4.1.4 Содержание Г+Ц штамма KMM 296 и <i>Cobetia amphilecti</i> NRIC 0815 ^T	150
4.1.5 Филогения и анализ штаммов рода <i>Cobetia</i> на основе полногеномных данных ..	151
4.1.6 Филогения и анализ штаммов рода <i>Cobetia</i> на основе пангенома	153
4.1.7 Анализ биосинтетических кластеров близкородственных типовых штаммов <i>Cobetia amphilecti</i> , <i>Cobetia litoralis</i> , <i>Cobetia marina</i> и <i>Cobetia pacifica</i>	157
4.1.8 Анализ кодирующих последовательностей ферментов разных функциональных категорий для идентификации близкородственных изолятов <i>Cobetia</i>	159
4.1.9 Измененное описание вида <i>Cobetia amphilecti</i> (Romanenko et al., 2013).....	162
4.1.10 Измененное описание вида <i>Cobetia marina</i> (Cobet et al., 1970, Arahall et al., 2002, Romanenko et al., 2013).....	162
4.2 Геномный, пангеномный и фенотипический анализ штаммов морских гетеротрофных гамма-протеобактерий рода <i>Pseudoalteromonas</i>	162
4.2.1 Фенотипические характеристики штаммов <i>Pseudoalteromonas distincta</i>	164
4.2.2 Внутриродовые филогенетические связи <i>Pseudoalteromonas distincta</i>	168
4.2.3 Пангеном штаммов филогеномного кластера <i>Pseudoalteromonas distincta</i>	170
4.2.4 Филогения штаммов <i>Pseudoalteromonas distincta</i> на основе корового генома	173
4.2.5 Анализ биосинтетических генных кластеров <i>Pseudoalteromonas</i> spp.	174
4.2.6 Ферменты углеводного обмена штаммов <i>Pseudoalteromonas distincta</i>	177
4.2.7. Анализ уникальных генов штаммов <i>Pseudoalteromonas distincta</i>	179
4.2.9 Измененное описание вида <i>Pseudoalteromonas distincta</i> (Romanenko et al., 1995, Ivanova et al., 2000, Nedashkovskaya et al., 2022)	188
4.3 Геномный, пангеномный и фенотипический анализ штаммов морских гетеротрофных альфа-протеобактерий нового рода <i>Rhodalgimonas</i>	188
4.3.1 Геномные характеристики и родоспецифичные особенности <i>Rhodalgimonas</i>	190
4.3.2 Морфологические, физиологические и биохимические характеристики.....	195
4.3.3. Хемотаксономия	195
4.3.4 Описание <i>Rhodalgimonas</i> gen. nov.	196
4.3.5 Описание <i>Rhodalgimonas zhirmunskyi</i> sp. nov.	196
4.4 Геномный и пангеномный анализ штаммов морских гетеротрофных флавобактерий рода <i>Arenibacter</i>	197
4.5 Филогенетический анализ и оценка функционального потенциала щелочной фосфатазы семейства PhoA морских гетеротрофных бактерий	202
4.5.1 Филогенетический анализ щелочной фосфатазы CmAP морской бактерии <i>Cobetia amphilecti</i> KMM 296, относящейся к семейству PhoA.....	204
4.5.2 Анализ гомологов и ортологов щелочной фосфатазы семейства PhoA морских гетеротрофных бактерий	209
4.5.3. Локализация щелочной фосфатазы PhoA в хромосоме <i>Cobetia</i> spp.	215
4.5.4 Предсказание метаболической функции щелочной фосфатазы PhoA на основе анализа метаболических путей <i>Cobetia</i> spp.	219

4.6. Структурно-функциональные особенности ЩФ семейства PhoA морской бактерии <i>Cobetia amphilecti</i> и ее рекомбинантных аналогов	229
4.6.1 Пространственная структура и каталитические свойства ЩФ PhoA <i>C. amphilecti</i> КММ 296, конструирование генно-инженерных белков и диагностических тест-систем	229
4.6.2 ЛПС-дефосфорилирующая активность и противовоспалительная эффективность ЩФ семейства PhoA бактерии <i>C. amphilecti</i> в модели хронического ДСН-индуцированного колита	245
4.6.3 Регуляторное действие ЩФ семейства PhoA морской бактерии <i>C. amphilecti</i> на процессы биопленкообразования и рост планктонных клеток.....	254
4.6.4 Экспрессия рекомбинантной ЩФ семейства PhoA <i>C. amphilecti</i> в растениях табака и ее функциональная роль при абиотическом стрессе	261
5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	272
6 ВЫВОДЫ.....	274
7 СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	276
ПРИЛОЖЕНИЕ А	323
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	341
ПРИЛОЖЕНИЕ В	351

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Бактериальные щелочные фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1) представляют собой полифилетическую группу неспецифичных металлозависимых фосфогидролаз. Они катализируют гидролиз широкого спектра моноэфиров фосфорной кислоты через образование ковалентного фосфосеринового интермедиата с последующим высвобождением неорганического фосфата (P_i) и спиртового или фенольного остатка. Обладая широким оптимумом pH (6,0–11,0), ЩФ играют ключевую роль в обеспечении клеток фосфором, детоксикации и трансдукции сигналов. Современные исследования сфокусированы на расшифровке молекулярных механизмов функционирования ЩФ у различных таксонов микроорганизмов. Особый интерес вызывает изучение специфической роли и систем регуляции этих ферментов у оппортунистических патогенов, в частности морского происхождения. Понимание этих процессов открывает перспективы для разработки антибактериальных препаратов и новых терапевтических стратегий в медицине, ветеринарии и растениеводстве. Тем не менее, существенным пробелом в современной биологии остается слабая изученность связи между первичной структурой ферментов, их генетическим контекстом и вкладом в метаболическую адаптацию клетки при взаимодействии как с окружающей средой, так и с организмом хозяина. Кроме того, представления о разнообразии ЩФ ограничены отсутствием системных полногеномных и пангеномных исследований для многих морских таксонов, что затрудняет оценку их глобального биогеохимического и биотехнологического значения.

Благодаря развитию технологий геномного секвенирования в бактериях идентифицировано четыре основные линии гомологов ЩФ, объединенные в семейства PhoA, PhoX, PhoD и PafA. Они различаются первичной структурой, субстратной специфичностью и архитектурой активных центров. К семейству PhoA относятся классические Mg^{2+}/Zn^{2+} -зависимые гомодимерные ЩФ (например, из *E. coli* и млекопитающих). Семейство PhoX представлено преимущественно мономерными ферментами, чья каталитическая активность зависит от триядерного Ca^{2+} -содержащего кластера. Несмотря на то, что PhoX была впервые описана у *Vibrio cholerae*, современные метагеномные данные подтверждают, что именно эта структура является доминирующей среди морских бактериальных таксонов. Ферменты семейства PhoD отличаются наличием триядерного $Fe^{3+}/Ca^{2+}(Co^{2+}, Cu^{2+})$ -содержащего активного центра. Эти ферменты обладают смешанной фосфомоно- и фосфодиэстеразной активностью и широко представлены как в почвенных, так и в морских метагеномах. Недавно описанное семейство PafA, выявленное у флавобактерий из микробиома растений, характеризуется наличием биметаллического Ca^{2+} -содержащего активного центра и способностью к конститутивной экспрессии, которая не зависит от концентрации P_i в окружающей среде. Согласно одним метагеномным данным, гомологи PhoA ограничены лишь определенными

группами *Bacteroidota* и *γ-Proteobacteria*; однако более поздние исследования указывают на широкое распространение генов *phoA* во всех океанических бассейнах и глубинных зонах.

Бактериальные ЩФ преимущественно катализируют гидролиз фосфомоноэфирных связей в ДНК, РНК, нуклеотидах, углеводах, фосфатидах липидов, полифосфатах (polyP) и пирофосфатах в среде, обогащенной органикой. Однако они могут проявлять перекрестную каталитическую активность в отношении сульфатов, а также ди- и триэфиров, в том числе нейротоксинов со связями Р-О-С. Каталитическая полифункциональность (промискуитет) ЩФ, сульфатаз и других представителей суперсемейства ЩФ объясняется высокой консервативностью их 3D-структур и механизмов действия, обусловленных общим эволюционным происхождением. Кроме того, ЩФ способны к неспецифическому дефосфорилированию белков, участвующих в трансдукции клеточного сигнала. Показано, что данные ферменты опосредуют конкурентные взаимодействия бактерий с грибами через регуляцию их метаболических путей, инициируют деградацию микробных биопленок и минерализацию экзоскелета беспозвоночных, а также участвуют в биоремедиации сред, загрязненных тяжелыми металлами и органическими поллютантами. Более того, в морской среде, в условиях дефицита биодоступного P_i , интенсивная реминерализация фосфора из органических соединений становится критически важной для осморегуляции морских бактерий. Согласно современным представлениям, накопление P_i в периплазме и формирование ионных пар с катионами (Na^+ , H^+) напрямую влияет на осмотический статус клетки. Этот процесс сопряжен с протон-движущей силой (PMF) и, в случае протеородопсин-содержащих бактерий, может эффективно подпитываться энергией света. Из периплазмы P_i поступает в цитозоль для запасания в виде полифосфатов (polyP). Индуцированный синтез polyP и активность внеклеточных ЩФ способствуют зарождению и росту кристаллов апатитов и фосфоритов, формирующих геологические породы. Облигатные олиготрофы, такие как *Prochlorococcus* и *Pelagibacter*, приспособились к условиям с очень низким содержанием питательных веществ, снижая свои потребности в Р, например, путем его замены на серу в составе мембранных липидов. Это позволяет им достигать численного превосходства в открытом океане. Гетеротрофные микроорганизмы ведут более разнообразный образ жизни и способны адаптироваться к переменным концентрациям P_i , используя локальные скопления питательных веществ или инициируя стрессовый ответ на дефицит фосфата. Таким образом, микробные ЩФ имеют глобальное биогеохимическое значение, являясь одними из самых распространенных ферментов в почвах и водах Мирового океана.

Щелочные фосфатазы широко распространены в природе – от бактерий до человека. У млекопитающих они представлены изоферментами семейства PhoA, закодированными в четырех паралогичных генах, экспрессия которых специфична для различных тканей. Эти изоферменты

различаются по структуре, профилю гликозилирования и, как следствие, по биохимическим свойствам и физиологическим функциям, многие из которых остаются предметом дискуссий. Важнейшими функциями кишечного изофермента (IAP) являются детоксикация липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий и других медиаторов воспаления, а также поддержание барьерной функции эпителия и микробного гомеостаза кишечника. Снижение активности ЩФ у человека ассоциировано с широким спектром патологий, включая метаболический синдром, фиброз печени, ишемическую болезнь сердца и остеопороз. Кроме того, повышенный уровень системного ЛПС-нагружения на фоне дефицита IAP коррелирует с повышенным риском развития рака печени и колоректального рака.

Несмотря на консервативность каталитического механизма, ЩФ млекопитающих характеризуются более высокой ферментативной активностью и эффективностью за счет высокого числа оборотов (k_{cat}), а также более щелочного оптимума pH по сравнению с бактериальными ферментами семейства PhoA. Однако ЩФ морских бактерий – например, ЩФ SmAP из *Cobetia amphilecti* и её гомолог (82 % идентичности) ЩФ VAP из *Vibrio splendidus* – по каталитическим характеристикам сопоставимы с эукариотическими аналогами. При этом для ЩФ SmAP показана функциональная активность в мономерной форме и при низких температурах. Данные специфические свойства, наряду с простотой получения рекомбинантных белков в бактериальных системах экспрессии (не требующих сложного гликозилирования), делают их перспективными инструментами для биотехнологии.

Таким образом, вопросы структурного разнообразия и филогенетического родства ЩФ семейства PhoA, а также их специфической роли в метаболизме факультативных гетеротрофных бактерий из различных морских эконих, требуют проведения комплексных геномных и пангеномных исследований. Создание эффективных систем экспрессии рекомбинантных аналогов, изучение их биохимических свойств и выявление структурно-функциональных особенностей, определяющих уникальные характеристики ЩФ морских микроорганизмов, позволят объективно оценить их биотехнологический потенциал для применения в биомедицине, сельском хозяйстве и других отраслях.

Целью настоящей работы является сравнительное полногеномное исследование морских гетеротрофных бактерий – продуцентов гидролитических ферментов и множественных гомологов щелочных фосфатаз (на примере представителей *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*), а также комплексная характеристика щелочных фосфатаз семейства PhoA, направленная на установление их метаболической функции и создание рекомбинантных аналогов для использования в биотехнологии, сельском хозяйстве и медицине.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Выполнить полногеномное секвенирование новых изолятов и типовых штаммов морских гетеротрофных бактерий из различных акваторий Тихого океана, провести комплексный таксономический анализ для уточнения их классификации.
2. Проанализировать метаболические пути, провести поиск гомологов и ортологов ЩФ структурного семейства PhoA для их функциональной аннотации в геномах исследуемых штаммов представителей морских *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*.
3. Провести филогенетический анализ кодирующих последовательностей (CDS) генов ЩФ для исследуемых штаммов морских бактерий *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*.
4. Выполнить анализ генных кластеров и оперонной структуры различных структурных семейства ЩФ для прогнозирования их функциональной роли.
5. Получить рекомбинантные аналоги ключевых гидролитических ферментов (ЩФ, нуклеазы, протеазы, гликозидазы) из некоторых штаммов морских бактерий для подтверждения функциональной аннотации и исследования их свойств.
6. Получить рекомбинантные и трансгенные продуценты референсной высокоактивной ЩФ структурного семейства PhoA из морской гамма-протеобактерии *C. amphilecti*.
7. Изучить физико-химические, ферментативные и биохимические свойства ЩФ PhoA *C. amphilecti* в экспериментах *in vitro*, *in vivo* и *in silico*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплексный анализ фенотипических и полногеномных данных позволил охарактеризовать более 100 изолятов морских аэробных гетеротрофных бактерий, в том числе описать новые виды представителей *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Обнаруженные признаки геномной и фенотипической диверсификации морских бактерий послужили обоснованием пересмотра таксономической классификации гамма-протеобактерий родов *Pseudoalteromonas* и *Cobetia*, и флавобактерий рода *Arenibacter*. Впервые описан новый род альфа-протеобактерий *Rhodalgimonas*, ассоциированный с красной водорослью *Ahnfeltia tobuchiensis*.
2. На основе сравнительного анализа геномов и пангеномов морских протеобактерий (*Pseudomonadota*) и флавобактерий (*Bacteroidota*) определены ключевые и уникальные метаболические пути, наборы углеводов-активных ферментов (CAZymes) и биосинтетические генные кластеры (БГК), ответственные за фенотипические отличия и адаптацию близкородственных штаммов к морским эконишам. Установлено, что биотехнологический потенциал исследуемых бактерий связан с синтезом гидролитических ферментов, метаболитов антимикробного, иммуносупрессивного и осморегуляторного действия, а также защитных пигментов (арилполиенов и меланинов).

3. Функциональная аннотация кодирующих последовательностей (CDS) гидролитических ферментов – щелочных фосфатаз, нуклеаз, протеаз и гликозидаз – подтверждена каталитической активностью их рекомбинантных аналогов. Определен биотехнологический потенциал психрофильных и галотолерантных ферментов морских бактерий. Разработанные системы гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*, псевдомонад, микромицетов и растениях табака обеспечивают эффективный биосинтез целевых белков, обладающих высоким потенциалом для использования в молекулярной биологии и биотехнологии.

4. Полногеномный анализ морских представителей *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* выявил множественность генов щелочных фосфатаз (от 2 до 9 копий), представленных независимыми гомологичными линиями PhoA, PhoD, PhoX и PafA, а также их внутригеномными паралогами. Распределение и разнообразие систем щелочных фосфатаз коррелирует с таксономической принадлежностью и экологической нишей штаммов, достигая максимума у флавобактерий, ассоциированных с макрофитами. Установлено, что щелочная фосфатаза семейства PhoA является штаммо- или видоспецифическим признаком морских аэробных гетеротрофов, ассоциированных с эукариотами. Структурные особенности морских гомологов PhoA (конформационная пластичность) обеспечивают адаптацию бактерий к условиям среды за счет сохранения каталитической эффективности при низких температурах и высокой ионной силе.

5. Разработанное веб-приложение Syntenome для визуализации и сравнительного анализа генетического контекста позволяет идентифицировать локализацию целевых последовательностей и прогнозировать функции белков на основе их синтенного окружения. Установлено, что ген *phoA* в хромосомах морских гетеротрофов локализован в составе кластера мембранного Rsx-комплекса (Na^+ -транслоцирующей ферредоксин:НАД⁽⁺⁾-оксидоредуктазы). На основе биоинформатического анализа метаболических путей обоснована гипотеза об участии внеклеточной ЩФ PhoA в регенерации пула кофермента НАД⁺ для обеспечения работы Rsx-комплекса, что указывает на вовлеченность фосфатаз в регуляцию окислительно-восстановительного баланса и энергетического метаболизма клетки.

6. Установлено, что гены гомологов ЩФ PhoD, PhoX и PafA локализованы в окружении генов альтернативных оксидоредуктаз и мембранных белков, участвующих в различных стратегиях получения энергии. Обнаруженная корреляция между количеством генов ЩФ в геноме и числом биосинтетических кластеров, ответственных за разные типы энергетического обмена, указывает на участие ЩФ в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза. Моноцистронная организация генов ЩФ предполагает наличие сложных систем дифференциальной регуляции этих ферментов в ответ на изменение редокс-условий среды. Кроме того, установлено, что ЩФ PhoA морской бактерии способна подавлять формирование биопленок, регулируя плотность популяции патогенов. Данный эффект подтверждает роль ЩФ

как ключевых медиаторов адаптационной пластичности, координирующих метаболизм и коллективное поведение бактерий.

7. Высокоактивная ЩФ семейства PhoA морских бактерий является перспективным биотехнологическим инструментом благодаря высокой каталитической эффективности и технологичности получения рекомбинантных форм. В составе химерных конструкций фермент эффективно выполняет роль репортерной метки для мониторинга очистки и анализа свойств специфических лиганд-связывающих белков. Применимость ЩФ PhoA в качестве высокочувствительного детектора подтверждена при разработке диагностических систем для детекции иерсиниозов методом ИФА, а также при скрининге онкомаркеров в твердофазном лектин-ферментном анализе (ТЛФА).

8. Установлено высокое функциональное сходство ЩФ PhoA морской бактерии *S. amphilecti* (SmAP) и тканеспецифических ЩФ млекопитающих по каталитическим параметрам, субстратной специфичности и чувствительности к низкомолекулярным ингибиторам (5-азаиндолам). Способность SmAP к детоксикации липополисахаридов (ЛПС) и снижению уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6) обосновывает её применение в качестве функционального аналога кишечной ЩФ человека в экспериментальных моделях патологий, связанных с нарушением барьерной функции кишечника и системной эндотоксемией. Биохимическое подобие прокариотических и эукариотических ЩФ семейства PhoA позволяет рассматривать морской фермент как перспективный агент для выявления метаболических путей ЩФ в реакциях иммунного ответа, а также для разработки методов профилактики и терапии процессов, ассоциированных с дефицитом эндогенных фосфатаз.

9. На основании общности происхождения и функций ЩФ семейства PhoA предложен универсальный механизм их противовоспалительного действия, основанный на метаболическом перепрограммировании клеток. Механизм включает каскадное дефосфорилирование внеклеточных медиаторов воспаления – пуринов (АТФ, АДФ, АМФ) до противовоспалительного аденозина и детоксикацию PAMP/DAMP (в частности, ЛПС). Это приводит к блокированию TLR-NF- κ B-зависимых путей и ингибированию НАДФН-оксидаз (NOX1, NOX2), что подавляет оксидативный стресс и обеспечивает переход клетки от анаэробного гликолиза к окислительному фосфорилированию. Данный процесс способствует восстановлению целостности биомембран и снижению проницаемости тканевых барьеров

10. Гетерологичная экспрессия гена ЩФ PhoA морской бактерии *S. amphilecti* в растениях табака обеспечивает выраженный ростостимулирующий эффект и повышает устойчивость к абиотическим стрессам (дефициту фосфата, засолению, оксидативному стрессу). Установлено, что бактериальная ЩФ индуцирует биосинтез антиоксидантных ферментов и защитных вторичных метаболитов, предотвращая деградацию биомембран и неконтролируемую утечку

электролитов. Полученные результаты обосновывают применимость морских ЩФ для разработки биотехнологических стратегий повышения стрессоустойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Впервые проведено комплексное полногеномное исследование разнообразия белковых семейств ключевых ферментов фосфатного обмена – щелочных фосфатаз (ЩФ, КФ 3.1.3.1) – в геномах морских аэробных гетеротрофных бактерий; проведена их классификация и получены рекомбинантные формы. Выделены и охарактеризованы более ста штаммов известных и новых видов бактерий (гамма-протеобактерии *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*; флавобактерии *Arenibacter*, *Polaribacter*, *Flavobacterium*), включая новый род альфа-протеобактерий *Rhodalgimonas*. Установлено, что данные микроорганизмы являются продуцентами уникальных ЩФ, нуклеаз, протеаз и гликозидаз. Получены новые рекомбинантные белки (ЩФ, гликозидазы, протеазы); исследованы их физико-химические свойства и определен биотехнологический потенциал. Проведена таксономическая ревизия родов *Pseudoalteromonas* и *Cobetia*; актуализированы и приведены в соответствие названия геномов их типовых штаммов в международной базе данных NCBI. Впервые разработано программное веб-приложение Syntenome для анализа геномного окружения ЩФ, с помощью которого предсказана регуляторная функция данных ферментов в энергетическом обмене бактерий. Впервые показано, что кластеризация структурных семейств ЩФ отражает таксономическую принадлежность штаммов на разных иерархических уровнях. Впервые установлено, что семейство ферментов PhoA является уникальным видо- или штаммоспецифическим маркером для морских гетеротрофных бактерий, ассоциированных с эукариотами. Впервые показано, что штаммы, ассоциированные с морскими губками и кораллами, обладают активными метаболическими путями синтеза специфических пигментов (каротиноидоподобных арилполиенов или меланина) и антимикробных соединений. Впервые обнаружено положительное влияние трансгена *phoA* на физиологию растений: показано ускорение роста и повышение устойчивости к фосфатному голоданию, высокой солености и окислительному стрессу. Впервые продемонстрировано выраженное противовоспалительное действие рекомбинантной ЩФ *C. amphilecti* (CmAP) на экспериментальной модели хронического колита у мышей, индуцированного декстрансульфатом натрия (ДСН). Обоснована перспективность применения фермента CmAP в качестве терапевтического агента для профилактики воспалительных заболеваний кишечника. Созданы генетические конструкции и штаммы-продуценты на базе *E. coli* и модельного растения табака (*Nicotiana tabacum*) для получения препарата ЩФ CmAP, свободного от примесей липополисахаридов (ЛПС). Впервые проведено комплексное исследование *in vitro* и *in silico* структурно-функциональных особенностей фермента CmAP, его рекомбинантных гибридов и

лигандов. Изучено взаимодействие фермента с природными гетероциклическими ингибиторами (5-азаиндолами) из морской губки. Обоснована концепция функциональной универсальности ЩФ семейства PhoA у прокариот и эукариот. Это позволило предложить бактериальный гомолог в качестве модели для изучения функций ЩФ в реакциях врожденного иммунитета, в том числе при онкогенезе, и поиска селективных ингибиторов, направленных на коррекцию aberrантной активности ЩФ человека при различных патологиях. Определены перспективы применения фермента SmAP и его гибридных форм в молекулярной диагностике и биомедицинских технологиях. На основе созданного в ходе исследования веб-приложения Syntenome предполагается создание интерактивного веб-сервера для анализа синтении локуса любого целевого гена и предсказания его функций. Полученные результаты, а также использованные в работе современные генно-инженерные, биотехнологические и биоинформатические методы включены в образовательные программы различных дисциплин и учебных практик Передовой инженерной школы «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем» Дальневосточного федерального государственного университета (ДВФУ). Результаты могут быть использованы в учебных курсах по биохимии, микробиологии, биотехнологии и биоинформатике в любых высших учебных заведениях.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых научных журналах: Biomedicines, Biomolecules, International Journal of Molecular Sciences, Molecules, Microorganisms, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Marine Biotechnology (NY), Agronomy, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Frontiers in Microbiology, Plants, Journal of Plant Growth Regulation, Life, Journal of Fungi, Fish & Shellfish Immunology, Marine Drugs, Environmental Science: Processes and Impacts, Plasmid, Food Control, Critical Reviews in Biotechnology, Data in Brief, Acta Naturae, Биология моря, Биоорганическая химия, Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, Хранение и переработка сельхозсырья, Вестник ДВО РАН. Общий список работ автора включает 207 публикаций (РИНЦ), включая 60 статей, индексированных в Web of Science и Scopus, в том числе по теме диссертации опубликовано 55 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Апробация работы. Результаты работ представлены на Международных и Всероссийских конференциях, включая 6-ую Международную научно-практическую конференцию «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, Россия, 2014, 2015); 39-ую Международную научно-практическую конференцию; «Технические науки – от теории к практике» (Новосибирск, Россия, 2014); VII Сателлитную всероссийскую школу-конференцию молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: углеводные детерминанты в межорганизменных взаимодействиях» (Саратов, Россия, 2014); Региональную научно-

практическую конференцию студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, Россия, 2014); FEBS EMBO 2014 Conference (Париж, Франция, 2014); VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015); V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, Россия, 2015); 19-ую Международную научно-техническую конференцию «Высокие технологии в промышленности и экономике» (Санкт-Петербург, Россия, 2015); V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференцию ADFLIM (Сочи – Дагомыс, Россия, 2016); III Всероссийскую конференцию «Фундаментальная гликобиология» (Владивосток, Россия, 2016); XVIII Международную научно-практическую конференцию «Современные проблемы техники и технологии пищевых производств» (Барнаул, Россия, 2017); International conference «Clinical Proteomics. Postgenome Medicine» (Москва, Россия, 2017); The 2nd International symposium: Marine Enzyme and Polysaccharides (Нячанг, Вьетнам, 2018); The 3rd International symposium on Life Sciences (Владивосток, Россия, 2018); Конференцию, посвященную 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, Россия, 2019); III Международную научно-практическую конференцию «Трансграничные рынки товаров и услуг: проблемы исследования» (Владивосток, Россия, 2019); Международную научную конференцию «Современные достижения и проблемы генетики и биотехнологии в животноводстве», посвященную 90-летию академика Л.К. Эрнста (пос. Дубровицы, Россия, 2019); The 6th International symposium on Biodiversity: Agriculture, Food and Pharmaceutical Application (Буон Ма Тхуот, Вьетнам, 2021); Всероссийскую научную молодежную конференцию «Геномика и биотехнология микроорганизмов» (Владивосток, Россия, 2022); Всероссийскую школу-конференцию «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» (Санкт-Петербург, Россия, 2022); Международный научный форум по применению технологий компьютерного моделирования в науке, промышленности и бизнесе FIT-M (Москва, Россия, 2022); XIX Всероссийскую молодежную школу-конференцию по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, Россия, 2022); Всероссийскую научную школу-конференцию молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений» (Владивосток, Россия, 2023); The 3rd Symposium on Marine Enzymes and Polysaccharides (Нячанг, Вьетнам, 2023); Международные конференции «Сохранение и приумножение генетических ресурсов микроорганизмов» (Санкт-Петербург, Россия, 2024, 2025); The 3rd International Electronic Conference on Diversity, Marine Diversity (MDPI: Basel, Switzerland, 2024); II Всероссийскую научную школу-конференцию молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений» (Владивосток, Россия, 2024); Международные научные чтения «Приморские зори – 2024» (Владивосток, Россия, 2024); Международную научно-

практическую конференцию им. Д.И. Менделеева (Тюмень, Россия, 2025). Результаты, вошедшие в диссертацию, представлялись для ежегодных отчетов ТИБОХ ДВО РАН в области морской биохимии и биотехнологии. Часть результатов диссертации получена при выполнении фундаментальных исследований ДВО РАН по теме «Исследование молекулярно-генетических механизмов действия и терапевтического потенциала бактериальных ферментов морского происхождения». Соискатель являлся руководителем или основным исполнителем проектов, в которых использованы ЩФ СмАР (генно-инженерное мечение) и другие рекомбинантные ферменты морских бактерий: гранты по программам фундаментальных исследований ДВО РАН 12-III-A-05-064 «Исследование молекулярных механизмов холодовой адаптации с помощью установления структурно-функциональных особенностей термолабильных гликозидаз морских бактерий»; 12-III-A-05-059 «Исследование структурно-функциональных особенностей маннан-связывающих лектинов иглокожих»; гранты РФФИ 12-04-00825-а «Влияние структурных взаимодействий на функциональность химерного белка на основе щелочной фосфатазы морской бактерии и лектина дальневосточного трепанга»; РФФИ 14-04-00696 «Изучение структурно-функциональных особенностей лектинов нового класса и перспективы их практического применения». Основные результаты работы в области микробиологии были получены в ходе выполнения гранта МИНОБРНАУКИ РФ 15.БРК.21.0004 по теме «Развитие биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» для реализации Федеральной программы в области генетических технологий» (соглашение № 075-15-2021-1052 от 29 сентября 2021 г.). Значительная часть научных результатов работы была получена на базе молодежной лаборатории «Рекомбинантные ДНК-технологии» при Передовой инженерной школе (ПИШ) Дальневосточного Федерального Университета (ДВФУ) в рамках реализации государственного задания МИНОБРНАУКИ РФ ФЗНС-2022-0015 по теме «Разработка и получение препаратов на основе рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии для использования в *in vitro* диагностике, а также прототипов инновационных противовоспалительных лекарственных средств».

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории морской биохимии ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН). Скрининг ферментативной активности ЩФ штаммов Коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН, открытие высокоактивной ЩФ СмАР в морской бактерии *S. amphilecti* КММ 296, выделение и очистка, а также исследование физико-химических и ферментативных свойств природного белка ЩФ СмАР и получение его рекомбинантных аналогов осуществлены автором лично или при его непосредственном участии. При выполнении диссертационной работы автор осуществлял: постановку задач, планирование и проведение экспериментальных исследований, анализ полученных данных и обобщение результатов,

подготовку публикаций, апробацию материалов исследований и формирование научного коллектива для выполнения работ. В ряде случаев выделение чистых культур, исследования фенотипов морских бактерий, конструирование и анализ экспрессии генов растительных генно-инженерных векторов, а также анализ некоторых *in silico* и *in vivo* результатов были выполнены коллегами, о чем свидетельствует соавторство в соответствующих публикациях. В публикациях права соавторов не нарушены.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН академику РАН д.х.н. В. А. Стонику за всестороннюю поддержку и помощь при подготовке диссертационной работы. Автор выражает глубокую признательность д.х.н. О. Д. Новиковой за внимание и всестороннюю поддержку на всех этапах работы. Автор бесконечно благодарен коллегам из Лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН под руководством к.м.н. В. А. Рассказова: к.б.н. С. Н. Ковальчук, к.м.н. М. П. Исаевой, к.б.н. Ю. А. Носковой, к.б.н. А. В. Сейткалиевой, Н. Ю. Отставных и Е. П. Быстрицкой, а также коллегам из Лаборатории бионанотехнологий и биомедицины ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН: зав. лабораторией д.б.н. Ю. Н. Шкрылю и к.б.н. Ю. А. Югай за плодотворное сотрудничество, ценные идеи и профессиональные советы, способствовавшие реализации данной работы. Автор благодарит за бесценную помощь в выделении и характеристике штаммов морских микроорганизмов д.б.н. О. И. Недашковскую, которая внесла неоценимый вклад в развитие Лаборатории микробиологии и Коллекции морских микроорганизмов КММ ТИБОХ ДВО РАН. Автор признателен соавтору многих работ и коллеге из Лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН д.х.н. И. Ю. Бакуниной за ценные консультации и совместную работу по исследованию свойств рекомбинантных холодоактивных ферментов морских бактерий. Автор выражает искреннюю признательность сотруднику Лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН к.ф.-м.н. Г. Н. Лихацкой за неоценимую помощь в проведении компьютерного моделирования и молекулярного докинга. Автор выражает благодарность коллегам из ТИБОХ ДВО РАН: к.б.н. О. Ю. Портнягиной и к.б.н. С. И. Бахолдиной из Лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета и к.х.н. И. В. Чикаловец из Лаборатории химии неинфекционного иммунитета за помощь в работе с ЛПС, методами ИФА и ТЛФА; а также коллегам из Лаборатории химии морских природных соединений: д.х.н. Т. Н. Макарьевой, д.х.н. Н. И. Федорову и к.х.н. А. Г. Гузий за исследование 5-азаиндолов морских губок. Автор признателен коллеге из Лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН, к.б.н. М. Г. Елисейкиной (Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН) за проведение электронной микроскопии и интерпретацию результатов. Автор выражает особую признательность руководителю Передовой инженерной школы (ПИШ)

ДВФУ к.т.н. Л. А. Текутьевой, а также коллегам из ПИШ ДВФУ и R&D центра «Арника» (г. Владивосток): к.м.н. А. Б. Подволоцкой, к.т.н. О. М. Сон и PhD. Ю. К. Пентехиной за всестороннюю поддержку и содействие в реализации многих этапов совместной работы. Автор благодарит за помощь в проведении биоинформатического анализа и разработку веб-приложения сотрудников ГНЦ РФ ФГБУ НМИЦ эндокринологии им. академика И. И. Дедова Минздрава России к.б.н. О. А. Колпакову и А. С. Глебуса. Автор выражает глубокую признательность коллегам из Испытательного центра «Инновационные Фармакологические Разработки» (ИФАР) (г. Томск) д.м.н., профессору В. А. Хазанову, д.с.-х.н. Н. А. Шмыковой, д.м.н. В. В. Быкову и к.м.н. С. А. Станкевичу за экспертную помощь в проведение работ по испытанию ферментов в экспериментальной модели хронического колита и интерпретацию результатов.

Перечень используемых сокращений и обозначений

Микробиология:

КММ – Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН;
 VKPM – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»;
 NRIC – Центр коллекционирования культур NODAI (NRIC, Токио, Япония);
 РОВ – растворенные органические вещества
 polyP – полифосфат;
 МА – морской агар;
 КОЕ – колониеобразующие единицы микроорганизмов (клеток);
 Ед (Единица) = U (Unit) — международная единица ферментативной активности.
 ЭД_{50%} – эффективная доза фермента, которая обеспечивает ингибирование роста биопленки (или клеточного деления) у 50% клеток.

Биоинформатический анализ:

NCBI – международная база Национального центра биотехнологической информации;
 AAI – средняя аминокислотная идентичность;
 ANI – средняя нуклеотидная идентичность;
 dDDH – цифровая ДНК-ДНК гибридизация;
 БГК (BGC) – биосинтетический генный кластер;
apeBGC – БГК арилполиенов; п.н. – пар нуклеотидов;
 КГ – кластеры генов;
 SCG – однокопийные гены;
 CDS – кодирующая последовательность ДНК;
 GH – семейство гликозилгидролаз;
 GTF (Gene Transfer Format) – файлы с разметками генов, транскриптов, белков и др.;
 COG – кластеры ортологичных групп;
 ML – максимальное правдоподобие;
 NRPS – нерибосомальная пептид-синтетаза;
 T1PKS – поликетидсинтаза I;
 RiPP – посттрансляционно модифицированный пептид;
 CAZymes (казимы) – ферменты углеводного обмена структурных семейств GH, GT, PL, CE, CBM, AA из базы данных CAZy (<https://www.cazy.org>);
metG – ген метионил-тРНК лигазы;
 ЭТЦ – электрон-транспортная цепь;
 RxD, RxC, RxB, RxA – субъединицы R_{sx}-комплекса ЭТЦ;

PhoA, PhoX, PhoD и PafA – структурные (белковые) семейства ЩФ;
 PDB – база данных о трехмерных структурах белков и других макромолекул;
 а.о. – аминокислотный остаток в последовательности белка или пептида;
 CDS (Coding DNA Sequence) – кодирующая ДНК-последовательность;
 MOE – комплексная интегрированная программная платформа для молекулярного моделирования и симуляции;
 RMSD (Root-Mean-Square Deviation) – среднеквадратичное отклонение, мера среднего расстояния между атомами наложенных друг на друга молекул.

Ферменты и белки:

ЩФ – щелочная(ые) фосфатаза(ы);
 CmAP – ЩФ PhoA *C. amphilecti* KMM 296;
 rCmAP – рекомбинантная ЩФ PhoA *C. amphilecti* KMM 296 из трансгенного табака;
 ECAP – ЩФ *E. coli*;
 CIAP – ЩФ кишечника теленка;
 IAP – кишечная ЩФ человека;
 hrecAP – рекомбинантная ЩФ IAP из клеток моркови;
 TNAP – тканевая неспецифичная ЩФ человека;
 VAP – ЩФ *V. splendidus* (= *Vibrio* sp. G 15-21);
 OmpF – порин возбудителя псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis*;
 CGL – лектин морской мидии *C. grayanus*;

Получение рекомбинантных белков и молекулярное моделирование:

ПЦР – полимеразная цепная реакция;
alp – ген ЩФ *C. amphilecti* KMM 296;
 у.а. – удельная активность
 IPTG – индуктор экспрессии изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид;
 WT – дикий (природный) тип;
 CGL/CmAP – гибридный белок лектина мидии и ЩФ морской бактерии;
 Gb3 – глоботриоза, лиганд лектина мидии CGL;
 OmpF/CmAP – гибридный белок порина *Y. pseudotuberculosis* и ЩФ морской бактерии;
 кДа (kDa) – килодальтон, единица измерения массы белка;
 ДСН-ПААГ электрофорез (SDS-PAGE) – электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия;
 ИФА – иммуноферментный анализ;
 ТЛФА – твердофазный лектин-ферментный анализ;

Механизм противовоспалительного действия ЩФ:

Р_i – неорганический фосфат;
 ЛПС – липополисахарид;
 НАДН – никотинамидаденин динуклеотид;
 НАДФН – никотинамидаденин динуклеотидфосфат;
 АМФ – аденозинмонофосфат;
 РAMP и DAMP – молекулярные паттерны патогенов и поврежденных клеток;
 АФК (ROS) – активные формы кислорода;
 PI3K-Akt (PI3K/Akt/mTOR) – сигнальный путь фосфатидилинозитол 3-киназы, ответственный за рост, пролиферацию, метаболизм клеток;
 СВ36 (B2, SR-B2) – трансмембранная транслоказа жирных кислот или рецептор класса В, ответственный за поглощение клетками длинноцепочечных жирных кислот, липопroteинов низкой плотности (ЛПНП), фосфолипидов и пр.;
 TLR4 – компонент наружной мембраны нейтрофилов и макрофагов, при связывании с ЛПС активирует NF-κB-зависимые пути иммунного ответа;
 NF-κB – группа факторов транскрипции многих провоспалительных путей иммунной системы (синтез цитокинов, оксидоредуктаз и пр.);
 NOX2 и NOX1 – мембранные НАДФН-зависимые оксидоредуктазы клеток врожденного иммунитета и эпителиоцитов соответственно;
 АФК (ROS, Reactive Oxygen Species) – активные формы кислорода, которые производятся иммуногенными оксидоредуктазами NOX, или являются побочным продуктом/результатом "утечки" электронов при других окислительно-восстановительных реакциях в клетке.

Модель мышинного хронического колита:

ДСН-индуцированный колит – воспаление толстой кишки, вызванное пероральным введением декстрансульфата натрия, модель неспецифического язвенного колита (ЯК);
 СОП – Стандартные операционные процедуры;
 ИЛ-1, ИЛ-6 (IL-1, IL-6) – интерлейкины;
 ФНО-α (TNF) – фактор некроза опухоли α.

Трансгенез растений и абиотический стресс:

pHREAC-SmAP и pEff-SmAP – растительные векторы для синтеза ЩФ SmAP;
 С11 и С12 – трансгенные линии табака, несущие ген ЩФ SmAP;
 DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил;
 MSI – индекс стабильности мембраны;
 МДА – малондиальдегид;

RWC – относительное содержание воды в тканях;

IC₅₀ – концентрация вещества, обеспечивающая полумаксимальное ингибирование роста растений.

Кинетический и ингибиторный анализ:

K_m – константа Михаэлиса;

K_i – константа ингибирования;

n-НФ(Ф) – *пара*-нитрофенол (*пара*-нитрофенилфосфат);

Git C и GitD – 5-азаиндолы из морской губки, гитаррины C и D;

IC₅₀ – ингибирующая концентрация (ИК₅₀) вещества, при которой остается 50% от активности фермента в контроле (без добавления ингибитора).

2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1 Эколого-географическая характеристика местообитаний и структура сообществ морских микроорганизмов

Три четверти поверхности Земли покрыто водой, что делает океан самой обширной непрерывной средой и местообитанием различных организмов большого биоразнообразия. В отличие от наземных биомов, где 96 % занимают растения, около 70 % биомассы в морских экосистемах приходится на микроорганизмы (Overmann, Lepleux, 2016; Bar-On et al., 2018). Соответственно, многие биохимические превращения с их участием имеют глобальные последствия для всех экосистем, включая человеческое сообщество.

Почти половина годовой первичной продукции Земли осуществляется в поверхностных слоях океана фитопланктоном (рис. 1), который использует энергию солнечного света и углекислый газ для биосинтеза биомолекул (Polz et al., 2006; Muthusamy, 2016; Cordone et al., 2022).

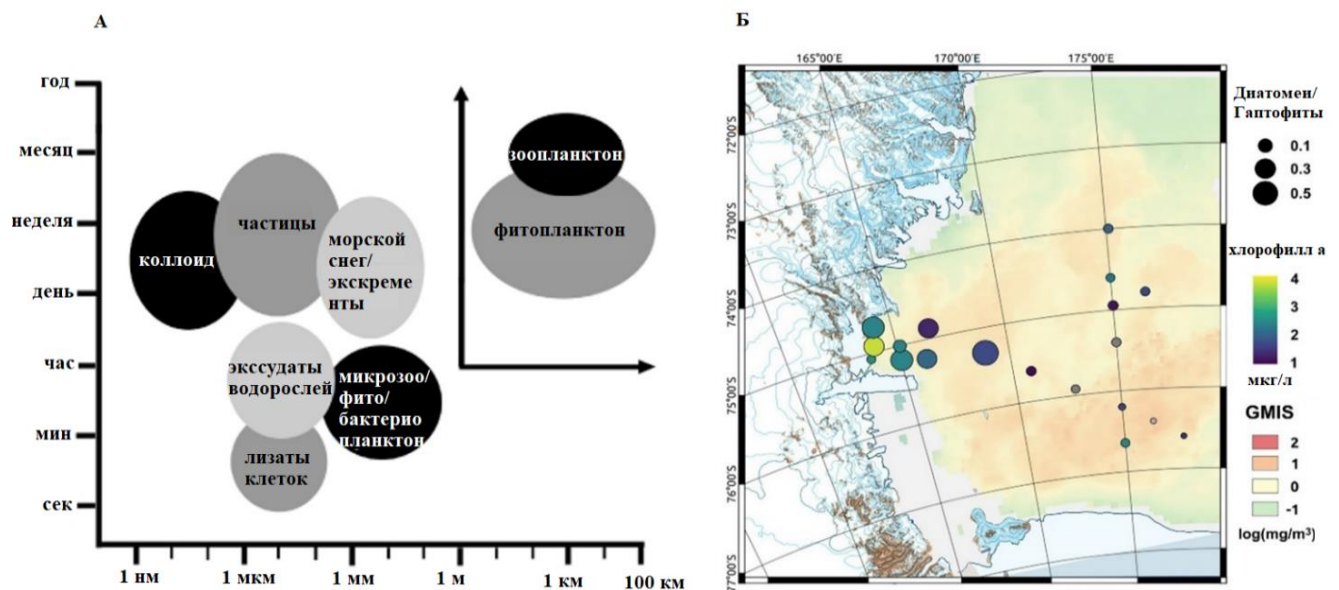


Рисунок 1 – А. Взаимодействие фитопланктона и бактериопланктона в контексте пространственно-временной гетерогенности морской среды. Область справа и выше стрелок обозначает диапазоны данных океанографических проб, полученных стандартными методами (адаптировано из Polz et al., 2006). Б. Распределение биомассы фитопланктона в море Росса (Тихий океан): среднемесячная концентрация хлорофилла *a* ($\log_{10}$ мг/м³) по данным спутникового мониторинга GMIS (*Global Marine Information System*) и экспериментально измеренные концентрации хлорофилла *a* (мкг/л) в точках отбора проб. Показатель состава фитопланктонного сообщества – отношение диатомей к гаптофитам (D/H) в зависимости от удаленности от литоральной зоны (адаптировано из Cordone et al., 2022)

Гетеротрофные бактерии являются важными участниками этих процессов, поскольку они влияют на круговорот углерода в морской среде, по крайней мере, на первичную продуктивность

фитопланктона (Moran et al., 2016), поставляя им витамины и другие питательные вещества (Bertrand et al., 2007; Averianova et al., 2020; Balabanova et al., 2021). Кроме того, гетеротрофы доминируют в трансформации органического вещества, выделяемого фитопланктоном, и, в конечном итоге, их метаболическая активность определяет судьбу органического углерода в морской среде (Moran et al., 2016). Таким образом, морские прокариотические и эукариотические микроорганизмы образуют тесно интегрированные пищевые сети и отвечают за львиную долю первичного производства и круговорота питательных веществ. Поэтому им принадлежит доминирующая роль в биогеохимических процессах на Земле, что обуславливает поражающее воображение фенотипическое и генотипическое разнообразие микробных сообществ и их участников (Ivanova et al., 2002a, 2005; Polz et al., 2006; Bakunina et al., 2013; Bosi et al., 2017, Walworth et al., 2020; Fernández-Juárez et al., 2021).

Существование огромных микробных популяций, обширных миграций, гомологичных и гетерологичных генетических рекомбинаций затрудняет исследование динамики и закономерностей эволюции микроорганизмов (Polz et al., 2006). Чтобы понять механизмы возникновения такого разнообразия необходимо определить признаки микробных популяций с предсказуемыми экологическими функциями. Морские бактериальные сообщества состоят из разнообразных групп бактерий, организованных в генотипические (и фенотипические) кластеры близкородственных организмов. Известно, что образованию генотипических кластеров и гетерогенности на уровне целых геномов гетеротрофных микроорганизмов способствуют, как минимум, две различные адаптивные стратегии, отвечающие за скорость и масштаб эволюционных процессов: 1) активный поиск питательных веществ и гетеротрофия - использование меняющихся во времени и пространстве ресурсов; 2) пассивная олиготрофия - приспособление к жизни в условиях среды с низкими концентрациями питательных веществ (Polz et al., 2006). Экологические различия в образе жизни микроорганизмов имеют фундаментальные последствия для темпов их роста, возникновения патогенности, эволюции геномов и популяций. В геномах закодированы функции, которые развивались в ответ на биотические и абиотические ограничения окружающей среды (DeLong, Karl, 2005; Polz et al., 2006). В связи с этим, одной из главных проблем остается поиск взаимосвязи между структурой и функцией на уровне аллелей генов и отдельных локусов в геномах особей вида и видов в сообществах. Важно понимать, в какой степени микробные геномы участвуют в организации функционально объединенных и эволюционно определенных популяций, что представляют собой функциональные единицы за пределами одной клетки и как такие организмы возникают и самоорганизуются в условиях различных экологических ниш (Polz et al., 2006).

Несмотря на многочисленные и сложные вариации физико-химических параметров и значительные различия в питательном статусе микроорганизмов разных океанических регионов,

средняя общая концентрация клеток по всей толще морской воды на удивление постоянна. В открытом океане и прибрежных районах она обычно составляет около 10^5 и 10^6 КОЕ/мл соответственно (Whitman et al., 1998; Polz et al., 2006). Полагают, что этот средний показатель регулируют хищники, например, простейшие и вирусы, так как они обладают сопоставимой скоростью размножения с микроорганизмами. В периоды “цветения” популяции бактериопланктона могут временно выходить из-под контроля питающихся бактериями организмов. Однако увеличение численности одной популяции должно сопровождаться снижением численности, по крайней мере, некоторых других. Таким образом, сообщества находятся в сбалансированном состоянии, а увеличение поступления питательных веществ приводит в первую очередь к увеличению скорости метаболизма, а не роста общего числа клеток (Polz et al., 2006).

Концентрации питательных веществ в основной массе морской воды (особенно субтропических зон) обычно настолько низкие, что определить в ней, например, содержание азота и фосфора затруднительно (Polz et al., 2006). В связи с этим, принято считать, что темпы роста микроорганизмов в океане достаточно медленные. Несмотря на более высокую концентрацию и разнообразие питательных веществ в прибрежных зонах и эстуариях, в целом, океан можно считать средой, похожей на пустыню. Динамика роста бактерий в океане вряд ли когда-либо выйдет за рамки кинетики первого порядка. Это подтверждают низкие показатели ежедневного увеличения численности бактериальных клеток: $0,05\text{--}0,3$ КОЕ (колониобразующих единиц)·день⁻¹ – для открытого океана и до $1\text{--}2$ КОЕ·день⁻¹ – для прибрежных зон (Ducklow, 2000; Crump et al., 2004; Polz et al., 2006). Однако океаническая вода неоднородна, и некоторые популяции бактерий, группирующиеся вокруг мелких частиц и/или прикрепляющиеся к ним, могут достигать более высокой скорости роста (рис. 1).

Различие между бедной питательными веществами интерстициальной водой и богатыми питательными веществами частицами и локациями (микросреды или биогенные пятна), вероятно, представляет собой ключевой параметр в структурировании океанических микробных сообществ (Polz et al., 2006, Cordone et al., 2022). Бактерии, обитающие в интерстициальной воде, испытывают дефицит питательных веществ при относительно стабильных концентрациях, в то время как бактерии, использующие стратегию поиска питательных микросред, живут в условиях временной изменчивости ландшафта, требующих частых и быстрых изменений в метаболизме. В морской воде существуют разные источники возникновения локальных питательных микросред, включающие такие растворимые и нерастворимые органические остатки, как высоко- и низкомолекулярные экссудаты водорослей, остатки клеток, высвобождаемые при вирусном лизисе или автолизе, частицы, образующиеся при питании зоопланктона, фекальные гранулы, “морской снег”, детрит, экзополимеры и коллоиды (рис. 1). В пределах биогенных пятен

концентрация растворенных соединений может быть на два-три порядка выше, чем в окружающей морской воде (Fenchel, 2002; Polz et al., 2006). В поверхностных слоях океана фитопланктон является основным источником растворенного органического вещества (РОВ), которое используют гетеротрофные бактерии. Анализ морской воды показывает огромную сложность и гетерогенность морского РОВ, в котором насчитывается как минимум десятки тысяч различных органических соединений (Polz et al., 2006; Hertkorn et al., 2006; Dittmar, Arnosti, 2018). Микроводоросли могут достигать плотности порядка 10^3 КОЕ·мл⁻¹ и, по имеющимся данным, выделять за сутки до 50 % продукта своего фотосинтеза, в результате чего образуется диффузионная зона, обогащенная РОВ (Hellebust, 1974; Bertilsson, Jones, 2003; Polz et al., 2006). Кроме того, твердые органические частицы (например, фекальные гранулы и морской снег) могут выделять РОВ в окружающую среду, поскольку скорость гидролиза полимеров прикрепленными к ним бактериями превышает скорость поглощения ими продуктов гидролиза. Таким образом, тонущие частицы оставляют за собой след, обогащенный питательными веществами, которые могут использоваться гетеротрофными бактериями из более низких глубинных слоев. Использование локально концентрированных источников питательных веществ увеличивает скорость минерализации в океане в 2 раза по сравнению со сценарием равномерного распределения питательных веществ, в то же время при гомогенизации образцов морской воды бактериальная продуктивность снижается на 12–20 % (Moeseneder, Herndl, 1995; Fenchel, 2002; Polz et al., 2006).

То, насколько активно бактерии могут использовать проходящие локальные источники питательных веществ, в значительной степени зависит от времени и места образования последних, а также способности бактерий «чувствовать и реагировать» на градиенты химических соединений (рис. 1). Например, клетки водорослей могут выделять мономеры и полимеры при достаточном количестве света в процессе осуществления фотосинтеза (Bertilsson, Jones, 2003; Flynn et al., 2008), фекальные гранулы являются источником более сложных РОВ и, как предполагается, теряют большую часть РОВ в течение первых 6 ч после их образования (Urban-Rich, 1999; Polz et al., 2006), тогда как остатки лизированных клеток могут рассеяться в морской воде в течение нескольких минут (Blackburn et al., 1998; Polz et al., 2006; Caron, Hutchins, 2012) (рис. 1). Подвижность и хемотаксис являются ценными свойствами, «активами», в использовании микробами локальных источников питательных веществ. Однако подвижность микробных клеток сопряжена со значительными метаболическими затратами, что может повысить вероятность использования данной эволюционной приспособленности только в случае минимальной плотности таких питательных участков в толще воды (Kiorboe et al., 2002; Mitchell, 2002; Polz et al., 2006). Действительно, геномы бактерий, выделенных из обедненных поверхностных вод, содержат больше жгутиковых генов, чем геномы глубоководных бактерий,

у которых энергетические затраты на перемещение от одного места к другому могут превышать преимущества от наличия жгутиков (Polz et al., 2006). Таким образом, оптимизация энергетических затрат ограничивает адаптивную ценность хемотаксиса (Kussel, Leiber, 2005; Polz et al., 2006). Учитывая эти соображения, частицы и неоднородности питательных веществ, вероятно, представляют собой высоко стохастический экологический ландшафт, оказывающий серьезное влияние на распределение бактерий (рис. 1).

До сих пор ведутся споры о том, представляют ли собой свободноживущие и прикрепленные к частицам бактерии независимые популяции, так как в результате некоторых исследований не выявлено существенных различий между этими группами (Martinez et al., 1996; Hollibaugh et al., 2000; Worm et al., 2001), а в результате других – различия отмечены (Acinas et al., 1999; Knoll et al. 2001; Polz et al., 2006).

В последнее десятилетие было показано, что в пелагических морских пищевых сетях прокариоты вносят значительный вклад в структурирование микрорукариотического сообщества (Kirchman et al., 2001; Wilkins et al., 2013; Cordone et al., 2022). Прокариотические сообщества влияют на ряд ключевых экосистемных процессов или доминируют в них, включая первичную продукцию, оборот биогенных элементов, минерализацию органического вещества и деградацию ксенобиотиков и загрязняющих веществ (Croft et al., 2005; Azam, Malfatti, 2007; Falkowski et al., 2008; Cordone et al., 2022). Так, исследования, выполненные в водах Антарктики, показали, что биомасса бактерий может составлять до 30 % от общей биомассы микроорганизмов в прибрежных районах (Fiala, Delille, 1992; Cordone et al., 2022). В различных регионах Антарктики состав свободноживущих морских микробных сообществ может значительно различаться, реагируя на колебания температуры, солености, состав и концентрацию питательных веществ в окружающей среде, а также на влияние океанических фронтов (Lozupone, Knight, 2007; Raes et al., 2018; Cordone et al., 2022). Например, в заливе моря Росса наблюдались существенные различия в составе бактериальных сообществ между прибрежными и морскими станциями, а также вдоль толщи воды, в которых гетеротрофные представители классов *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, принадлежащие к типу *Pseudomonadota* (ранее филум *Proteobacteria*), являются доминирующими флотипами (Giovannoni et al., 2005; Celussi et al., 2009; Wilkins et al., 2013; Cordone et al., 2022) (рис. 2).

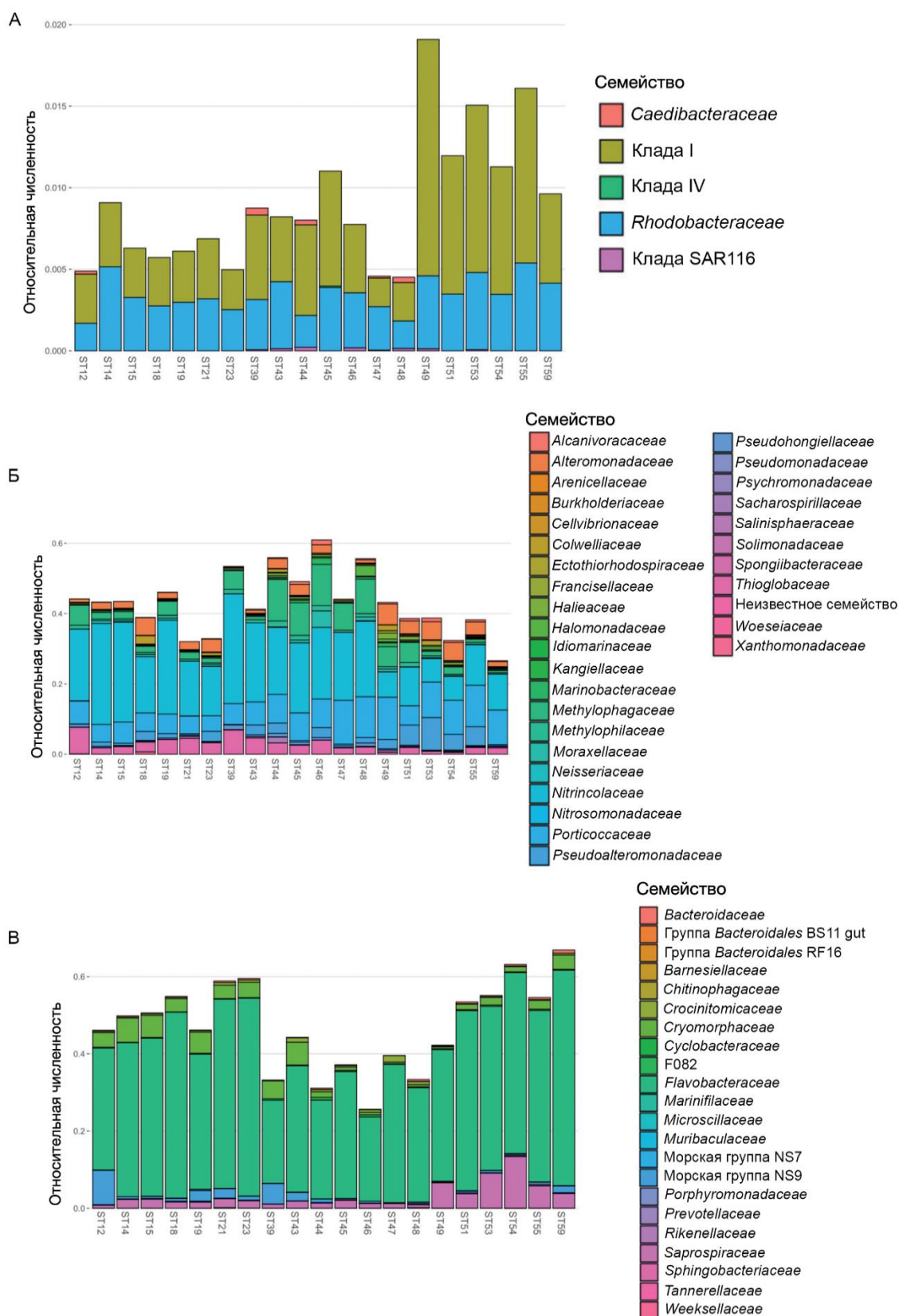


Рисунок 2 – Распределение доминирующих семейств морских бактерий, принадлежащих к классам *Bacteroidia* (А), *Gammaproteobacteria* (Б) и *Alphaproteobacteria* (В). ST12–ST59 – станции отбора проб морской воды в заливе Терра-Нова (море Росса, Тихий океан, Антарктика) (адаптировано из Cordone et al., 2022)

Исследования многолетнего и сезонного льда морских экосистем также показывают, что рост бактерий часто зависит от РОВ, получаемого из фитопланктона (Church et al., 2000; Morán et al., 2002; Piquet et al., 2011). Широкое разнообразие представителей типа *Bacteroidota* было отмечено в различных районах Южного океана (Abell, Bowman, 2005). По мнению Piquet et al. (2011), стратификация талых вод и переход к нестабилизированным поверхностным водам в Антарктике могут оказывать влияние не только на микроэукариот, но и на состав бактериальных сообществ, при этом на границах смешения вод происходит переход от альфа- и гамма-протеобактерий к сообществу с преобладанием группы бактерий *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. В некоторых исследованиях было обнаружено, что в нижней части морского льда присутствуют строго анаэробные эпсилон-протеобактерии (в настоящее время переклассифицированные в *Campylobacterota*), вероятно, вследствие уменьшения содержания кислорода и накопления сульфидов, вызванного высокой скоростью деградации симпагических диатомей аэробными и анаэробными гетеротрофами. Таким образом, за изменениями в эукариотических планктонных сообществах быстро следуют изменения в бактериальном сообществе, при этом ряд фитопланктонно-бактериальных взаимодействий приводит как к положительным, так и отрицательным петлям обратной связи (Bertrand et al., 2007; Piquet et al., 2011).

Например, в водах умеренной зоны цветение фитопланктона весной и летом вызывает изменения в структуре бактериопланктонного сообщества (Teeling et al., 2016; Chafee et al., 2018). Такая динамика повторяется в разных акваториях, что указывает на сезонность, обусловленную фитодетритом поверхностных вод, и позволяет предположить, что фитопланктонно-прокариотические взаимодействия в поверхностных водах более сложны, чем считалось ранее (Seymour et al., 2017). Со временем была предложена мутуалистическая природа взаимодействия между фитопланктоном и бактериопланктонными сообществами. Например, обмен экссудатами фитопланктона и продуцируемым бактериями цианокобаламином (витамином B12) представляет собой одну из наиболее изученных петель обратной связи (Bertrand et al., 2007; Bolinesi et al., 2020). Продукция и высвобождение витамина B12 бактериями, по сути, зависит от деградации фитопланктонных экссудатов и приводит к возникновению сложного механизма обратной связи между прокариотическими и фитопланктонными сообществами, и осуществляемого с помощью гетеротрофных бактерий (Fang et al., 2017; Balabanova et al., 2021). Подобное трофическое взаимодействие между фитопланктоном и бактериопланктоном в морских экосистемах имеет важную роль, особенно в полярных регионах (Di Poi et al., 2013; Flaviani, 2017; Richert et al., 2019), прямо или косвенно влияя на доступность и взаимозависимое ограничение количества таких микроэлементов, как железо, кобальт и витамин B12 (Bertrand et al., 2007; Tagliabue et al., 2017;

Bolinesi et al., 2020), а также на поглощение питательных веществ (Amin et al., 2015; Cordone et al., 2022).

2.2 Фенотипическая и геномная дивергенция как основа современной систематики морских микроорганизмов

В последние годы исследования микробного разнообразия достигли значительного прогресса и все больше опираются на данные популяционной генетики и сравнительной геномики, в результате чего появляются гипотезы возникновения экологически дифференцированных популяций. Микробное разнообразие в океане, как и в большинстве других сред, в основном изучалось путем оценки разнообразия последовательностей генов 16S рРНК, полученных с помощью амплификации (ПЦР, полимеразная цепная реакция), клонирования и секвенирования (Rappé, Giovannoni, 2003; Chakravorty et al., 2007) (рис. 3).

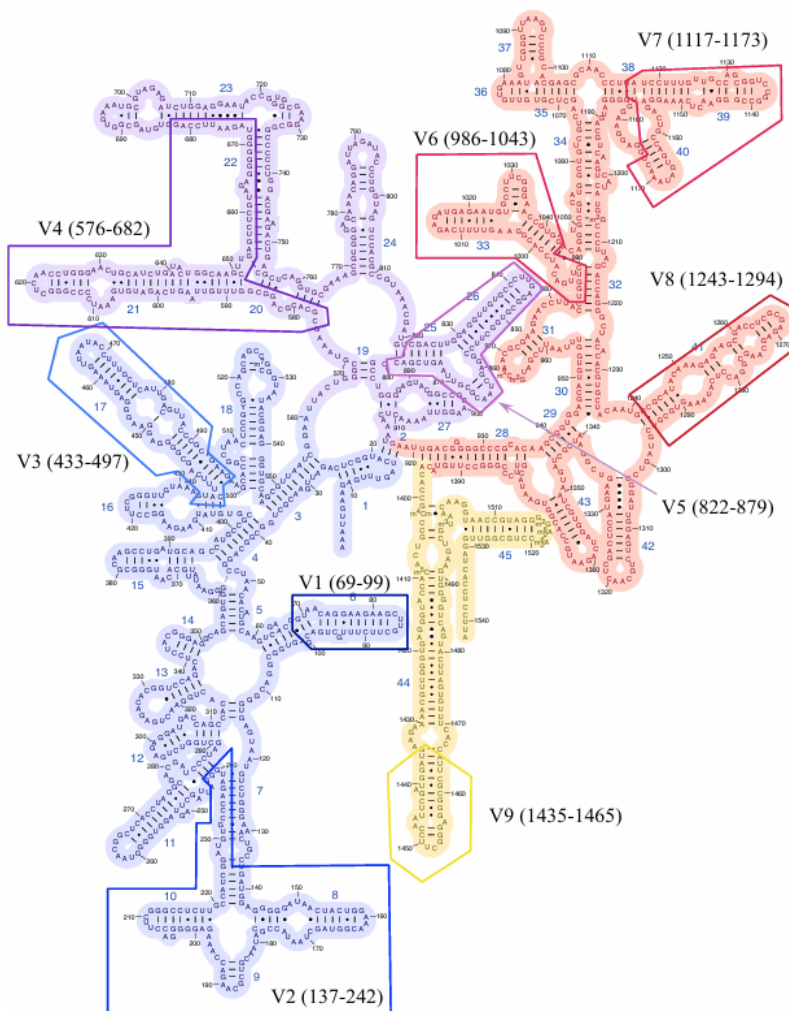


Рисунок 3 – Структура гена 16S рРНК – универсального таксономического маркера бактерий.

Вариабельные регионы (V1–V9) амплифицируют с использованием пар праймеров, комплементарных консервативным участкам (обозначены рамками соответствующего цвета), с последующим секвенированием и сравнительным анализом с последовательностями референсных штаммов (адаптировано из Chakravorty et al., 2007)

На сегодняшний день определен, по меньшей мере, 41 филогенетический бактериопланктонный тип (филотип), причем многие из них не имеют культивируемых представителей (Giovannoni, Stingl, 2005; Parte et al., 2020). Подавляющее большинство бактерий в океане все еще остается недоступным для идентификации и изучения их метаболических путей. Однако новые методы культивирования и метагеномные подходы позволяют выявить особенности многих бактериальных типов.

Несмотря на избыточность генетического кода, анализ генов и генных локусов выявил важные закономерности распределения различных филогенетических групп. Обычно бактерии объединяют в филотипы в соответствии с различными отсечениями последовательностей, а затем сравнивают распределение филотипов между различными образцами. Это показало, что многие филотипы встречаются как в открытом океане, так и в прибрежной среде, но, очевидно, не все филотипы встречаются повсеместно, по крайней мере, не в одинаковых пропорциях (Giovannoni, Rappé, 2000; Polz et al., 2006). Так, альфа-протеобактерии группы SAR11 (*Candidatus Pelagibacter*) – первые представители преобладающих в океане свободноживущих олиготрофных бактерий с самым маленьким геномом (около 1,3 МВ), составляли на момент исследования не менее 16 % всех клеток в мезопелагиали и до 50 % бактериопланктона в поверхностных слоях океана (Morris et al., 2002; Malmstrom et al., 2005; Polz et al., 2006). Однако легко культивируемые филотипы, зачастую, не являются самыми многочисленными представителями бактериопланктона, но в некоторых случаях их биологическая роль является весьма значимой из-за высокой скорости метаболизма (Worden et al., 2006). Заметным исключением являются альфа-протеобактерии клады *Roseobacter*, которые легко культивируются и могут составлять до 20 % клеток прибрежного бактериопланктона (Buchan et al., 2005; Polz et al., 2006).

Несмотря на то, что многие филотипы демонстрируют дифференцированное распределение в образцах окружающей среды, остается вопрос, как должны быть сгруппированы кодирующие (и/или регуляторные) последовательности генов или геномов, чтобы это позволило идентифицировать экологически различимые популяции. Некоторые метаболические гильдии бактерий имеют сигнатуры в рРНК (например, сульфатредуцирующие бактерии, метанотрофы, нитрификаторы), но большинство четко очерченных филогенетических групп не связаны с метаболическими или физиологическими функциями (Pernthaler, Amann, 2005; Polz et al., 2006). Таким образом, для выявления однородных экологических популяций возможны два основных подхода: 1) определение границы отсечения последовательностей, которые заметно соотносятся с известными таксономическими единицами в других кладах; 2) проведение поиска возникающих иерархических паттернов вариаций среди сообществ (т.е. естественно возникающие кластеры в разнообразии последовательностей) (Polz et al., 2006).

Первый подход привел к использованию отсечения последовательностей 16S рРНК с 3%-ной дивергенцией для выделения таксономических единиц. Он основан на данных о том, что при уровне гибридизации ДНК-ДНК выше 70 % (традиционный метод разграничения видов) не обнаружено сходства 16S рРНК менее чем на 97 % (Stackebrandt, Goebel, 1994; Rosselló-Mora, Amann, 2001; Polz et al., 2006). Однако правомерность использования 3%-ных отсечений последовательностей для разделения экологических единиц (экотипов) неоднократно оспаривалось на основе как эмпирических, так и теоретических исследований. Анализ близкородственных штаммов показал, что они могут иметь разнообразные и, по-видимому, экологически дифференцированные геномы, что говорит о том, что традиционное определение таксонов слишком широкое. Впервые это было обнаружено для генов, определяющих патогенность, которые часто группируются в геномных островках, единственных уникальных локусах, в основном, однородных геномов патогенных бактерий (Hacker, Carniel, 2001; Bertelli et al., 2017). Действительно, большинство бактериальных геномов содержит ряд таких дифференцированных геномных островков. Например, сравнительный анализ штаммов *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* показал, что сотни генов являются уникальными для отдельных изолятов этих хорошо изученных видов бактерий (Welch et al., 2002; Polz et al., 2006; Balabanova et al., 2020).

Другой подход привел к поиску естественных иерархических единиц, что требует достаточно больших наборов данных для изучения взаимосвязей на нескольких уровнях дифференциации. Это позволило выявить микромасштабные закономерности дифференциации внутри риботипических последовательностей, которые свидетельствуют о преобладании естественных кластеров с 1%-ой внутренней дивергенцией последовательностей. Так, в прибрежном бактериопланктоне и в образцах сульфатредуцирующих бактерий из болотных отложений большинство кодирующих последовательностей попали в такие микроразнородные кластеры, что указывает на наличие близкородственных таксонов бактерий (Acinas et al., 2004; Клерас-Серай et al., 2004; Polz et al., 2006). Действительно, кластеры последовательностей могут представлять собой характерные для популяций или видов единицы дифференциации (Hettle et al., 2019; Balabanova et al., 2023, 2024a; Adedibu et al., 2024a; Nedashkovskaya et al., 2024). Например, широко распространенный род гамма-протеобактерий *Pseudoalteromonas* встречается в различных водных средах разных климатических широт, в том числе в ассоциации с тканями беспозвоночных, рыб и макроводорослей, где они могут использовать преимущества этих богатых полисахаридами источников (Khudary et al., 2008; Bosi et al., 2017; Hettle et al., 2019; Parrilli et al., 2021). С помощью методов геномики, транскриптомики и структурно-функциональных исследований авторам Hettle et al. (2019) удалось установить активный

метаболический путь у псевдоальтеромонады, ответственный за расщепление галактана красных водорослей – каррагинана (рис. 4).

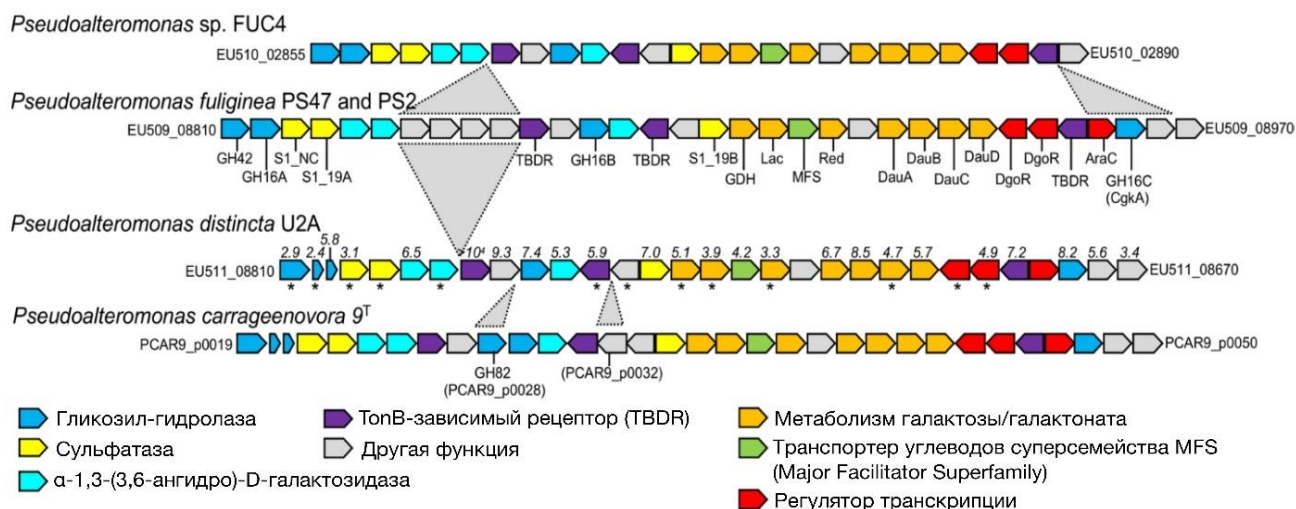


Рисунок 4 – Синтения геномных локусов утилизации каррагинана у штаммов *Pseudoalteromonas* spp. Каждый ген представлен стрелкой, цвет которой соответствует его предполагаемой функции (согласно легенде на нижней панели). Серые треугольники между гомологичными локусами указывают на сайты инсерции дополнительных генов. Цифры над генами в локусе *Pseudoalteromonas distincta* U2A отражают значения $\log_2$ кратности дифференциальной экспрессии (fold change) при выращивании штамма на κ/ι -каррагинане относительно галактозы, определенные методом RNA-seq. Значения приведены только для генов с $|\log_2 \text{ratio}| > 1,5$ и $p < 0,05$. Символом «*» отмечены гены с высоким уровнем транскрипции (> 10 TPM) на среде с галактозой. Границы локусов обозначены номерами первого и последнего генов (адаптировано из Hettle et al., 2019)

Генный локус специфической деградации полисахарида κ/ι -каррагинана (рис. 4) обеспечивал изолятам, обладающим этим локусом, способность расти на данном субстрате, что стало ключевым фактором их адаптации к уникальной экологической нише (Hettle et al., 2019). Штаммы гамма-протеобактерий *Cobetia* sp. IU 180733JP01 и 190790JP01, выделенные из морских водорослей *Laminaria* sp., накапливали гомополимер поли(3-гидроксибутират) [P(3НВ)] в минеральной среде, содержащей альгинат в качестве единственного источника углерода (Moriya et al., 2020). Анализ геномной последовательности выделенных штаммов позволил предсказать кодирующие последовательности ферментов ассимиляции альгината и синтеза P(3НВ), которые образуют отдельные кластеры. Тем не менее, численное значение генетического разнообразия микроорганизмов, соответствующее наблюдаемым кластерам, может варьировать от таксона к таксону. Существуют теории возникновения генных кластеров, а также теории, объясняющие их возможное экологическое значение.

2.3 Кластеры нуклеотидных и аминокислотных последовательностей как молекулярные маркеры в систематике и экологии микроорганизмов

Принято считать, что многоклеточные организмы группируются в кластеры по фенотипам, то есть фенотипическая дифференциация внутри групп намного меньше, чем между группами, и это лежит в основе интуитивного понятия «вид». Подобная фенотипическая кластеризация наблюдается и во многих других таксонах, включая бактериальные таксоны. Однако критерии распределения бактериальных изолятов по фенотипическим кластерам чаще обусловлены целями исследования, поэтому многие фенотипические группы весьма условны (Polz et al., 2006). По этой причине от чрезмерного дробления таксонов пострадала классификация патогенов. Например, *Shigella* теперь считается просто разновидностью *E. coli*, отличающейся по нескольким признакам, которые выявлялись многократно и независимо друг от друга (Puro et al., 2000; Fukiya et al., 2004).

Тем не менее, вопрос о возможности фенотипической кластеризации бактерий, которая соответствовала бы их генетическим признакам, остается актуальным и по сей день. Современные способы таксономической классификации штаммов, объединяющей их в популяции и виды, сфокусированы на обнаружении кластеров нуклеотидных (и белковых) последовательностей. В частности, мультилокусный анализ последовательностей (мультилокусный сиквенс-тип, МЛСТ), который появился в результате генотипирования патогенных штаммов, является эффективным для поиска функционально определенных популяций и видов (Jolley et al., 2018). Поскольку этот подход нацелен на множество предположительно нейтральных локусов в каждом бактериальном геноме, филогенетическая принадлежность, выведенная из последовательности объединенных генов, более надежна, чем из одного гена. Действительно, МЛСТ выявляет кластеры последовательностей, которые соответствуют некоторым валидно определенным видам бактерий, и эта концепция согласуется с филогенетической концепцией вида (Taylor et al. 2000; Polz et al., 2006; Jolley et al., 2018).

Основной интерес представляет то, в какой степени кластеры последовательностей обозначают экологически дифференцированные популяции и/или виды. Согласно классической точке зрения, разработанной на основе биологии метазоев, репродуктивная изоляция возникает, прежде всего, когда экологическая или географическая изоляция определяет границы видов (Polz et al., 2006). Признание этих границ, в свою очередь, гарантирует, что мутации, дающие выгодные фенотипические эффекты в одной среде, не будут разбавлены генетической рекомбинацией с иммигрантами, и, как считается, обеспечивает относительно большое разнообразие между видами, чем внутри них. Однако элементы этой классической модели отсутствуют во многих биологических системах, например, в популяциях, развивающихся в симпатрии (или парapatрии), и в бесполом организмах. Это ставит под сомнение

универсальность данного подхода для понимания основ фенотипической кластеризации. Этот алгоритм также не является неотъемлемой частью более фундаментальной концепции видов как популяций организмов, селективно оптимизированных для проживания в определенных экологических условиях (Polz et al., 2006).

Исследование особенностей организации бактериального генома дает возможность понять, могут ли генные кластеры возникать как следствие экологической специализации. Один из возможных механизмов заключается в том, что селективный отбор периодически способствует удалению генетических вариаций из сосуществующих геномов (Cohan, 2006; Polz et al., 2006) (рис. 5). Это предполагает, что клонально размножающиеся бактерии будут накапливать мутации, которые, в редких случаях, являются адаптивными. Носитель таких адаптивных мутаций будет увеличивать их частоту до тех пор, пока не превзойдет по количеству особей все остальные клоны в своей нише. У организмов, размножающихся строго клонально, генетическая изменчивость обнуляется по всем локусам, поскольку остается только клон-победитель. После отбора все локусы начнут диверсифицироваться, и в большинстве локусов генов домашнего хозяйства должны проявиться сходные паттерны кластеризации (рис. 5 Б (ii)). Важно отметить, что вариации внутри кластера, специфичного для конкретной ниши, будут сохраняться, поскольку конкуренция не настолько сильна для того, чтобы они были вычищены. Такие кластеры были названы экотипами (Cohan, 2002; Polz et al., 2006). Одна из привлекательных черт концепции экотипов заключается в том, что она действительно придает экологический смысл кластерам последовательностей, наблюдаемым в библиотеках экологических клонов (Acinas et al., 2004; Polz et al., 2006). Основная критика в отношении потенциальной возможности разветвки, приводящей к кластеризации, которую можно наблюдать по любому локусу, вытекает из соображений о переносе генов между бактериальными родами (рис. 5 Б (iv)). Бактерии размножаются клонально, и перенос генов является эпизодическим событием, которое обычно затрагивает только небольшие участки генома, не связанным с размножением (Polz et al., 2006). Поэтому весь генетический обмен у бактерий происходит горизонтально и принимает форму гомологичной или нелегитимной рекомбинации, когда новые аллели или локусы попадают в клетку путем трансформации, трансдукции или конъюгации. Каждый из этих процессов протекает по своим правилам, по крайней мере, некоторые из них обусловлены экологическими условиями, так что ожидаемая вариативность бактериальных геномов может зависеть от образа жизни соответствующих бактерий в природе (Polz et al., 2006). Формирование кластеров может регулироваться сложным взаимодействием гомологичной рекомбинации (HR) и отбора, что может приводить к различным паттернам для разных локусов и областей генома (рис. 5 Б (iv)). Например, HR может размывать границы зарождающихся кластеров, если скорость передачи генов высока, а различия в

приспособленности между конкурентами низки, что замедляет скорость генетической гомогенизации популяции (Polz et al., 2006). В этом случае как селективно благоприятные, так и нейтральные аллели могут перемещаться между геномами, тем самым диверсифицируя кластеры. В другом, крайнем случае высокий отбор и низкая скорость рекомбинации приводят к появлению полностью клональных популяций после селективного отбора (рис. 5 Б (ii)).

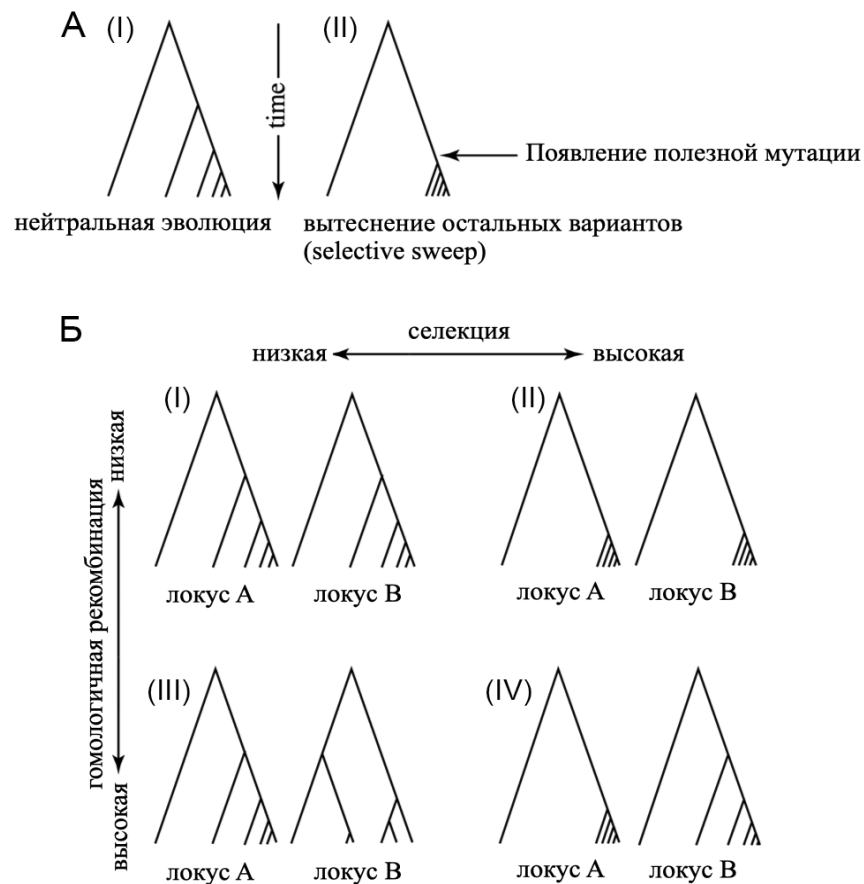


Рисунок 5 – Влияние естественного отбора и гомологичной рекомбинации (HR) на филогению последовательностей. А. (i) В отсутствие отбора длина ветвей отражает коалесцентный процесс и генетический дрейф; (ii) после «селективного подметания» (*selective sweep*) длина ветвей сокращается, что отражает потерю генетического разнообразия. Б. (i, ii) Низкая частота HR между локусами обуславливает общую генеалогическую историю, т. е. высокую корреляцию между филогениями отдельных локусов; (iii, iv) рекомбинация нарушает эту корреляцию: даже после селективного события сокращение длины ветвей наблюдается только в локусе, являющемся мишенью отбора (адаптировано из Polz et al., 2006)

Однако в настоящее время ни скорость HR, ни различия в приспособленности в природных микробных популяциях не охарактеризованы в достаточной степени. В частности, даже относительно большие различия в приспособленности к приобретению ресурсов могут быть подавлены отрицательным частотно-зависимым отбором. Например, хищничество фагов может непропорционально быстро удалять победителя из конкурентной борьбы, нивелируя очевидные

преимущества в приспособленности (Thingstad, 2000; Polz et al., 2006). Более того, моделирование эволюционного сценария показало, что кластеры могут возникать, по крайней мере, транзиторно в отсутствие положительного отбора при условии высоких скоростей HR (Falush et al., 2006; Hanage et al., 2006), поэтому некоторые наблюдаемые кластеры могут не нести практически никакой экологической информации (Polz et al., 2006). Кроме того, эволюционный успех мутации, то есть то, насколько многочисленным может стать мутантный клон, зависит исключительно от места возникновения мутации, а вовсе не от приспособленности клона (Gralka, Hallatschek, 2019). С помощью минимальной модели эволюции показано, что простых некоррелированных гетерогенностей среды достаточно, чтобы оказать сильное влияние на популяционную генетику и фенотип при расширении ареала (рис. 6).

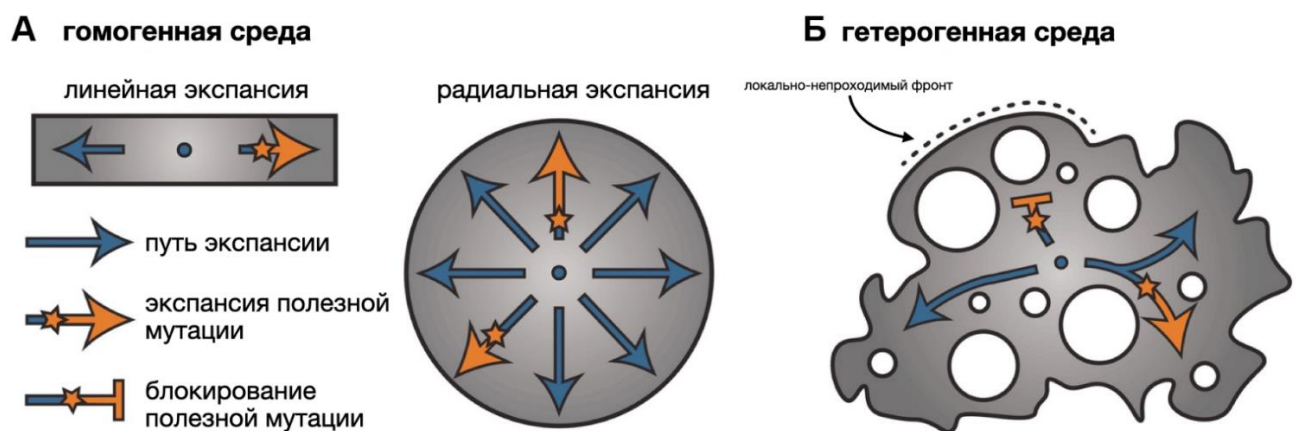


Рисунок 6 – Влияние гетерогенности среды на эволюционную динамику при расширении ареала (экспансии) мутантного клона. А. В гомогенной среде локально возникшая адаптивная мутация (отмечена звездой), преодолев порог генетического дрейфа, беспрепятственно распространяется в популяции (показано стрелками). Б. В гетерогенной среде распространение адаптивной мутации может быть ограничено пространственными барьерами («тупиковыми» участками, обозначены пунктирной линией), в то время как по доступным коридорам продолжается одномерная экспансия (адаптировано из Gralka, Hallatschek, 2019)

Эти эффекты сохраняются даже тогда, когда гетерогенность среды не представляет собой непроходимых препятствий, а лишь замедляет рост. Поскольку мутации происходят в растущей популяции на границе экспансии, то замедление роста оказывает на эволюционную динамику влияние, сравнимое с полной остановкой (Gralka, Hallatschek, 2019). Когда популяция расширяет свой ареал, она, вероятно, не сталкивается с полностью однородной средой. По крайней мере, одни районы будут более благоприятными, чем другие, но некоторые участки среды могут оказаться совершенно недоступными для популяции, например, из-за физико-химических свойств среды, сильного местного конкурента или хищника, а также в отсутствие или при нехватке ресурсов (рис. 6). Таким образом, неоднородность среды, скорее, является правилом,

чем исключением. В зависимости от мутационного сценария, то есть относительной скорости и эффекта пагубных и полезных мутаций, гетерогенность среды может не только замедлить процесс адаптации, но и привести к совершенно разным долгосрочным эволюционным результатам. Было обнаружено, что скорость адаптации может переходить от положительной (адаптация со временем) к отрицательной (накопление пагубных мутаций) в зависимости только от степени неоднородности среды. Таким образом, гетерогенность среды может кардинально изменить эволюционную динамику расширения ареала новых генетических вариантов (Gralka, Hallatschek, 2019).

С другой стороны, после своего образования бактериальные генные кластеры могут оказаться генетически изолированными (Polz et al., 2006). В экспериментах с чистыми культурами было показано, что вероятность гомологичной рекомбинации (HR) уменьшается логарифмически с увеличением дивергенции последовательностей (Vulic et al., 1997; Majewski et al., 2000; Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020). Это означает, что HR между дивергентными кластерами может быть настолько маловероятным событием, что они оказываются фактически изолированными (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020). Результаты МЛСТ-анализа действительно соответствуют этому ожиданию. Большинство штаммов обычно попадают в филотип, определенный генными кластерами, но некоторые из них не попадают, возможно, в результате случайного внедрения дивергентных аллелей с помощью HR (Hanage et al., 2005; Polz et al., 2006).

Теоретические соображения позволяют предположить, что дивергентные кластеры могут также постепенно формироваться в результате горизонтального переноса генов путем нелегитимной (гетерологичной) рекомбинации, поскольку вставка нового генетического материала препятствует HR в соседние области генома (Lawrence, 2002; Polz et al., 2006). Таким образом, генетическая изоляция может нейтрально распространяться по геному через накопление точечных мутаций, еще больше подавляющих HR (Vetsigian, Goldenfeld, 2005). Такие процессы могут происходить с разной скоростью в разных геномных регионах (Gavrilets, Vose, 2005), но они могут продолжаться до тех пор, пока бактерии не станут, по сути, генетически изолированными по всему своему геному (Lawrence, 2002; Polz et al., 2006; Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020). Тогда кластеры, возникшие в результате этого процесса, смогут свободно дивергировать в экологическом плане, сохраняя при этом значительное генотипическое разнообразие.

Чтобы решить вопрос, возникают ли кластеры последовательностей путем нейтральной эволюции (случайные мутации и генетический дрейф) или соответствуют экологически дифференцированным популяциям, мы должны соотнести их с соответствующими экологическими параметрами или нишами. На рисунке 7 представлен идеализированный

сценарий ожидаемого экологического распределения различных генотипических кластеров, предполагающий различный уровень адаптации к различным нишам.

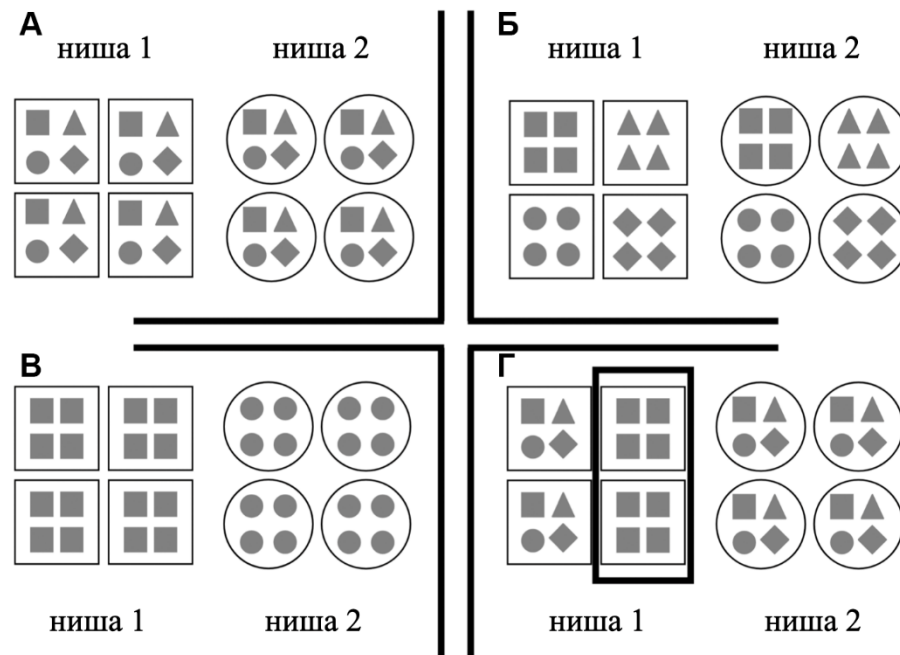


Рисунок 7 – Модели распределения генотипических кластеров в зависимости от степени экологической дифференциации и стохастических процессов колонизации ниш. А. Случайное распределение по экологическим нишам при отсутствии значимых различий в приспособленности генотипов. Б. Клональная экспансия в локальных нишах вследствие «бутылочного горлышка» (*bottleneck*) или эффекта основателя, формирующая выраженную популяционную структуру. В. Выраженная корреляция генотипа с экологической нишей, указывающая на адаптивные различия в приспособленности. Г. Клональная экспансия вследствие локальных всплесков численности («микрoэпидемий»), приводящая к доминированию одного генотипа в конкретной области (обозначено жирной линией). Условные обозначения: большие квадраты и круги – отдельные ниши; разные символы внутри фигур – популяции с различными генотипами в пределах одной ниши; одинаковые символы – штаммы идентичного генотипа (адаптировано из Polz et al., 2006)

В ряде исследований действительно удалось установить, что организмы, отнесенные к разным кластерам, демонстрируют различное распределение и динамику в рамках одних и тех же бактериопланктонных сообществ (Pommier et al., 2012; Shapiro et al., 2012; Sun et al., 2018; Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020). Впервые это было описано для генов 16S рРНК, принадлежащих к кладам SAR11 (*Pelagibacter*) из различных экологических библиотек клонов, у которых было установлено различное распределение по глубине ветвей (длина ветвей) двух кластеров (Field et al., 1997; Polz et al., 2006). Позднее было обнаружено, что третий кластер, который первоначально не удалось соотнести с экологическими факторами, имеет четкие временные закономерности встречаемости, вероятно, обусловленные стратификацией водной

толщи (Morris et al., 2005; Polz et al., 2006). Аналогичным образом, у цианобактерии *Prochlorococcus* кластеры последовательностей в штаммах, адаптированных к высокой и низкой освещенности, демонстрируют различное распределение по длинам ветвей в кластере (Rocap et al., 2003; Cai et al., 2022). Кроме того, шесть кладов, отличающихся последовательностями внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS), демонстрируют различные модели распределения бактериопланктона по океаническим градиентам (Johnson et al., 2006; Polz et al., 2006). В частности, температурный фактор коррелировал с встречаемостью и пределами толерантности различных изолятов внутри кластеров, и прослеживалась связь с другими экологическими факторами (Johnson et al., 2006; Sriaporn et al., 2023). Температура является ключевым фактором кластеризации последовательностей 16S рПНК популяций *Vibrio* spp. Они показали отчетливые сдвиги в численности популяций между холодным и теплым сезонами в ходе годичного исследования эстуария умеренной зоны (Randa et al., 2004; Polz et al., 2006).

Кластеры последовательностей являются динамичными образованиями в эволюционном масштабе времени, а гены, используемые для выделения любых кластеров, должны иметь достаточный уровень генетической вариативности. Однако, некоторые клады бактерий могут быть более древними и, следовательно, заметными по консервативным генам 16S рПНК (рис. 3), другие, возникшие совсем недавно, будут заметны только по более быстро эволюционирующим генам. Например, цианобактерии *Prochlorococcus* кластеризуются по генам 16S рПНК менее отчетливо, чем по генам ITS, которые уже могут соответствовать экологической дифференциации этой группы бактерий (Rocap et al., 2003; Johnson et al. 2006; Polz et al., 2006).

Более того, не все генные кластеры одинаково информативны в отношении принадлежности микроорганизмов к экологическим нишам. Как было сказано выше, некоторые кластеры могут возникать в результате нейтральных процессов, а другие – в результате селективного отбора. Действительно, наборы данных МЛСТ, основанные на белок-кодирующих последовательностях, обычно выявляют иерархию кластеров, то есть кластеры внутри кластеров. Какие кластеры соответствуют экологически дифференцированным геномам, должно быть решено путем соотнесения иерархии каждого кластера с соответствующими параметрами окружающей среды и геномным разнообразием в рамках популяционной генетики. И, в конечном счете, необходимо найти подробные механистические объяснения, связывающие пространственные и временные вариации физико-химических градиентов с определенными генетическими элементами, обеспечивающими селективные преимущества (Polz et al., 2006; Sriaporn et al., 2023).

Как метагеномика, так и результаты секвенирования чистых культур бактерий показали, что белок-кодирующие гены образуют похожие кластеры у сосуществующих родов *Prochlorococcus*, *Pelagibacter*, *Vibrio* и др., которые содержат значительные расхождения в

синонимичных последовательностях (Giovannoni et al., 2005; Polz et al., 2006; Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020). Однако средний уровень идентичности нуклеотидов в них колеблется от 78 до 95%, что говорит о том, что эти кластеры не являются недавними. Как отмечают Стингл и Джованнони, такая редкость прочесывания явно противоречит постулату Кимуры, согласно которому даже незначительные различия в приспособленности должны эффективно сортировать большие популяции. В таком случае бактериопланктон с его потенциально огромными размерами популяций должен постоянно совершенствоваться под действием отбора (Giovannoni, Stingl, 2005; Polz et al., 2006). С другой стороны, в огромных просторах океана селективный отбор может занять значительное время до более существенной диверсификации геномов.

Еще одним фактором, который в настоящее время мало изучен, является диверсификация генома за счет нелегитимной (гетерологичной) рекомбинации и потери генов (делеции) (Polz et al., 2006). В целом, сравнение близкородственных геномов выявило очень высокую гетерогенность в содержании генов. Впервые это было показано на примере трех штаммов *E. coli*, которые, как ни удивительно, разделяли лишь около 40 % своего совокупного генного набора, это же было зафиксировано и у видов бактериопланктона (Welch et al., 2002; Sun et al., 2018). Такие наблюдения привели к предложению разделить геномы на кластеры основных генов корового генома, общих для всех в группе, и генов вспомогательного (вариативные гены) и уникального (синглтоны) геномов – для некоторых членов группы (Hacker, Carniel 2001; Bosi et al., 2017; Sun et al., 2018).

Вариабельный геном (вспомогательный, гибкий) представляет собой баланс между нелегитимной рекомбинацией и делециями и включает до 20 % генов, ответственных за адаптацию (Hacker, Carniel, 2001; Polz et al., 2006; Bosi et al., 2017; Hettle et al., 2019) (рис. 8). С другой стороны, считается, что ядро генома (коровый геном) – это стабильный набор генов, таких как рибосомальные гены и гены домашнего хозяйства. Это ядро отражает общую эволюционную историю рода, поскольку латеральный перенос генов через широкие филогенетические границы представляется редким явлением (Acinas et al., 2004; Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020) (рис. 8). Нелегитимная рекомбинация в гибком геноме представляется наиболее важным источником эволюционных инноваций в бактериальных геномах, поскольку она может приносить адаптивные локусы. Впервые это было обнаружено в контексте патогенеза (Hacker, Carniel, 2001; Polz et al., 2006), где гибкий геном был задействован в дифференциации экзистенции и адаптации к хозяину. У свободноживущих бактерий эти процессы могут способствовать поддержанию мобильного генофонда (рис. 8), повышающего приспособленность к меняющимся условиям среды (Hacker, Carniel, 2001; Polz et al., 2006). Более того, было показано, что нелегитимная рекомбинация отвечает за возникновение новых функций в метаболических сетях (Pal et al., 2005; Hall et al., 2017; Yang et al., 2024).

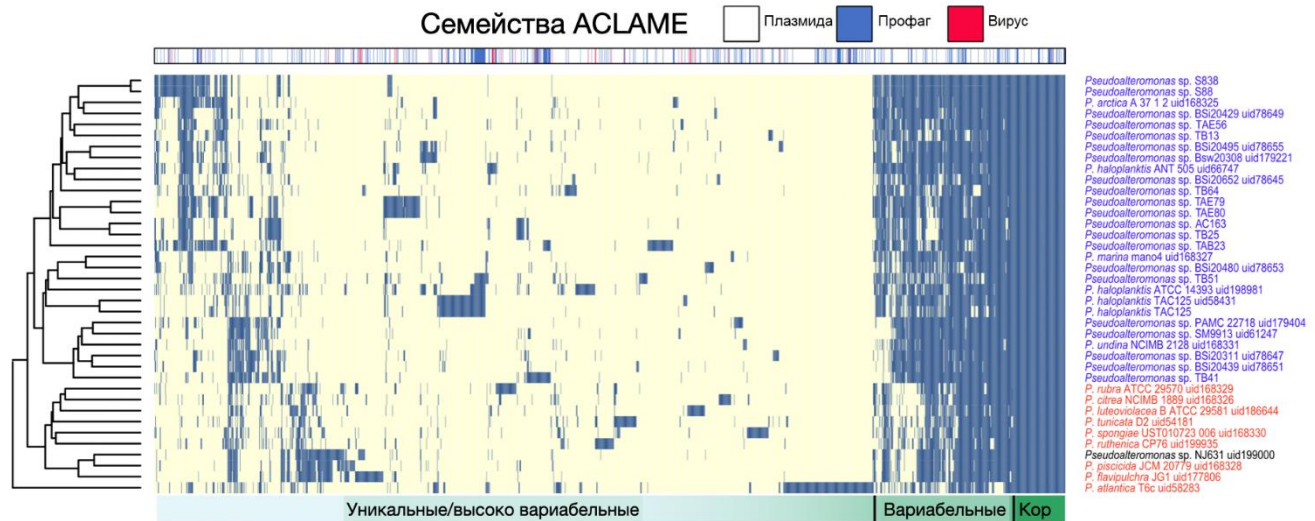


Рисунок 8 – Тепловая карта (heatmap) распределения коровых, варибельных и уникальных генов у морских бактерий рода *Pseudoalteromonas*. Семейства ACLAME – мобильные генетические элементы согласно базе данных ACLAME (<http://aclame.ulb.ac.be>). Красным цветом выделены названия пигментированных штаммов (адаптировано из Bosi et al., 2017)

В какой степени новые гены, переданные в результате нелегитимной рекомбинации, могут сохраняться в геномах, если они не являются адаптивными? Геномы должны быть способны без ущерба «переносить» определенное количество нефункциональных генов, поскольку даже адаптационные гены не сразу становятся полностью функциональными и могут проходить периоды оптимизации и/или акклиматизации (Polz et al., 2006). Однако скорость удаления неиспользуемых генов должна примерно соответствовать скорости нелегитимной рекомбинации, поскольку размер генома не растет беспрестанно. Действительно, моделирование показало, что горизонтально приобретенные последовательности могут сохраняться в течение длительного времени у значительной части особей в бактериальной популяции, даже если они нейтральны или не наносят сильного вреда (Berg, Kurland, 2002; Polz et al., 2006; Sela et al., 2016). Следовательно, ожидается, что микробная популяция будет иметь большое разнообразие переходных нейтральных генов. Это ожидание соответствует наблюдениям за высокой скоростью удаления генов в неселективной среде и очень большими различиями в размере генома и содержании генов у близкородственных бактерий (Welch et al., 2002; Berg, Kurland, 2002; Polz et al., 2006; Sela et al., 2016).

Необходимость «переносить» появление новых генов в геномах может привести к тому, что они будут направляться в специальные геномные области, кроме того, должны существовать механизмы восстановления функции после утраты генов. Действительно, многие бактерии поддерживают плазмиды, имеют литические и лизогенные фаги и крупные геномные области (например, кодирующие интегрины), которые могут захватывать новые гены (Polz et al., 2006). С

другой стороны, внехромосомные элементы (такие как плазмиды и фаги) имеют свою собственную эволюционную «повестку дня», которая может привести к более высокой скорости передачи определенных типов генов. Одним из примеров генетической канализации, которая отражает способность фенотипа организма оставаться неизменным, несмотря на мутации, могут быть гены, кодирующие процессы фотосинтеза, переносимые фагами у *Prochlorococcus* spp. Предполагается, что гены, передающиеся фагами, повышают способность к синтезу бактериальных белков с чрезвычайно высоким оборотом в клетках хозяина во время инфицирования (Lindell et al., 2005). Однако фаг может выступать и как высокоэффективный агент распространения внутри или между популяциями клеток аллелей генов, адаптационных «с точки зрения» хозяина (Polz et al., 2006).

Таким образом, жизнь в условиях дикой природы может оказывать значительное влияние на геномное разнообразие даже в близкородственных группах бактериопланктона. Океан представляет собой ландшафт с низко- и высокопитательными эконишами (рис. 1). В этих условиях гетеротрофные бактерии, таких родов как, например, *Vibrio*, *Roseobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Cobetia* и др., развили способность чувствовать и реагировать на изменение окружающей среды с помощью ряда механизмов, включая системы кворум-сенсинга, хемотаксис, адгезию к тканям животных или водорослей, быструю колонизацию биотических и абиотических поверхностей, продуцирование антимикробных соединений, кофакторов, пигментов и пребиотиков для сосуществования с морскими сообществами прокариот и эукариот (Buchan et al., 2005; Plisova et al., 2005; Polz et al., 2006; Bosi et al. 2017; Lv et al., 2019; Moriya et al., 2020; Christensen et al., 2021; Fernández-Juárez et al., 2022; Israel et al., 2023; Rosado et al., 2023; Barno et al., 2024).

Так, пигментированные бактерии *Pseudoalteromonas* spp., выделенные из морских беспозвоночных, продуцировали метаболиты с большей биологической активностью, чем их непигментированные сородичи (Bosi et al., 2017), а штаммы *Cobetia* spp., ассоциированные с кораллами и креветками, служили для них эффективными пробиотиками (Lv et al., 2018; Moriya et al., 2020; Rosado et al., 2023; Barno et al., 2024). Взаимосвязь между изменениями в микробиомах и уровнях метилирования ДНК у кораллов показывает, что бактериальные сообщества могут вызывать долгосрочные и, возможно, наследуемые изменения у своих хозяев путем модификации их эпигеномов (рис. 9).

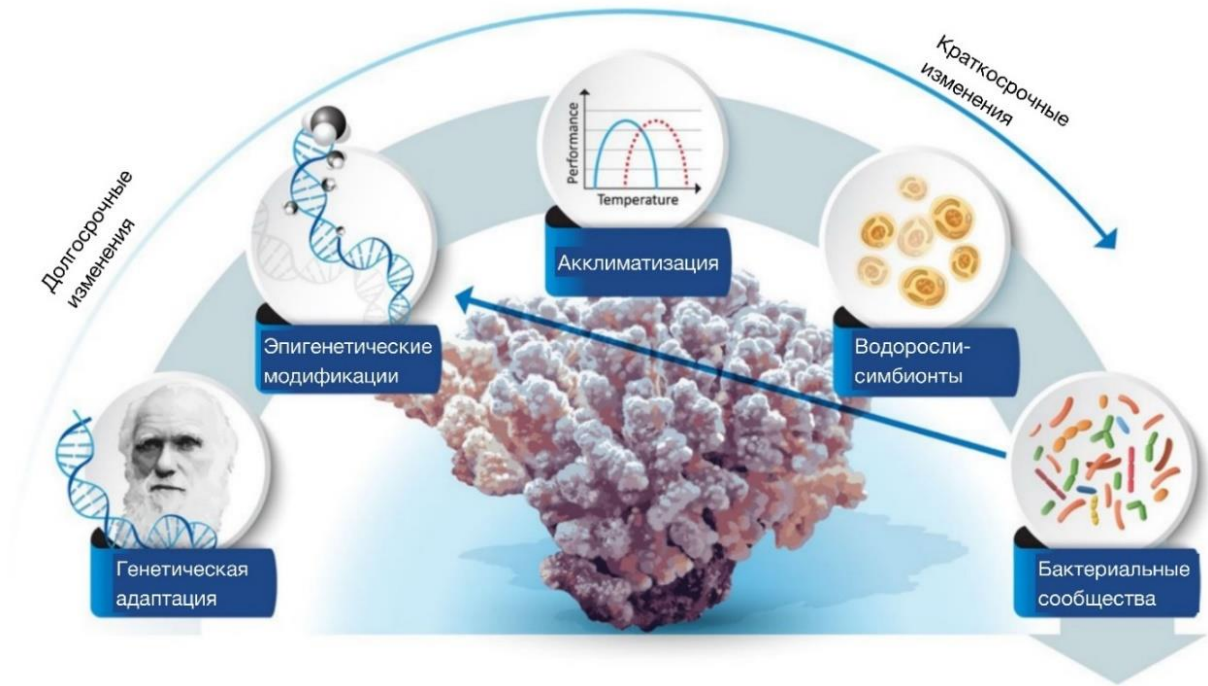


Рисунок 9 – Влияние микробиома на эпигенетический ландшафт кораллов посредством взаимодействия участников симбиотического сообщества (адаптировано из Barno et al., 2024)

Напротив, высокоадаптивным признаком для олиготрофов (*Prochlorococcus*, *Pelagibacter*), которые живут в условиях крайнего ограничения питательных веществ, является эффективность метаболизма и сохранение энергии (Polz et al., 2006). Основное различие между этими двумя экологическими типами заключается в том, что оптимизация эффективности роста вызывает у олиготрофов более низкую «толерантность» к переносу неиспользуемого или редко используемого генетического материала. Помимо возможной оптимизации размера генома, могут существовать различия в потенциале переноса генов. Как в *Prochlorococcus*, так и у *Pelagibacter* отсутствуют плазмиды и транспозоны, а интегративные фаги редки. Жизнь в виде одиночных, свободно плавающих клеток также, вероятно, исключает трансформацию как важный механизм переноса генов. Гетеротрофы имеют гораздо больше способов переноса генов. Действительно, вибрионы обычно выделяют около 1 % своего генома на рекомбиназы/интегразы, в то время как у *Prochlorococcus* и *Pelagibacter* – менее 0,1 % таких генов (Polz et al., 2006). Например, роль интегрирующих фагов *Vibrio cholerae* в патогенезе была хорошо описана, и почти все вибрионы имеют крупные интегрины. Они обладают геномными интегразами, которые могут захватывать гены и собирать регионы размером до 125 килобаз (kb) (Heidelberg et al., 2000; Boucher, Stockes, 2006). Это может иметь серьезные последствия для скорости HR и нелегитимной рекомбинации в совместно обитающих бактериальных штаммах. Эти ограничения на оптимизацию генома и перенос генов могут объяснить различия в наблюдаемом количестве и степени variability геномных островков между

представителями родов *Prochlorococcus* и *Vibrio*. У *Vibrio* spp. геномные острова могут быть многочисленными (например, не менее 14 в *Vibrio vulnificus*) и связанными с фагами, транспозонами и интегринами (Quirke et al., 2006; Bertelli et al., 2017). У видов *Roseobacter* значительная часть генома кодируется в плазмидах (10 % у *Silicibacter pomeroy*), включая метаболически значимые гены (Moran et al., 2004). Более того, вариации размера генома и содержания генов от штамма к штамму в пределах природной популяции *Vibrio* sp. очень велики. Так, в популяции *V. splendidus*, имеющей гены 16S рРНК с дивергенцией менее 1 %, сосуществуют варианты генома с различиями до 20 % (Thompson et al., 2005; Polz et al., 2006). Таким образом, средняя концентрация уникальных генов бактериопланктона достаточно низкая, что имеет пренебрежительно малое значение для индивидуальной приспособленности или общего функционирования популяции. В целом, эти различия могут иметь важные последствия для эволюции и адаптации «оппортунистов» *Vibrio* и *Roseobacter* с разнообразным образом жизни, что может потребовать наличия гибких геномов.

Действительно, гены могут быть адаптивными в одних экологических условиях, но нейтральными в других. Например, некоторые гены, экспрессируемые для инфицирования рыбы, могут оставаться неиспользованными при росте бактерии на водорослевых экссудатах. Именно этим можно объяснить высокое генотипическое разнообразие вибрионов, встречающихся в бактериопланктоне (Thompson et al., 2005; Polz et al., 2006).

Кроме того, частая смена океанических зон с различными температурными режимами привели к накоплению в популяциях бактериопланктона генов, кодирующих специфические белки и биосинтез вторичных метаболитов для адаптации к холодовому шоку (рис. 10).

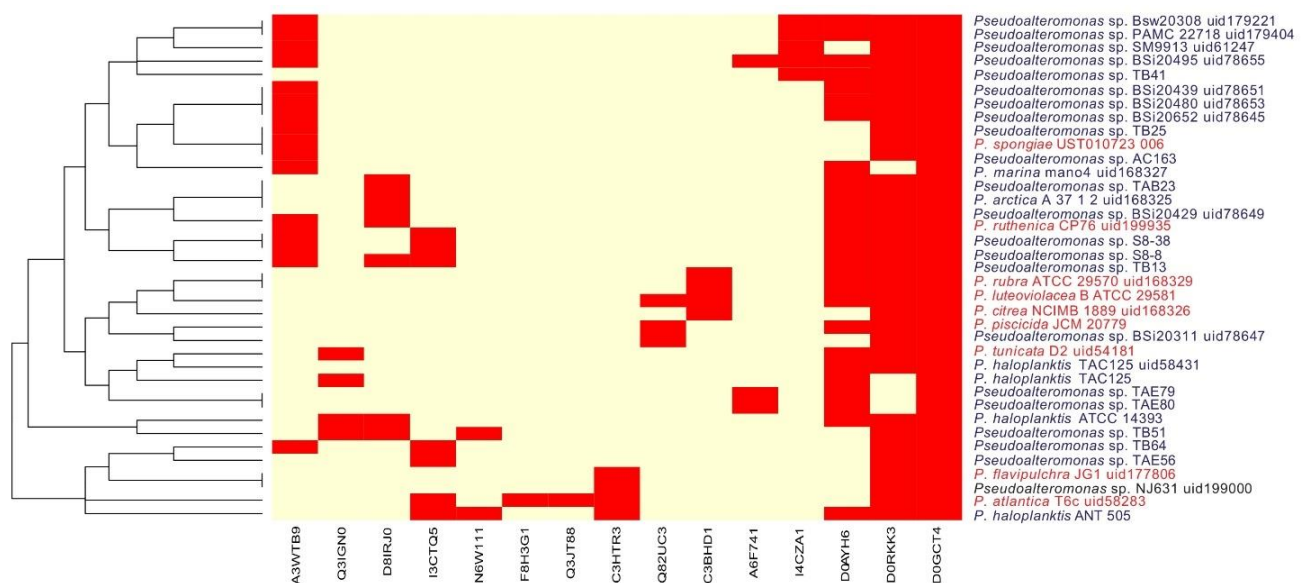


Рисунок 10 –Тепловая карта (heatmap) кластеризации холодоактивных белков морских бактерий рода *Pseudoalteromonas*. В нижней части панели указаны идентификаторы (accession numbers) последовательностей в базе данных NCBI (адаптировано из Bosi et al., 2017)

Среди стратегий, направленных на адаптацию к холоду, выделяется устойчивость психрофилов к активным формам кислорода (АФК, ROS), специфическое смещение в использовании определенных кодонов, влияющее на устойчивость белков к старению – циклизацию и деамидирование аспарагина, и большое количество генов рРНК и тРНК, чем можно объяснить эффективность трансляции даже при низких температурах (Parrilli et al., 2021; Bosi et al., 2017). Интеграция геномных, экспрессионных и транскрипционных данных с физиолого-экологическими сведениями для морских гетеротрофных бактерий позволяет создавать метаболические модели в масштабе геномов, которые можно использовать для предсказания фенотипов и для направленного дизайна экспериментов по оптимизации метаболических и биотехнологических возможностей штаммов (Bosi et al., 2017; Karan et al., 2020; Christensen et al., 2021) (рис. 10).

В связи с вышесказанным, использование данных секвенирования генома позволяет более информативно и точно классифицировать, и идентифицировать представителей бактерий и архей, а также создавать базы данных геномов с корректной таксономической информацией для изучения прокариотического разнообразия и открытия новых видов и родов. Современная интегрированная база данных должна содержать таксономическую иерархию бактерий и архей, представленную генами 16S рРНК и геномными последовательностями под контролем качества секвенирования (Yoon et al., 2017; Parte et al., 2020). Так, в базу данных EzBioCloud вошли 61700 видов/филотипов, в том числе 13132 с достоверными названиями, и 62362 полногеномные сборки с установленным родом, видом и подвигом (Yoon et al., 2017). Для каждого рода или таксона более высокого уровня были рассчитаны геномные характеристики, такие как размер генома и содержание Г+Ц в ДНК, а также встречаемость в микробиоме человека. Эта объединенная база таксономических данных оснащена дополнительными биоинформатическими инструментами для анализа генов и геномов, так как практически идентичные последовательности генов 16S рРНК не могут гарантировать принадлежность двух штаммов к одному и тому же виду (Kim et al., 2014; Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2021, 2024; Balabanova et al., 2023). В связи с этим, для определения видовых границ было предложено несколько общих индексов родства геномов (OGRI) (Chun et al., 2014). Так, средняя нуклеотидная идентичность ANI (Richter, Rosselló-Móra, 2009) и OrthoANI (Lee et al., 2016) определяет видовую границу на уровне 95–96 % (рис. 11). Как и в случае с геном 16S рРНК, создание курируемой базы данных геномов всех типовых штаммов является необходимым условием для более широкого применения таксономии на основе геномики (Yoon et al., 2017; Parte et al., 2020). В настоящее время в первичных публичных базах данных, таких как NCBI Assembly Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly), доступно более 70000 геномных последовательностей. Несмотря на то, что эти геномы обладают большим потенциалом в качестве ресурса для фундаментальной, прикладной и клинической

микробиологии, их метаданные, такие как таксономические названия, требуют существенной проверки и валидации. Поэтому интеграция более 62000 геномов, прошедших качественную фильтрацию на платформах, подобных EzBioCloud (www.ezbiocloud.net/), позволяет составлять полные отчеты о содержании Г+Ц в ДНК, размерах геномов, количестве кодирующих последовательностей (CDS), длине CDS и межгенных областей, функциональной аннотации каждой CDS, количестве генов 16S рРНК и других важных геномных характеристиках каждого таксона (Yoon et al., 2017; Parte, et al., 2020) (рис. 11).

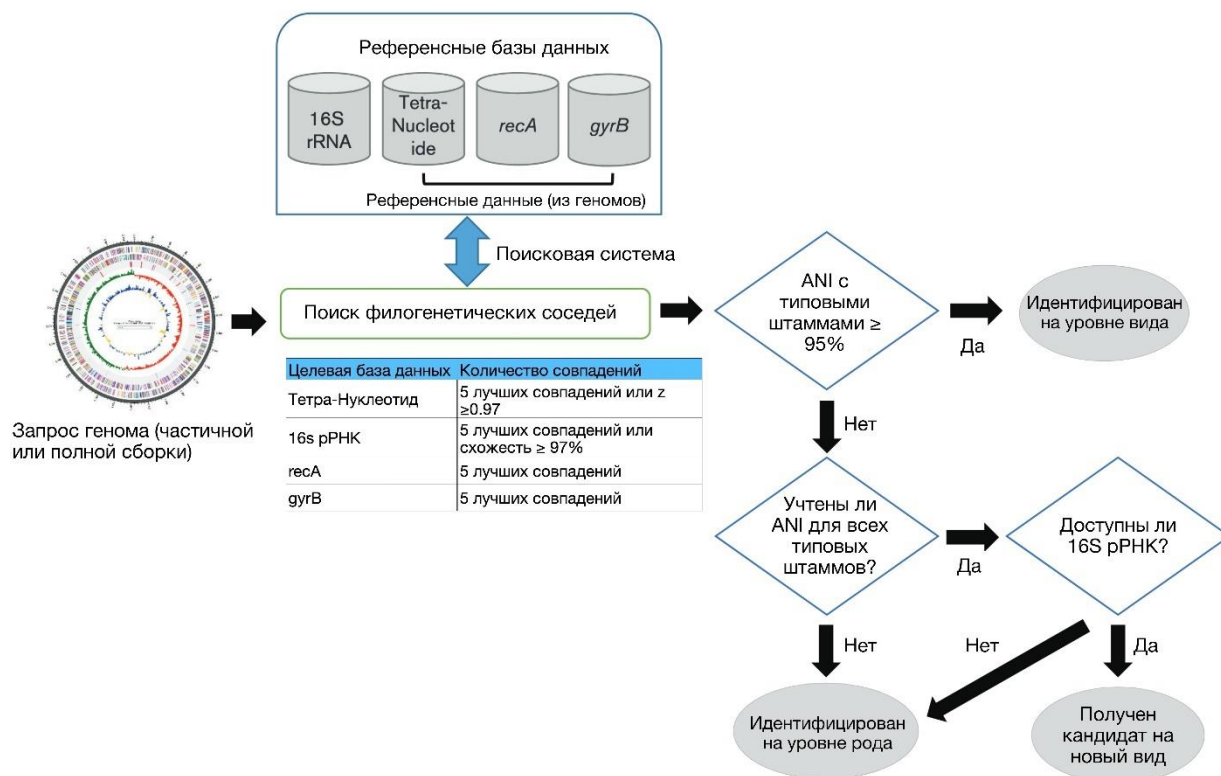


Рисунок 11 – Схема алгоритма таксономической идентификации бактерий на основе анализа черновых (*draft*) или завершенных (*complete*) сборок геномов (хромосомы и плазмиды) с использованием платформы EzBioCloud. Новые виды вносятся в базу при условии наличия валидно опубликованной последовательности 16S рРНК (адаптировано из Yoon et al., 2017)

2.4 Метаболическая специфика и трофическая дифференциация морских гетеротрофных бактерий

Гетеротрофные бактерии перерабатывают значительную часть растворенных органических веществ (РОВ), но предпочтение в использовании определенных питательных субстратов зависит от метаболических свойств всего микробного сообщества, к которому они принадлежат. Ряд исследований показывает, что происхождение РОВ, в свою очередь, влияет на таксономический состав микробных сообществ (Giovannoni, Stingl, 2005; Salazar, Sunagawa, 2017), и его метаболические предпочтения могут вносить вклад в структуру сообщества

(Osterholz et al., 2016; Datta et al., 2016; Teeling et al., 2016; Buchan et al., 2014; Forchielli et al., 2022). Например, гетеротрофы, связанные с фитопланктоном, демонстрируют предпочтение к ассимиляции аминокислот, небольших серосодержащих и одноуглеродных соединений (Amin et al., 2015; Durham et al., 2019; Ferrer-González et al., 2020). Выявление связей между составом РОВ и метаболизмом гетеротрофных бактерий имеет ключевое значение для понимания экологических факторов, лежащих в основе круговорота углерода в океанических экосистемах. Это могло бы улучшить глобальные модели морских микробных процессов, в которых обычно предполагается, что гетеротрофы выполняют схожие метаболические задачи (Weitz et al., 2015). В связи с этим, получение четкого представления о возможностях утилизации разных форм углерода отдельными штаммами в зависимости от их таксономической принадлежности представляется важным шагом к пониманию того, как гетеротрофные бактерии влияют на круговорот углерода в морской среде. Было предположено, что информацию о субстратных предпочтениях различных гетеротрофов можно получить из их геномов, однако на практике оказалось, что анализ данных секвенирования демонстрирует ограниченные возможности предсказания фенотипов микроорганизмов и функции их сообществ (Burga, Lehner, 2012; Reed et al., 2014; Choi et al., 2016; Mallick et al., 2019; Forchielli et al., 2022). Так, в недавнем исследовании микробиома кишечника человека по метаболическим моделям удалось воспроизвести рост только 10 из 40 предсказанных штаммов, что говорит о том, что геномная информация в сочетании с литературными данными недостаточна для описания сложности метаболизма бактерий (Tramontano et al., 2018). Forchielli et al. (2022) предложили в качестве альтернативы определение условий для роста отдельных штаммов на тех или иных источниках углерода и их фенотипических профилей, которые дают прямое представление о метаболических предпочтениях и стратегиях роста бактерий. Такие измерения все чаще проводятся для характеристики коллекций микроорганизмов из разных биомов (Ernebjerg, Kishony, 2011; Wiegand et al., 2020). В идеальном случае необходимо анализировать фенотипические профили в сочетании с геномами организмов, чтобы получить представление о генах и путях, которые обуславливают метаболические предпочтения (Zimmermann et al., 2021). На сегодняшний день несколько количественных моделей фенотипических профилей были получены с использованием синтетических сред (Forchielli et al., 2022). Анализ разнообразия метаболических предпочтений многих репрезентативных гетеротрофов путем систематического выращивания их на различных фракциях РОВ показал, что разные филогенетические клады бактерий существенно отличаются по этому показателю. Некоторые предпочтения углеродных источников бактериями оказались связанными с наличием определенных генов и метаболических путей, что отражает связь между их метаболическими возможностями и экологическим образом жизни. Однако лабораторные исследования дают лишь общее

представление о способах влияния на метаболическую активность гетеротрофных бактерий в океане, поскольку полная картина микробного роста включает в себя гораздо больше факторов, чем количество и структура источников углерода (Forchielli et al., 2022). К ним относятся, например, влияние доступности других питательных веществ, ландшафт РОВ в толще воды, биотические взаимодействия конкурентной среды и другие условия. Более ранние работы также показали, что элементная стехиометрия РОВ оказывает сильное влияние на функционирование микробного сообщества, что подтверждает экологическую значимость разработки фенотипических моделей ассимиляции источников углерода (Teeling et al., 2016; Bryson et al., 2017; D'Andrilli et al., 2019; Forchielli et al., 2022).

Forchielli et al. (2022) провели фенотипирование 63-х штаммов гетеротрофных бактерий, представляющих основные морские филотипы, на основе систематического анализа их метаболических предпочтений во время роста на различных органических средах, содержащих избыток азота, фосфора, серы, солей, микроэлементов и витаминов и одного из 8-ми классов углеродсодержащих соединений: пептидов, аминокислот, липидов, дисахаридов, органических кислот, нейтральных сахаров, аминосахаров и кислых сахаров (рис. 12). Создавая упрощенные среды, которые имеют различные фракции молекулярных компонентов морского РОВ, авторы охарактеризовали метаболические свойства различных репрезентативных гетеротрофов из 5-ти филотипов и 29-ти семейств. Полученные фенотипы были сопоставлены с результатами филогенетического анализа, наличием генных кластеров и активизацией определённых метаболических путей в ответ на присутствие определенных источников углерода. Все штаммы морских гетеротрофов росли, по крайней мере, на одной из 8-ми углеродсодержащих сред, достигая максимальных значений оптической плотности (макс. изменение, OD_{600}) (рис. 12). Разные среды приводили к разным показателям продуктивности штаммов (рис. 12). Несмотря на то, что в экспериментах по выращиванию бактерий обычно используют нейтральные сахара (глюкоза, арабиноза и пр.), рост при их использовании был минимальным, тогда как применение сред с пептидами и аминокислотами в качестве основных источников углерода приводили к наибольшему объему биомассы для многих штаммов бактерий (рис. 12). Причина этого не ясна, учитывая тот факт, что не было усиленного роста на среде с аминосахаром (одной из самых низкоэнергетических сред в данном эксперименте), которая содержит значительно больше азота, чем неаминные среды (рис. 12). Более того, регрессионный анализ показал, что связь между изменением оптической плотности среды (OD_{600}) и количеством азота в среде очень слабая (Forchielli et al., 2022). Таким образом, избыток азота, скорее всего, не является основной или единственной причиной экстенсивного роста бактерий на аминокислотах, другим объяснением может быть энергетическое преимущество в использовании готовых аминокислот по сравнению с их биосинтезом *de novo* (Payne, Wiebe, 1978). Кроме того, некоторые штаммы достоверно

демонстрировали незначительный рост на среде без добавления источников углерода (рис. 12). Таким образом, нельзя исключить возможность того, что эти штаммы способны использовать для роста другие соединения, помимо добавленных источников углерода, например, внутренние запасы углерода (Alvarez et al., 1997; Rontani et al., 1999), либо они обладают способностью переходить на автотрофный или хемогетеротрофный образ жизни, включая фиксацию CO_2 (Moran, Miller, 2007; Muthusamy, 2016; Maeda, Abe, 2022) (рис. 12).

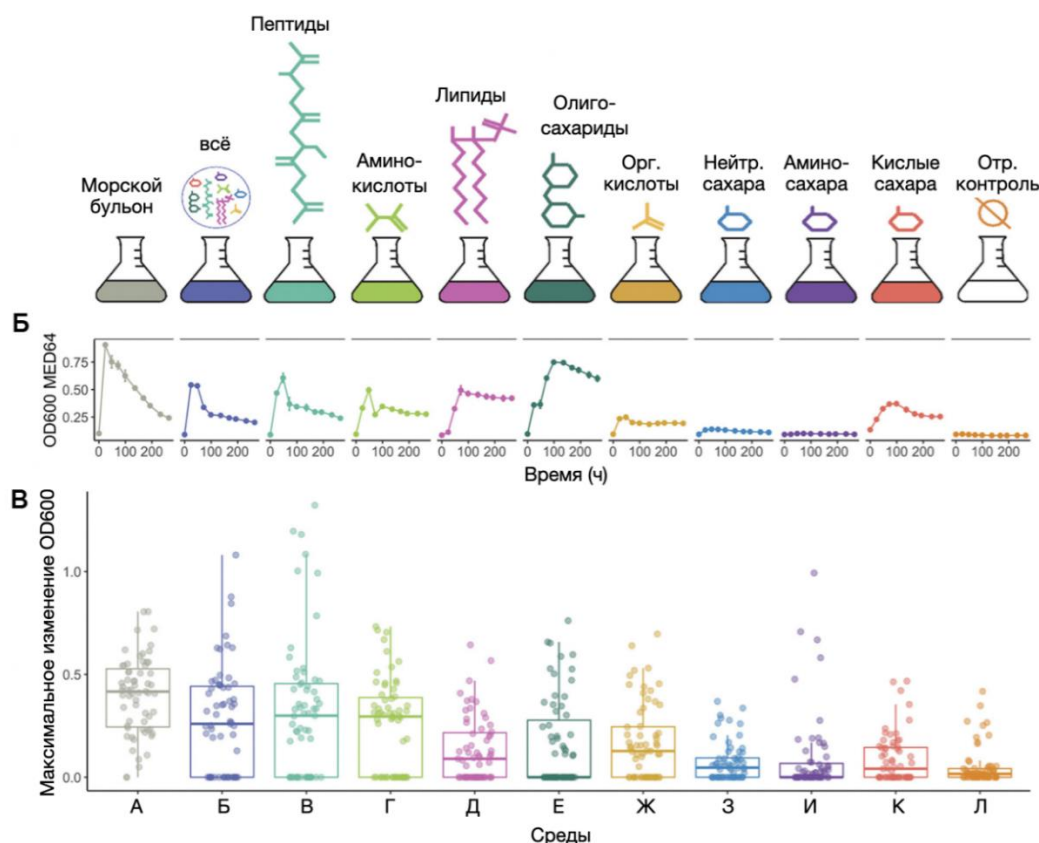


Рисунок 12 – А. Экспериментальная схема определения метаболических профилей морских гетеротрофных бактерий. Штаммы выращивали на 11 вариантах модифицированной среды Marine Broth (Difco), содержащих индивидуальные источники углерода восьми различных классов (А–К на оси х), смесь всех субстратов («всё») и отрицательный контроль без источника углерода (Л). Рост оценивали по значению OD_{600} в течение 264 ч. Б. Характерные кривые роста на примере штамма *Alteromonas mediterranea* MED64. В. Максимальные значения OD_{600} (относительно начального момента времени), достигнутые каждым штаммом на всех исследованных средах. Данные представлены в виде диаграмм размаха (boxplot), где точки соответствуют индивидуальным значениям (с горизонтальным джиттером для визуализации), горизонтальная линия – медиане, границы прямоугольника – квартилям. Примечание – Незначительный рост некоторых штаммов в отрицательном контроле (Л) может быть обусловлен утилизацией неуглеродных компонентов среды, фиксацией CO_2 или использованием внутриклеточных резервов (адаптировано из Forchielli et al., 2022)

На основе метаболического фенотипирования гетеротрофные бактерии можно разделить на два основных и 7 более мелких кластеров (рис. 13). Кластеры можно описать в терминах уникальных метаболических «сигнатур», т. е. различных наборов классов углерода, на которых штаммы достигали сходного роста биомассы. Шесть основных кластеров разделяются на две категории метаболических профилей: одна группа (кластеры 1, 3 и 4) включает организмы, которые интенсивно растут на аминокислотах и относительно слабо на органических кислотах (рис. 13 А, Б).

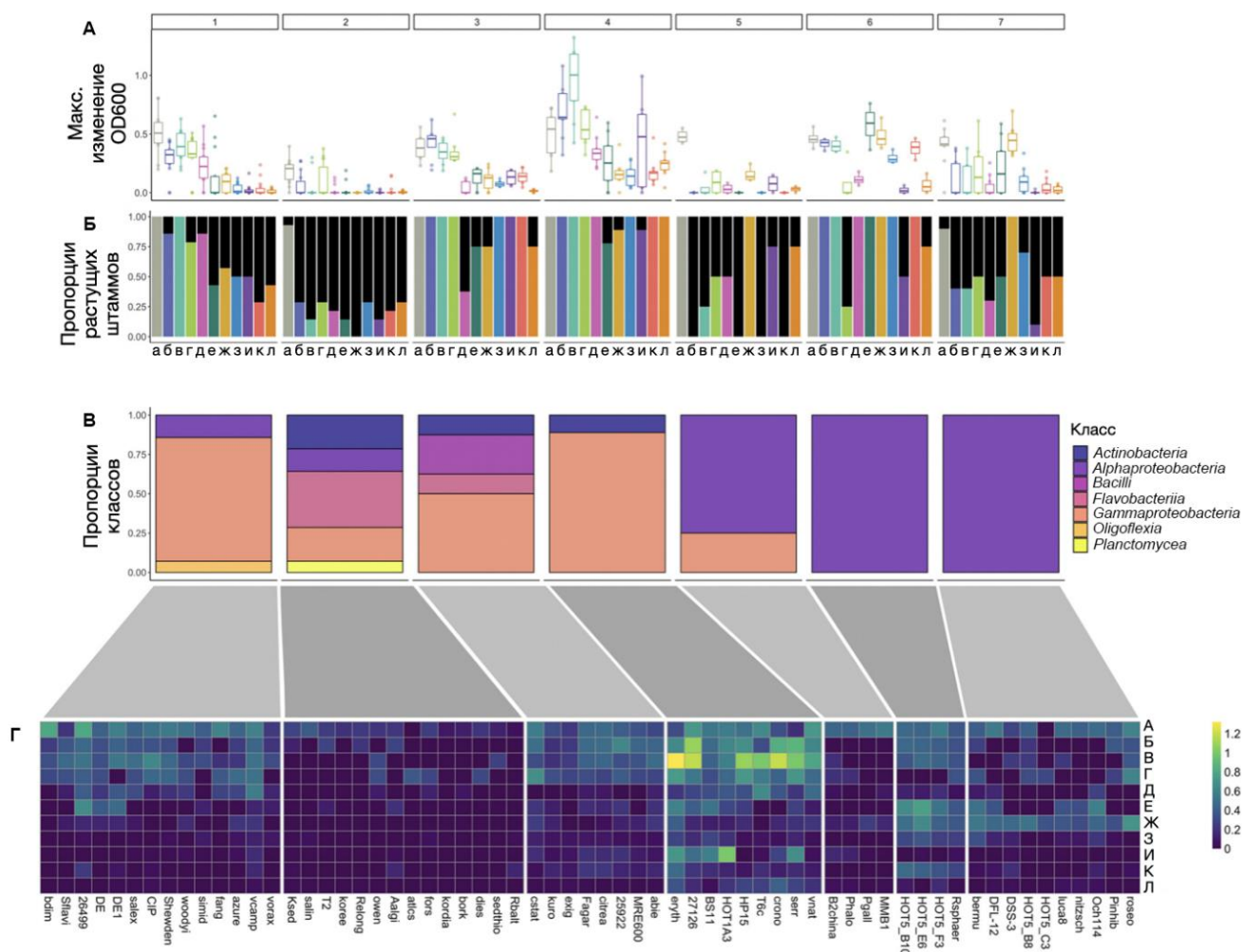


Рисунок 13 – Кластеризация профилей роста (OD_{600}) исследуемых штаммов на средах А–Л (обозначения см. на рис. 12). А. Максимальные значения OD_{600} для кластеров 1–7.

Представлены диаграммы размаха по средам А–Л; цветовая панель справа соответствует таксономическим классам микроорганизмов. Например, кластер 4 объединяет штаммы, активно растущие на пептидосодержащей среде (В). Б. Доля штаммов с положительным ростом на каждой среде в пределах каждого кластера. В. Таксономический состав кластеров на уровне классов бактерий (согласно цветовой легенде). Г. Тепловая карта (heatmap) кластеризации максимальных значений OD₆₀₀ для каждой комбинации «штамм (ось x) / среда (ось y)» (адаптировано из Forchielli et al., 2022)

Кластеры 1, 3 и 4 обогащены представителями класса *Gammaproteobacteria* (рис. 13). Известно, что органические кислоты являются побочными продуктами аэробного роста некоторых прокариот и могут иметь концентрационнозависимый ингибирующий эффект (Carpenter, Broadbent, 2009; Pinhal et al., 2019). Кластеры 6 и 7 состоят из организмов, которые производят значительно больше биомассы при выращивании на среде с органическими кислотами по сравнению со средой с аминокислотами (рис. 13 А, Б). Эти кластеры сильно обогащены бактериями класса *Alphaproteobacteria*. Вероятно, высокие концентрации некоторых аминокислот негативно влияют на рост этих бактерий (Barbara, Mitchell, 2003). Кластер 5 повторяет кластеры 6 и 7, но показатели роста бактерий, входящих в него, значительно меньше, а наблюдаемые различия не являются статистически значимыми (рис. 13 А, Б). Оставшийся кластер (2) филогенетически очень разнообразен, при этом классы бактерий *Flavobacteriia* и *Actinobacteria* заметно преобладают (рис. 13). В целом, штаммы кластера 2 не имеют предпочтений в отношении источника углерода, однако растут неустойчиво на всех типах сред, что может указывать на потребность в дополнительных факторах роста или условиях среды, не предоставленных в тестируемых условиях (рис. 12, 13).

Таким образом, метаболические особенности гетеротрофов определяются возможностью оптимизации роста либо на аминокислотах, либо на органических кислотах, но не на обоих источниках РОВ (рис. 12, 13).

В другом исследовании, посвященном доминирующим группам гетеротрофных бактерий в сообществе с морскими цианобактериями *Synechococcus*, было показано, что представители альфа-протеобактерий семейства *Rhodobacteraceae* (тип *Pseudomonadota*) имеют больше АВС-транспортеров для использования более широкого спектра источников углерода, чем флавобактерии семейства *Flavobacteriaceae* (тип *Bacteroidota*) и гамма-протеобактерии семейства *Alteromonadaceae* (тип *Pseudomonadota*) (Xia et al., 2021). Более того, у гамма-протеобактерий было больше транспортеров для импорта фосфатов и аминокислот, но меньше транспортеров для импорта олигосахаридов, полиолов и липидов, чем у флавобактерий. Метагеномный анализ в данном исследовании показал, что во всех смешанных культурах преобладают бактерии, участвующие в нитрат-аммонификации, а сети метаболических путей сообществ, сформированных фитопланктоном и гетеротрофными бактериями, зависят от местообитания, где различные доминирующие гетеротрофы играют разную роль (Xia et al., 2021). Многие гетеротрофы способны диссимилировать и/или ассимилировать соединения серы, тяжелых металлов и CO₂ (факультативный анаэроб), влияя на общий круговорот углерода и экологию в акваториях, особенно в условиях тенденции к глобальному потеплению Мирового океана (Shirokova et al., 2015; Muthusamy, 2016; Braun et al., 2021). Примечательно, что в основе таких метаболических взаимоотношений между самыми распространенными микроорганизмами

океана, составляющими фитопланктон, и гетеротрофными бактериями лежит хемотаксис (Stocker, Seymour, 2012; Raina et al., 2023).

При сравнительном анализе филогенетических и метаболических дистанций между штаммами интересным оказался тот факт, что эти показатели плохо коррелируют с их полученными метаболическими профилями (рис. 14). В связи с этим, в результате линейной регрессии была выявлена несущественная связь между метаболическими профилями роста и последовательностями геномов (Forchielli et al., 2022). То же самое наблюдалось и при сравнении результатов кластеризации профилей роста и генных кластеров (модулей), соответствующих данным Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG), которые могут лучше аппроксимировать метаболическое расстояние между штаммами (Kanehisa et al., 2025) (рис. 14). В целом, глобальные геномные данные не отражают различий в метаболических фенотипах, наблюдаемых между штаммами (Forchielli et al., 2022). Одно из возможных объяснений таких наблюдений заключается в том, что гены, играющие ключевую роль в дифференциации роста на различных источниках углерода, «заглушаются» наличием множества неинформативных для транскриптов, которые не оказывают влияния на результаты данного эксперимента (рис. 14).

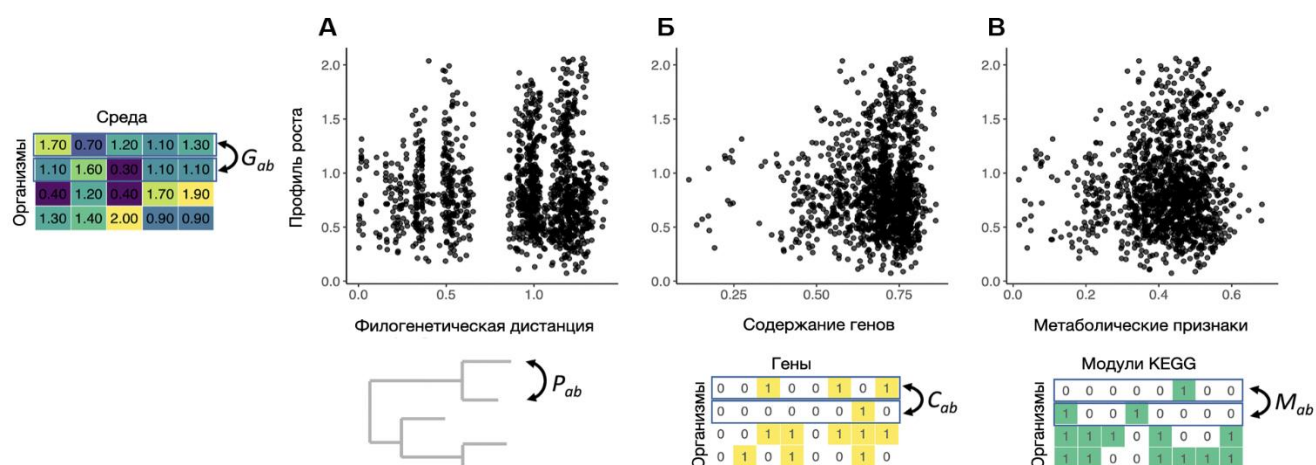


Рисунок 14 – Анализ корреляции геномных расстояний между парами штаммов (ab) и их фенотипического сходства. А. Филогенетическое расстояние P_{ab} . Б. Геномное расстояние C_{ab} . В. Расстояние на основе метаболических модулей KEGG M_{ab} . Геномные показатели сравниваются с фенотипическим расстоянием G_{ab} между профилями роста. Установлено, что геномные дистанции обладают низкой прогностической ценностью в отношении различий в профилях роста. Ось y на всех панелях – евклидово расстояние между профилями роста (по значениям максимальной OD_{600}); ось x: (А) – кофенетическое расстояние, (Б) и (В) – расстояние Жаккара между бинарными векторами (адаптировано из Forchielli et al., 2022)

Учитывая слабую корреляцию между метаболическим расстоянием и общим содержанием генов и филогенетическим расстоянием, необходимо анализировать отдельные

гены или биосинтетические генные кластеры (пути) в вариабельном геноме каждого штамма определенного таксона (пангеноме), учитывая его рост на каждой среде (Forchielli et al., 2022). Если посмотреть на список отдельных генов, имеющих значительную корреляцию с ростом штамма, то можно заметить, что более 300 из 1000 наиболее сильно коррелирующих генов связаны с ростом на среде с органическими кислотами (рис. 15).

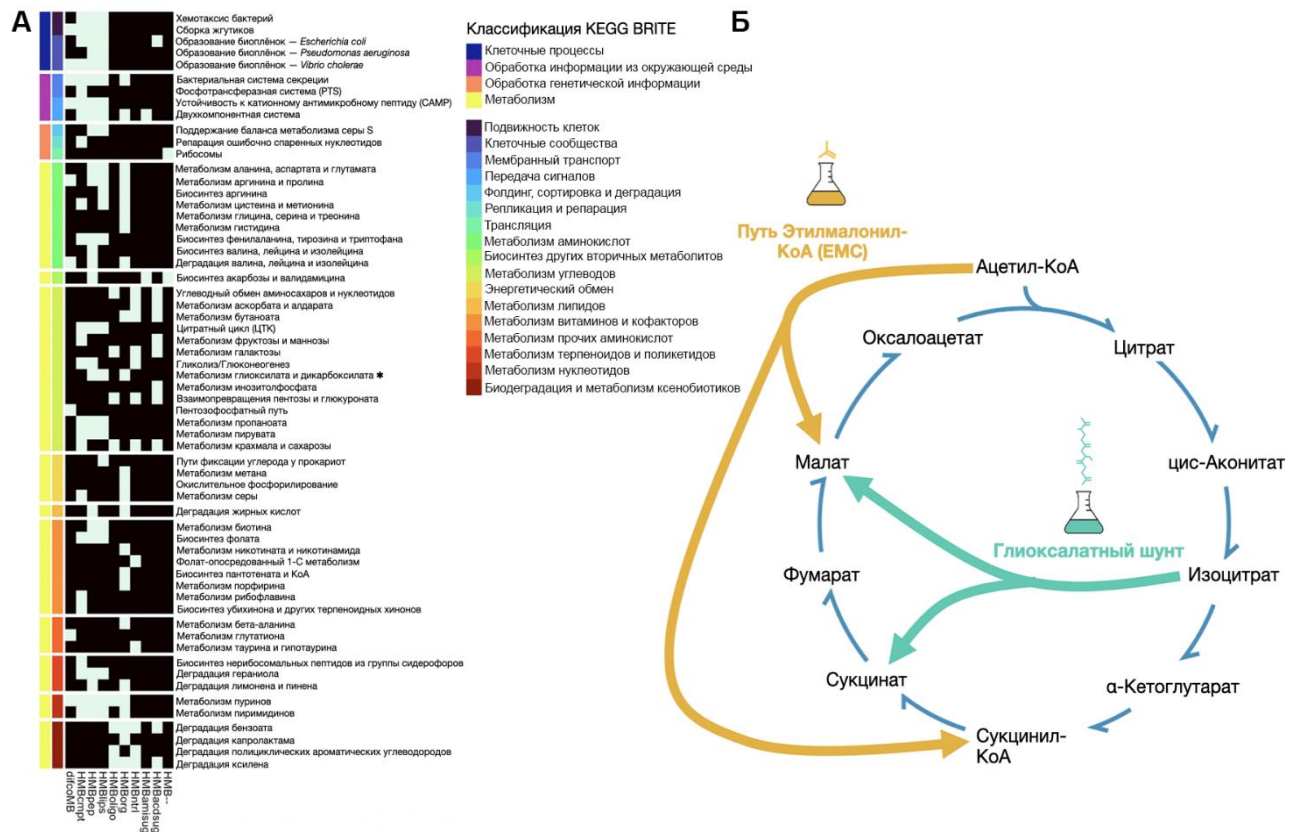


Рисунок 15 – Рост бактериальных штаммов на однокомпонентной среде связан с повышением уровней экспрессии генов определенных метаболических путей: А. Тепловая карта показывает высокоэкспрессируемые гены для каждой среды (обозначения внизу: НМВ – отрицательный контроль, НМВacdsug – кислые сахара, НМВamisug – аминсахара, НМВntrl – нейтральные сахара, НМВogr – органические кислоты, НМВoligo – олигосахариды, НМВlips – липиды, НМВvrep – пептиды, НМВvcmpt – все компоненты, difcoMB – морской бульон). Список метаболических путей представлен на панели справа в соответствии с классификацией KEGG. Для каждой среды высокоэкспрессируемые гены окрашены в бледно-голубой цвет. Черный цвет означает отсутствие статистически значимого обогащения транскриптов отдельных генов данного пути. Пути KEGG аннотированы цветами, соответствующими их классификации в базе данных BRITE (Kanehisa et al., 2025). Б. Метаболический путь этилмалонил-CoA (EMC) представлен в KEGG как часть пути метаболизма глиоксилатов и дикарбоксилатов (звездочка на панели А). Путь EMC задействован у бактерий при росте на органических кислотах. Этот путь является многофункциональным и может использоваться для ассимиляции органических кислот в качестве альтернативы глиоксилатному шунту (адаптировано из Forchielli et al., 2022)

Наоборот, при росте на среде с аминокислотами в геномах штаммов не было выявлено ни одного уникального гена (синглтона) несмотря на то, что эта среда поддерживает высокий рост ряда штаммов. Одна из возможных интерпретаций этого различия заключается в том, что растущие на органических кислотах организмы обычно используют узкоспециализированный и достаточно последовательный набор метаболических путей, тогда как организмы, растущие на аминокислотной среде, используют различные подмножества из общих путей метаболизма 20-ти аминокислот (рис. 15 А). Напротив, среды на основе простых углеводов не вызывают активность метаболических путей, вовлеченных в метаболизм аминокислот, при этом возбуждают KEGG-пути, вовлеченные в метаболизм галактозы, крахмала и сахарозы, а также во взаимопревращения между пентозными моносахаридами и глюкуроном, продуктом деградации альгината (Teske et al., 2011; Forchielli et al., 2022; Kanehisa et al., 2025). В случае использования сред, лишенных углеводов, бактериальный транскриптом не обогащен продуктами путей деградации углеводов (рис. 15 А). Вместо этого повышается экспрессия генов глиоксилатных и дикарбоксилатных путей, для которых запасы углеводов могут пополняться из предшественников аминокислот (Koedooder et al., 2018; Forchielli et al., 2022) (рис. 15 Б, 16).

В других случаях рост на определенной категории углеводов связан с путями, которые могут быть вовлечены в утилизацию этих соединений, но не затрагивают основные пути метаболизма. Например, у организмов, растущих на органических кислотах, выявлено превалирование транскриптов определенных участков пути этилмалонил-КоА (ЕМС), который хорошо описан при ассимиляции двухуглеродных соединений и биосинтеза углеводов из жирных кислот (Peugaud et al., 2009) (рис. 15 А, 16).

Примечательно, что путь ЕМС является альтернативой глиоксилатному шунту, который используется бактериями для поддержания анаплеротических реакций цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) во время роста на C2-субстратах, например, ацетате (рис. 15 Б, 16).

Глиоксилатный шунт – это двухступенчатый метаболический путь, встречающийся у аэробных бактерий, который служит альтернативным маршрутом в классическом цикле ЦТК (рис. 16). Основная функция глиоксилатного шунта заключается в обходе этапа производства CO₂ в ходе ЦТК, чтобы стимулировать метаболизм жирных кислот и двухуглеродных соединений, таких как ацетат, для производства оксалоацетата, который в дальнейшем может служить предшественником в глюконеогенезе (рис. 16).

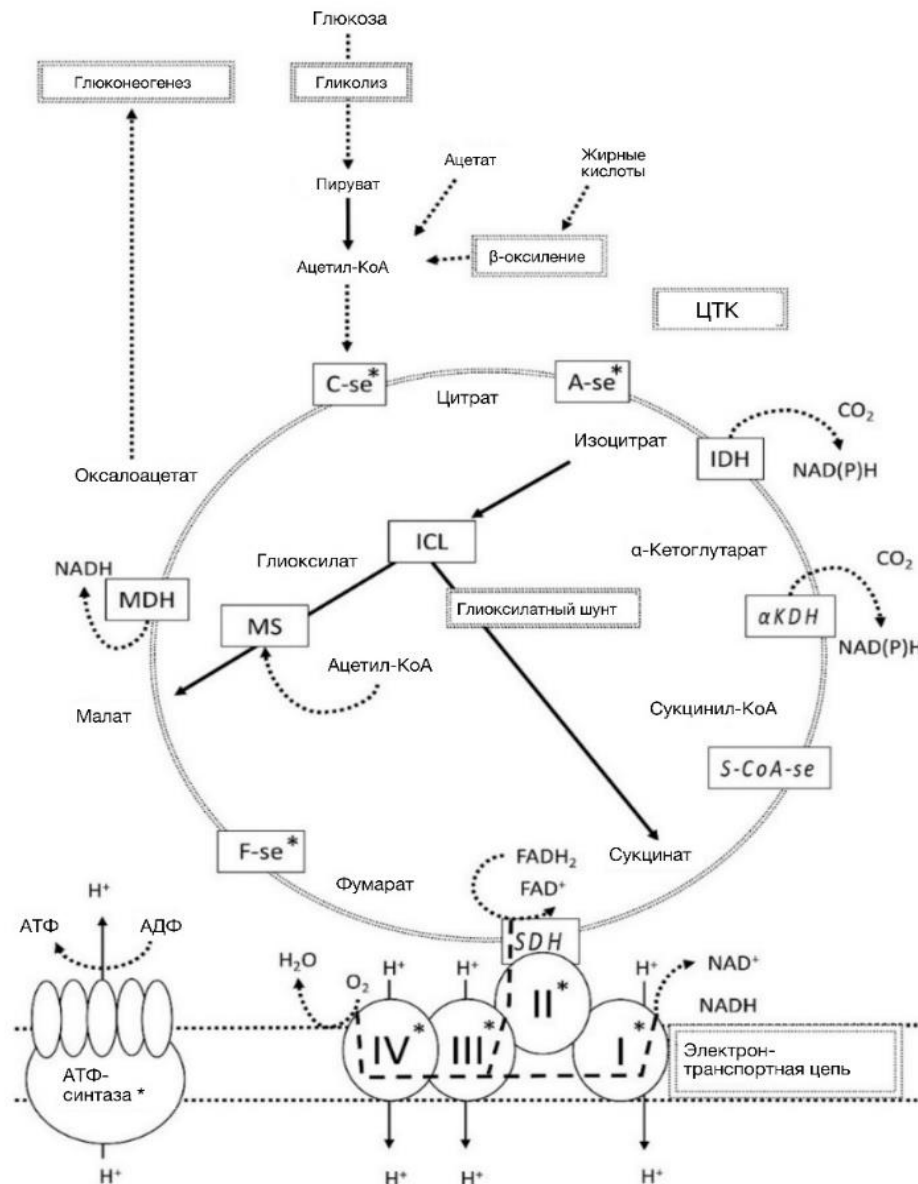


Рисунок 16 – Схема цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и электронтранспортной цепи (ЭТЦ).

Двойной линией обведены основные компоненты метаболизма, одинарной линией – используемые ферменты, рядом указаны предшественники и метаболиты. Глиоксилатный шунт

(жирные сплошные линии) образует оксалоацетат для глюконеогенеза в обход реакций декарбоксилирования ($\uparrow \text{CO}_2$). Электроны НАДН (NADH) или ФАДН₂ (FADH₂) поступают в комплексы ЭТЦ I или II (жирные пунктирные линии) для синтеза АТФ. SDH – комплекс II. * –

Fe-содержащие ферменты ЦТК и ЭТЦ. C-se – цитратсинтаза; A-se – аконитаза; IDH – изоцитратдегидрогеназа; ICL – изоцитрат-лиаза; α -KDH – альфа-кетодегидрогеназа; S-coA-se – сукцинил-КоА-синтаза; SDH – сукцинатдегидрогеназа; F-se – фумараза; MS – малат-синтаза; MDH – малат-дегидрогеназа; Q – хинон; I, II, III, IV – комплексы ЭТЦ (адаптировано из Koedooder et al., 2018)

Глюкоза подвергается гликолизу с образованием пирувата, который преобразуется в ацетил-КоА и вместе с оксалоацетатом входит в ЦТК с образованием цитрата (рис. 16). При росте бактерий на ацетате или жирных кислотах, эти субстраты могут также превращаться в ацетил-

КоА, но дальнейший биосинтез углеводов – глюконеогенез, происходит только путем глиоксилатного шунта, поскольку путь от пирувата до ацетил-КоА в ЦТК необратим. Глиоксилатный шунт обходит производство CO_2 , образуя сукцинат и малат/оксалоацетат с помощью всего двух ферментов – изоцитратлиазы (ICL) и малатсинтазы (MS) (рис. 16). Метаболизм жирных кислот и ацетата в отсутствие глиоксилатного шунта является просто катаболическим процессом, при котором производство углеводов невозможно из-за необратимого превращения пирувата в ацетил-КоА в результате гликолиза (Koedooder et al., 2018). По этой причине индукция глиоксилатного шунта связана с анаболическими путями. Что еще более важно, глиоксилатный шунт обходит этапы производства НАДН (NADH), который необходим в ЭТЦ для производства АТФ (рис. 16). Индукция глиоксилатного шунта может представлять собой одну из ключевых стратегий обхода морскими гетеротрофами железодефицитных условий, так как Fe в поверхностных водах океана присутствует в следовых количествах ($<0,1 \text{ нМ}$) (Koedooder et al., 2018). У космополита *P. aeruginosa* в условиях Fe-лимитирования и окислительного стресса также наблюдалась индукция глиоксилатного шунта (Ahn et al., 2016; Ha et al., 2018). В целом, этот путь служит стратегией метаболической акклиматизации для бактерий. У гетеротрофных бактерий лимит Fe – важного кофактора многих ферментов, в том числе ЦТК, особенно влияет на производство АТФ (рис. 16).

По оценкам специалистов, около 90 % общего клеточного поглощения Fe у гетеротрофных бактерий используется в комплексах I, II, III и IV ЭТЦ, где оно служит кофактором для различных Fe-редокс-ферментов, таких как цитохромы и кластеры Fe:S (Koedooder et al., 2018). Поэтому Fe-лимитирование может резко сократить как рост из-за снижения метаболизма, так и дыхание бактерий из-за неэффективности ЭТЦ, что, соответственно, скажется на эффективности реминерализации органического углерода. Однако некоторые гетеротрофные бактерии могут перестраивать свой метаболизм, чтобы минимизировать зависимость от Fe-содержащих ферментов и Fe-зависимых путей. Во многих исследованиях сообщалось о кардинальных изменениях в физиологии гетеротрофных бактерий (физиологическая пластичность) за счет регуляции цикла ЦТК, гликолиза и окислительного фосфорилирования в ответ на ограничение содержания Fe (Fourquez et al., 2014, Koedooder et al., 2018).

Существуют две стратегии, с помощью которых бактерия может перестроить свой метаболизм, чтобы справиться с Fe-стрессом (Caza, Kronstad, 2013). Во-первых, она может увеличить производство молекул, поглощающих Fe, таких как сидерофоры, или увеличить количество и разнообразие ферментов Fe-транспортеров (Wiens et al., 2014; Sasnow et al., 2016). Во-вторых, бактерия может снизить свою зависимость от Fe-содержащих ферментов. Например, в рамках цикла ЦТК морская гетеротрофная гамма-протеобактерия *Alteromonas macleodii* может

заменить Fe-зависимую на Fe-независимую фумаразу C (Fourquez et al., 2014). Другой пример – перенаправление производства АТФ с окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи на менее Fe-зависимый путь гликолиза (Fourquez et al., 2014). Так, Fe-лимитирование повышало индукцию глиоксилатного шунта в *E. coli* и морской прибрежной гамма-протеобактерии *Photobacterium angustum* S14 семейства *Vibrionaceae* (Koedooder et al., 2018). Интересно отметить, что фотоактивный ретиналь-содержащий белок протейородопсин, обнаруженный у морских планктонных бактерий, архей и динофлагеллят, также индуцирует глиоксилатный шунт в присутствии света (Palovaara et al., 2014). Протейородопсин – управляемый светом протонный насос, связан с синтезом АТФ и одновременным перенаправлением ЦТК на глиоксилатный шунт для увеличения эффективности биосинтеза. Было предположено, что глиоксилатный шунт связан с адаптацией к условиям, приводящим к неэффективности ЭТЦ (рис. 16). Например, при ограничении аэрации (лимитирования O_2) штаммы *Mycobacterium tuberculosis* индуцируют глиоксилатный шунт и восполняют НАД⁺ для производства АТФ посредством гликолиза (Eoh, Rhee, 2013; Koedooder et al., 2018). Повышение уровня активности глиоксилатного пути также наблюдалось у штаммов *P. aeruginosa*, обладающих устойчивостью к антибиотикам, направленным на ЭТЦ (Meylan et al., 2017). Связь между глиоксилатным шунтом и окислительным стрессом при дефиците Fe наблюдалась у ряда других штаммов (Ahn et al., 2016; Meylan et al., 2017; Ha et al., 2018). В условиях сильно выраженного Fe-лимитирования у штаммов морских бактерий *A. macleodii*, не способных индуцировать глиоксилатный шунт (мутация Δicl), наблюдалась более низкая скорость дыхания (Fourquez et al., 2014). Окислительное дыхание, осуществляемое посредством ЭТЦ, неизбежно приводит к образованию АФК (Lesser, 2006). Производство АФК может быть нейтрализовано Fe-зависимыми ферментами, такими как супероксиддисмутаза и пероксидаза/каталаза, которые преобразуют молекулы АФК в H_2O_2 с последующим высвобождением нейтральных молекул H_2O и O_2 (Tiwari et al., 2002). В связи с этим, нарушение или повышение неэффективности ЭТЦ, например, в результате Fe-лимитирования, может привести к увеличению восприимчивости некоторых бактерий к окислительному стрессу и накоплению АФК и H_2O_2 внутри клетки (Leaden et al., 2018; Koedooder et al., 2018). Однако морская бактерия *P. angustum* S14 известна своей устойчивостью к ультрафиолету и высоким уровням H_2O_2 , которая обусловлена нейтрализующими действиями нескольких ферментов окислительного стресса, таких как -глиоксалаза, AhpC, RecA, а также Fe-зависимая супероксиддисмутаза и пероксидаза (Ostrowski et al., 2001; Matallana-Surget et al., 2013). Таким образом, глиоксилатный шунт в условиях Fe-лимитирования перенаправляет метаболизм клетки с окислительного фосфорилирования на другой тип энергетического обмена, снижая вероятность окислительного стресса из-за неэффективной работы ЭТЦ (рис. 16).

В ряде экспериментов ингибирование ЭТЦ антибиотиками, а не Fe-лимитированием, индуцировало глиоксилатный шунт, но не было связано со снижением скорости дыхания (Meylan et al., 2017; Koedoodeer et al., 2018). Действительно, при рассмотрении связи между активностью глиоксилатного шунта и скоростью дыхания центральную роль может играть сукцинатдегидрогеназа (SDH) - Fe-S фермент, необходимый как в ЦТК, так и в цепи переноса - электронов (рис. 16). При сильно выраженном Fe-лимитировании поток электронов, образующихся в результате всего цикла ЦТК, в основном, уменьшается из-за снижения активности комплекса I, который содержит семь Fe-S кластеров. Несмотря на снижение продукции НАДН за счет индукции глиоксилатного шунта, результаты свидетельствуют о том, что это компенсируется в значительной степени увеличением активности сукцинатдегидрогеназы (SDH) и изоцитрат-лиазы (ICL) (рис. 16). Это еще раз доказывает, что индукция глиоксилатного шунта способствует перестройке бактериального метаболизма. Культивирование на ацетате, серине и аланине в качестве единственного источника углерода показало, что источник углерода также играет значимую роль в повышении уровня ключевого фермента глиоксилатного пути, изоцитрат-лиазы (Wolfe, 2005; Blank et al., 2008; Koedoodeer et al., 2018) (рис. 15, 16). Однако изоцитрат-лиаза отсутствует у некоторых морских бактерий, таких как фотогетеротроф *Rhodobacter sphaeroid*, которые, тем не менее, обладают способностью расти на ацетате в качестве единственного источника углерода (Shimizu et al., 2019). Это обусловлено наличием у фотогетеротрофных бактерий, растущих на органических кислотах, пути этилмалонил-КоА (рис. 15) (Moran, Miller, 2007; Newton et al., 2010). Такие бактерии являются продуцентами витамина B₁₂, что является определяющей характеристикой взаимодействия эукариотического фитопланктона и гетеротрофных бактерий (Geng, Belas, 2010). Фотогетеротрофия является широко распространенной метаболической стратегией среди некоторых клад *Alphaproteobacteria*, таких как семейство *Rhodobacterales* (Moran, Miller, 2007; Newton et al., 2010). У штаммов этого семейства отсутствуют известные гены для фиксации двуокиси углерода, поэтому они не способны расти автотрофно, но используют свет для восполнения своих энергетических потребностей (Moran, Miller, 2007; Stoecker et al., 2017). Это позволяет предположить, что путь этилмалонил-КоА у фотогетеротрофных бактерий может играть двойную роль, как в ассимиляции органических кислот (рис. 15), так и фиксации CO₂ (Bill et al., 2017; Koedoodeer et al., 2018).

Таким образом, ассоциации определенных фенотипических и генотипических признаков, как и наличие характерных биосинтетических генных кластеров (БГК), могут быть сигнатурой экологической адаптации микроорганизмов, включая симбиотические отношения в микробных сообществах (Zoccarato et al., 2022). Так, рост на органических кислотах, помимо включения пути этилмалонил-КоА (ЕМС), повышал экспрессию генов KEGG-идентифицированных путей

биосинтеза кобаламина (витамина B₁₂) и бактериохлорофилла а и b (рис. 15 А). Гены пути биосинтеза фолата (витамина B₉) экспрессировались при росте на пептидах, липидах и смешанной среде (Forchielli et al., 2022). Кроме того, рост на пептидах (и липидах) связан с молекулярными механизмами подвижности клеток, включая хемотаксис и сборку жгутиков, а также с образованием биопленок (рис. 15 А). Эти признаки чаще обнаруживаются в микробных сообществах, ассоциированных с поверхностями твердых частиц на определенных стадиях сукцессии или во время цветения микроводорослей (Stocker, Seymour, 2012; Dang, Lovell, 2015; Datta et al., 2016). Способность быстро прикрепляться к поверхностям и ассимилировать аминокислоты и пептиды обеспечивает конкурентное преимущество гетеротрофов на ранних этапах колонизации белковой материи (Obayashi, Suzuki, 2005; Nagata, 2008). Кроме того, выявлены фазы цветения микроводорослей, характеризующиеся увеличением ассимиляции пептидов, связанных с определенными филогенетическими линиями морских гетеротрофов (Buchan et al., 2014; Teeling et al., 2016; Needham, Fuhrman, 2016). Таким образом, дополнительное кластерное разделение гетеротрофов на основе предпочтительного использования ими различных фракций РОВ поможет объяснить существующие наблюдения за сукцессиями, эконишами и типами взаимоотношений внутри микробного сообщества.

2.5 Психрофильные и галофильные ферменты морских микроорганизмов: молекулярные основы адаптации

Морские микроорганизмы считаются одним из самых значительных источников новых биологически активных соединений, включая вторичные метаболиты и ферменты (Zhang, Kim, 2010; Birololi et al., 2019; Jin et al., 2019; Karan et al., 2020; Parvizpour et al., 2021; Hamid et al., 2022; Auta et al., 2022; Xu et al., 2024). Ферменты – это биокатализаторы белковой природы, которые способствуют ускорению биохимических реакций как внутри клеток, так и в окружающей среде. Эти биомолекулы играют центральную роль в минерализации и круговороте веществ в различных средах обитания живых организмов. Морские микробные сообщества способны продуцировать обширный спектр ферментов в соответствии с их средой обитания и экологической ролью (рис. 17). Конкуренция между микроорганизмами за место обитания и питательные вещества в морской среде является мощной селективной силой, которая привела к эволюции их ферментных систем, предназначенных для адаптации к жизни в морских условиях (Zhang, Kim, 2010; Tendulkar et al., 2021). Многие глубоководные микробные сообщества состоят из экстремофилов с широким функциональным и таксономическим разнообразием (Tendulkar et al., 2021; Hamid et al., 2022), и их классифицируют на термофилов (от 55 до 121 °C), психрофилов (от -2 до 20 °C), галофилов (25 М NaCl или KCl), пьезофилов (>500 атмосфер), алкалофилов (pH > 8), ацидофилов (pH < 4) и металлофилов (высокие концентрации металлов, например, меди,

цинка, кобальта, кадмия и мышьяка) в соответствии со средой, в которой они растут, и экстремальными условиями, которые они могут переносить (рис. 17).

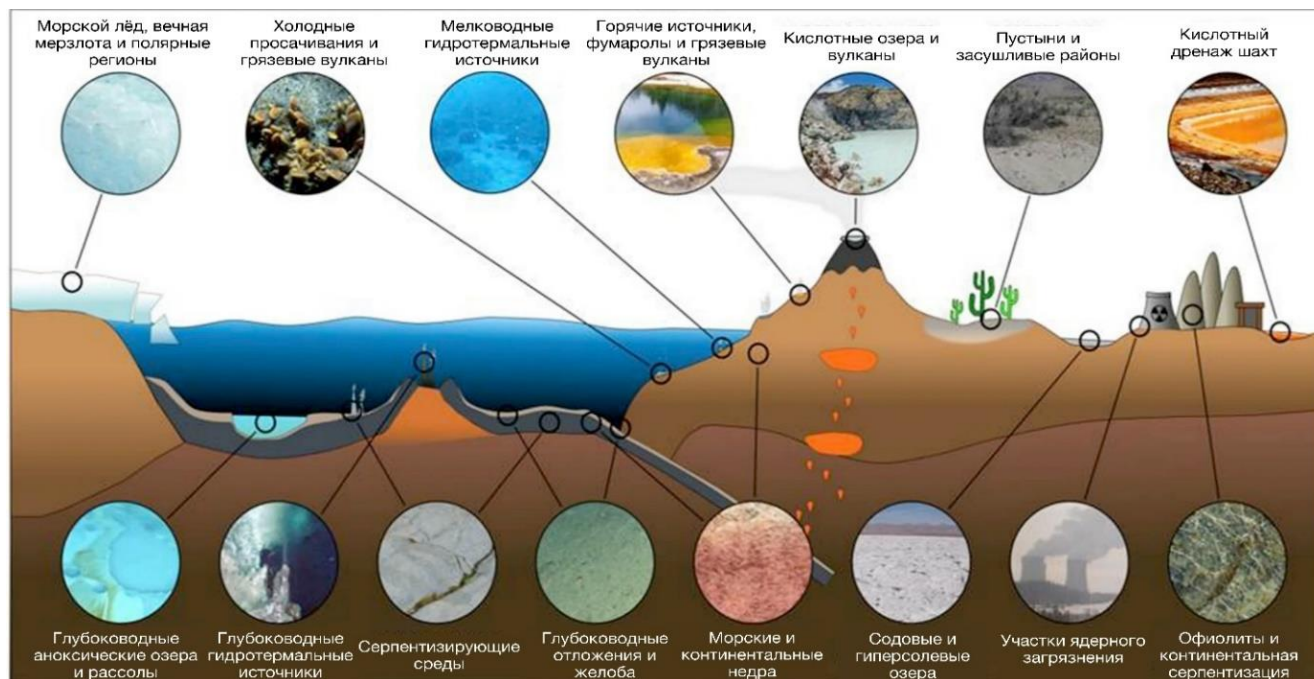


Рисунок 17 – Природные источники и экосистемы обитания микроорганизмов-экстремофилов (адаптировано из Tendulkar et al., 2021)

Многие глубоководные микроорганизмы являются полиэкстремофилами (Karan et al., 2020; Tendulkar et al., 2021; Hamid et al., 2022) и источниками уникальных протеаз, амилаз, липаз, хитиназ, целлюлаз, лигниназ, пектиназ, ксиланаз, нуклеаз (Hamid et al., 2022) (рис. 18). Кроме того, были изучены многие ферменты морских микроорганизмов, участвующие в ключевых реакциях органического синтеза, включая реакции дерацемизации, эпоксидирования, декарбоксилирования, гидроксирования, лигирования, изомеризации и пр. (Birolli et al., 2019; Hamid et al., 2022) (рис. 19). Ферменты морских бактерий и грибов участвуют также в различных биогеохимических процессах, опосредованных биокатализом, при которых образуются уникальные продукты или происходит биотрансформация исходных субстратов, иногда с получением более чем одного продукта (Parales et al., 2002; Birolli et al., 2019) (рис. 18, 19). Кроме того, морские микроорганизмы как источники уникальных высокоактивных ферментов являются посредниками формирования экологических ниш, участвуя в процессах биodeградации и биоремедиации, направленных на минерализацию сложных органических соединений в донных осадках и воде (рис. 18, 19).

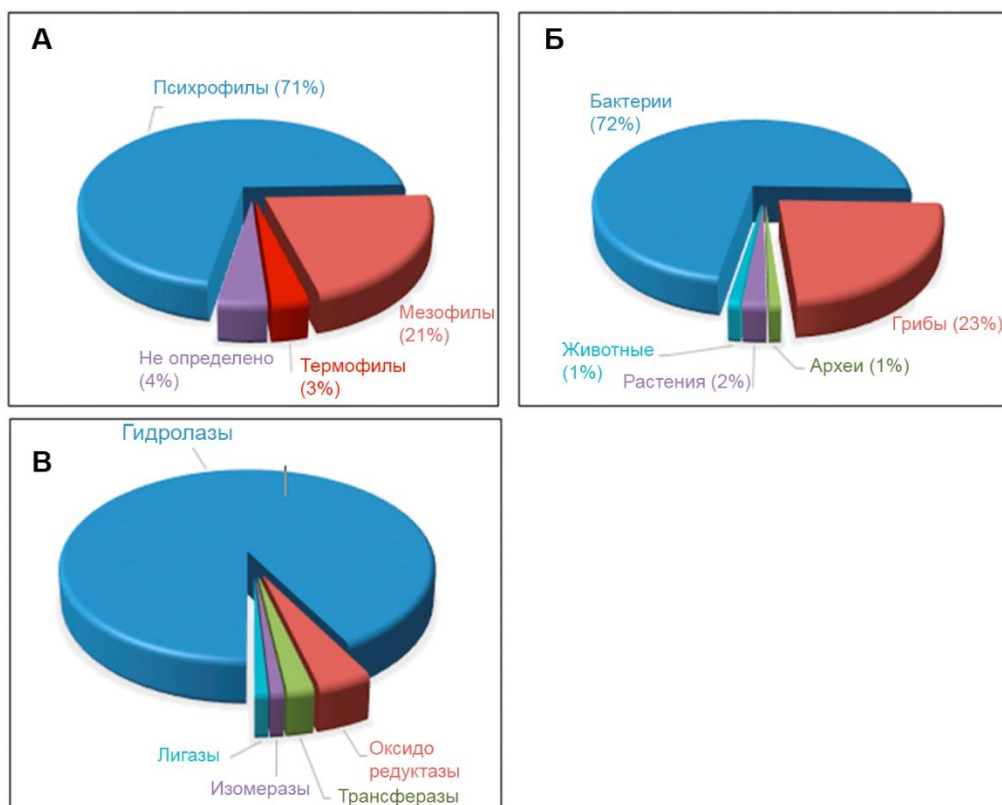


Рисунок 18 – Распределение холодоактивных ферментов (%) в зависимости от: А – температурного диапазона роста продуцентов; Б – таксономической принадлежности продуцентов; В – степени изученности ферментов (адаптировано из Hamid et al., 2022)

Холодоактивные и солеустойчивые ферменты морских микроорганизмов особенно привлекательны для биотехнологического применения (Birolli et al., 2019; Jin et al., 2019; Parvizpour et al., 2021; Xu et al., 2024) (рис. 19). Высокая солеустойчивость ферментов влечет за собой толерантность к низкой активности воды, преобладающей в некоторых смесях водных и органических веществ или неводных средах, а устойчивость к низким температурам позволяют экономить энергию и устранять микробное загрязнение (Karan et al., 2020; Hamid et al., 2022). Эти характеристики повышают потенциал морских ферментов как промышленных биокатализаторов, поскольку для улучшения растворимости гидрофобных субстратов часто используются органические растворители, а также изменяют гидролитическое и кинетическое равновесие и, следовательно, способствуют увеличению выхода и специфичности продуктов (Karan et al., 2020; Hamid et al., 2022). Холодоактивные ферменты находят широкое применение в пищевой промышленности, используются в качестве добавки к моющим средствам, для биотрансформации и биоремедиации в холодном климате, а также для очистки сточных вод в условиях низкого энергопотребления (Jin et al., 2019; Mangiagalli et al., 2020; Hamid et al., 2022) (рис. 19).

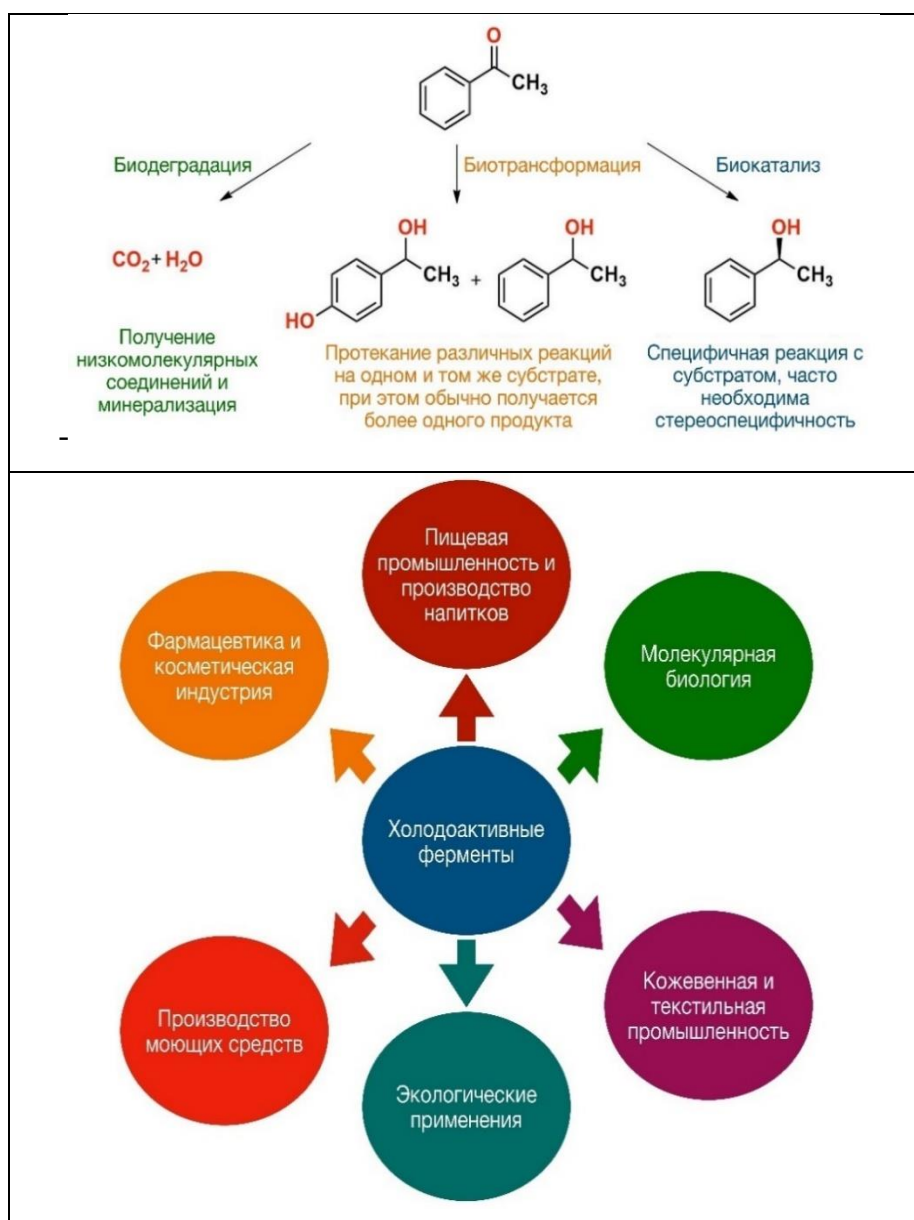


Рисунок 19 – Биотехнологический потенциал холодоактивных ферментов в процессах биодеградации, биотрансформации и биокатализа (адаптировано из Hamid et al., 2022)

Помимо использования в биотехнологических целях, психрофильные и галофильные белки представляют большой научный интерес, потому что высокая концентрация солей в окружающей среде вызывает экзоосмос, ведущий к обезвоживанию клетки (Britton et al., 2006; Hamid et al., 2022). Кроме того, гиперосмотическая среда желудочно-кишечного тракта ($\approx 0,3$ М солей желчных кислот) способствует развитию у резидентной микрофлоры адаптации в виде экспрессии генов солеустойчивых и солезависимых ферментов, например, генов мембранной β -каротин-15,15'-монооксигеназы (*brpA*), трегалозы-6-фосфат гидролазы или гидролазы семейства GH5, сохраняющей 50 % активности в 4 М NaCl (Yang et al., 2020). Низкие температуры критически влияют на гидратационную оболочку белка и ограничивают его конформационную

подвижность, необходимую для эффективного катализа (Jin et al., 2019; Al-Ghanayem, Joseph, 2020). Белки с устойчивой структурой и функциональной активностью в экстремальных условиях могли образоваться в пребиотические эпохи, что предполагает их критическую роль в зарождении жизни. Изучение белков экстремофилов может не только помочь понять раннюю эволюцию жизни на Земле, но и предсказать существование жизни на других планетах (DasSarma et al., 2013; Laye et al., 2017; Jin et al., 2019; Karan et al., 2020).

Поскольку метаболические процессы и физиологические функции морских микроорганизмов приспособлены к протеканию в условиях экстремальных температур и солености, ферменты этих микроорганизмов обладают уникальными свойствами, позволяющими катализировать реакции в присутствии соли (до 5,2 М), различных поверхностно-активных веществ, органических растворителей, и при повышенных или пониженных температурах и щелочных значениях pH (Karan et al., 2020; Hamid et al., 2022). В отличие от них, ферменты из мезофильных источников функционируют менее эффективно или денатурируют в экстремальных условиях (Karan et al., 2020). Активность большинства неадаптированных к холоду ферментов снижается в 16–80 раз при падении температуры с 37 до 0 °С (Jin et al., 2019). Психрофилы разработали несколько адаптивных стратегий для осуществления ферментативных процессов при пониженных температурах (рис. 20).

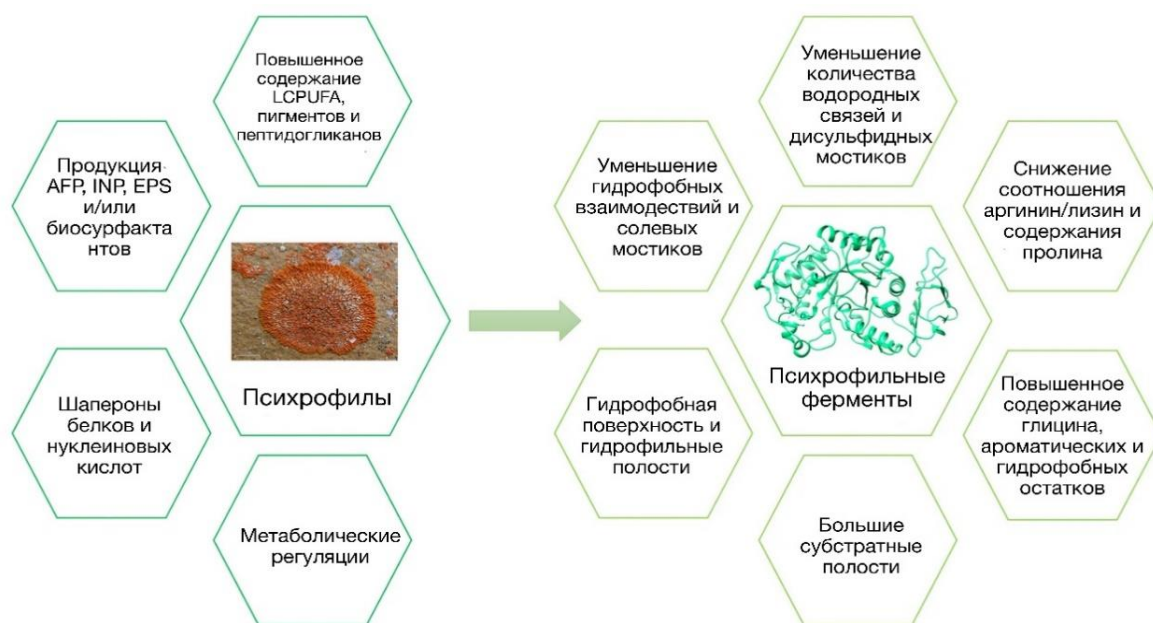


Рисунок 20 – Ключевые адаптивные стратегии психрофилов и структурные особенности холодоактивных ферментов. В качестве примера приведена ленточная модель (*ribbon diagram*) трёхмерной структуры психрофильной α -амилазы *Pseudoalteromonas haloplanktis* (идентификатор PDB: 1AQH) (адаптировано из Xu et al., 2024)

Психрофилы изменяют содержание жирных кислот в липидном бислое для формирования гомеовязкой адаптации (Siddiqui et al., 2013). Стремясь сохранить жидкий бислой при низких температурах в функциональном состоянии, клетки, в первую очередь, увеличивают содержание длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (LCPUFA), а также некоторых короткоцепочечных, разветвленных и/или цис-изомерных жирных кислот (Chintalapati et al., 2004; Russell, 2008) (рис. 20). Жирные кислоты LCPUFA могут также препятствовать проникновению в клетки АФК и H_2O_2 , образуя гидрофобную границу между липидными бислоями, что позволяет противостоять окислительному стрессу при низких температурах (Yoshida et al., 2016). Пигменты, особенно каротиноиды, могут также влиять на текучесть клеточных мембран (Collins, Margesin, 2019). Кроме того, эти пигменты играют роль антиоксидантов при защите от ультрафиолетового излучения и АФК, характерных для многих низкотемпературных сред обитания и/или сильном освещении (Pandey et al., 2018). У некоторых психрофилов для укрепления физического барьера клетки при понижении температуры повышается экспрессия генов биосинтеза пептидогликанов (Rodrigues et al., 2008; Xu et al., 2024). На уровне метаболической регуляции многие микроорганизмы снижают интенсивность центрального метаболизма (Tribelli, López, 2018). У некоторых психрофилов наблюдается перераспределение приоритетов метаболических процессов в пользу определенных путей, таких как гликолиз, пентозофосфатный путь, синтез белков ЦТК и/или ЭТЦ (Tribelli, López, 2018; Xu et al., 2024). При низких температурах могут активироваться укороченные или альтернативные пути, такие как глиоксилатный шунт, окисление этанола, метилглиоксальный или 2-метилцитратный циклы, метаболизм ацетата или катаболизм пропионил-KoA (Ayala-del-Río et al., 2010; Tribelli, López, 2018). Такая стратегия метаболического перепрограммирования может снизить окислительный стресс, присущий жизнедеятельности бактерий, что имеет решающее значение для долгосрочного выживания. На молекулярном уровне психрофилы имеют «набор инструментов» против возникновения низкотемпературного стресса, включая белковые и нуклеиновые шапероны, антифризные белки (AFP), льдонуклеирующие белки (INP), совместимые растворители, внеклеточные полимерные вещества (EPS) и/или биосурфактанты (рис. 20). Белковые шапероны способствуют правильному сворачиванию ферментов и вспомогательных белков, предотвращая их дисфункцию и агрегацию (Collins, Margesin, 2019). Эффективная репликация ДНК, транскрипция и трансляция протекают в психрофилах в сопровождении шаперонов, которые активируются при низких температурах или постоянно сверхэкспрессируются как белки холодовой акклиматизации, например РНК-геликазы (Lim et al., 2000). Антифризные белки препятствуют нуклеации и кристаллизации льда (Voets, 2017). С другой стороны, льдонуклеирующие белки известны как мембраносвязанные белки, способствующие гетерогенной кристаллизации льда при высоких значениях отрицательной

температуры, которые упорядочивают и стабилизируют молекулы воды (Pandey et al., 2016). Психрофилы увеличивают биосинтез биологически совместимых осмолитов, таких как глицин-бетаин, трегалоза, глицерин, сахароза, саркозин, маннит и сорбит, которые помогают восстановить осмотический баланс и компенсировать обезвоживание при низких температурах (Mykytczuk et al., 2013; Xu et al., 2024). Изменяется и синтез внеклеточных полисахаридов (EPS) – многофункциональных высокомолекулярных биополимеров, которые прикрепляются к внешней поверхности клеток или выделяются в окружающую среду (рис. 20). EPS образует гидратированный гель, выполняющий различные функции, такие как адгезия клеток, поглощение АФК и защита белков (Deming, Young, 2017). Еще одна группа метаболитов, реагирующая на холодовые условия, это – биосурфактанты, поверхностно-активные амфифильные соединения, синтезируемые микроорганизмами в качестве антибактериальных и антимикотических агентов. Кроме того, биосурфактанты выполняют функцию регулирования биопленок и контроля адгезии на поверхностях, повышения биодоступности слаборастворимых гидрофобных субстратов, а также факторов патогенности и кворума бактерий (Perfumo et al., 2018).

Соответственно, ферменты психрофильных микроорганизмов в ходе эволюции также претерпели ряд адаптационных изменений в своей структуре (рис. 20). Вероятно, адаптация ферментов к низкотемпературному катализу происходила одновременно с развитием их термолабильности. Поскольку большинство ферментов, продуцируемых психрофилами, адаптированы к окружающей среде, они поддерживают оптимальную скорость биохимических реакций за счет высокой удельной активности или каталитической эффективности (Collins, Margesin, 2019). Такая эффективность может быть достигнута путем повышения пластичности их структуры, в основном, за счет ослабления внутримолекулярных взаимодействий, участвующих в сворачивании белка и стабилизации зарождающейся полипептидной цепи. В связи с этим, в молекулярных структурах психрофильных ферментов наблюдается меньшее количество гидрофобных взаимодействий, солевых мостиков, дисульфидных и водородных связей (рис. 20). Кроме того, для этих ферментов характерно уменьшение соотношения аргинин/лизин и содержания остатков пролина, в то же время увеличение содержания глицина и ароматических остатков способствует конформационной гибкости (Al-Ghanayem, Joseph, 2020; Namid et al., 2022). Наряду с этим, психрофильные ферменты имеют большее содержание неупорядоченной структуры, чем мезофильные аналоги, что приводит к повышению энтропии и снижению энергии связей (Al-Ghanayem, Joseph, 2020). Психрофильные ферменты могут иметь более крупную полость активного центра и большое количество окружающих ее гидрофильных групп, а громоздкие боковые цепи заменены в них на более мелкие, что приводит к изменению конформации активного центра (Paredes et al., 2011; Hjörleifsson et al., 2020). Таким образом

ферментативная полость активного центра становится более доступной для субстратов и способна присоединять их или высвобождать продукты реакции с меньшими энергетическими затратами на конформационные перестройки (Hjörleifsson et al., 2020; Markússon et al., 2022). Поскольку психрофильные ферменты отличаются повышенной динамикой активного центра, они имеют меньшее сродство к субстратам, и это отражается на более высоких значениях константы Михаэлиса (K_m), оборотов фермента и каталитической эффективности k_{cat}/K_m (Hjörleifsson et al., 2017, 2020). К перечню адаптационных стратегий психрофильных бактерий можно добавить изменение четвертичной структуры ферментов (Zanphorlin et al., 2016; Hjörleifsson et al., 2019). Zanphorlin et al. (2016) обнаружили, что олигомеризация психрофильной β -глюкозидазы GH1 из штамма *Exiguobacterium antarcticum* B7 послужила основой холодной адаптации этого фермента. Фермент стабилизирует естественную конформацию за счет тетрамерной структуры, что в 10 раз увеличивает его активность по сравнению с активностью мономера (Zanphorlin et al., 2016). Karan et al. (2020) показали, что адаптация к низким температурам β -галактозидазы из антарктического археона *Halorubrum lacusprofundi* может быть результатом мутации шести аминокислотных остатков.

Благодаря огромному биотехнологическому потенциалу, конструирование и рекомбинантное получение новых психрофильных ферментов с улучшенными функциями привлекает большое внимание исследователей (рис. 21).

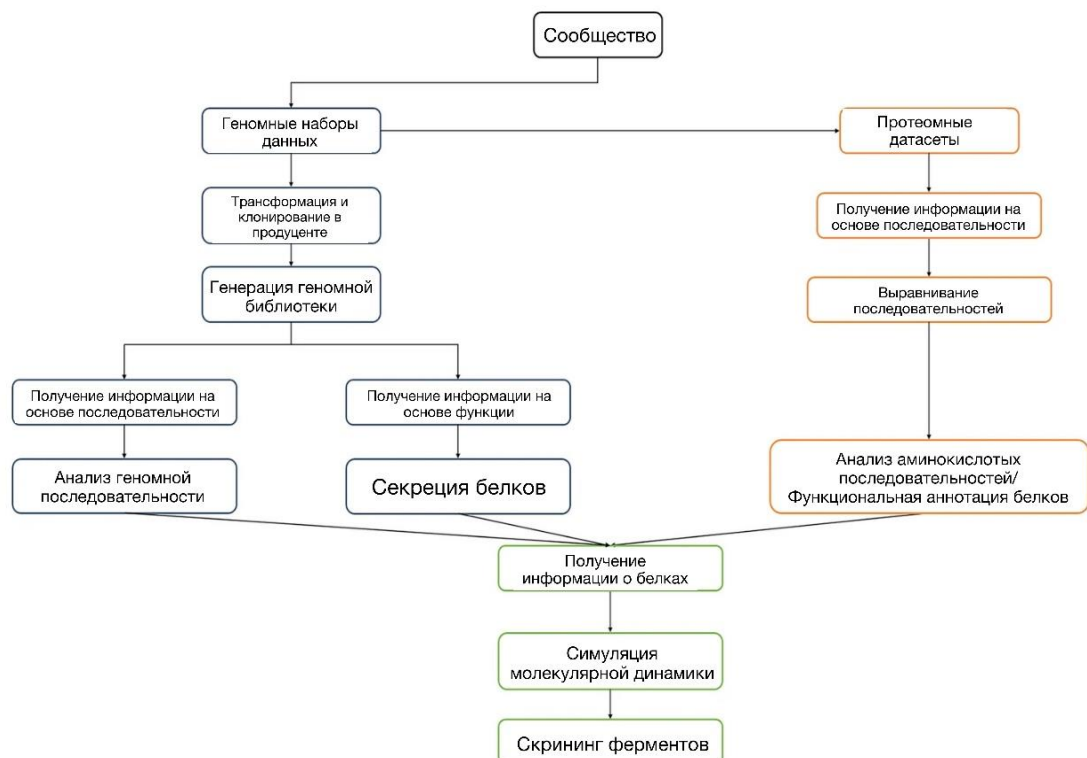


Рисунок 21 – Стратегия метагеномного поиска новых ферментов, включающая биоинформатический анализ, молекулярное клонирование и функциональный скрининг активности рекомбинантных белков (адаптировано из Xu et al., 2024)

Существует и прямой подход, например, для продукции внеклеточных психрофильных фосфатаз, который заключается в подборе условий культивирования морских бактерий (De Prada, Brenchley, 1997; Plisova et al., 2005). Однако такой метод ограничен небольшой продуктивностью природных микробов (обычно <1%) и использованием специальных питательных сред и оборудования с регулируемой температурой (Cavicchioli et al., 2011; Xu et al., 2024). На сегодняшний день данные о структуре и регуляции экспрессии ферментов морских микроорганизмов могут быть получены из баз данных геномов с использованием различных биоинформатических инструментов (рис. 21). Основным ограничением поиска на основе кодирующих последовательностей является низкая вероятность возможности обнаружения генов с присвоенной функциональной аннотацией в пайплайнах обработки данных ($\approx 40\%$ идентичности с известными структурами), которые, скорее всего, представляют лишь небольшую часть генов в наборах данных (Vieites et al., 2009). Функциональный поиск новых ферментов включает анализ геномных или метагеномных данных и анализ свойств рекомбинантных белков, полученных с использованием выделенных генов (Fang et al., 2012; Thakur et al., 2021) (рис. 21). Так, из метагеномной библиотеки микробных сообществ Южно-Китайского моря (Fang et al., 2012) были получены рекомбинантные белки высокоактивной бактериальной лакказы (lac21) и новой холодоактивной пуллуланы I (Thakur et al., 2021). Холодоактивная целлобиоза-2-эпимераза была выбрана по предсказанным характеристикам из геномных данных многих кандидатов, найденных в морских изолятах, а также с помощью компьютерного моделирования 3D-структуры и молекулярной динамики (Chen et al., 2020a).

Кроме того, существует несколько стратегий, способствующих экспрессии генов и правильному сворачиванию психрофильных ферментов в гетерологичных хозяевах. Так, в стрессовых условиях достичь вновь синтезированным полипептидам и денатурированным белкам своей «естественной» конформации помогают молекулярные шапероны. С помощью шаперонов Cpn60 и Cpn10 из психрофильной бактерии *Oleispira antarctica* RB8^T была сконструирована система для экспрессии термолabileй эстеразы в клетках *E. coli* при 37 °C (Ferrer et al., 2004). Удельная активность фермента в 180 раз превышала активность аналога из штамма *E. coli*, не содержащего шаперон. Kim et al. (2015) продемонстрировали результаты ко-экспрессии психрофильной эстеразы в *E. coli* с шаперонной системой PsyGroELS штамма психрофильной бактерии *Psychrobacter* sp. PAMC21119 при 10 °C, в результате чего активность фермента увеличилась более чем на 70 % относительно контроля.

Вместе с молекулярными шаперонами часто используются промоторы холодоактивных белков. Qing et al. (2004) разработали векторы pCold, содержащие промотор *cspA*, который обеспечивает высокий уровень экспрессии нескольких генов при индукции холодовым шоком. Ген холодоактивной липазы Lip-948 антарктической бактерии *Psychrobacter* sp. G, лигированный

в плазмиду pColdI, давал 39 % целевого белка (от общего количества белка), большая часть которого представляла собой тельца включения. Однако при ко-экспрессии с различными молекулярными шаперонами растворимость белка заметно повышалась (Shuo-shuo et al., 2011).

Понижение температуры при экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli* также может способствовать уменьшению образования телец включения. Кроме того, разрабатываются системы экспрессии белков на основе психрофилов. Наиболее изученным психрофильным хозяином является антарктическая гамма-протеобактерия *P. haloplanktis* TAC125. На основе ее использования в качестве хозяина была получена рекомбинантная секретируемая психрофильная α -амилаза с правильно сформированными дисульфидными мостиками химерного белка (Cusano et al., 2006).

В другом исследовании в качестве психрофильного продуцента рекомбинантного белка использовали штамм *Pseudoalteromonas* sp. SM20429 (Zhao et al., 2011). Кроме того, была разработана эукариотическая экспрессионная система на основе мицелиального гриба *Aspergillus oryzae*, в которой экспрессирован ген α -амилазы из психрофильного микромицета *Geomyces pannorum* (Mao et al., 2015). Таким образом, благодаря высокой ферментативной активности при низких и умеренных температурах (5–30 °C), уникальной (или широкой) специфичности и умеренной термостабильности (время полужизни (T_{50}) до 30 мин при 37–50 °C), психрофильные ферменты являются подходящими кандидатами для использования в ряде молекулярно-биологических и промышленных технологий (рис. 21, табл. 1).

Таблица 1 – Психрофильные ферменты морских микроорганизмов и их применение

Ферменты	Источник выделения	Применение	Ссылки
Лактазы/ β -галактозидазы	<i>Paracoccus</i> sp., <i>Cystofilobasidium capitatum</i> SPY11, <i>Rhodotorula</i> sp.	Молочная промышленность (гидролиз лактозы)	Wierzbicka-Wos et al., 2011; Mangiagalli et al., 2020; Hamid et al., 2022
α -Амилазы	<i>B. subtilis</i> N8, <i>G. pannorum</i>	Пищевая, хлебопекарная промышленность и производство моющих средств	He et al., 2017; Arabaci, Arkan, 2018
Целлюлаза	<i>Pyrococcus</i> sp.	Пищевая и текстильная промышленность, ферментация этанола	Mao et al., 2015; Dhaulaniya et al., 2018
Хитиназы	<i>Metschnikowia</i> sp., <i>Glaciozyma antarctica</i> , <i>Mrakia psychrophila</i> , <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	Тендеризация мяса, деградация хитин-содержащих отходов, контроль фитопатогенов	Ramli et al., 2011; Carrasco et al., 2012
Металлопротеаза	<i>Pedobacter cryoconitis</i>	Биоремедиация сточных вод	Margesin et al., 2005
Щелочные протеазы	<i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>B. subtilis</i> WLCP1	Моющие средства и текстиль	Saba et al., 2012; Furhan et al., 2019

Ферменты	Источник выделения	Применение	Ссылки
Липазы	<i>P.haloplanktis</i> TAC125, <i>Penicillium canesense</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. VITCLP4	Корма для животных, моющие средства и текстиль	Kavitha et al., 2017; Sahay et al., 2018
Фермент гликогенового разветвления	<i>Rhizomucor miehei</i>	Производство хлеба и хлебопекарная промышленность	Wu et al., 2014
Фитазы	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Candida carpophila</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Пищевая и кормовая промышленность	Ranjan et al., 2013; Yu et al., 2015
Пектиназы	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> PPY-1, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PT1, <i>Cystofilobasidium capitatum</i> SPY11, <i>Leucosporidium drummii</i> , <i>S. salmonicolor</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> F46	Пищевая и фруктовая промышленность, ферментация пектина, экстракция сока	Sahay at al., 2013; Pan et al., 2014; Belda et al., 2016
Ксиланазы	<i>P. haloplanktis</i> TAH3A, <i>Flavobacterium</i> sp. MSY-2, <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Cryptococcus adeliensis</i>	Хлебопекарная промышленность, гидролиз ксилана, осмопротекторы, производство биотоплива	Borges et al., 2014; Cai et al., 2018; Miri et al., 2018
Протеазы	<i>Flavobacterium limicola</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>G. pannorum</i> , <i>Naganishia albida</i>	Текстильная и кожевенная промышленность, минерализация оргполимеров в пресноводных отложениях, пищевая и кормовая промышленность	Tamaki et al., 2003; Salwan et al., 2010
Сериновая протеаза	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Низкотемпературная обработка пищевых продуктов, кожевенная промышленность	Wang et al., 2008
Щелочная фосфатаза	<i>V. splendidus</i>	Молекулярная биология	Hjörleifsson et al., 2019
ДНК лигаза	<i>P. haloplanktis</i>	Молекулярная биология	Georlette et al., 2000
РНК полимераза	<i>Pseudomonas syringae</i>	Молекулярная биология	Uma et al., 1999
Альдолаза фукулозы	<i>G. antarctica</i> PI12	Фармацевтическая промышленность	Siddiqui et al., 2015; Jaafar et al., 2016
Синтаза эктоина	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	Косметика, биомедицина	Kobus et al., 2015; Widderich et al., 2016

2.6 Биогеохимическая роль щелочных фосфатаз морских микроорганизмов в циклах трансформации фосфора

Фосфор играет важнейшую роль в биологической продуктивности океана, так как является одним из фундаментальных элементов для синтеза нуклеиновых кислот, фосфолипидов и многочисленных метаболитов (Dyhrman et al., 2007). Фосфорсодержащие органические

соединения необходимы для поддержания клеточной структуры (фосфолипиды), передачи метаболической энергии (АТФ) и хранения информации (ДНК, РНК) во всех известных формах жизни. Однако фосфор менее распространен в природе, чем другие основные биологически важные элементы (С, Н, О, N, S), и, в основном, заключен в малорастворимых фосфатных минералах (например, гидроксилapatите ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Baidya et al., 2024). Поэтому в геологическом масштабе времени (геохронологическая шкала) он является лимитирующим питательным веществом для морской биопродуктивности (Reinhard et al., 2017). В теориях возникновения жизни низкая растворимость фосфата в воде и его низкая реакционная способность при фосфорилировании органических соединений в совокупности известны как «фосфатная проблема». Для объяснения проблемы растворимости фосфата было разработано несколько гипотез, включая его присутствие в щелочных озерах, богатых карбонатами (Toner, Catling, 2020), или в растворах, богатых карбамидно-аммиачной формацией, с низкой активностью воды, которая повышает растворимость природных фосфатных минералов, включая апатит (Bursar et al., 2016). Также было высказано предположение, что древний океан Тетис содержал более высокие уровни растворенного фосфата (Brady et al., 2022). Альтернативным решением проблемы низкой растворимости неорганического фосфата (P_i) может быть его превращение в соединения с более восстановленной формой Р, например фосфиты (HPO_3^{2-} , P(III)), примерно в 1000 раз более растворимые, чем фосфаты в природных жидкостях, включая морскую воду, в присутствии двухвалентных металлов Ca, Mg и Fe(II) (Herschy et al., 2018; Baidya et al., 2024). Наиболее реакционногенный фосфит мог быть предшественником первых фосфорилированных молекул на Земле. Он обнаружен в архейских породах и «используется» органической жизнью, по крайней мере, со времен неоархейского-палеопротерозойского периода (Boden et al., 2024).

Полифосфаты считаются возможными предшественниками АТФ, то есть «энергетической валюты» всего живого на Земле (Baidya et al., 2024). Полифосфаты известны как конденсированные фосфаты, которые включают длинноцепочечные соединения Р, такие как пирофосфат (PP_i), трифосфат (PPP_i), тетра- и другие фосфаты высшего порядка (PPPP_i^+), а также циклофосфаты, такие как триметафосфат (PPPs) и тетраметафосфат (PPPPs). Циклофосфаты, в частности, могут выступать как в роли полимеризующих, так и фосфорилирующих агентов, например, они могут быть предшественниками амидофосфатов и способны фосфорилировать глицериновую кислоту, сахара, аминокислоты и нуклеозиды (Pasek et al., 2017; Baidya et al., 2024). С учетом важности этих альтернативных видов Р на ранней пребиотической Земле, было предложено три основных механизма образования фосфитов: (1) H_2O -индуцированное окисление шрайберсита ($(\text{Fe,Ni})_3\text{P}$), который был либо доставлен метеоритами, либо образовался в почве, пораженной молнией, (2) восстановление апатита под действием молний в облаках

вулканического пепла и (3) восстановление фосфата в сочетании с окислением Fe^{2+} в безводных условиях при повышенной температуре (180 °C) (Herschy et al., 2018; Baidya et al., 2024) (рис. 22).

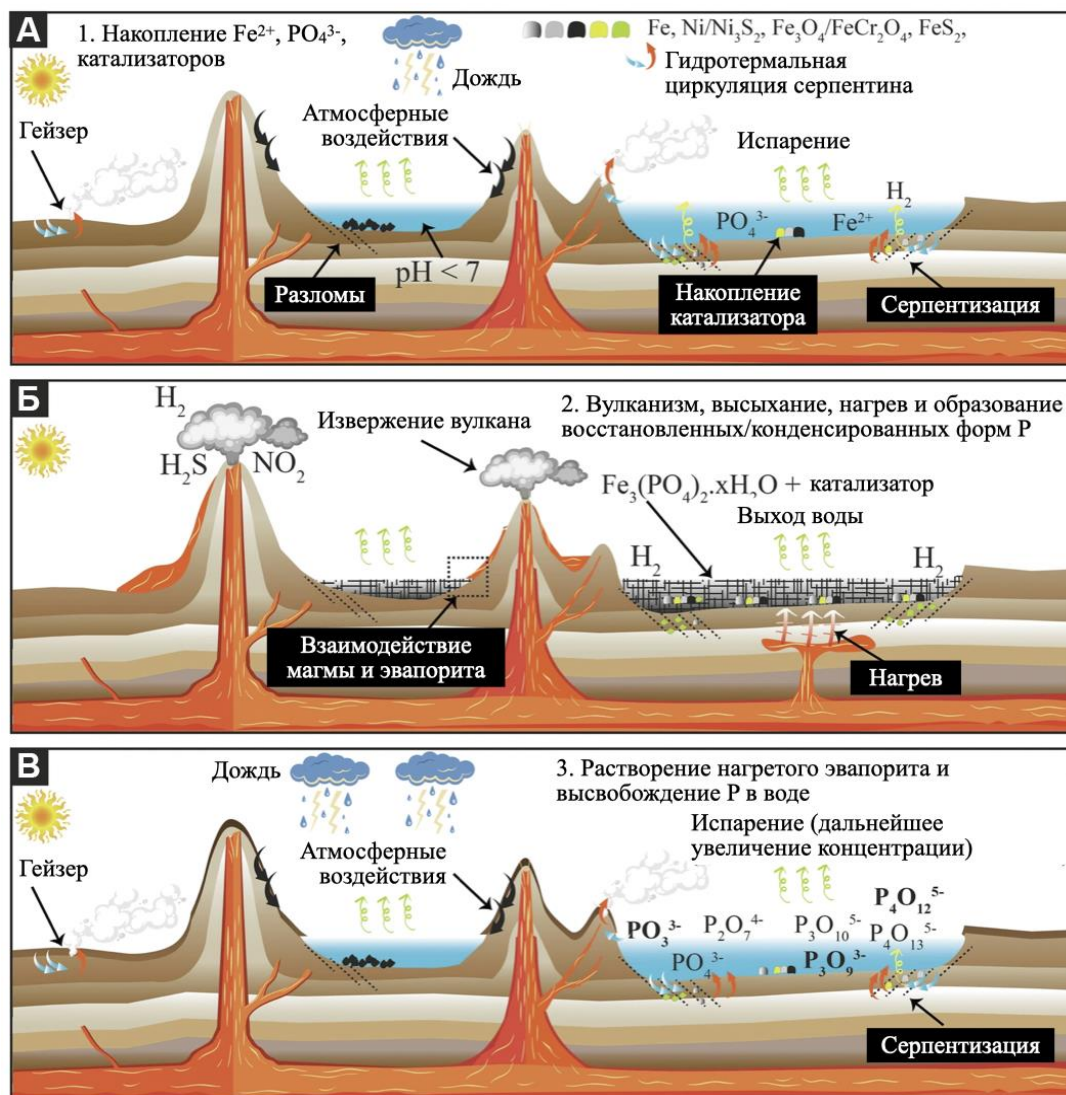


Рисунок 22 – Модель круговорота фосфора в пребиотических условиях: А) Процессы накопления: возможные пути концентрирования фосфатов, ионов Fe^{2+} и минералов-катализаторов во влажно-сухих бассейнах за счет гидротермальной циркуляции и выветривания горных пород. Б) Осадконакопление и метаморфизм: формирование в бассейнах эвапоритов или осадков, содержащих $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Последующий термический метаморфизм (при магматическом нагреве) стимулирует полимеризацию и/или восстановление фосфатов в зависимости от температуры, наличия восстановителей и катализаторов. В) Регенерация: повторное растворение продуктов и высвобождение полимеризованных и восстановленных форм фосфора (P) в окружающую среду (адаптировано из Baidya et al., 2024)

Среди всех механизмов Fe^{2+} -индуцированное восстановление фосфатов может считаться самым распространенным. Природный пример этого механизма включает диагенез железистых отложений и серпентинизацию ультраосновных пород, содержащих оливины (класс силикатов) (Pasek et al., 2022). Образование полифосфатов было продемонстрировано с использованием: (1)

чистых фосфатов (например, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) при 80–1200 °С, (2) высокотемпературных (>1200 °С) вулканических систем; и (3) растворения металлического фосфида при температуре окружающей среды (Pasek et al., 2017) (рис. 22).

Для полимеризации фосфатов на пребиотической Земле, вероятно, были необходимы относительно высокие начальные концентрации фосфатов (рис. 22, 23).

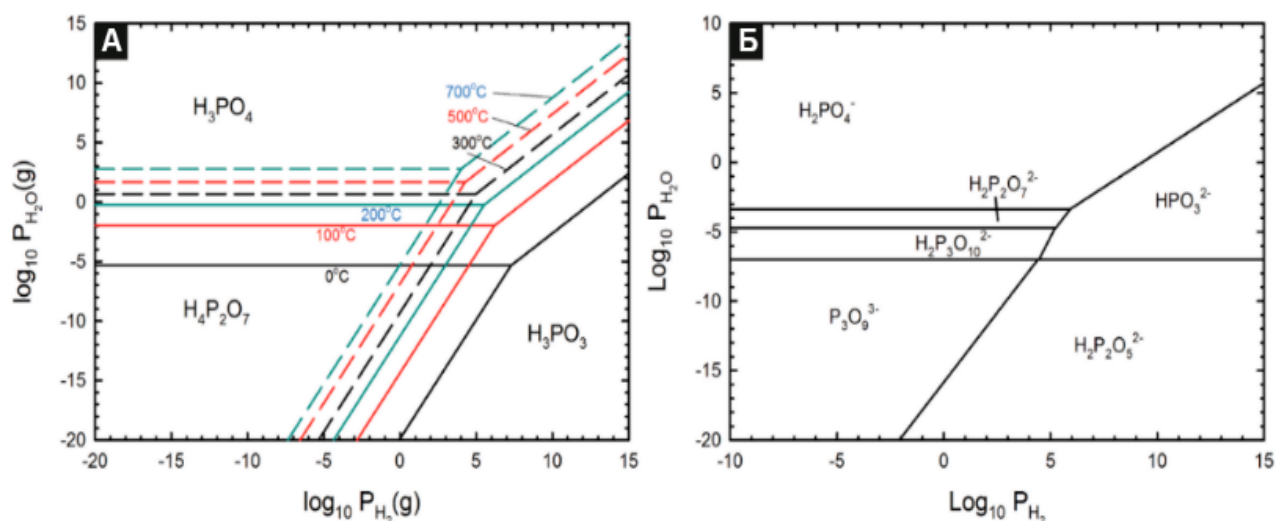


Рисунок 23 – Расчетные условия полимеризации и восстановления фосфатов. Давление указано в атм. Расчеты проведены в программах HSC Chemistry при 25 °С от 0 до 700 °С, активность Р для каждой линии принималась как равная. А – Предсказанные области, где фосфат (H_3PO_4) полимеризуется в пирогосфат ($\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$) и фосфит (H_3PO_3), являются функцией H_2O и активности H_2 . Изменения происходят в зависимости от температуры системы (0-700°C). Все виды Р рассматриваются как кислоты. Б – Данные по пребиотическим фосфорилирующим агентам предсказывают области, где различные полифосфаты, фосфиты и пирогосфаты должны доминировать при рН 7, которые также являются функцией H_2O и активности H_2 . В линейных полифосфатах ≥ 3 –4 фосфатных единиц циклизация происходит спонтанно (адаптировано из Baidya et al., 2024)

Концентрация растворенного фосфата в океане архейского периода является предметом споров. Оценки варьируют от субмикромольных уровней до 1 мМ, то есть в 1000 раз выше, чем сегодня (Brady et al., 2022). Если же уровень фосфатов в морской воде был низким, то вулканические озера и бассейны с горячими источниками могли быть альтернативной средой с высоким уровнем растворенных фосфатов, подобно их современным аналогам, таким как озеро Магади в Африке, и термальным источникам на полуострове Камчатка (Toner, Catling, 2020; Baidya et al., 2024). Вулканически нагретые субаэральные среды с озерами и гидротермальными бассейнами могли обеспечить идеальные условия для полимеризации фосфатов, что было подтверждено в экспериментах (рис. 22). Более распространенными вблизи поверхности должны были быть железистые осадочные среды, подвергшиеся термическим воздействиям (диагенез и

метаморфизм), которые приводят к уменьшению содержания Р (Herschy et al., 2018; Pasek et al., 2022). В результате одного из исследований, проведенного при температуре 180 °С в присутствии железистых пород, продемонстрировано образование PP_i с выходом 15 % (Herschy et al., 2018). Таким образом, метаморфические осадочные породы в качестве условий, благоприятных для полимеризации Р в дополнение к его восстановлению, возможно, и обеспечили появление реакционноспособных видов Р, необходимых для возникновения жизни. Кроме того, в щелочных фосфатных системах полимеризации Р может способствовать аморфный кремнезем (de Zwart et al., 2004; Baidya et al., 2024).

Однако термодинамическая модель предсказывает, что полимеризация Р лучше всего протекает при низкой активности воды, а восстановлению Р лучше всего способствует высокое содержание H_2 (рис. 23 А). Результаты моделирования также предполагают образование циклофосфатов, которое возможно при более низких температурах, если активность воды низкая (рис. 23 Б).

Микроорганизмы являются драйверами биогеохимических циклов на Земле (Falkowski et al., 2021). Растворенный P_i считается наиболее биодоступной формой, содержание которой в морских поверхностных водах часто ограничено (Elser et al., 2007). В отличие от азота (N) и углерода (C), которые микроорганизмы могут добывать из атмосферы (CO_2 - и N_2 -фиксация), биодоступность Р зависит от факторов переноса и растворимости его источников в воде (Haas et al., 2024). Бактериопланктон приспосабливается к нехватке P_i , извлекая его из различных фосфоросодержащих соединений (Sebastian and Ammerman, 2009; Srivastava et al., 2021), входящих в пул РОВ. В окружающей среде концентрация P_i ($\sim 10^{-6}$ М) недостаточна даже для пребиотического фосфорилирования нуклеозидов (Haas et al., 2024; Boden et al., 2024) в отличие от растворенных органических фосфатов (РОФ) (Björkman, Karl, 2003; Dyhrman et al., 2007), которые влияют на рост и состав микробного сообщества (Björkman, Karl, 2003; Pinhassi et al., 2006), первичную продуктивность, фиксацию азота и поглощение CO_2 (Mather et al., 2008; Letscher, Moore, 2015). Таким образом, морские микробные сообщества «полагаются» на реминерализацию РОФ для удовлетворения потребностей в P_i (Lockwood et al., 2022; Boden et al., 2024). Современные микробные сообщества справляются с ограниченной доступностью P_i , используя богатое разнообразие P_i -связывающих белков и ферментов для деградации РОФ и некоторых видов неорганических соединений Р (рис. 24).

Большинство биогеохимических моделей основано на каталитическом превращении биомолекул под действием микробных ферментов, выполняющих определенную функцию согласно своей субстратной и/или каталитической специфичности (Song et al., 2017; Li et al., 2021) (рис. 24).

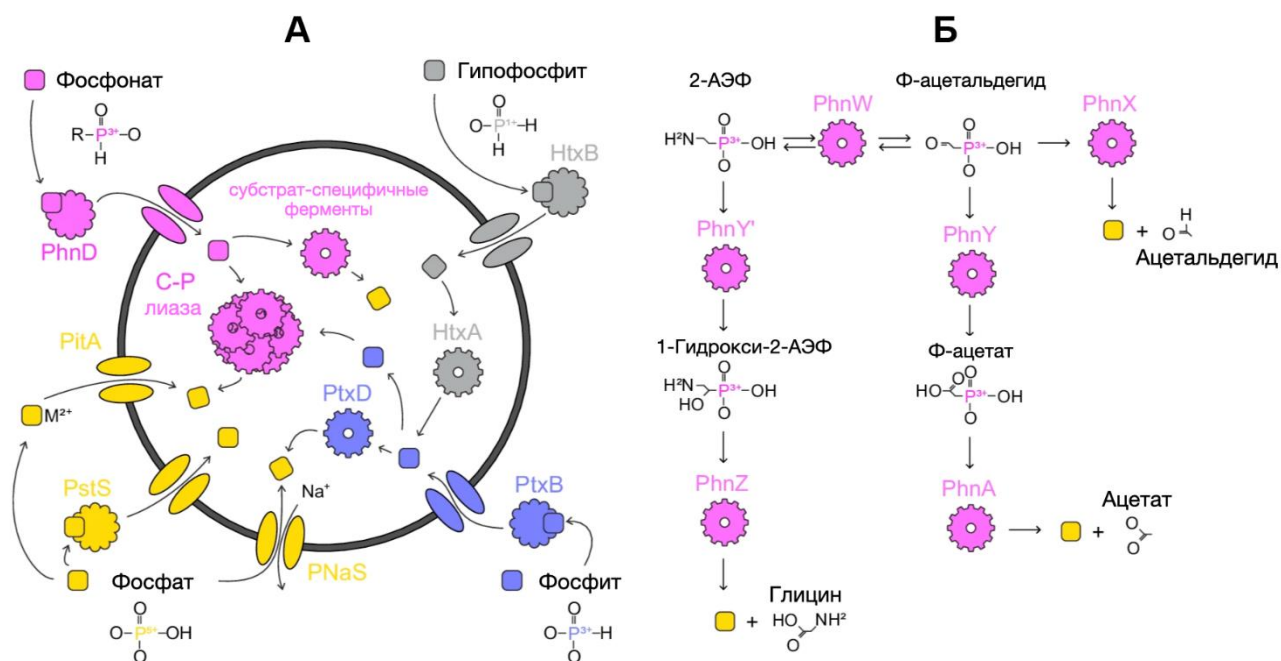


Рисунок 24 – Метаболизм (А) и субстрат-специфические пути деградации фосфонатов (Б).

Цветовая индикация молекул: серый квадрат – гипофосфит; синий – фосфит; розовый – фосфонат; желтый – фосфат. Соответствующими цветами обозначены ферментные системы, ответственные за их транспорт (импорт) и катаболизм (адаптировано из Boden et al., 2024)

Однако некоторые белковые семейства ферментов могут обладать многофункциональной активностью (Baier et al., 2016; Srivastava et al., 2021). Такими ферментами являются гидролазы и изомеразы суперсемейства щелочных фосфатаз (ЩФ), куда входят различные структурные семейства с однотипным каталитическим доменом ЩФ, субстрат-связывающим остатком и металлосвязывающим центром для взаимной координации нуклеофила и субстрата во время катализа (рис. 25). Согласно результатам рентгеноструктурного анализа, на сегодняшний день к суперсемейству ЩФ отнесены щелочные фосфатазы (ЩФ) (3.1.3.1); арилсульфатазы (3.1.6.8); фосфоглицератмутазы (5.4.2.1); фосфонатазы (3.11.1.2) и фосфоенолмутазы (5.4.2.7) (рис. 25). Каталитический домен представителей суперсемейства ЩФ бывает связан с одним ионом Mn^{2+} или Ca^{2+} , как у фосфонатмоноэфиргидролаз и арилсульфатаз (рис. 25 А, В), или с двумя ионами Zn^{2+} или $\text{Ca}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, как у ЩФ и нуклеотидпирофосфатаз/фосфодиэстераз (NPP) соответственно, и с разными нуклеофильными остатками аминокислот – серина, треонина и формилглицина (Duarte et al., 2013; Paysan-Lafosse et al., 2022; Chandonia et al., 2021) (рис. 25). Однако консервативная архитектура активного центра (3D-структура) каталитических доменов во всех ферментах суперсемейства ЩФ обеспечивает идентичный или очень похожий каталитический механизм, аналогичный механизму классической ЩФ из *E. coli*. (рис. 25, 26).

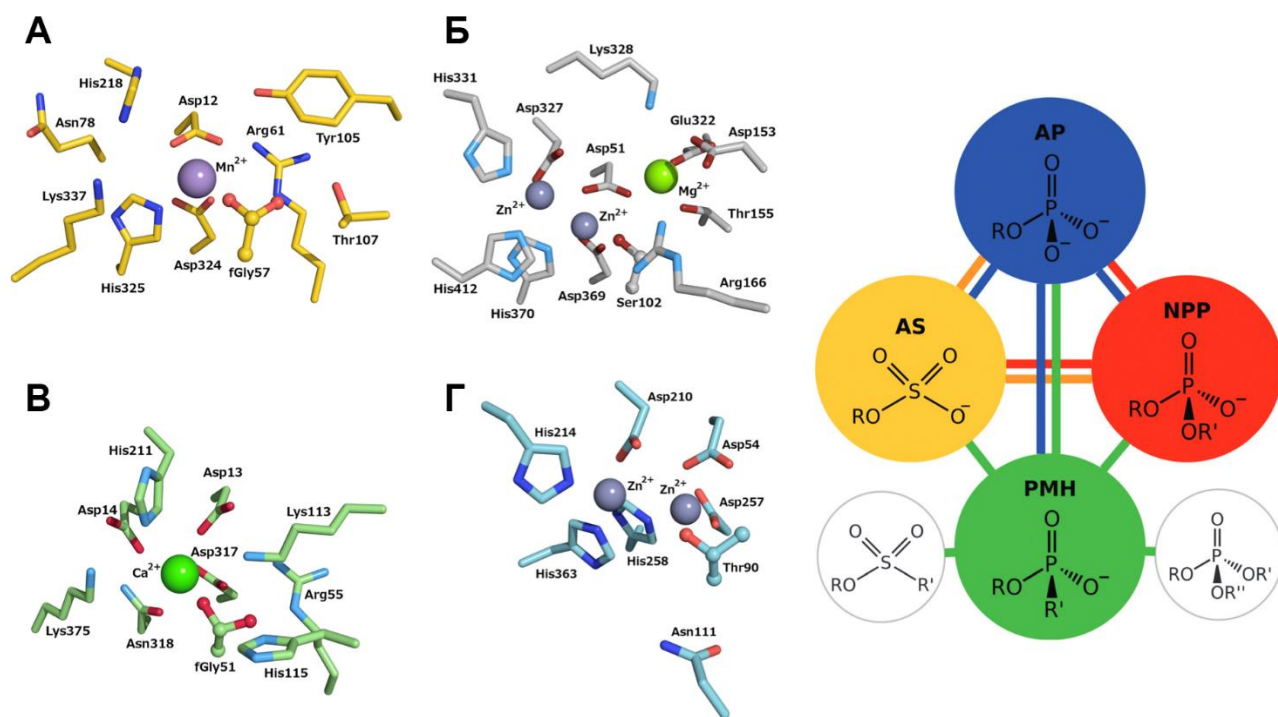


Рисунок 25 – Слева: Топология аминокислотных остатков и ионов двухвалентных металлов в активных центрах ферментов суперсемейства ЩФ: А) фосфонатмоноэстераза *Rhizobium leguminosarum* (PDB: 2VQR); Б) щелочная фосфатаза *E. coli* (PDB: 1ALK); В) арилсульфатаза *P. aeruginosa* (PDB: 1HDH); Г) нуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза *Xanthomonas axonopodis* (PDB: 2GSN). Справа: Схема перекрестной субстратной специфичности ферментов суперсемейства ЩФ: AP – щелочная фосфатаза (синий); AS – арилсульфатаза (желтый); NPP – нуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза (красный); PMH – фосфонатмоноэфиргидролаза (зеленый). Цвет круга соответствует специфическому субстрату; соединительные линии указывают на перекрестную каталитическую активность ферментов в отношении данных субстратов (адаптировано из Barrozo et al., 2015)

Комплекс активного центра классической ЩФ *E. coli* (семейство ЩФ PhoA) с субстратом ROPO_3^{2-} (рис. 26) первоначально образуется за счет координации атомов кислорода фосфатного субстрата двумя каталитическими ионами $\text{Zn}^{2+}(1)$ и $\text{Zn}^{2+}(2)$ и водородными связями гуанидиновой группы Arg166 (рис. 26 А, Б) (Балабанова и др., 2023; Aoki et al., 2021). Нуклеофильный остаток Ser102 в классической ЩФ *E. coli* активируется Mg^{2+} -связанным OH^- с образованием $\text{Zn}^{2+}(2)$ -координированного Ser102 (алкоксидный тип), который занимает позицию, противоположную позиции уходящей RO-группы, как показано на рисунке 26 (А, Б).

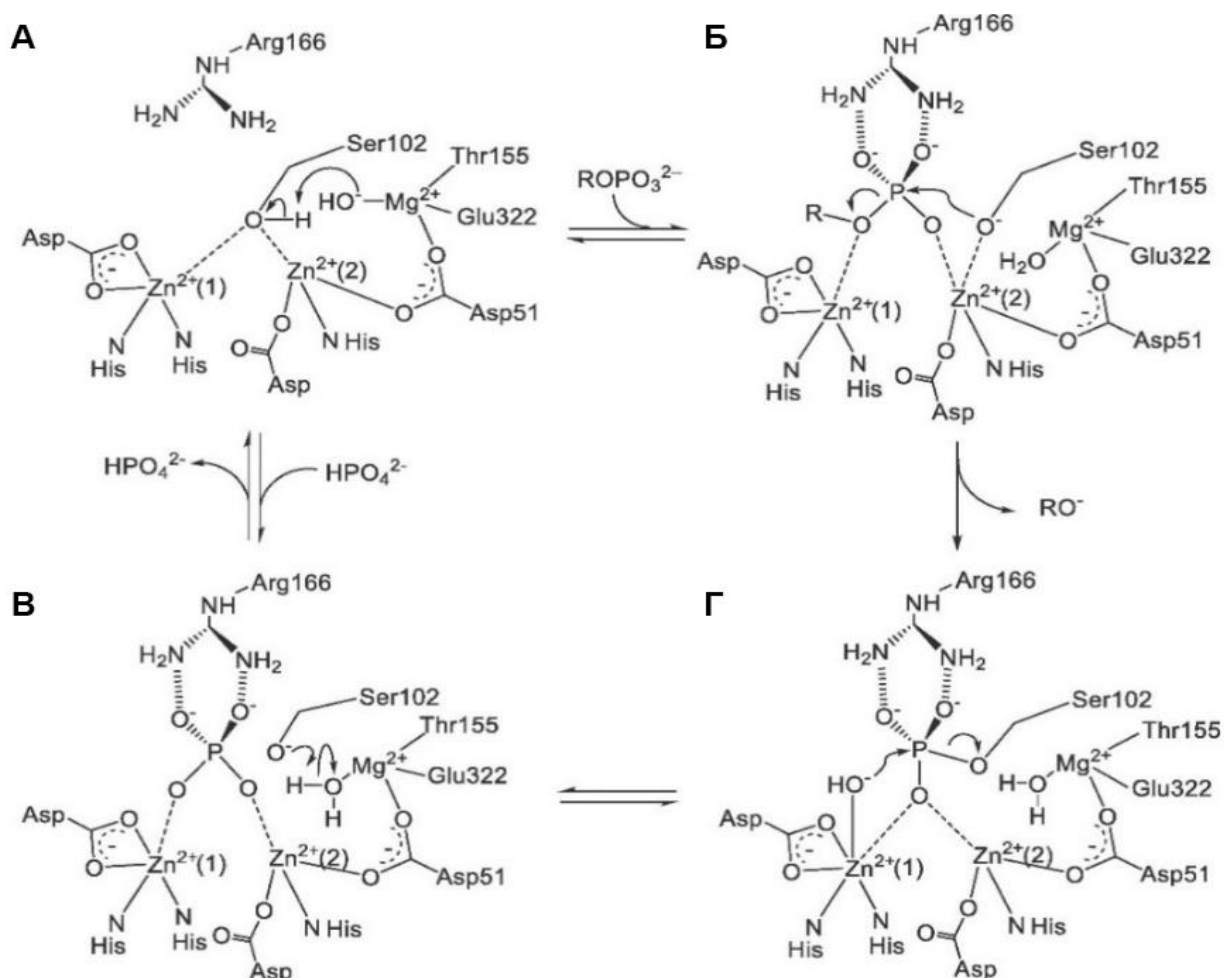


Рисунок 26 – Механизм каталитического действия ЩФ *E. coli* (адаптировано из Aoki et al., 2021)

Нуклеофильная атака Ser102 на ROPO_3^{2-} способствует расщеплению связи POR , в результате чего образуется комплекс ЩФ- PO_4^{2-} , в котором фосфат, связанный с Ser102 (комплекс фермент-продукт (E-P)), стабилизируется Arg166 (рис. 26 Б, Г). После этих процессов Zn^{2+} -связанный OH^- атакует Ser102-связанный фосфат с образованием нековалентного комплекса E- PO_4^{3-} (или E- HPO_4^{2-}), как показано на схеме (рис. 26 В, Г). Наконец, продукт реакции P_i высвобождается при регенерации каталитического сайта активного центра (рис. 26 А, В).

Таким образом, предполагается, что третий ион металла (Mg^{2+}) у классических ЩФ не входит в активный центр и не участвует непосредственно в катализе, а лишь аллостерически и поочередно оптимизирует активную конформацию субъединиц димерного фермента (рис. 27).

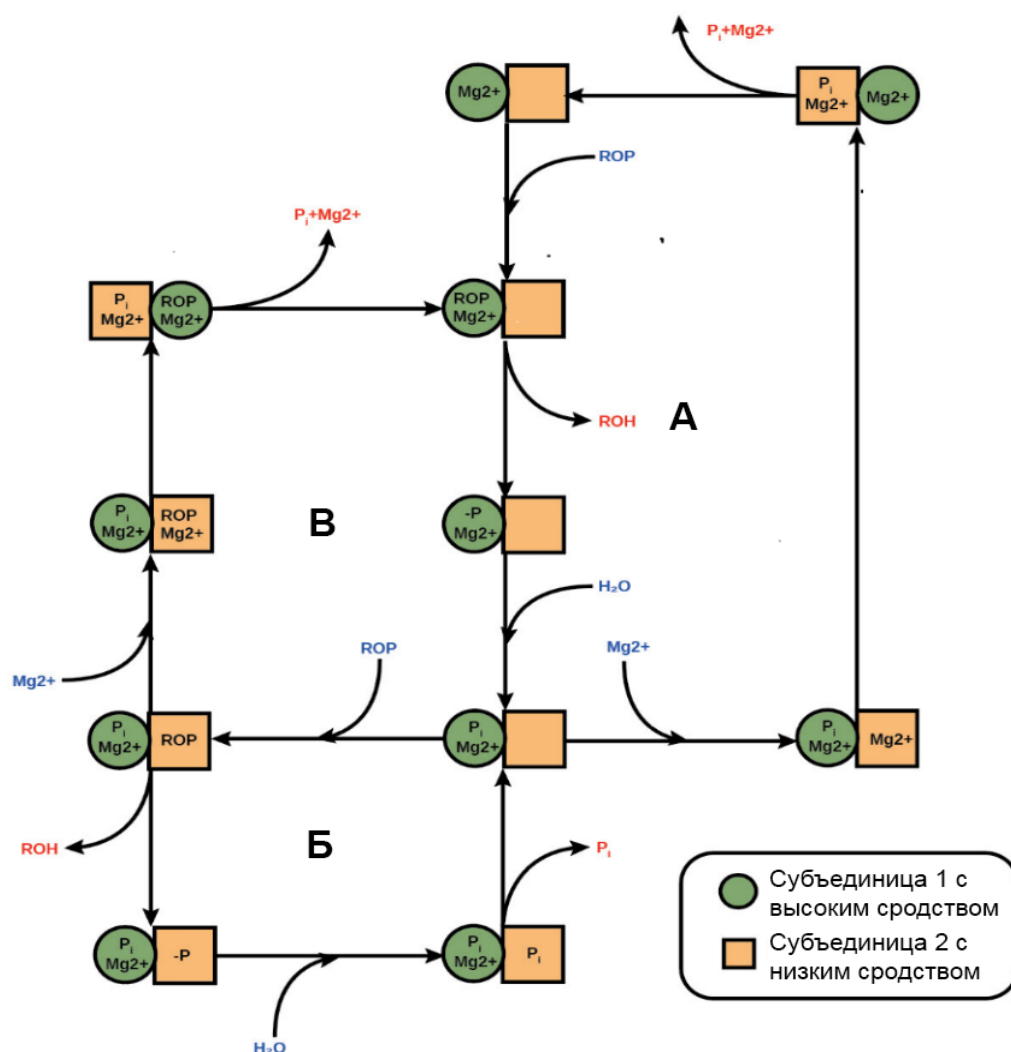
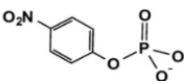
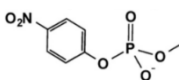
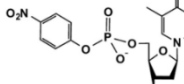
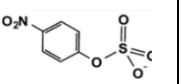
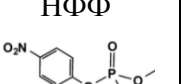


Рисунок 27 – Предложенная схема отрицательной аллостерической регуляции субъединиц димерной ЩФ *E. coli* ионами Mg^{2+} в каталитическом цикле. В процессе катализа субъединицы принимают асимметричную конформацию, поочередно связывая Mg^{2+} и субстрат (феномен отрицательной кооперативности). А. Субъединица 1 с высоким сродством (○ – зеленый круг), связав ион Mg^{2+} (вертикальная стрелка вниз), взаимодействует с субстратом (ROP). Это приводит к высвобождению уходящей группы (ROH) и формированию фермент-фосфатного комплекса ($-P/Mg^{2+}$). При участии молекул H_2O происходит гидролиз с образованием фосфат-иона (P_i) и активация Субъединицы 2 с низким сродством (□ - желтый квадрат). Б, В. Субъединица 2 (□) связывает Mg^{2+} и переходит в состояние Субъединицы 1 (○), либо связывает субстрат ROP, замыкая цикл по альтернативным сценариям (адаптировано из Orhanović et al., 2003)

В связи с наличием общего механизма действия, ферменты суперсемейства ЩФ имеют тенденцию к перекрестной каталитической и субстратной специфичности (неспецифичности), когда субстрат фермента одного семейства может подвергнуться неспецифическому гидролизу под действием фермента, принадлежащего к другому белковому семейству (рис. 25, табл. 2).

Таблица 2 – Каталитическая эффективность некоторых ЩФ и фосфодиэстераз (ФДЭ) в отношении *n*-нитрофенилфосфат(*n*-НФФ) и сульфат(*n*-НФС) моно-, ди- и триэфиров

Фермент	Эффективность катализа k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)				
	<i>n</i> -НФФ 	метил- <i>n</i> -НФФ 	dT5'- <i>n</i> -НФФ 	<i>n</i> -НФС 	Диметил- <i>n</i> -НФФ 
ЩФ <i>EcAP</i>	$3,3 \times 10^7$ ^a [$6,3 \times 10^8$] [*]	$1,8 \times 10^1$ ^b	$<2,0 \times 10^{-2}$ [*]	$2,8 \times 10^{-3}$ ^c	НД ⁸
ФДЭ <i>NPP</i>	1,0 ^d	$2,3 \times 10^2$ ^d	$1,6 \times 10^6$ ^d	$2,0 \times 10^{-5}$ ^e	$<5,9 \times 10^{-4}$ [*]
ЩФ <i>PafA</i>	$1,6 \times 10^6$ ^a [$4,3 \times 10^8$] [*]	$1,7 \times 10^1$ ^a	$1,6 \times 10^{-3}$ [*]	$1,6 \times 10^{-4}$ [*]	НД ⁸

Примечания: 1. ^{*} Sunden et al., 2016. 2. ^a O'Brien, Herschlag, 2002. 3. ^b Zalatan et al., 2008. 4. ^c Andrews et al., 2014. 5. ^d Zalatan et al., 2006. 6. ^e Lassila et al., 2008. 7. Условия анализа активности были следующими: 0,1 мкМ натрия МОПС, pH 8,0, 0,5 мкМ NaCl, 100 мкМ ZnCl₂ и 500 мкМ MgCl₂ при 25 °С. В квадратных скобках дана расчетная константа скорости реакции второго порядка с учетом лимитирующей стадии (^{*} Sunden et al., 2016; ^c Andrews et al., 2014). 8. НД, нет данных.

Каталитическая неспецифичность фермента может иметь вторичное значение и не оказывать существенного влияния на физиологию и, соответственно, на жизнеспособность организма (Corpley, 2017). Однако в морской среде, где внеклеточному ферменту доступно множество различных потенциальных субстратов, перекрестная каталитическая активность может сыграть решающую роль в выживании как одной клетки, так и всей популяции или даже целого сообщества. Примеры внеклеточных пептидаз в морской среде подтверждают эту концепцию, когда один субстрат может быть гидролизован целым рядом специфичных ферментов (Steen et al., 2015). Напротив, полиспецифичный фермент суперсемейства ЩФ может обеспечить гидролиз любых Р-содержащих субстратов при условии дефицита своего основного природного субстрата (Балабанова и др., 2023). Так, ЩФ являются, прежде всего, Р-моноэстеразами, которые катализируют гидролиз моноэфиров алкил- и арилфосфатов с образованием Р_i и спирта (или фенола соответственно) и могут выступать в роли Р-диэстераз, Р-триэстераз и сульфатаз, но с гораздо меньшей эффективностью (табл. 2). Так, классическая ЩФ семейства *PhoA* из кишечной палочки *E. coli* может действовать как Р-моноэстераза, -диэстераза и сульфатаза одновременно (табл. 2) (Catrina et al., 2007; Sunden et al., 2016). Кроме того, ЩФ *PhoA E. coli* обладает побочной активностью гидрогеназы, так как фосфит в ее присутствии окисляется до фосфата и молекулярного водорода (Yang et al., 2004). Другим примером является

ЩФ PhoA гамма-протеобактерии *A. mediterranea* штамма DE (глубоководный экотип), которая проявляет Р-диэстеразную, -триэстеразную и сульфатазную активность (Srivastava et al., 2021). Бактерия известна присутствием огромного количества в олиготрофных поверхностных водах, морских глубинах и прибрежных районах (около 30% от общего количества прокариот), особенно во время цветения фитопланктона (Ivars-Martínez et al., 2008). Многофункциональная ЩФ PehA также обладает широкой субстратной специфичностью из-за перекрестной каталитической активности, гидролизуя моно-, ди- и триэфиры фосфатов, моноэфиры фосфонатов, моноэфиры сульфатов и сульфонов (van Loo et al., 2010). PehA может гидролизовать моноэфиры глифосата (N-(фосфонометил)-глицина), с меньшей эффективностью – глицерилглифосата. Гомологи ЩФ PehA обнаружены у бактерий видов *Trinickia caryophylli* и *Rhizobium johnstonii* (тип *Pseudomonadota*).

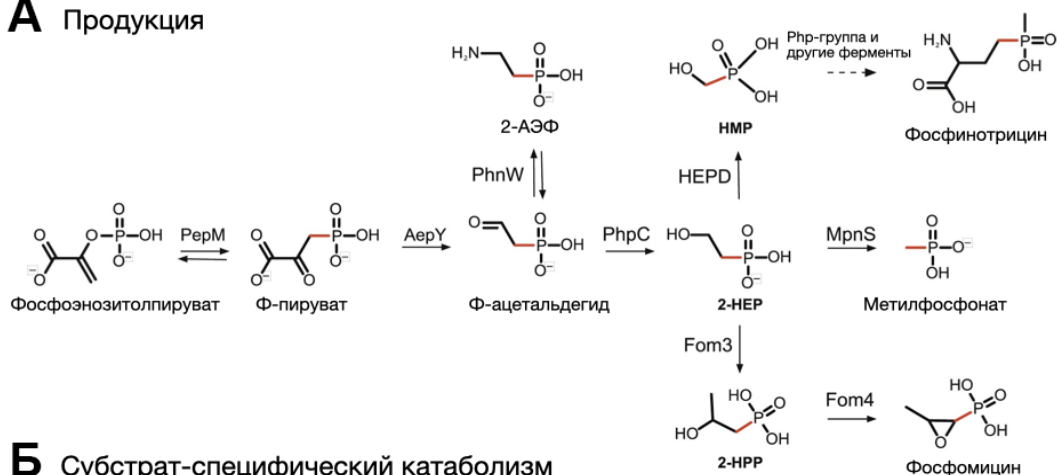
Среди трех типов фосфоэфирных связей, существующих в природе, фосфоди- и триэфирные связи исключительно стабильны и имеют период полураспада около 3×10^7 лет при умеренной температуре и нейтральном значении pH, в то время как ускорение их разрыва (до 10^{16} раз) может быть достигнуто только путем ферментативного гидролиза металлоферментами, такими как ЩФ (Балабанова и др., 2023; O'Brien, Herschlag, 2002; Zalatan et al., 2006, 2008, Lassila et al., 2008; Andrews et al., 2014; Sunden et al., 2016). Это свойство указывает на важную роль ЩФ в цикле Р за счет огромного разнообразия типов субстратов, которые они могут ферментативно деградировать при реминерализации Р (рис. 24, 25).

Эти субстраты включают ортофосфаты и фосфорные эфиры, где Р находится в полностью окисленном состоянии (P(V)), а также более восстановленные соединения в виде фосфита (P(III)), фосфонатов различной структуры (P(III)) и гипофосфита (P(I)) (Ewens, et al., 2021; Lockwood et al., 2022). Фосфит и гипофосфит составляют до 26% РОФ в некоторых местообитаниях, а геохимические оценки позволяют предположить, что фосфит занимал значительное место в палеоархейском океане из-за его поступления из метеоритов и наличия восстановительных условий во всех средах на Земле в тот период времени (Шигаева и др., 2020; Pasek et al., 2017; Baidya et al., 2024). Кроме того, фосфит является источником Р для множества видов микроорганизмов, а в некоторых случаях он может служить донором электронов для хемолитотрофов (Martinez et al., 2011; Ewens et al., 2021).

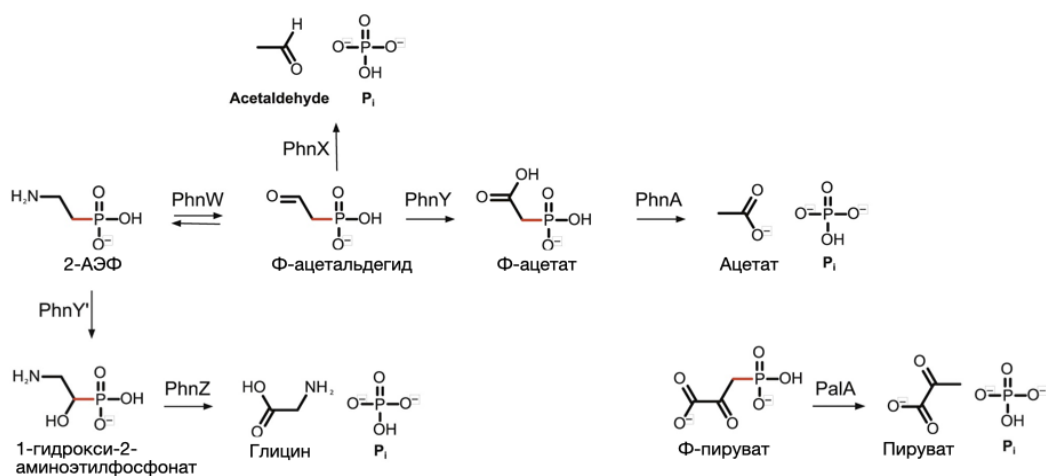
Фосфонаты составляют примерно четверть всех высокомолекулярных РОФ в Мировом океане (Kolowitz et al., 2001). Они содержат углеродные цепи с химически инертными углеродно-фосфорными (С-Р) связями, которых нет в других восстановленных молекулах, содержащих Р. Стабильность связи С-Р обеспечивает их устойчивость к ферментативным и абиотическим процессам деградации. Причем фосфонаты могут усваиваться в качестве питательного ресурса разнообразными бактериальными и архейными таксонами из различных сред обитания (Martinez

et al., 2011; Acker et al., 2022; Boden et al., 2024). Фосфонаты выполняют множество функций: от встраивания в липиды, гликаны и гликопротеины для повышения их химической прочности, защиты от ферментативной деградации и до действия в качестве антиметаболитов их структурных аналогов, например, фосфорных эфиров. Микроорганизмы с генами катаболизма фосфонатов могут использовать фосфонаты в качестве источников Р и, в некоторых случаях, углерода и азота (Lockwood et al., 2022). Микробная утилизация фосфонатов происходит благодаря субстрат-специфическому катаболизму с помощью специализированных гидролаз/диоксигеназ и неспецифическому катаболизму с помощью С-Р лиаз, которые могут гидролизовать широкий спектр субстратов (рис. 24, 28). Геномные исследования показали, что фосфонат-катаболизирующие пути, которые основаны на каталитическом действии СР-лиаз, фосфонатаз и некоторых диоксигеназ, особенно распространены в водах с дефицитом фосфатов (Sosa et al., 2019; Lockwood 2022), например в почвах (Oliverio et al., 2020). Это свидетельствует о том, что они могут быть вовлечены в механизм устранения дефицита Р биологическими сообществами (Boden et al., 2024). Катаболизм фосфонатов включает расщепление связи С-Р (окисленное состояние фосфора $+3$) до P_i или фосфит-ионов (окисленное состояние $+5$) и играет центральную роль в океаническом окислительно-восстановительном цикле Р (Van Mooy et al., 2015; Pasek et al. 2017; Lockwood et al., 2022). Несмотря на большое разнообразие фосфонатов в морской среде, особое значение имеют 2-аминоэтилфосфонат (2-АЭФ) и метилфосфонат (MPn) (рис. 28 Б, В). Недавно было показано, что минерализация 2-АЭФ является важным этапом окислительно-восстановительного цикла в морской среде (Murphy et al., 2021). Метилфосфонат (MPn) является ключевым фосфонатом в морской среде и, вместе со своим предшественником 2-гидроксиэтилфосфонатом (2-НЕР), составляет до 20% Р, связанного с РОФ, в виде сложных эфиров полисахаридов (Repeta et al., 2016) (рис. 28). Функция MPn в клетке точно не известна, однако было показано, что микробы могут его использовать для синтеза экзополисахаридов, модифицированных MPn (Metcalf et al., 2012). Важно отметить, что катаболизм MPn приводит к аэробной продукции метана, который выделяется в достаточном количестве, чтобы влиять на атмосферный цикл метана, объясняя тем самым «морской метановый парадокс» (рис. 28 В).

А Продукция



Б Субстрат-специфический катаболизм



В Неспецифический катаболизм (C-P Лиаза)

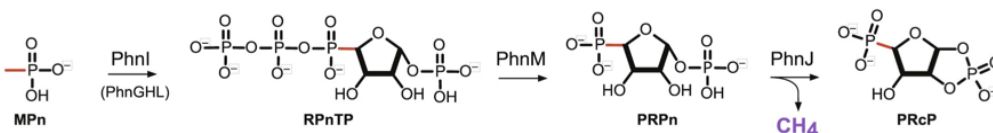
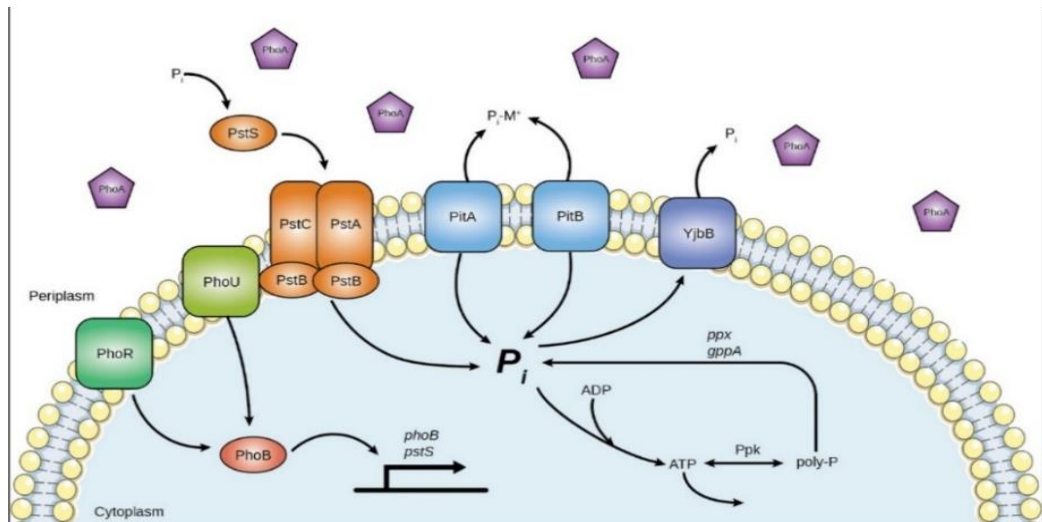


Рисунок 28 – Процессы микробной трансформации и биосинтеза фосфонатов (А), а также пути их субстрат-специфического (Б) и неспецифического катаболизма (В). Связь С-Р (красным цветом); фосфоенолпируват мутаза (PcpM); фосфонопируват декарбоксилаза (AcpY); фосфоноацетальдегид редуктаза (PhnC); 2-гидроксиэтилфосфонат диоксигеназа (HepD); метилфосфонат синтаза (MpnS); фосфоноацетальдегид метилаза (Fom3); (S)-2-гидроксипропилфосфоновая кислота эпоксидаза (Fom4); 2-АЭП-пируват трансминаза (PhnW); фосфоноацетальдегид гидролаза (PhnX); фосфоноацетальдегид дегидрогеназа (PhnY); фосфоноацетат гидролаза (PhnA); 2-аминоэтилфосфонат диоксигеназа (PhnY'); 2-амино-1-гидроксиэтилфосфонат диоксигеназа (PhnZ); фосфонопируват гидролаза (PalA); C-P лиаза I (PhnI); C-P лиаза J (PhnJ); Alpha-D-рибоза 1-метилфосфонат-5-трисфосфат дифосфатаза (PhnM); фосфоенолпируват (PEP), фосфонопируват (Pn-pyruvate), фосфоноацетальдегид (Pn-acetaldehyde); фосфоноацетат (Pn-acetate); 2-аминоэтилфосфонат (2-АЭФ); 2-гидроксиэтилфосфонат (2-HEP); гидроксиметилфосфоновая кислота (HMP); метилфосфонат (MPn); 2-гидроксипропилфосфоновая кислота (2-HPP); альфа-D-рибоза-1-метилфосфонат-5-трифосфат (RPNTP); альфа-D-рибоза-1-фосфонат-5-фосфат (PRPn); альфа-D-рибоза-1,2-циклический-фосфат-5-фосфат (PRCp) (адаптировано из Lockwood et al., 2022)

Бактерии выработали определенный механизм поглощения фосфатов из окружающей среды для поддержания стабильного внутриклеточного уровня P_i (1-10 мМ) (McClear, 2017). Фосфатный гомеостаз устанавливается за счет поддержания баланса между импортом, ассимиляцией, секвестированием и экспортом фосфатов клеткой с помощью белков двух транспортных систем, регулируемых в соответствии с изменениями концентрации P_i в окружающей среде. Этот механизм включает работу нескольких низкоаффинных белков-импортеров P_i Т системы (PitA-PitH), а также комплекса белков высокоаффинной (высокоспецифичной) P_i -транспортной системы PstSCAB (рис. 29).

Включение P_i в биомолекулы (ассимиляция) осуществляется клеткой преимущественно через синтез АТФ из АДФ с использованием внутриклеточного пула P_i . Мониторинг концентрации P_i в окружающей среде происходит через двухкомпонентную систему сигнальной трансдукции PhoB/PhoR путем формирования комплексов рецепторных белков с сигнальными молекулами на мембране, которые запускают экспрессию генов синтеза P_i -связывающих белков, а также ферментов, катализирующих расщепление альтернативных источников Р в условиях дефицита P_i в окружающей среде (рис. 29). Концентрация внутриклеточного P_i поддерживается циклом биокаталитического синтеза и расщепления полифосфата (polyP). Механизм контроля внутриклеточного пула P_i включает специфические паттерны экспрессии транспортеров с разной аффинностью и соответственно скоростью доставки P_i в клетку (Hsieh, Wanner, 2010). Формирование внутриклеточного пула polyP энергозатратно и требует синтеза молекул АТФ. После того, как уровень внутриклеточного P_i достигает верхнего предела, белки-транспортеры (PitA, PitB, YjbB) экспортируют его обратно в окружающую среду (рис. 29). Метаболические реакции, сопряженные с этим процессом, дополнительно контролируют внутриклеточное содержание polyP как запасного вещества. Первичными импортерами P_i являются белки PitA, PitB и PstSCAB (рис. 29). Белки транспортной системы P_i Т могут выполнять функцию вторичного $Na^{(+)}-H^{(+)}$ -зависимого транспорта в клетку P_i в виде его соединений с металлами (ортофосфатов) (Jackson et al., 2008). Белки транспортной системы PstSCAB являются P_i -зависимыми беками, относящимися к семейству ABC-транспортеров, которые осуществляют перенос P_i за счет энергии гидролиза АТФ (McClear, 2017). К белкам обратного транспорта P_i (экспорта) относятся глицерол-3-фосфат: P_i -антипортеры PitA, PitB и GlpT, гескозо-6-фосфат: P_i -антипортер UhpT, и P_i -экспортер YjbB (Motomura et al., 2011; McClear, 2017).

Двухкомпонентная сигнальная система PhoB/PhoR, повышающая уровень экспрессии генов всех этих белков в ответ на нехватку P_i в окружающей среде для роста микробных популяций, состоит из ключевого белка, гистидин киназы PhoR, и белка-регулятора ответа PhoB (Hsieh, Wanner, 2010; Santos-Beneit, 2015) (рис. 29).



А

		TM1		TM2		TM3	
PitA	1	MLHLFAGLDLHTGCLLLALLAFVLFYEAI	INGFHD	TANAVATVI	YIYTRAMRSQLAVVM	AAVFNLGVLLGGLSVAYAI	VHMLPTDLLNMGSSHGLAMVFSM
PitB	1	MLNLFVGLDIYTGCLLLALLAFVLFYEAI	INGFHD	TANAAVAIV	YIYTRAMQPLAVVM	AAFFNFGVLLGGLSVAYAI	VHMLPTDLLNMGSSHGLAMVFSM
		TM4		TM5			
PitA	101	LLAAIWNLTWYFGLPASSHTLIGAI	IGLTLN	MTGTSVVDALNIPKVL	SIFGSLIVSPIVGLV	FAGGLIFLLRRYWSG	TKKRRIHLTPAEREKK
PitB	101	LLAAIWNLTWYFGLPASSHTLIGAI	IGLTLN	ALLTGSSVMDALNLRVTK	IFSSLI	VSPVGLVIAGGLIFLLRRYWSG	TKKRRIHLTPAEREKK
		TM6		TM7			
PitA	201	DGKKKPPFWTRIALILSAIGVAFS	HGANDQ	KGIGLVMLVLIGVAPAGFVVM	NATGVEITRTRDAINNVEAY	FQHPALLKQATGADQLVPAEAGATQ	..
PitB	201	DGKKKPPFWTRIALILSAIGVAFS	HGANDQ	KGIGLVMLVLIGVAPAGFVVM	NATGVEITRTRDAINNVEAY	FQHPALLKQATGADQLVPAEAGATQ	..
				TM8			
PitA	301	PAEFHCHPSNTINALNRLKGM	LTDDVESYDKLSLDQRSQMR	RIMLCVSDTIDKVVKMPGVS	ADDQRLLEKLSMDLSTIEYAPVWII	MAVALALGIGTMI	..
PitB	301	VTEFHCHPANTFDAIARVKTML	PGNMSYEPLSVSQRSLR	RIMLCISDTSAKLAKLPGVSKEDQ	NLLKLSMDLSTIEYAPVWII	MAVALALGIGTMI	..
		TM9		TM10			
PitA	401	GWRRVATTIGEKIGKGM	TYAQGMSAQMTAAVSI	GLASYTGMEVSTTHVLSSVAGT	HMVVDGGGLQRTVTSILMAVFTL	PAVLLSGGLYWLQFL	..
PitB	401	GWRRVATTIGEKIGKGM	TYAQGMAAQMTAAVSI	GLASYTGMEVSTTHVLSSVAGT	HMVVDGGGLQRTVTSILMAVFTL	PAVLLSGGLYWLQFL	..

Б

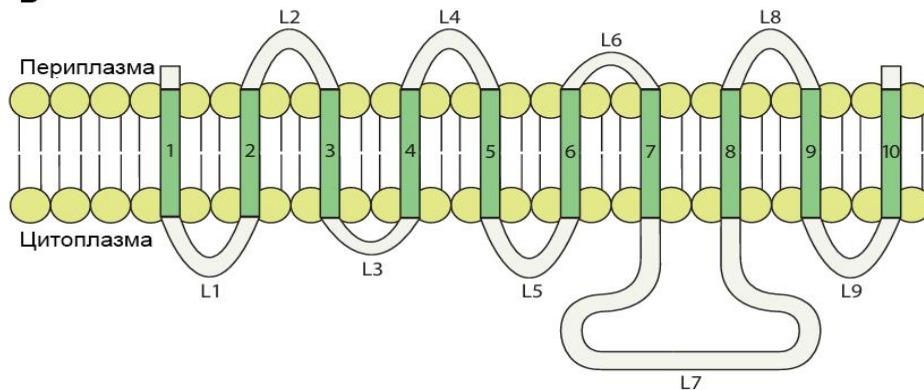


Рисунок 29 – Индуцибельная система поддержания гомеостаза P_i в клетке *E. coli* (верхний рисунок автора). Концентрация P_i поддерживается (≈ 10 мМ) транспортерами с низким (PitA, PitB, голубые фигуры) и высоким (PstSCAB, оранжевые) сродством к P_i . Сигнальная система PhoB/PhoR (красный/зеленый) контролирует экспрессию генов синтеза транспортеров, фосфатазу/киназу PhoR и внеклеточную ЦФ (фиолетовые пятиугольники). PolyP синтезируется из АТФ (АТР) под действием полифосфат киназ Ppk (схема). Взаимодействие транспортеров PstSCAB опосредовано белковым регулятором PhoU (салатовый). Нижний рисунок (адаптировано из McClear, 2017): А. Выровненные белковые последовательности транспортеров PitA и PitB *E. coli*. Регионы α -спиралей TM1-TM10 (зеленый), консервативные мотивы (красный). Б. топологическая модель транспортных белков PitA и PitB. Трансмембранные спирали обозначены цифрами 1–10, соединяющие их петли обозначены L1–L9

Когда киназа PhoR передает регулятору PhoB фосфорильную группу, тот связывается с ДНК в месте активации транскрипции ряда генов (рис. 29), ответственных за экспрессию белков с высокой аффинностью к P_i , включая транспортную систему PstSCAB и ферменты для утилизации альтернативных источников P_i – органофосфатов (McClear, 2017). Кроме того, поскольку транспортеры Pst во время транспорта P_i изменяют конформацию молекулы с обращенной внутрь на обращенную наружу, они по-разному взаимодействуют с PhoR через белок PhoU (рис. 29). Обращенная внутрь конформация белка PstB взаимодействует с белком PhoR, стабилизируя его фосфатазную конформацию. Конформация транспортеров PstSCAB, обращенных наружу для связывания экзогенного P_i , благоприятствует стабилизации конформации киназы PhoR, которая позволяет ее специфическому домену связывать АТФ и аутофосфорилировать свой домен (McClear, 2017) (рис. 29).

Было показано, что регулон PhoB обеспечивает регуляцию не менее 31-го гена, в том числе генов периплазматической ЩФ, транспортных белков PstSCAB и регуляторных белков PhoB и PhoR (Hsieh, Wanner, 2010; McClear, 2017). К членам регулона Pho, действующего в случае перехода на альтернативные органические источники P, относятся и гены *ugpBAECQ*, которые кодируют ABC-транспортеры глицеро-3-фосфата и фосфодиэстеразу, а также гены *phnCDEFGHIJKLMNOP*, кодирующие транспортер фосфоната и ферменты комплекса СР-лиаз, которые участвуют в синтезе фосфорибозильного фрагмента из импортируемого фосфоната. Кроме этих 31-го генов, напрямую контролируемых регулоном PhoB (Hsieh, Wanner, 2010; McClear, 2017), под его косвенным влиянием (положительным и отрицательным) может находиться синтез, предположительно, еще 400 белков (Yuan et al., 2006; McClear, 2017). ЩФ, в свою очередь, участвует в поставке P_i в периплазму и цитозоль клетки для осуществления реакций переноса фосфорильных групп киназами (фосфорилирования/дефосфорилирования), синтеза фосфорсодержащих первичных и вторичных метаболитов и энергетического обмена (синтеза АТФ) (рис. 24, 25, 29).

Кроме того, на сегодняшний день достоверно известно, что регулярное поступление и аккумулятирование P_i в периплазме в виде ассоциации P_i -анионов с хемиосмотическими катионами H^+/Na^+ (периплазматическое фосфатирование, или буферизация) жизненно необходимо бактериальной клетке для осмотической регуляции в условиях жизни в морской воде, где концентрация соли достигает 0,5 М (Kamennaya et al., 2020) (рис. 30). При этом происходит накопление катионов H^+/Na^+ в периплазме, импорт которых через плазматическую мембрану сопряжен с синтезом АТФ, а также постоянное насыщение транспортной системы PstS. Для установления равновесия образующегося осмотического перепада из-за накопления высокой концентрации соли P_i молекулы воды будут поступать в периплазму из окружающей среды, увеличивая ее объем и тургор наружной мембраны (рис. 30 а†).

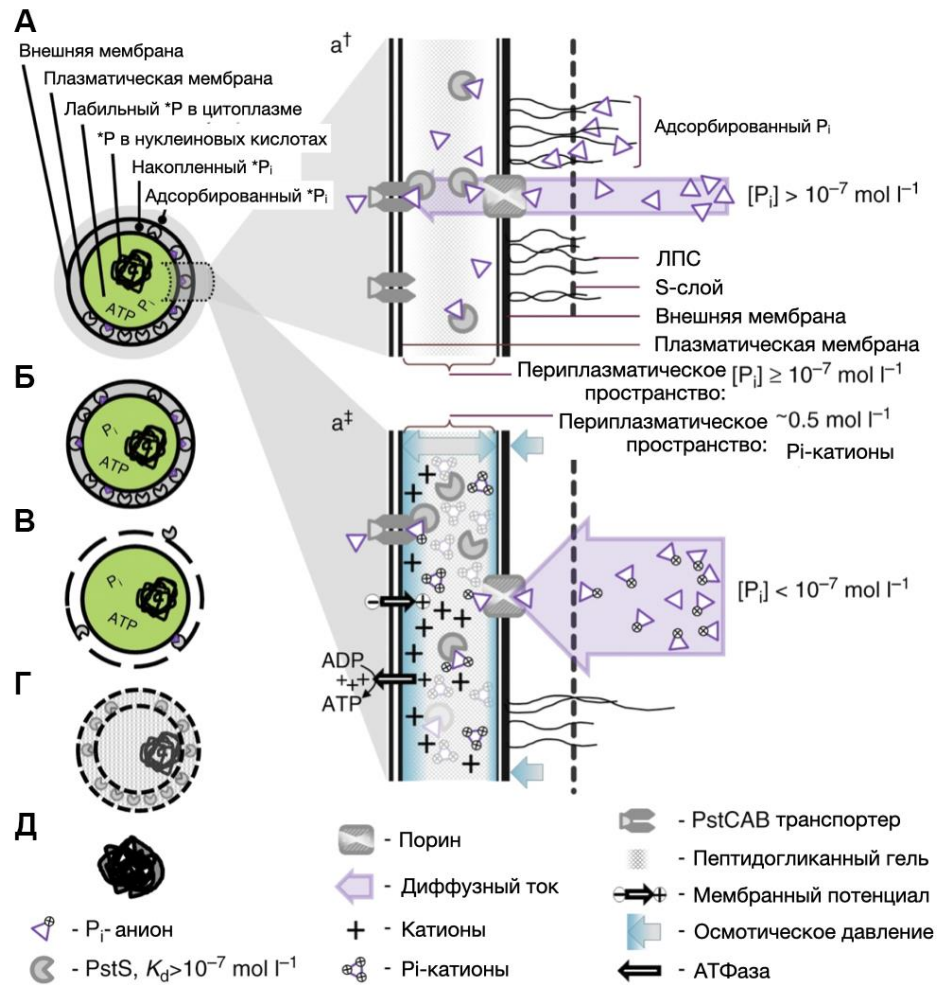


Рисунок 30 – Альтернативные модели механизма транспорта P_i в морских бактериях. (А) – Модельная клетка *Synechococcus* sp. WH8102 с меченым *P_i. (на поверхности клетки, в периплазме, с субъединицей транспортного белка PstS в периплазме, в свободной или ассимилированной форме в цитоплазме (ДНК, фосфолипиды и пр.): ($a^{\ddagger}$) – Традиционная модель транспорта и ассимиляции P_i в клетках бактерий – параллельные процессы пассивной адсорбции P_i на липополисахаридах (ЛПС) наружной мембраны и покрытых (у некоторых бактерий) белковым S-слоем, и диффузии P_i через наружную мембрану и порины в периплазму. Диффузия напрямую связана с транспортом P_i через цитоплазматическую мембрану с помощью транспортеров ABC-типа (PstCAB) с использованием периплазматического P_i-связывающего белка (PstS). ($a^{\ddagger}$) – Предложенная модель Kamennaya et al. (2020): массовый перенос анионов P_i через внешнюю мембрану посредством поринов, их буферизация катионами мембранного потенциала в периплазме и импорт P_i из буферного запаса (P_i-буфера) через цитоплазматическую мембрану с помощью фосфат-специфичной транспортной системы PstCAB. Изотоническое или слабое гипертоническое осмотическое давление в периплазме поддерживается забуференной солью P_i. (Б-Д) – удаление различных пулов P_i из клеток модельного микроорганизма *Synechococcus* sp. WH8102 (адаптировано из Kamennaya et al., 2020)

Явлением периплазматического фосфатирования можно объяснить существование у галофильных и умеренно галофильных бактерий высокоактивных ЩФ, которые не ингибируются высокими концентрациями конечного продукта реакции – P_i (Plisova et al., 2005; Lidbury et al., 2021). Такими бактериями являются обитатели засоленных почв, морские бактерии, а также микроорганизмы, колонизирующие внутренние органы животных и человека, в частности, ЖКТ и мочевыделительную систему (Yang et al., 2020).

Полномасштабная реконструкция истории эволюции микробных генов фосфатного обмена, участвующих в утилизации фосфатов, фосфонатов, фосфитов и гипофосфитов (*pnas*, *pstS*, *pitA*, *pitH*, *perM*, *ppd*, *phnX*, *phnA*, *phnZ*, *phnJ*, *phnM*, *phnW*, *htxA*, *htxB*) и генов 16S рРНК с использованием 865-ти геномов широкого таксономического разнообразия бактерий и архей показала наличие взаимосвязи между моделью присутствия/отсутствия и количества копий генов фосфатного обмена микроорганизмов и концентрации фосфатов в океане (Zeng et al., 2022; Boden et al., 2024) (рис. 31). Филогенетические деревья, полученные тремя разными методами молекулярных часов (CIR, LN и UGAM), свидетельствуют о том, что последний универсальный общий предок (LUCA) появился у бактерий и архей около 4,35–4,37 млн лет назад, после появления первых источников жидкой воды (Boden et al., 2024). Бактерии *Actinobacteria* являются родственниками *Firmicutes* (UBS = 95), а *Proteobacteria*, вероятно, имеют более позднего общего предка с *Bacteroidetes* (UBS = 66) (рис. 31). Результаты анализа путей фосфатного метаболизма у взятой выборки таких бактерий свидетельствуют о широком распространении генов, кодирующих фосфат-натриевые симпортеры (*pnas*), и генов, относящихся к механизмам активного высокоаффинного транспорта фосфата (*pstS*) (в 257-ми и 174-х геномах соответственно) (Boden et al., 2024) (рис. 31). Гены низкоаффинных транспортеров системы P_iT (*pitA-pitH*) во многих геномах отсутствуют (рис. 29, 31). У целого ряда бактерий есть пути низкоаффинного транспорта P_i , но большинство архей не могут метаболизировать фосфонаты, фосфиты или гипофосфиты (рис. 31). В отличие от большинства микроорганизмов, бактерии филума *Proteobacteria* (тип *Pseudomonadota*) обладают очень широким спектром генов фосфонат-циклирования (Lockwood et al., 2022). Однако распределение геномов на древе жизни показывает больший таксономический разброс фосфонат-продуцирующих организмов, по сравнению с фосфонат-катаболизирующими, так как пути синтеза фосфонатов в каждом отдельно взятом таксоне встречаются реже, чем пути их катаболизма (рис. 31). Лишь 30 из 865-ти геномов содержат гены синтеза фосфонатов из фосфорных эфиров (*perM* и *ppd*), тогда как 94 генома имеют хотя бы один из генов путей катаболизма фосфонатов (*phnX*, *phnA*, *phnZ*, *phnJ* или *phnM*). Из последних наиболее распространены гены *phnJ* и *phnM*, кодирующие СР-лиазы широкого спектра действия, по сравнению с генами *phnX*, *phnW*, *phnA* и *phnZ*, которые участвуют в субстрат-специфичном катаболизме фосфонатов (рис. 31).

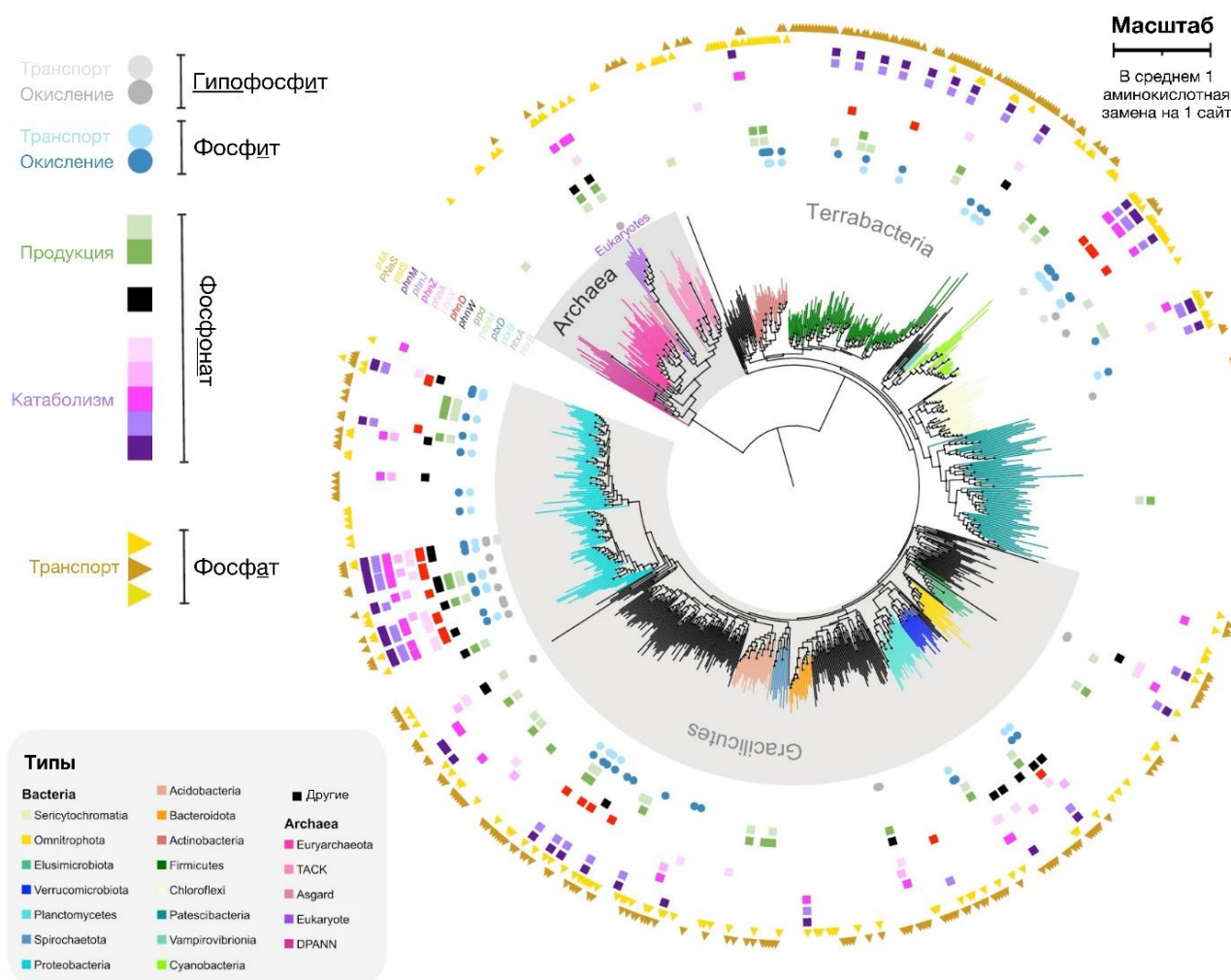


Рисунок 31 – Распределение генов цикла фосфора на филогенетическом древе жизни. Цветовая индикация за терминальными ветвями соответствует гомологам ферментов, участвующих в метаболизме гипофосфита и фосфита (круги), фосфоната (квадраты) и фосфата (треугольники). Ветви окрашены в соответствии с таксономической принадлежностью микроорганизмов (согласно легенде слева). Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия (ML) на основе последовательностей 16S рРНК. Масштабная линейка соответствует количеству нуклеотидных замен на сайт (адаптировано из Boden et al., 2024)

Только 4 генома имеют ген *htxB*, кодирующий связывающий белок более восстановленной формы фосфора – гипофосфита, для его активного транспорта из окружающей среды. Два из этих геномов имеют ген *htxA* для окисления гипофосфита до фосфита, еще 15 геномов имеют только ген *htxA*, вероятно, кодирующий ферменты окисления формиата вместо гипофосфита (Boden et al., 2024) (рис. 24, 28, 31).

Чтобы оценить время появления и распространения генов фосфорного цикла по древу жизни (рис. 31), деревья молекулярных часов были сверены с байесовскими эволюционными деревьями по каждому отдельно взятому гену для определения времени видообразования, дупликации, потери и горизонтального переноса генов (рис. 32).

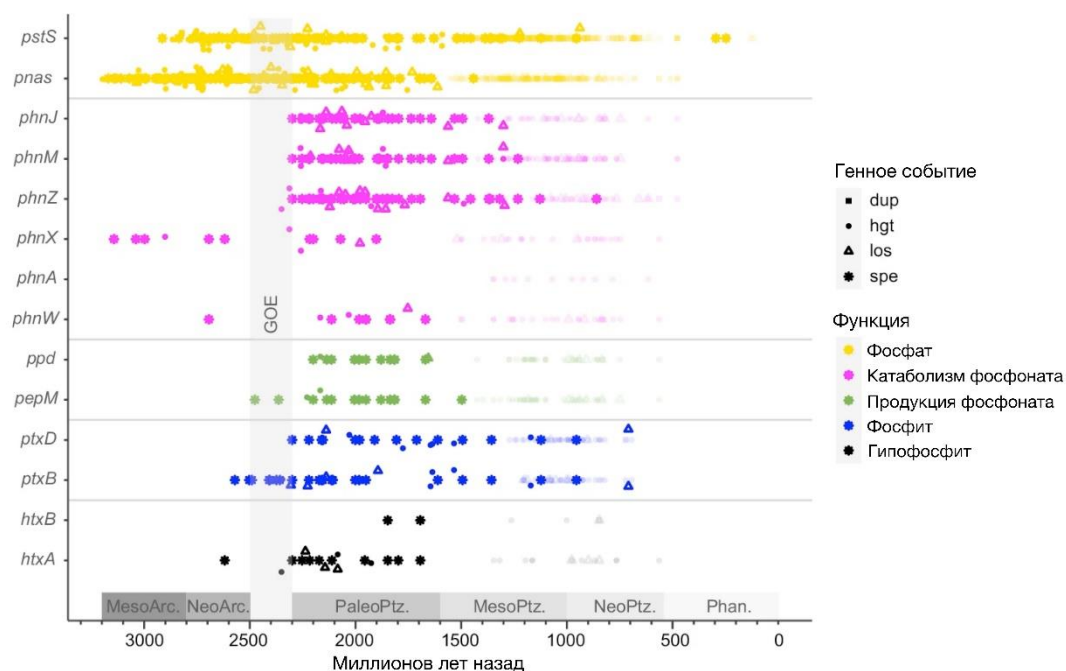


Рисунок 32 – Реконструкция происхождения бактериальных генов катаболизма и ассимиляции соединений фосфора при весовых коэффициентах событий 3:2:1:0 для горизонтального переноса (*hgt*), дупликации (*dup*), утраты (*los*) и видообразования (*spe*) соответственно. Цветовая индикация событий: видообразование (звездочки), горизонтальный перенос генов (заполненные круги), дупликация (заполненные квадраты) и утрата генов (пустые треугольники). Цветовая индикация метаболических путей: утилизация фосфатов (желтый), использование фосфонатов (розовый), биосинтез фосфонатов (зеленый), использование фосфитов (синий) и гипофосфитов (черный). Яркие оттенки обозначают события на внутренних ветвях древа, блеклые – на терминальных ветвях (адаптировано из Boden et al., 2024)

Самое древнее событие для конкретного гена представляет собой первое филогенетическое свидетельство его присутствия, в то время как кластеризация событий в определенном временном интервале свидетельствует о широком распространении данного типа метаболизма среди различных линий клеток (рис. 32). Все три модели показывают, что микробные сообщества начали поглощать фосфат до того, как у них появились пути ассимиляции восстановленных молекул фосфора в виде фосфоната, фосфита и гипофосфита. Например, самые ранние свидетельства существования фосфатно-натриевого симпортера *pnas* появляются в палеоархее, а самые ранние свидетельства импорта и окисления фосфита - в неоархее (рис. 32). Микроорганизмы начали катаболизировать фосфонаты с появлением гена фосфонатазы *phnX* в мезоархее, но в наше время эта способность осталась у немногих (рис. 32). Фосфонатаза действует на фосфоноацетальдегид с образованием фосфата и малых органических молекул для потребностей внутриклеточного метаболизма (рис. 24, 28, 31, 32). Со временем количество видов фосфонатов, которые могут использоваться клеткой в качестве источника Р, увеличилось и появился ген *phnW*, кодирующий 2-аминоэтилфосфонат-пируват трансминазу, которая

совместно с продуктом гена *phnX* высвобождает P_i из 2-АЭФ (рис. 24, 31, 32). Геномный репертуар катаболизма фосфонатов также увеличился в палеопротерозое с распространением генов *phnJ* и *phnM*, кодирующих ключевые компоненты неспецифичных СР-лиаз, которые позволили микроорганизмам высвобождать P_i и глицин из 2-АЭФ, а также катаболизировать широкий спектр фосфонатов разной структуры (рис. 32). Биологический синтез фосфонатов начал зарождаться через несколько сотен миллионов лет после возникновения обоих механизмов поглощения фосфата во время «Великого окисления» (Great Oxidation Event, GOE), глобального изменения состава атмосферы Земли, и связан с возникновением гена *perM*, ответственного за преобразование окисленного фосфорного эфира – фосфоенолпирувата (P(V)), в более восстановленный фосфонат – фосфонопируват (P(III)), и наоборот. Для осуществления обратной реакции в направлении синтеза фосфоната требуется другой фермент – фосфонопируватдекарбоксилаза (кодируемая генами *ppd* или *aerY*). Результаты изучения филогенеза показывают, что ген *ppd* появился менее чем через 300 миллионов лет после появления гена *perM* (рис. 31, 32). Самые ранние свидетельства микробной утилизации фосфита и гипофосфита появились в неоархее (или позднем мезоархее) с появлением гена *ptxB* - для импорта фосфита, и гена *htxA* - для окисления гипофосфита и формиата (White, Metcalf, 2002) (рис. 32). Диссимиляционное окисление фосфита (DPO) (*ptxD*) у бактерий типа *Firmicutes* возникло позднее – около 2,3 млн лет назад (рис. 32). Таким образом, было показано, что многие гены, вовлеченные в круговорот соединений восстановленного фосфора, появляются в микробных сообществах только тогда, когда отсутствуют более легкодоступные для усвоения формы P, такие как ортофосфаты (Kolowitz et al., 2001; Martinez et al., 2011; Oliverio et al., 2020; Lockwood et al., 2022).

Регрессионный анализ метагеномных данных проекта Tara Oceans Project (Jacox et al., 2016; Salazar et al., 2017; Boden et al., 2024) также выявил значительные корреляции между обилием генов метаболизма у морских микроорганизмов и концентрацией фосфатов в поверхностном слое океана, где они обитают (рис. 33). Наблюдаемые тенденции означают, что гены, кодирующие СР-лиазы (*phnM* и *phnJ*) и высокоаффинные транспортеры фосфатов (*pstS*), присутствуют у изолятов, обитающих в среде с низкими концентрациями фосфата, и относительно редки в тех регионах, где их концентрация приближена к максимальной (3,29 мкМ). Напротив, ген транспортера *nptA*, который является членом семейства низкоаффинных симпортеров PNaS, более многочислен в регионах с более высокими концентрациями фосфата >1 мкМ (рис. 33).

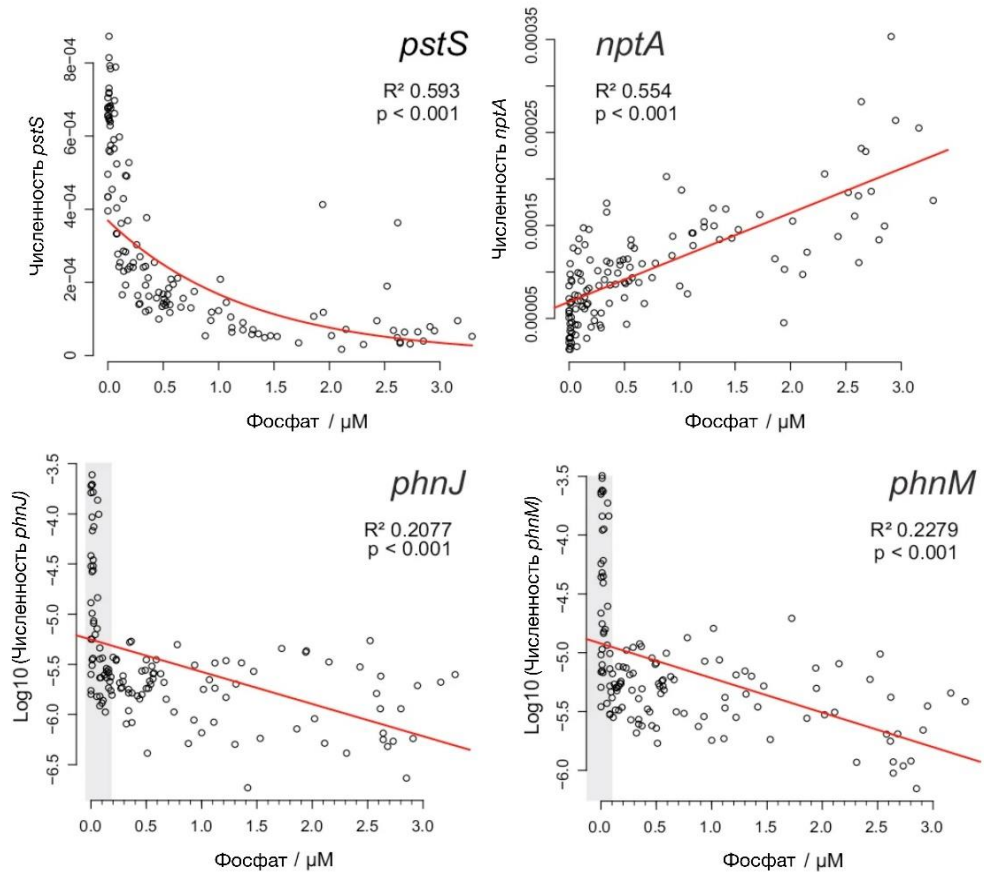


Рисунок 33 – Регрессионный анализ распространенности генов цикла фосфора в районах Мирового океана с различным уровнем содержания фосфатов. Количество ридов (прочтений), кодирующих *pstS*, *nptA*, *phnJ* и *phnM*, отложено по оси y относительно микромолярной концентрации фосфатов (ось x) для 139 образцов из Океанического микробного справочного каталога v2 (OM-RGC.v2) проекта *Tara Oceans*. Линии регрессии (выделены красным) соответствуют результатам двустороннего статистического теста. Полученные значения: $p < 2,2 \times 10^{-16}$ для *pstS* и *nptA*; $p = 4,5 \times 10^{-8}$ для *phnJ*; $p = 8,2 \times 10^{-9}$ для *phnM* при числе степеней свободы $df=129$. Серые области соответствуют низким концентрациям фосфатов, при которых наблюдается максимальное относительное обилие генов C-P-лиазы (адаптировано из Jasox et al., 2016; Boden et al., 2024)

В поверхностных слоях океана микроорганизмы используют фосфонаты в качестве источника P, поскольку встречаемость генов *phnJ* и *phnM* у изолятов резко снижается при концентрации фосфатов выше 0,1 мкМ (Boden et al., 2024). Выше этого порога самые высокие показатели количества генов *phnM* и *phnJ* падают на порядок, а медианные значения – в 4–5 раз (рис. 33). В глубинах океана (от 200 до 1000 м) фосфат более доступен (средняя концентрация 2,1 мкМ с диапазоном от 0,18 до 3,29 мкМ по сравнению с 0,37 мкМ с диапазоном от 0 до 2,31 мкМ на поверхности) (Sunagawa et al., 2015), поэтому генов *phnJ* и *phnM* в целом меньше, но они не становятся более многочисленными, когда концентрация фосфата меньше (Lockwood et al., 2022). В связи с этим можно предположить, что в среде, богатой фосфатами, фосфонаты могут

катаболизироваться бактериями преимущественно как источник углерода, а в среде с низкими концентрациями фосфатов – преимущественно как источник фосфора (Lockwood et al., 2022; Boden et al., 2024). Поскольку генов, кодирующих СР-лиазы, у бактерий меньше в обогащенной фосфатами среде мезопелагиали по сравнению со средой поверхностного океана с очень низкой концентрацией фосфатов (менее 0,1 мкМ), то это, вероятно, и привело к эволюции полиспецифичного фосфонатного катаболизма (Lockwood et al., 2022; Boden et al., 2024).

По данным геохимических исследований, концентрация растворенного фосфата в архейском океане варьировала от $\leq 0,0048$ до 4100 мкМ, что в ~ 1000 раз превышает самое высокое значение концентрации фосфата в современном океане (0–3,29 мкМ по данным базы Tara) (Brady et al., 2022; Boden et al., 2024). Учитывая положительную линейную корреляцию натрий-фосфатного симпортера *nptA* с доступностью фосфатов (рис. 32), вполне вероятно, что организмы впервые приобрели эти симпортеры во времена палеоархея под воздействием более высоких концентраций фосфатов, чем существуют сегодня в океане (рис. 33). Присутствовали ли они в организмах из наземной, морской или почвенной среды, пока не ясно, но имеющиеся данные согласуются с глобальными геохимическими оценками (Boden et al., 2024). Когда в результате эволюции появился высокоаффинный фосфатный транспортер *pstS*, в некоторых районах планеты концентрация фосфатов должна была стать настолько низкой, чтобы вызвать возникновение более энергетически затратных способов получения Р клеткой (рис. 32). Экстраполяция экспоненциальных регрессий показывает, что при 1000 мкМ фосфата в окружающей среде существование *pstS* в бактериях будет крайне маловероятным (рис. 33). При 25 мкМ фосфата численность генов *pstS* также очень низка, что, вероятно, не привело бы к сильному селективному давлению, стимулирующему эволюцию этих генов (рис. 33). Более вероятно, что палеоархейские или позднемезоархейские организмы (рис. 32), в которых впервые эволюционировал ген *pstS*, занимали территории с низкой концентрацией фосфатов – 1 мкМ или менее, что соответствует геохимическим оценкам ряда исследований (Jones et al., 2015; Reinhard et al., 2017; Boden et al., 2024). Аналогичные районы с низким содержанием фосфатов должны были сохраняться на протяжении неоархея, протерозоя и докембрия и стимулировать видообразование, дубликацию и перенос генов *pstS*, которые были “предсказаны” молекулярными часами (рис. 32). Генетические события с участием *pstS* и *pnas* были многочисленными и происходили в целом ряде бактериальных филумов, включая *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Omnitrophota*, *Acidobacteriota*, *Cyanobacteria* и *Firmicutes*. Напротив, более поздние события, связанные с генами *phnJ* и *phnM*, были более редкими и происходили в *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria* и *Proteobacteria* (рис. 31). Представители этих типов бактерий сегодня занимают множество различных мест обитания, включая земные недра и морскую толщу (Yilmaz et al., 2016; Tendulkar et al., 2021; Boden et al., 2024). Поэтому

вполне возможно, что в архее и палеопротерозое в широком диапазоне локальных географических областей концентрация фосфатов была такой же или ниже современной (рис. 34).

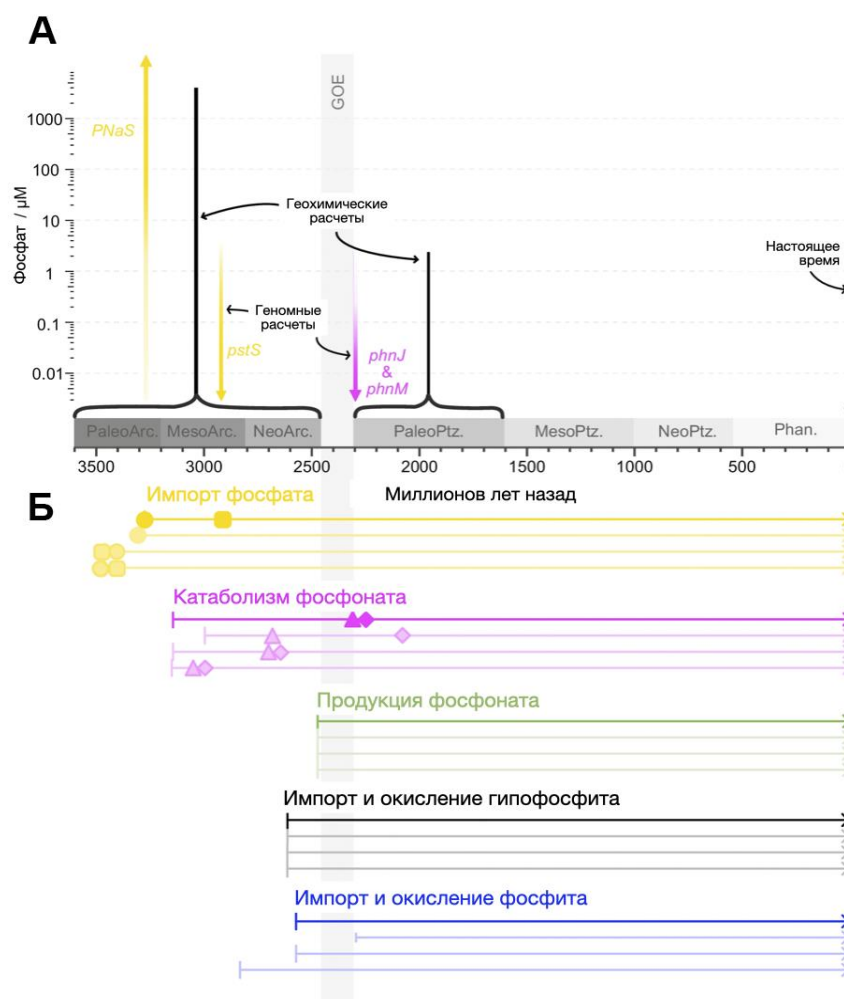


Рисунок 34 – А. Геохимические оценки концентрации морских фосфатов (черные столбцы) в архее в сопоставлении с пороговыми значениями концентраций, инициировавшими эволюцию систем транспорта фосфатов (*pstS*, *pNaS*; желтые стрелки) и метаболизма фосфонатов (*phnJ*, *phnM*; розовая стрелка). Оценки времени дивергенции приведены согласно модели CIR1. Б. Временные интервалы существования ферментных систем (цветные горизонтальные линии): *pNaS* (желтые круги), *pstS* (желтые квадраты), *phnJ* (розовый треугольник) и *phnM* (розовый ромб). GOE (*Great Oxidation Event*) – Великое кислородное событие (адаптировано из Boden et al., 2024)

Позднепалеоархейское появление P_i -натриевых симпортеров (*pnas*), которые в настоящее время также встречаются у изолятов из обедненных фосфатами сред, а следом фосфонатаз и высокоаффинных белков транспорта P_i (*pstS*), которые наиболее распространены сейчас в таких средах (рис. 32, 33) (Lockwood et al., 2022; Boden et al., 2024), позволяют предположить, что истощение P_i произошло к концу архея (рис. 34). Это снижение, если оно носило глобальный

характер, могло быть связанным с увеличением количества отложений полосчатых железных формаций (ПЖФ). Если первичные ПЖФ (BIF) состояли из оксидов железа (Fe(III)), которые обладают высоким сродством к фосфатам, то они могли адсорбировать фосфаты из водной толщи (Jones et al., 2015; Boden et al., 2024). Напротив, фосфат был бы более растворим в присутствии только Fe(II), что, возможно, позволило бы достичь его концентраций от сотен до тысяч мкМ (Brady et al., 2022). Однако задержка между появлением механизмов поглощения фосфата у бактерий с низкой и высокой аффинностью и связанное с этим падение уровня фосфата могла быть обусловлена и биологическими причинами – сверхпотреблением фосфата быстрорастущими организмами. Падение концентрации фосфатов с раннего до позднего мезоархея могло ограничить биологическую продуктивность и производство O₂ цианобактериями, что, возможно, надолго отсрочило повышение O₂ в атмосфере Земли (Great Oxidation Event, GOE) после эволюционного зарождения кислородного фотосинтеза. Действительно, множество видов микроорганизмов из разных филумов были способны импортировать фосфат в архее, тогда как меньшее количество видов могло использовать соединения восстановленного фосфора, на что указывает относительная скудность событий появления соответствующих генов (рис. 32). По-видимому, ситуация изменилась на рубеже неоархея и палеопротерозоя, для которого филогенетические данные указывают на более широкое распространение геномных механизмов усвоения фосфита (через *ptxD*) и широкого спектра фосфонатных молекул (через *phnZ*, *phnJ* и *phnM*). Это расширение пула P, доступного микробам после GOE, могло быть следствием роста биосферы и появления большого разнообразия фосфорилированных биомолекул, также используемых в качестве источника питательных веществ (Ward et al., 2019; Boden et al., 2024).

Фосфорилирование и дефосфорилирование нуклеиновых кислот, белков и других биологических молекул - важные реакции в живых системах, которые обычно контролируются действием в большей степени субстрат-специфичных ферментов цитозоля, чем внеклеточных ферментов суперсемейства ЩФ. Фосфорилирование происходит под действием киназ, примером которых являются тирозинкиназы, участвующие в передаче сигналов в живых клетках (Hardie, 2001). Дефосфорилирование, опосредованное фосфатазами, также является важным механизмом включения и выключения клеточной сигнализации. Дефосфорилирование остатков фосфосерина и фосфотреонина в белках является обратной реакцией превращения, осуществляемым протеинкиназами, и обычно катализируется классом ферментов, которые называются протеинфосфатазами (Kerk et al., 2021; Aoki et al., 2021). Аминокислотные последовательности протеинфосфатаз (белковых серин/треониновых фосфатаз (КФ 3.1.3.16)) и щелочных фосфатаз (КФ 3.1.3.1), а также пищеварительных лизосомальных кислых фосфатаз (КФ 3.1.3.2), не имеют прямого родства и принадлежат к разным структурным суперсемействам белков. Несмотря на

это, все они являются типичными металлофосфатазами (металлофосфоэстеразами) со сходными структурами активных центров, поскольку содержат биметаллические реакционные сайты, координированные с аминокислотами и гидроксид-ионами (рис. 35).

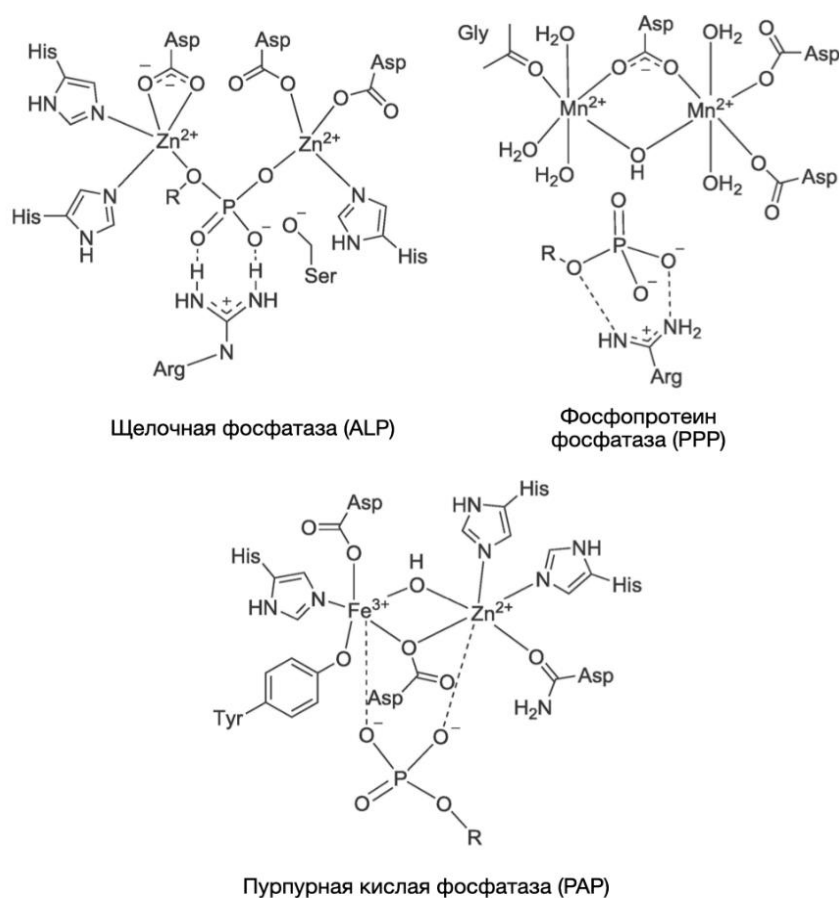


Рисунок 35 – Архитектура каталитических центров природных фосфатаз различных суперсемейств: щелочных фосфатаз (ALP) и металлофосфоэстераз (МРЕ), включая фосфопротеинфосфатазы (PPP) и пурпурные кислые фосфатазы (PAP) (адаптировано из Aoki et al., 2021)

Так, фосфопротеин фосфатаза 2с (PPP) содержит в активном центре два иона Mn^{2+} , а пурпурная кислая фосфатаза из бобовых растений (PAP) и Ser/Thr-протеинфосфатаза I содержат ионы Zn^{2+} и Fe^{3+} (рис. 35). Таким образом, можно утверждать, что эволюция субстратной специфичности металлофосфатаз происходила от множества предковых форм путем включения различных модификаций, которые приводили к одному результату – реализации функции отщепления и переноса фосфорильной группы в сложившихся условиях, в которых клеткам приходилось выживать (Kerk et al., 2021; Aoki et al., 2021). Высказано предположение, что предком фосфопротеин фосфатазы семейства PPP является фосфодиэстераза, которая взаимодействует со своим полинуклеотидным субстратом через связи с остатками His в двух мотивах аминокислотной последовательности (Kerk et al., 2021). Мутационная потеря одного

остатка His и замена его на Pro сохранила ферментативную активность, но потребовала изменения геометрии субстрата для возможности «стыковки» с активным центром. Это ключевое мутационное событие запустило траекторию эволюции фермента, ведущую к появлению фосфомоноэстераз семейства PPP, специфичных к связыванию и катализу реакции расщепления фосфорилированного серина и/или треонина (Kerk et al., 2021; Aoki et al., 2021). Кроме того, внутри каждого семейства белков ЩФ происходила активная диверсификация структуры и, вероятно, степени аффинности в отношении более доступных фосфатов в окружающей среде, а также металлоспецифичности, в зависимости от доступности растворимых солей металлов в окружающей среде (Srivastava et al., 2021; Lidbury et al., 2022; Torcello-Requena et al., 2024). Так, популяция морских олиготрофных пикоцианобактерий из Р-обедненных освещенных солнцем регионов океана, ежегодно расширяющихся из-за изменения климата, продуцируют уникальную высокоаффинную фосфатазу Psip1, так как фосфор является одним из основных макроэлементов, потенциально ограничивающих рост и способность к фиксации CO₂ в таких системах (рис. 36).

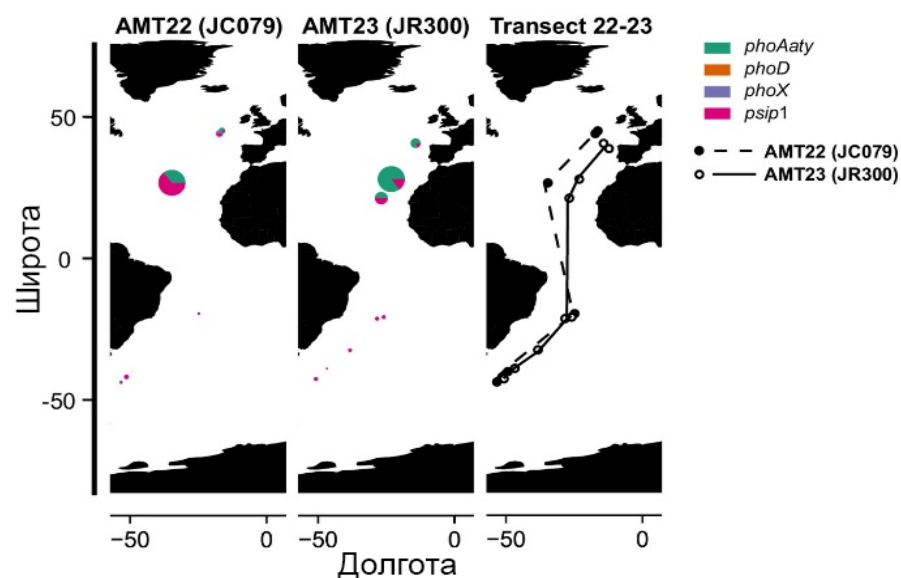


Рисунок 36 – Уровни экспрессии гена ЩФ *psip1* пикоцианобактерий (выделено розовым) в сравнении с другими бактериальными ЩФ (*phoX*, *phoA*, *phoD*, *phoX*) вдоль Атлантического меридионального трансекта в 2012 (AMT22) и 2013 (AMT23) гг. На правой панели приведена карта станций отбора проб. Относительный уровень экспрессии на каждой станции пропорционален размеру круговой диаграммы (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

Фосфатаза Psip1 индуцируется в условиях фосфатного голодания, поэтому в изобилии присутствует в Р-обедненных регионах (рис. 36). Результаты кластеризации ЩФ Psip1 с белковыми последовательностями ЩФ других бактерий показали их существенную диверсификацию (рис. 37).

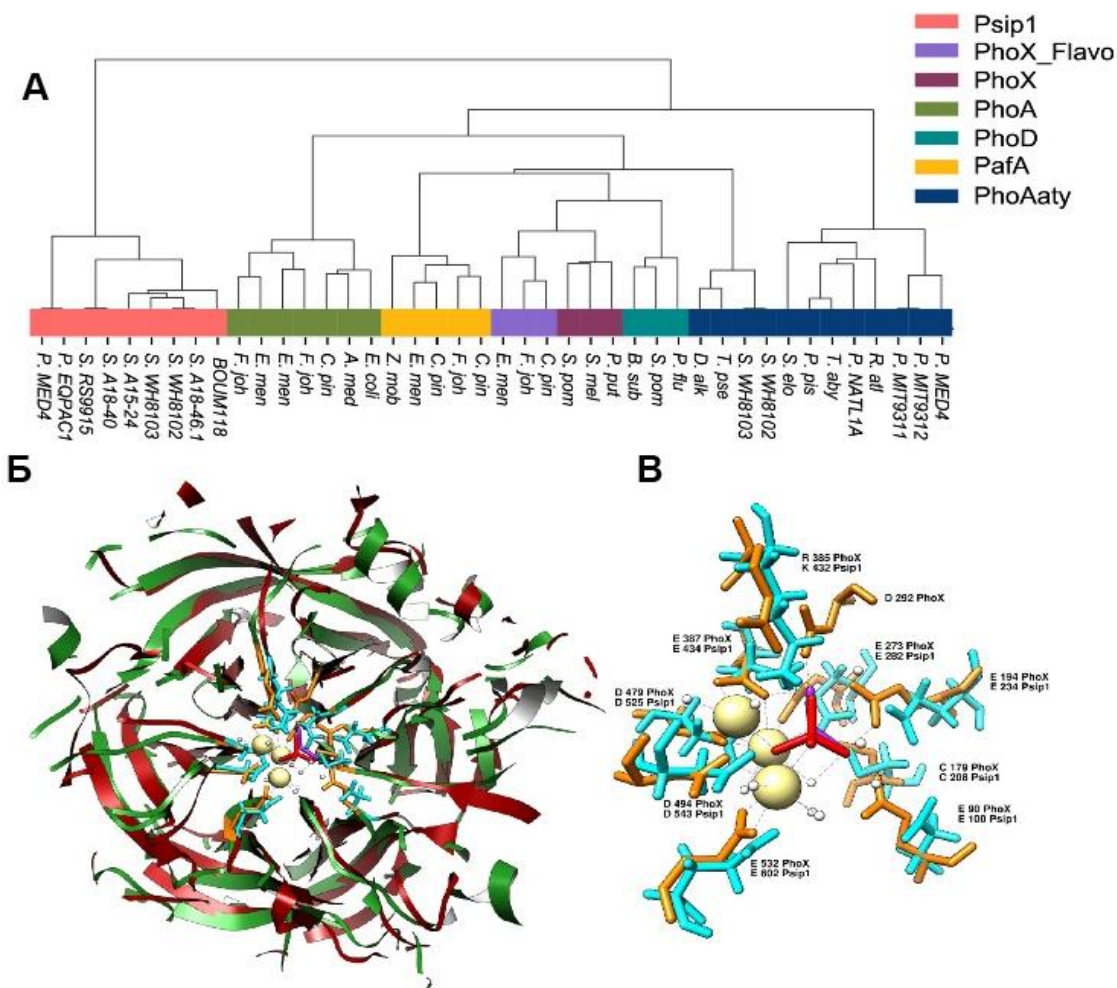


Рисунок 37 – А. Дендрограмма аминокислотных последовательностей ЩФ морских бактерий семейств PhoX, Psip1, PhoA (*PhoAaty*), PhoD и PafA. Кластеризация выполнена иерархическим агломеративным методом на основе матрицы попарного сходства последовательностей, полученной по результатам анализа blastp (использованы отрицательные логарифмы значений *E-value*). Сокращения: *F.joh*, *Flavobacterium johnsoniae*; *C.pin*, *Chitinophaga pinensis*; *E.men*, *Elizabethkingia meningoseptica*; *R.pom*, *Ruegeria pomeroyi*; *B.sub*, *B. subtilis*; *P.flu*, *Pseudomonas fluorescens*; *P.put*, *Pseudomonas putida*; *Z.mob*, *Zymomonas mobilis*; *S.mel*, *Sinorhizobium meliloti*; *A.med*, *A. mediterranea*; *P.MED4*, *P.EQPAC1*, *P.MIT9311*, *P.MIT9312*, *P.NATL1A* – *Prochlorococcus* spp.; *S.A18-46.1*, *S.WH8102*, *S.WH8103*, *S.A15-24*, *S.BOUM118*, *S.A18-40*, *S.RS9915* – *Synechococcus* spp.; *R.atl*, *Ruegeria atlantica*; *T.aby*, *Thalassobius abyssi*; *P.pis*, *Phaeobacter piscinae*; *S.elo*, *Synechococcus elongatus*; *T.pse*, *Thalassiosira pseudonana*; *D.alk*, *Desulfoglaeba alkanexedens*. Б. Пространственная суперпозиция (3D-совмещение) структур Psip1 из *Prochlorococcus* sp. MED4 (красный) с PhoX (зеленый) из *P. fluorescens*. Визуализация выполнена в программе UCSF Chimera. В. Совмещение консервативных аминокислотных остатков PhoX (оранжевый) и Psip1 (голубой), координирующих ионы металлов (Ca^{2+} (желтый) и Fe^{3+} (фиолетовый)), и фосфорильную группу субстрата (красный) (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

Наложение 3D-структур обоих белков показало, что единственными общими элементами для них являются каталитический, металлосвязывающий сайты и структура β -пропеллера вокруг активного центра (рис. 37). Более того, гомологи ЩФ Psip1 могут иметь различные вариации в структуре, в частности каталитические домены фитазы – мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат-фосфогидролазы, подкласс фосфатаз, расщепляющих соединения фитиновой кислоты (рис. 38).

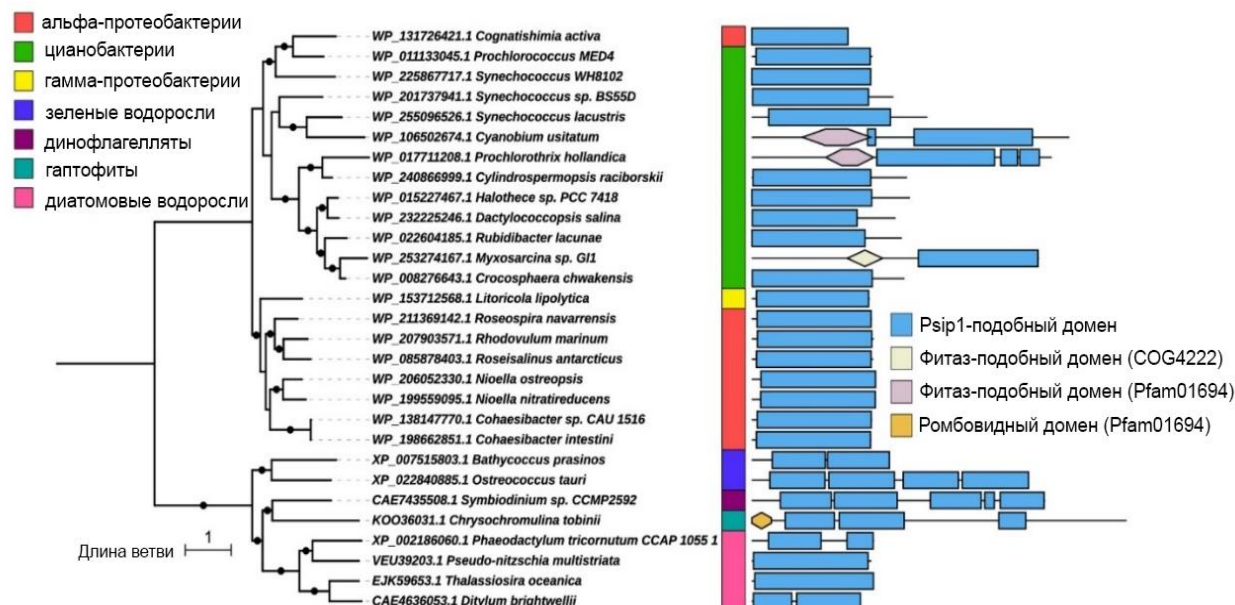


Рисунок 38 – Филогенетическое древо ЩФ семейства Psip1, реконструированное на основе аминокислотных последовательностей базы данных RefSeq (порог E-value $<10^{-20}$ для blastp-совпадений). Слева цветом обозначено таксономическое происхождение белков. Psip1-подобный домен (голубой) идентифицирован с использованием профильных скрытых марковских моделей (программы hmmbuild и hmmsearch). Домены фитазы (белый и розовый) аннотированы с помощью сервиса CDD-search (E-value $<10^{-20}$). Узлы с поддержкой бутстреп $>70\%$ отмечены черными точками (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

ЩФ Psip1 широко распространены как среди гетеротрофных бактерий, так и среди олиготрофных альфа-протеобактерий (*Roseospira navarrensis*, *Nioella ostreopsis*, *Cognatishimia activa*), а также обнаружены в эукариотическом фитопланктоне, в том числе в диатомовых и зеленых водорослях, что указывает на общность их происхождения (рис. 38).

Благодаря развитию технологий геномного секвенирования и геной инженерии на сегодняшний день в бактериях идентифицировано 4 основных типа белковых структур ЩФ, которые произошли от разных предковых линий гомологов и условно объединены в структурные семейства PhoX, PhoD, PafA и PhoA (рис. 37) (Балабанова и др., 2023; Balabanova et al., 2024a). Каждая гомологичная линия ЩФ отличается от других первичной структурой, субстратной специфичностью (и/или средством к субстрату) и зависимостью ферментативной активности от

разных ионов металлов, температуры и pH среды при сходстве структуры активного центра и механизмов ферментативного действия (Srivastava et al., 2021; Lidbury et al., 2021, 2022; Torcello-Requena et al., 2024) (рис. 26, табл. 3).

Таблица 3 – Сравнительная характеристика субстратной специфичности и сродства (аффинности) бактериальных ЩФ различных структурных семейств

ЩФ	Микроорганизм	K_m	Субстрат	Оптимум pH	Ссылки
Psp1	<i>Prochlorococcus</i> MED4	$0,35 \pm 0,03$ мкМ	(МБФ)-фосфат	8,8*	Torcello-Requena et al., 2024, Duhamel et al., 2011
		$2,5 \pm 1,18$ мкМ	<i>n</i> -НФФ	9,8	
		$46,10 \pm 5,72$ мкМ	бис-(МБФ)-фосфат	8,8*	
PhoX	<i>Phaeobacter</i> sp. ED193	$97,0 \pm 10,3$ мкМ	<i>n</i> -НФФ	7,5*	Westermann et al., 2023
		$62,9 \pm 11,3$ мкМ	ФХ		
	<i>S. meliloti</i>	$85,3 \pm 4,5$ мкМ	<i>n</i> -НФФ	10*	Zaheer et al., 2009
		$92,1 \pm 8,7$ мкМ	АМФ		
	<i>V. cholerae</i>	~240 мкМ	<i>n</i> -НФФ	8,2	Roy et al., 1982
	<i>Pasteurella multocida</i> X-73	~95 мкМ	<i>n</i> -НФФ	10*	Wu et al., 2007
PhoA	<i>A. mediterranea</i>	$94,0 \pm 35,0$ мкМ	(МБФ)-фосфат	8,2*	Srivastava et al., 2021
PhoD	<i>Aphanotheca halophytica</i>	~3,38 мМ	<i>n</i> -НФФ	10*	Kageyama et al., 2011
	<i>C. amphilecti</i> KMM 296	~4,2 мМ	<i>n</i> -НФФ	9,2	Noskova et al., 2019

Примечание – * Значения K_m получены при pH, указанном в первоисточнике (может не соответствовать pH-оптимуму фермента). Субстраты: *n*-нитрофенилфосфат (*n*-НФФ); фосфохолин (ФХ); аденозинмонофосфат (АМФ); 4-метилумбеллиферилфосфат (4-МУФ); бис-(4-метилумбеллиферил)фосфат (бис-4-МУФ) (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

Согласно результатам филогенетического анализа, высокоаффинная ЩФ Psp1 имеет наибольшее структурное сходство с ЩФ семейства PhoX, что свидетельствует о конвергентной эволюции, поскольку аминокислотные остатки, входящие в состав металлосвязывающего/активного сайта, являются общими для этих двух белков (Torcello-Requena et al., 2024) (рис. 37). До недавнего времени Ca^{2+} -активируемая ЩФ семейства PhoX была охарактеризована лишь для патогенной бактерии *V. cholerae* (Majumdar et al., 2005; Sebastian, Ammerman, 2009; Zaheer et al., 2009; McDonough et al., 2016). Однако ЩФ Psp1 активируется лишь при одновременном добавлении ионов кальция и железа, как и ЩФ PhoX *P. fluorescens* Pf0-1 (Yong et al., 2014) (рис. 39 А).

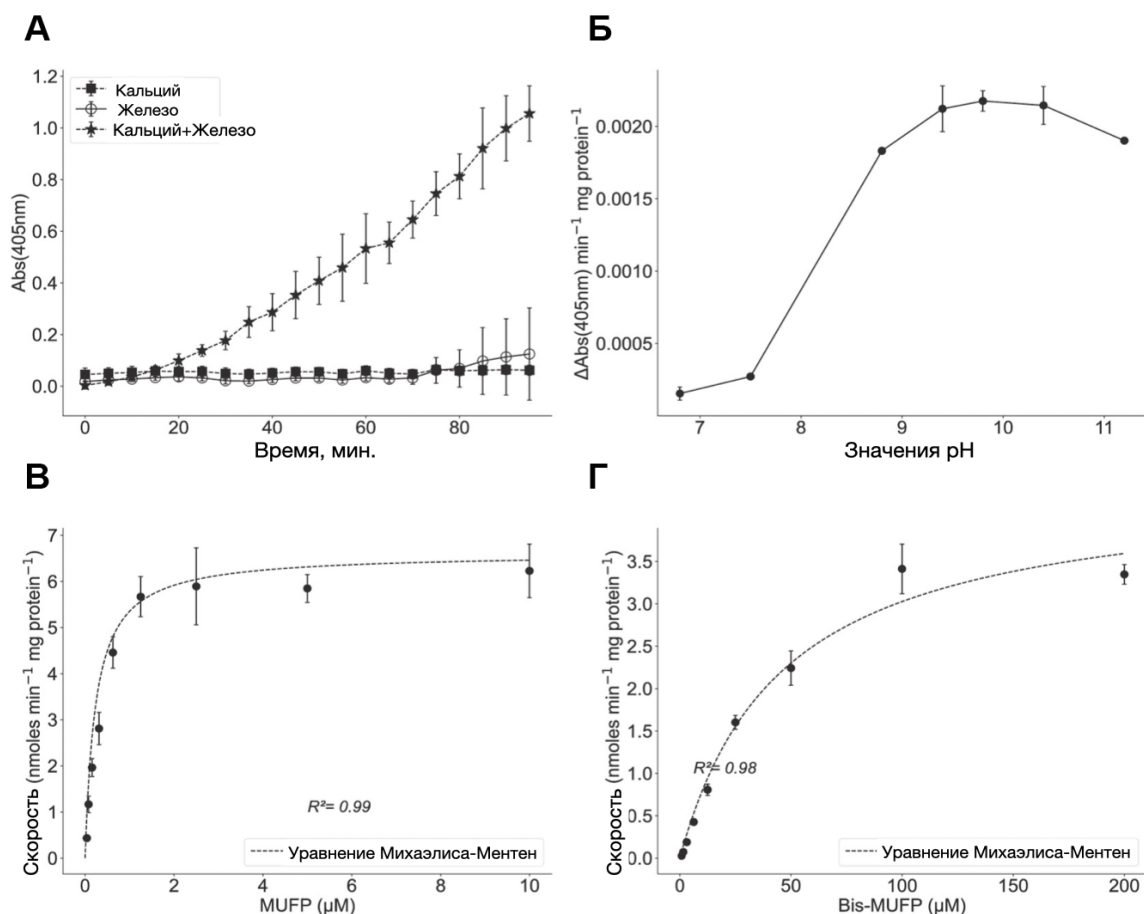


Рисунок 39 – Биохимическая характеристика ЩФ Psip1 из *Prochlorococcus* sp. MED4. А. Зависимость активности Psip1 от наличия ионов кальция (100 мМ) и железа (0,1 мМ) (n=6). Б. Влияние рН на каталитическую активность Psip1. Гидролиз *n*-НФФ проводили в присутствии ионов Fe и Ca (n=3). В. Кинетика Михаэлиса–Ментен для субстрата 4-метилумбеллиферилфосфата (4-МУФ; MUFP). Г. Кинетическая кривая гидролиза бис-(4-метилумбеллиферил)фосфата (bis-MUFP) (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

Изучение биохимических свойств ЩФ Psip1 выявило способность этой фосфатазы расщеплять как фосфомоноэфирный субстрат, (МБФ)-фосфат (рис. 39 Б), так и диэфир, бис-(МБФ)-фосфат (рис. 39 Г). Кинетические расчеты показали, что K_M и V_{max} для (МБФ)-фосфата составляют $0,35 \text{ мкМ} \pm 0,033$ и $6,6 \pm 0,16 \text{ нмоль мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ соответственно (Torcello-Requena et al., 2024). Это свидетельствует о том, что Psip1 является высокоаффинной ЩФ по сравнению с ЩФ других семейств (табл. 3). Кроме того, ЩФ Psip1 имеет высокое сродство к ряду природных органических соединений Р: глицерол-1-фосфату (G1P), глицерол-3-фосфату (G3P), фосфохолину (PC), фосфорилэтаноламину (PE), аденозинмонофосфату (AMP) и глюкозамин-6-фосфату (Ga6P) (Torcello-Requena et al., 2024). Можно утверждать, что гены белков семейства PhoX, подобные Psip1, являются экологически важными нише- и штаммоспецифическими признаками *Prochlorococcus* sp. EQPAC1, MED4 и *Synechococcus* spp., принадлежащих к одному

филотипу. Они обеспечивают устойчивость микробных сообществ к долгосрочному истощению Р в поверхностных водах океана (Kathuria et al., 2011; Doré et al., 2020). Установлено, что ген *psip1* регулируется как двухкомпонентной системой PhoBR, так и транскрипционным регулятором PtrA, который является белком семейства CRP (рецептор циклического АМФ) (Ostrowski et al., 2010; McCleary, 2017; Torcello-Requena et al., 2024). У *Synechococcus* sp. WH8102 в ответ на сильный Р-стресс PtrA повышает регуляцию нескольких генов, включая гены предсказанных ЩФ, в том числе *psip1*, ген потенциальной фитазы, а также различные гены гипотетических белков с неустановленной функцией (Ostrowski et al., 2010; Torcello-Requena et al., 2024). Тот факт, что *ptrA* регулируется двухкомпонентной системой PhoBR, позволяет предположить каскадный транскрипционный ответ на Р-ограничение/голодание. Первый уровень, опосредованный системой PhoB/PhoR, индуцирует экспрессию генов высокоаффинных транспортеров P_i , таких как *pstS*, а второй, регулируемый PtrA, вероятно, является ответом на хроническое Р-голодание (Ostrowski et al., 2010).

Представители структурного семейства ЩФ PhoD имеют $Ca^{2+}(Co^{2+})/Fe^{3+}$ -металлоспецифичность, являются экологическими маркерами почвенных бактерий и обладают превалирующей фосфодиэстеразной активностью (Балабанова и др., 2023; Rodriguez et al., 2014; Ragot et al., 2016; Noskova et al., 2019; Liang et al., 2020; Balabanova et al., 2024a). Ca^{2+} -зависимый фермент семейства PafA, обнаруженный недавно у флавобактерий (*Bacteroidota*) растений, также может иметь фосфодиэстеразную активность, но, в отличие от своих ортологов, является P_i -неиндуцибельным (конститутивным) белком, что предполагает его отличительную физиологическую функцию, связанную, вероятно, с симбиозом (Lidbury et al., 2021, 2022). Было показано, что наличие ЩФ PafA у флавобактерий способствует быстрой реминерализации различных органофосфатов и накоплению P_i для обеспечения вторичного роста других видов бактерий в микробиомах (Lidbury et al., 2022). Кроме того, PafA-подобные ЩФ могут проявлять активность в отношении фосфотриэфиров, что расширяет биологическую роль этих ферментов в природе (Ragot et al., 2015; Barrozo et al., 2015). Похожие свойства найдены и у некоторых ЩФ PhoD, PhoX и PhoA (Wu et al., 2007; Kageyama et al., 2011; Ragot et al., 2015; Sunden et al., 2016; Srivastava et al., 2021).

К ферментам семейства PhoA относятся всесторонне исследованные Mg^{2+}/Zn^{2+} -зависимые димерные ЩФ *E. coli* и человека (рис. 26, 27, 35), в связи с чем их принято называть классическими ЩФ (McComb et al., 1979; Millán, 2006; Harroun et al., 2023). Ранее считалось, что гены *phoX* и *phoD* более распространены в морских организмах, чем *phoA* (Sebastian, Ammerman, 2009; Luo et al., 2009). Однако более поздние данные показали, что *phoA* и *pafA* встречаются чаще, чем *phoX*, в организмах, обитающих в поверхностных слоях морской воды по всему миру (Lidbury et al., 2022). Наличие генов, кодирующих семейство ЩФ PhoA с широкой субстратной

и каталитической специфичностью в метагеномах морских микробных сообществ, может быть показателем большого количества представителей *Bacteroidota*, которые активно размножаются во время цветения микроводорослей (Sebastian, Ammerman, 2009; Baltar et al., 2016; Srivastava et al., 2021). Авторы вышеупомянутых исследований отмечают, что распространенность ЩФ PhoA может достигать 30 % от общего количества прокариотических ЩФ, ассоциированных с цветущим фитопланктоном (Tada et al., 2011; Srivastava et al., 2021). Гомологи PhoA, имеющие отдаленное родство с классической ЩФ *E. coli* (48,0 % покрытия, 30,8 % идентичности, 6e-12), были обнаружены и в цианобактериях *Prochlorococcus* spp. и *Synechococcus* spp. (Torcello-Requena et al., 2024). Более того, дивергентные белки PhoA из цианобактерий и фотосинтезирующих эукариот (микроводоросли), названные атипичными ЩФ (PhoAaty) (рис. 37), также продемонстрировали активность, характерную для ЩФ (Lin et al., 2017; Torcello-Requena et al., 2024). Это еще раз доказывает, что структурная классификация ферментов ЩФ отражает только их принадлежность к различным гомологичным линиям, произошедшим от разных предковых генов, которые эволюционировали в разных регионах океана независимо друг от друга для выполнения одних и тех же функций в организме и/или микробиоме (рис. 36, 37, 39).

В настоящее время при сравнении регионов океана, в целом, существенной разницы между количеством генов ЩФ *psip1*, *phoX* и *phoD* отмечено не было, за исключением Средиземного моря, где отмечается обилие генов *psip1* как по данным геномного анализа, так и по данным транскриптомики (рис. 40). Атипичные гены *phoA* (*phoAaty*) также многочисленны для микроорганизмов во многих регионах, где распространены микроводоросли и цианобактерии (рис. 36, 37, 40). Эти закономерности, свидетельствующие об обилии генов и транскриптов *psip1* и *phoA*, хорошо согласуются с другим типом генетической адаптации к хроническому Р-стрессу – ремоделированию мембранных липидов, которое, как известно, широко распространено в микробных сообществах в Средиземном море и других морских регионах с дефицитом Р (Sebastián et al., 2015). В метагеномах базы данных Marine Atlas TARA Ocean Unigenes (MATOU) численность *psip1* показала значительную отрицательную связь с концентрацией P_i во фракциях >0,8, 0,8–5, 5–20 и 20–180 мкм, но не во фракции 180–2000 мкм (рис. 41).

Таким образом, гены ЩФ *psip1* и *phoAaty* микроводорослей и цианобактерий могут быть использованы в качестве маркеров фосфатного стресса (Ustick et al., 2021). Интересно, что для остальных (бактериальных) *phoA* и *phoD* не было обнаружено значительной отрицательной связи между концентрацией P_i и численностью этих генов в метагеномах и метатранскриптомах (рис. 40, 41).

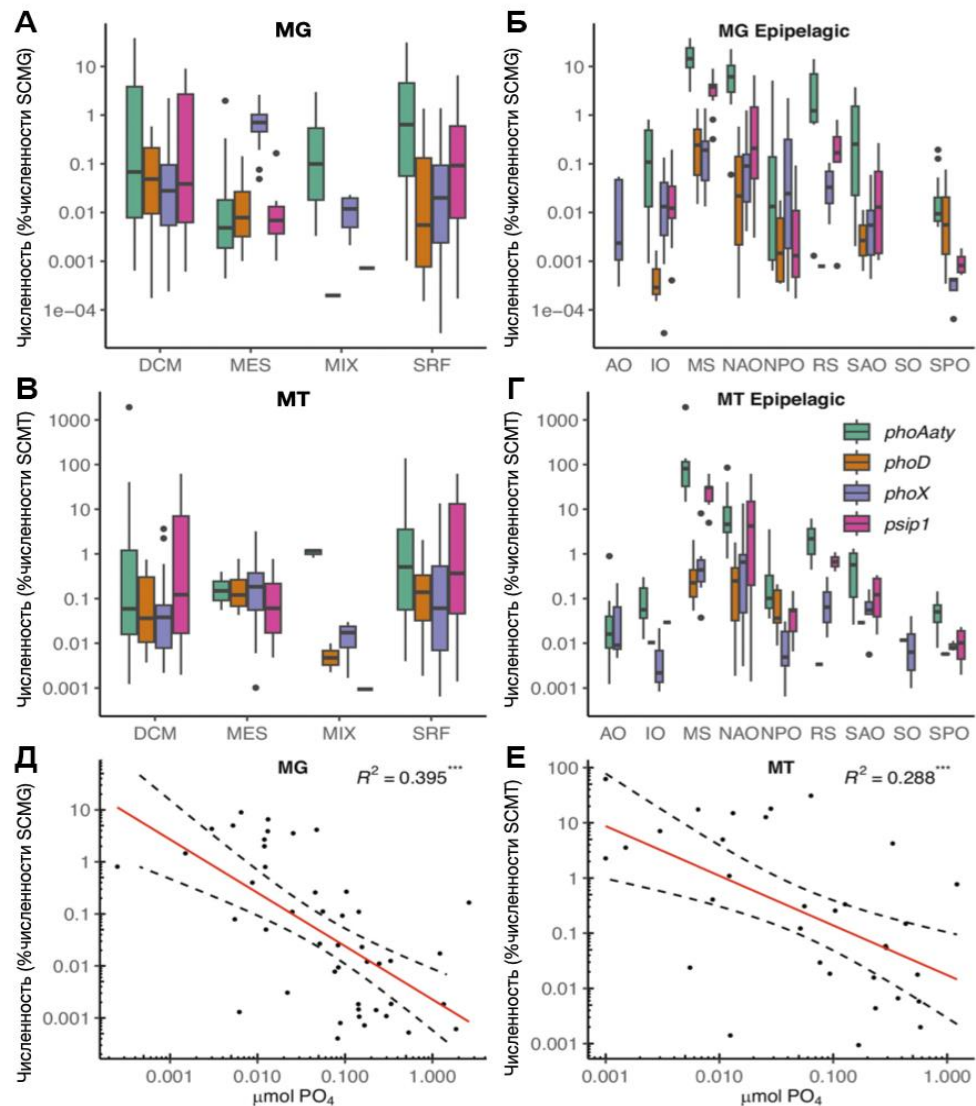


Рисунок 40 – Экспрессия генов ЦФ цианобактерий согласно данным проекта «TARA Oceans». А. Относительное обилие генов ЦФ в метагеномах (MG) бактерий в зависимости от глубины отбора проб (нормировано по % однокопийных маркерных генов SCMG). Б. Относительное обилие транскриптов ЦФ в метатранскриптомах (MT) бактерий в зависимости от глубины (нормировано по % однокопийных маркерных транскриптов SCMT). (В) Относительное обилие ЦФ в MG разных океанических регионов. Г. Относительное обилие ЦФ в MT разных океанических регионов. Обозначения: Горизонтальная линия в диаграммах размаха (boxplot) – медиана, черные точки – выбросы. SRF – поверхность; MIX – ветровой смешанный слой; DCM – максимальная концентрация хлорофилла; MES – мезопелагический слой. Регионы: АО – Северный Ледовитый океан; ИО – Индийский океан; MS – Средиземное море; NAO – Северный Атлантический океан; NPO – Северная часть Тихого океана; RS – Красное море; SAO – Южная часть Атлантического океана; SO – Южный океан; SPO – Южная часть Тихого океана. (Е и F) Корреляции между обилием *psip1* (log₁₀) и PO₄ (красные линии). Показаны значения R², ***P < 0,001 (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

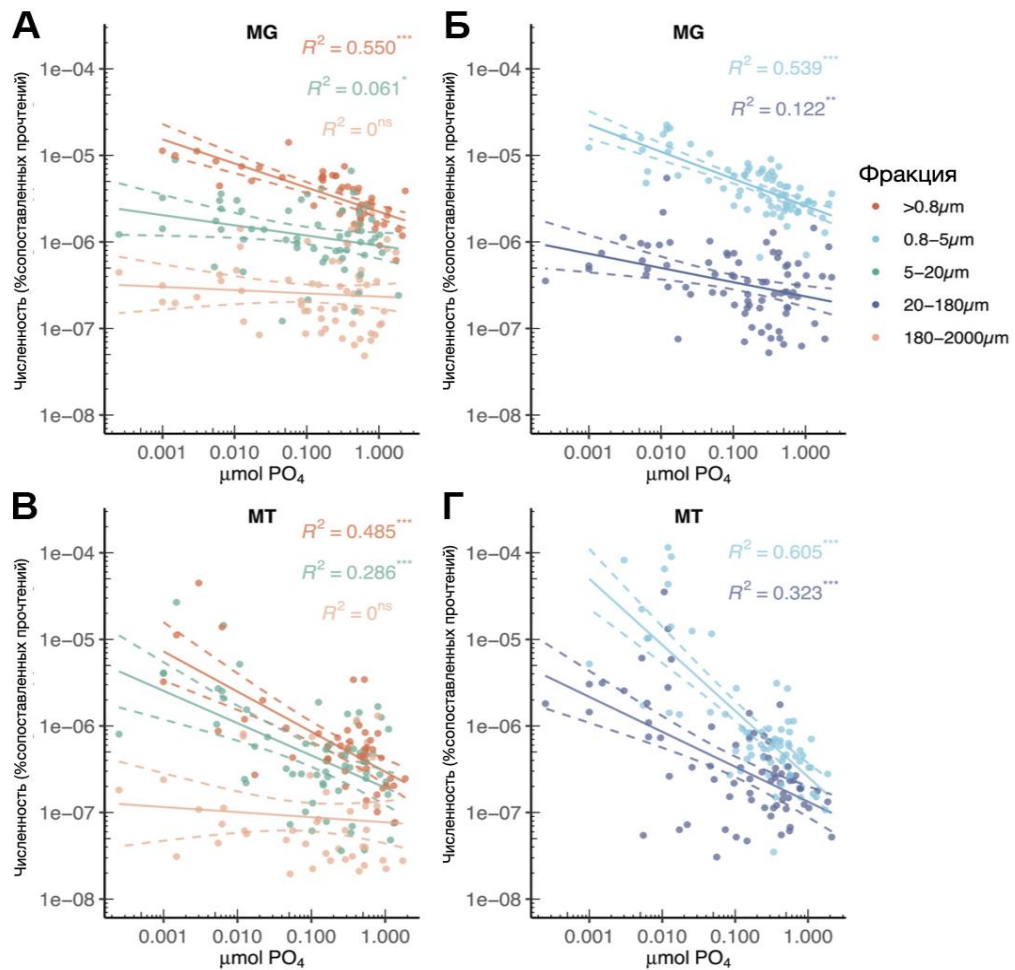


Рисунок 41 – Корреляция между обилием гена *psip1* в метагеномных (А, Б) и метатранскриптомных (В, Г) данных и концентрацией неорганического фосфата (PO_4 , мкМ). Данные дифференцированы в зависимости от размера размерной фракции микроорганизмов, использованной при экстракции нуклеиновых кислот. Сплошными линиями показаны линейные регрессии $\log_{10}$ -преобразованных значений обилия генов относительно концентрации PO_4 . Значения R^2 приведены соответствующим цветом; статистическая значимость $P < 0,05$ –0,001 (адаптировано из Torcello-Requena et al., 2024)

Более того, оба гена *phoA* и *phoD* оказались более многочисленны в регионах с высоким содержанием P_i для некоторых фракций набора метагеномных данных (но не метатранскриптомов) (Torcello-Requena et al., 2024). Zhang et al. (2021a) также обнаружили всплеск экспрессии *phoA* морских диатомовых водорослей в условиях избытка P_i . При этом происходило одновременное снижение потребления одноклеточными эукариотами АТФ, биосинтеза НАДФ⁽⁺⁾-зависимой трансгидрогеназы, большинства вторичных метаболитов, в частности хлорофилла и других пирролов, белков-транспортёров железа, а также прекращение деления клеток (Zhang et al., 2021a). Предположено, что ЦФ PhoA имеет важное значение для поддержания метаболического гомеостаза, окислительно-восстановительного баланса и

регуляции численности популяции синезеленых водорослей, предотвращая их чрезмерное размножение (рис. 42).

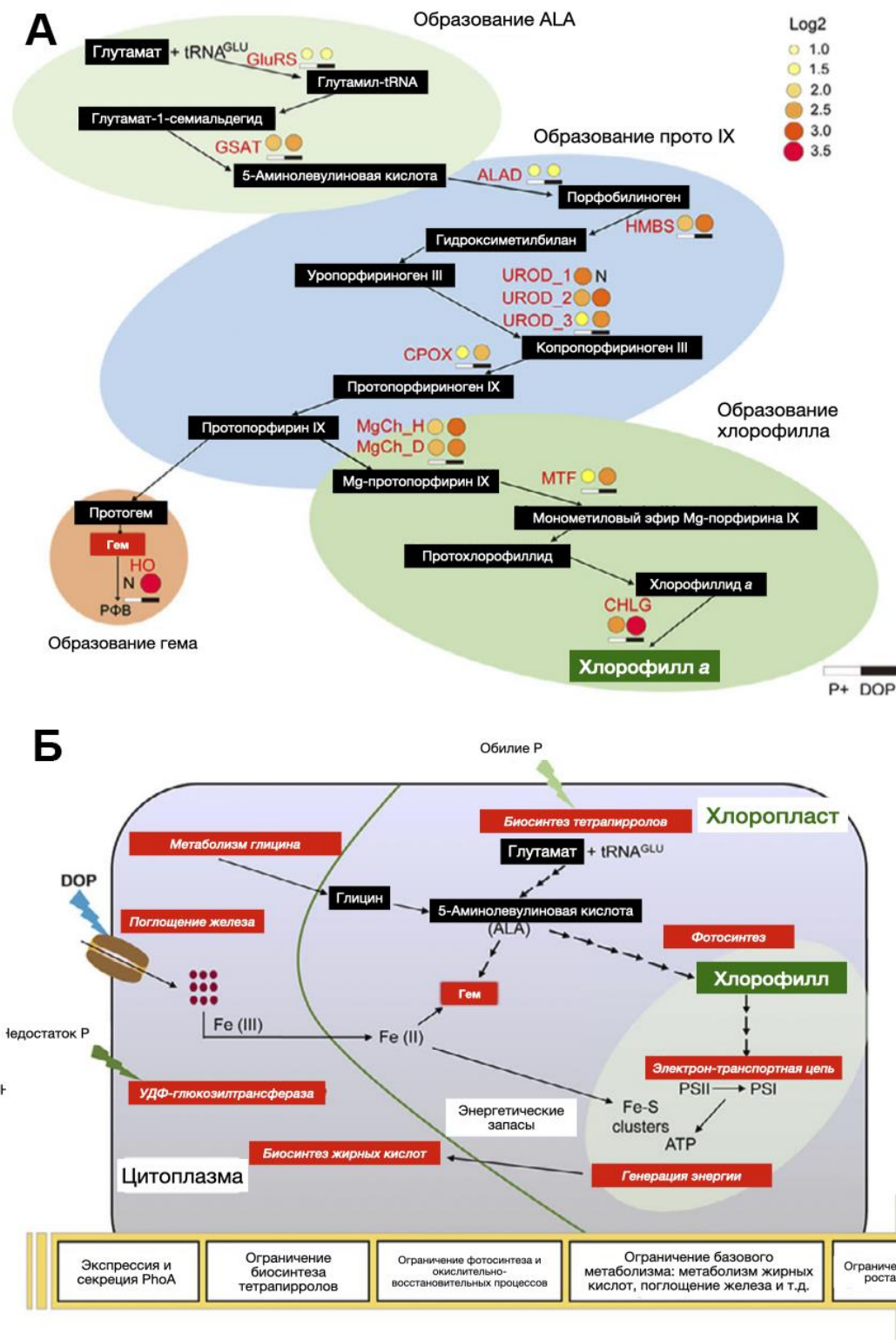


Рисунок 42 – Влияние экспрессии *phoA* дикого типа (WT) и делеции $\Delta phoA$ (mPhoA) на процессы метаболизма при разной концентрации P_i . (А) Транскрипты красного цвета – повышенная регуляция анаболических путей у мутанта mPhoA. Размер точки и цвет – в присутствии P_i (P+, белая полоса) или фосфатов (DOP, черная полоса). (Б) Отрицательная регуляция анаболических путей (красные) в WT вне зависимости от концентрации P_i (адаптировано из Zhang et al., 2021a)

С рядом похожих метаболических процессов также тесно сопряжена регуляция экспрессии генов фосфатного регулона (Pho-регулон) в бактериях (рис. 29), основной функцией которого принято считать контроль внутриклеточного уровня P (Santos-Beneit et al., 2015; McClear, 2017). Так, в штамме *E. coli* K-12 транскрипционные факторы PhoB (*cis*-регуляторные элементы промотора) участвуют в регуляции клеточного гомеостаза ионов железа (Fur) и метаболизма жирных кислот и фосфолипидов (FadR) (da Silva Neto et al., 2009; Skouri-Panet et al., 2018). Кроме того, было показано, что ЩФ PhoA участвует в регуляции локальных микробиомов, индукции минерализации биопленок и экзоскелетов беспозвоночных, ремедиации тяжелых металлов и органических загрязнений (Plisova et al., 2005; Skouri-Panet et al., 2018; Doing et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Zorzetto et al., 2023).

Рекомбинантная ЩФ PhoA *E. coli* в трансгенном рисе значительно улучшала рост и продуктивность культуры в условиях острого дефицита P_i при обработке сорняков фосфитом (Ram et al., 2019).

Как было отмечено выше, бактериальные ЩФ PhoA преимущественно присутствуют в морских гетеротрофных бактериях классов *Bacteroidetes* и *γ-Proteobacteria*, соседствующих с популяциями цианобактерий (Sebastia, Ammerman, 2009; Zaheer et al., 2009; Tada Y, 2011; Baltar et al., 2016; Srivastava et al., 2021), их гены находят в микробиомах растений и животных, в частности, в симбионтах (или патогенах) планктонных ракообразных Copepoda (*Vibrio* spp.), симбионтах (факультативных патогенах) человека (*E. coli*), эндофитах корней сахарного тростника (*Enterobacter roggkampii*), патогенах морских рыб (*V. splendidus*), бактериях внутренних тканей морской мидии и губки (*C. amphilecti*), а также в корнях и стеблях морской травы *Zostera* spp. (*C. amphilecti*) (Gómez-León et al., 2005; Plisova et al., 2005; Romanenko et al., 2013; Alexiev et al., 2016; Hjørleifsson et al., 2020; Shoemaker et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Zorzetto et al., 2023).

Кроме того, все беспозвоночные и позвоночные эукариоты имеют собственные ферменты семейства ЩФ PhoA, за исключением растений, которые сильно зависят от реминерализации P почвенным микробиомом (Yang et al., 2012; Rader et al., 2012; Ram et al., 2019; Liang et al., 2020; Lidbury et al., 2021, 2022; Duan, 2022; Adedibu et al., 2024). ЩФ PhoA млекопитающих кодируются четырьмя паралогами для экспрессии в разных тканях организма: ЩФ эпителия кишечника (IAP, Intestine Alkaline Phosphatase), ЩФ зародышевых, или эмбриональных, клеток (GCAP, Germ Cell Alkaline Phosphatase; EAP, Embryonic Alkaline Phosphatase) и плаценты (PLAP, Placental Alkaline Phosphatase), а также тканевая неспецифичная ЩФ (TNAP, Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase) (Millán et al., 2006; Sharma et al., 2014; Duan, 2022). Они отличаются по первичной структуре и типу гликозилирования и, соответственно, биохимическим свойствам, а также многочисленным физиологическим функциям, далеко не все из которых известны (Millán,

2006; Sato et al., 2021; Levitt et al., 2022; Yu et al., 2023; Balabanova et al., 2024b). Важнейшей функцией кишечного изофермента IAP считается участие в реакциях врожденного иммунитета – дефосфорилирование ЛПС и других медиаторов воспаления, а также поддержание барьерной функции эпителия и микробного гомеостаза кишечника (Ghosh et al. 2020; Gao et al., 2022; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Balabanova et al., 2024a, б). Однако у ЩФ TNAP также предполагают противовоспалительный эффект и участие в развитии и дифференцировке прогениторных (стволовых) клеток (Zhang et al., 2021b). В TNAP-дефицитных прогениторных клетках наблюдалась гиперфункция митохондрий и повышенный уровень АТФ, что нарушало их пролиферацию и дифференцировку (Zhang et al., 2021b). Дефицит ЩФ у человека является причиной целого ряда патологий, включая метаболический синдром, фиброз печени, ишемическую болезнь сердца, остеопороз и старение, а повышенный уровень ЛПС в организме человека коррелирует с повышенным риском развития рака печени и колоректального рака (Ghosh et al., 2020; Levitt et al., 2022; Duan, 2022; Le-Vinh et al., 2022; Yu et al., 2023). Предполагают, что гомологи и паралоги ЩФ *PhoA* позвоночных возникли и эволюционировали в ходе многократной дупликации генов у древних беспозвоночных и хордовых (рис. 43).

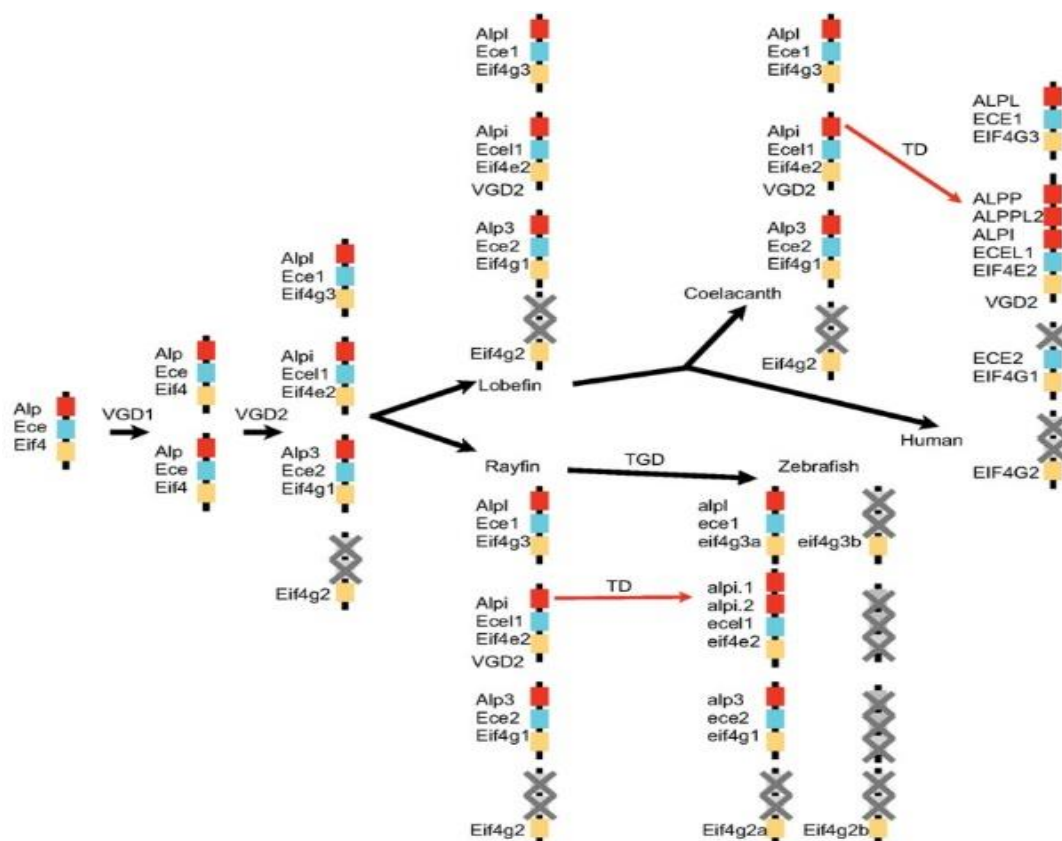


Рисунок 43 – Эволюция локуса щелочных фосфатаз в хромосомах хордовых. Дупликации у предков лучеперых рыб (VGD1, VGD2; черные стрелки) образовали 4 кластера-паралога (*Alp*, *Ece* и *Eif4*), ген *Alp* был утерян. Тандемные дупликации (TD, красные стрелки) в локусе гена ЩФ *Alpi* привели к появлению изоферментов ЩФ человека (*ALPL*, *ALPPL2*, *ALPI*) и современных рыб *Danio rerio* (*alpi.1*, *alpi.2*, *alpi.3*) (адаптировано из Yang et al., 2012)

В свою очередь, ген кишечной ЩФ древних костных рыб мог стать прародителем генов изоферментов тканеспецифичных ЩФ позвоночных (ALPP, ALPPL2, ALPI), включая человека и других млекопитающих (рис. 43). Функцией древней кишечной (столбчатого эпителия) ЩФ семейства PhoA являлось также взаимодействие хозяина с микробиомом через липид А (основной компонент ЛПС) – сигнальную молекулу бактериальной коммуникации (Yang et al., 2012). Распознавание и дефосфорилирование ЛПС бактерий относится к системе врожденного иммунитета всех многоклеточных организмов (Yang et al., 2012; Rader et al., 2012). Так, колонизация светового органа (фотофора) кальмара *Euprymna scolopes* симбиотической люминесцентной бактерией *Vibrio fischeri* и регулирование численности ее популяции в соответствии с суточным ритмом активности кальмара происходит путем изменения уровня экспрессии ЩФ PhoA эпителия фотофора (Rader et al., 2012). Повышение уровня экспрессии ЩФ фотофора при наступлении сумерек и, как следствие, дефосфорилированного ЛПС, является сигналом для *V. fischeri* к размножению, что влечет за собой увеличение интенсивности люминесценции фотофора. Кроме того, дефосфорилирование липида А служит животному защитой от чрезмерного воспаления и разрушения собственных тканей (Rader et al., 2012). В микробиомах пациентов со снижением иммунного статуса, которому сопутствует понижение экспрессии ЩФ, ЛПС-содержащие бактерии преобладают по своей численности над облигатными симбионтами человека из отряда *Bacteroidales*, что приводит к воспалению кишечника (Malard et al., 2021). Однако рекомбинантная человеческая ЩФ PhoA положительно модулирует состав и численность резидентной микрофлоры и снижает воспаление эпителиальной ткани кишечника в экспериментальной модели язвенного колита у мышей (Wojcik-Grzybek et al., 2022).

Рекомбинантная ЩФ PhoA *E. coli* также показала способность подавлять реакции иммунного ответа в ЛПС-индуцированной модели эпителиальных клеток (Dong et al., 2022). Однако удельная активность бактериальных ферментов, в частности ЩФ *E. coli*, значительно ниже, чем ферментов млекопитающих и человека (McComb et al., 1979; Millán et al., 2006; Dong et al., 2022). Несмотря на консервативность механизма ферментативного действия, ЩФ млекопитающих характеризуются более высокой удельной активностью, каталитической эффективностью и пониженной аффинностью к фосфатам (K_m), а также pH-оптимумом в более щелочной области по сравнению с бактериальными ферментами семейства PhoA (McComb et al., 1979; Millán, 2006). Ферменты семейства ЩФ PhoA морских бактерий, таких например, как ЩФ SmAP из *S. amphilecti* и ее структурный прототип – ЩФ VAP из *V. splendidus*, обладают каталитическими характеристиками, сопоставимыми с таковыми ЩФ PhoA эукариот (Балабанова и др., 2023; Plisova et al., 2005; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015; Hjörleifsson et al., 2020). Способность эффективно работать в мономерной форме и при низких температурах, а

также простота в получении рекомбинантных аналогов этих ЩФ (отсутствие посттрансляционных модификаций), делает их привлекательными для использования в различных биотехнологических процессах (Буйновская и др., 2018; Nasu et al., 2012; Kovalchuk et al., 2015, 2018; Balabanova et al., 2014, 2017, 2018a, 2020; Golotin et al, 2015; Hjørleifsson et al., 2017, 2020; Buinovskaya et al., 2018).

Таким образом, многие вопросы, касающиеся структурного разнообразия ЩФ, распространенности и особенной роли структурного семейства ЩФ PhoA у морских факультативных гетеротрофных бактерий, выделенных из разных морских источников, а также их филогенетических связей, хромосомной локализации, таксономической принадлежности и метаболических особенностей невозможно решить без проведения современных геномных и пангеномных исследований. Получение генно-инженерных продуцентов и их рекомбинантных аналогов, исследование свойств и определение молекулярных механизмов, ответственных за отличительные свойства ЩФ семейства PhoA морских бактерий, позволят провести оценку их биотехнологического потенциала и возможностей использования в биомедицине и сельском хозяйстве.

3 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Выделение и культивирование морских бактерий

Штаммы бактерий выделяли из различных объектов и регионов Тихого океана (Балабанова и др., 2016; Бакунина и др., 2020; Nedashkovskaya et al., 2014, 2018, 2021, 2023, 2024; Balabanova et al., 2023; Pentekhina et al., 2023). Штамм *C. amphilecti* KMM 296 (ранее *Deleya marina* (Ivanova et al., 1994), позднее *C. marina* (Балабанова и др., 2016; Plisova et al., 2005)) был выделен из мидии *C. grayanus* на глубине 3 м, б. Троица Японского моря (Ivanova et al., 1994; Nedashkovskaya et al., 2024). Типовые штаммы *C. amphilecti* NRIC 0815^T (=KMM 1561^T), *Cobetia litoralis* NRIC 0814^T (=KMM 3880^T), *Cobetia pacifica* NRIC 0813^T (=KMM 3879^T) и *C. marina* LMG 2217^T были предоставлены коллекциями NODAI (NRIC, Токио, Япония) и BCCM (Гент, Бельгия) для проведения их полногеномного секвенирования и использования в качестве референсных штаммов в хемотаксономическом анализе штаммов и изолятов рода *Cobetia*.

Штамм *P. distincta* 16-SW-7 (=KMM 701) был выделен из пробы морской воды Охотского моря у о-ва Парамушир (Курильские о-ва) путем посева 0,1 мл морской воды непосредственно на питательную среду, содержащую 0,5 % (w/v) бакто-пептона (Difco), 0,2 % (w/v) гидролизата казеина (Merck), 0,2 % (w/v) бакто-дрожжевого экстракта (Difco), 0,1 % (w/v) глюкозы, 0,02 % (w/v) KН₂РO₄, 0,005 % (w/v) MgSO₄ и 1,5 % (w/v) Bacto agar (Difco), 50 % (v/v) природной морской воды и 50 % (v/v) дистиллированной воды. После первичного выделения и очистки бактерию культивировали при 28 °С на той же среде или морском агаре 2216 (Difco, bioMérieux, Pacific Biosciences) и хранили при -80 °С в искусственной морской воде или морском бульоне (Difco, bioMérieux, Pacific Biosciences), содержащем 20 % (v/v) глицерина. Штамм 16-SW-7 депонировали в КММ ТИБОХ ДВО РАН, Корейской коллекции типовых культур (КСТС) и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номерами КММ 701, ККТК 52772 и ВКМ В-2135 D соответственно (Nedashkovskaya et al., 2021). Штамм *P. distincta* 2-2А-13 (=KMM 6257) был выделен из морской звезды *Leptasteria* sp., собранной в Охотском море р-на Северных Курильских о-вов на глубине 584 м (Balabanova et al., 2023). Типовой штамм *P. distincta* КММ 638^T (=АТСС 700518^T) (ранее *Alteromonas distincta* КММ 638^T) был выделен ранее из морской губки, собранной в Беринговом море у Командорских о-вов на глубине 350 м (Romanenko et al., 1995). Штамм *P. distincta* КММ 3548 (ранее *P. paragorgicola* КММ 3548^T) был выделен из образца кораллового полипа *Paragorgia arborea* Охотского моря, собранного у о-ва Онекотан (Курильские о-ва) на глубине 202 м (Ivanova et al., 20026; Nedashkovskaya et al., 2021).

Штамм *R. zhirmunskyi* 10Alg 79^T (=KMM 6723^T) был выделен из красной водоросли *A. tobuchiensis*, собранной у о-ва Парамушир (Курильские о-ва) в ходе исследований видового состава бактерий и гидролитических ферментов ее микробиома (Бакунина и др., 2020;

Nedashkovskaya et al., 2023). Образец водорослей (5 г) гомогенизировали в 10 мл стерильной морской воды в стеклянном гомогенизаторе. Гомогенат (0,1 мл) наносили на чашки Петри с морским агаром 2216 (MA, Difco). После инкубации чашки при 28 °C в течение 7 дней получали свежие культуры изолятов от одной колонии. После первичного выделения и очистки штаммы культивировали при 28 °C на той же среде и хранили при -80 °C в морском бульоне (Difco, Sparks, MD, USA) с добавлением 20 % (v/v) глицерина. Типовые штаммы *Aquicoccus porphyridii* JCM 31543^T и *Marimonas arenosa* KCTC 52189^T, полученные из Японской коллекции микроорганизмов (JCM) и Корейской коллекции типовых культур (KCTC) соответственно, использовали в качестве референсных штаммов в параллельных тестах данного исследования. Данные штамма *Lentibacter algarum* ZXM100^T, соседствующего с новым изолятом в геномном дереве, также были включены в анализ (Nedashkovskaya et al., 2023).

Штамм *Arenibacter latericius* KMM 426^T (=VKM В 2137D^T, =LMG 19694^T, =CIP 106861^T) был выделен из морских отложений Южно-Китайского моря (Ivanova et al., 2001). Штаммы хитинолитических бактерий *Pseudoalteromonas* spp., *Vibrio* spp. и др. выделяли из разных объектов и регионов Тихого океана как описано (Pentekhina et al., 2023). Все исследуемые штаммы хранятся в КММ ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, Россия (<https://kmm644.ru>).

Для генетической, морфологической, биохимической, физиологической и хемотаксономической характеристик штаммы выращивали при 28–30 °C в течение 24–48 ч на морском агаре (MA, Difco, USA) и тестировали с использованием стандартных методов и наборов реагентов (Nedashkovskaya 2014, 2018, 2021, 2023, 2024; Balabanova et al., 2023).

3.2 Фенотипирование и хемотаксономия морских бактерий

Физиологические, морфологические и биохимические характеристики типовых штаммов и новых изолятов определяли по стандартным методикам с использованием галерей API 20E, API 20NE, API ID 32GN, API 50CH и API ZYM (bioMérieux, Марси-л'Этуаль, Франция) в соответствии с инструкциями производителя. Все галереи инкубировали при 28 °C. Морфологию клеток изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, используя клетки, выращенные в течение 48 ч на МА при 28 °C. Окрашивание по Граму проводили в соответствии с рекомендациями Gerhardt et al. (1994). Окислительную или ферментативную утилизацию глюкозы определяли на среде Хью и Лейфсона, модифицированной для морских бактерий (Lemos et al. , 1985). Активность каталазы проверяли добавлением 3 % (v/v) раствора H₂O₂ к колонии бактерий и наблюдением за появлением газа. Оксидазную активность определяли с помощью N,N,N,N,N-тетраметил-*n*-фенилендиамина. Разложение агара, крахмала, казеина, желатина, хитина, ДНК и мочевины; рост в диапазоне pH 5–11 (с шагом в 1 единицу pH); производство кислоты из углеводов, гидролиз Tween 20, 40 и 80, восстановление нитратов и

производство сероводорода были протестированы согласно Smibert, Krieg (1994). Температурный диапазон для роста составлял 4–42 °C с интервалом в 1 °C и оценивался на МА. Толерантность к NaCl проверяли в среде, содержащей 5 г бактопептона (Difco), 2 г бактодрожжевого экстракта (Difco), 1 г глюкозы, 0,02 г KH_2PO_4 и 0,05 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на литр дистиллированной воды, содержащей 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8 и 10% (w/v) NaCl. Чувствительность к антибиотикам определяли обычным методом диффузионных дисков. Диски были пропитаны следующими антибиотиками: ампициллин (10 мкг), бензилпенициллин (10 U), карбенициллин (100 мкг), цефалексин (30 мкг), цефазолин (30 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), эритромицин (15 мкг), доксициклин (10 мкг), гентамицин (10 мкг), канамицин (30 мкг), Линкомицин (15 мкг), налидиксовая кислота (30 мкг), неомицин (30 мкг), офлоксацин (5 мкг), олеан-домицин (15 мкг), оксациллин (10 мкг), полимиксин В (300 ЕД), рифампицин (5 мкг), стрептомицин (30 мкг), тетрациклин (5 мкг) и ванкомицин (30 мкг).

Для сравнительного анализа жирных кислот и полярных липидов в цельных клетках штаммы выращивали в оптимальных условиях (28–30 °C) в течение 24–48 ч на МА. Метилловые эфиры жирных кислот (FAMES) готовили по методике, описанной Sasser (1990), с использованием стандартного протокола Sherlock Microbial Identification System (версия 6.0, MIDI) и анализировали на хроматографе GC-21A (Shimadzu) с капиллярной колонкой из плавленого кварца (30 м × 0,25 мм), покрытой фазами Supercowax-10 и SPB-5 (Supelco) при 210 °C. Идентификацию FAME проводили с помощью измерения эквивалентной длины цепи и сравнения времени удерживания с аутентичными стандартами. Полярные липиды исследуемых штаммов выделяли методом экстракции хлороформом/метанолом по Bligh и Dyer (1959). Двумерную TLC полярных липидов проводили на силикагеле 60 F254 (10 × 10 см, Merck) с использованием хлороформа/метанола/воды (65:25:4, v/v) в первом направлении и хлороформа/метанола/уксусной кислоты/воды (80:12:15:4, v/v) во втором направлении (Collins, Shah, 1984).

3.3 Секвенирование генов и филогения таксономических маркеров

ДНК выделяли из клеток (0,1–0,2 г), используя набор NucleoSpin Microbial DNA Mini kit (Macherey-Nagel, Германия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для генов 16S рРНК проводили с использованием геномной ДНК типовых штаммов и новых изолятов, выделенной набором реактивов и колонок NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Германия), и пар олигонуклеотидных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') или 11F (5'-GTTTGATCMTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg, 1991) и системы GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Singapore, Сингапур). Для секвенирования ПЦР-ампликонов использовали набор BigDye Terminator версии 3.1 Cycle (Applied Biosystems). Очищенные продукты секвенирования анализировали методом

электрофореза с использованием 50-см капиллярной решетки на ДНК-секвенаторе ABI Prism 3130xL (Applied Biosystems, Hitachi, Япония), последовательности собирали с помощью программы SeqScape версии 2.6 (Applied Biosystems). Полученные последовательности депонировали в NCBI (табл. A1) для сравнительного анализа с референсными филотипами в базе данных EzBioCloud (Yoon et al., 2017; Nedashkovskaya et al., 2021, 2024; Noskova et al., 2021; Balabanova et al., 2023; Pentekhina et al., 2023). Мультилокусное типирование для идентификации видовой принадлежности близкородственных изолятов проводили с использованием видоспецифичных праймеров методом анализа ПЦР-продуктов в агарозном геле (табл. A1, A2, рис. A1). Поиск генов 16S рРНК в полногеномных сборках изолятов проводили с использованием возможностей видовой идентификации сервера TYGS (Meier-Kolthoff, Göker et al., 2019). Кроме того, филогению молекулярных маркёров проводили программой MEGA X версия 10.2.1 с использованием метода присоединения ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ), максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, MP) и максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) для генов 16S рРНК и ML для белков RpoC (ДНК-зависимая РНК-полимераза) (Tamura et al., 2021). Генетические расстояния рассчитывали в соответствии с двухпараметрической моделью Кимуры, значения бутстрепа получали из 500-1000 альтернативных деревьев. Филогению аминокислотных последовательностей, выведенных из геномных последовательностей, проводили методом ML с помощью веб-сервера IQ-TREE версия 1.6.12 (Nguyen et al., 2015), используя 100 непараметрических бутстреп-реплик и модель замещения LG+I+G4, определенную в программе ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017).

3.4 Секвенирование геномов и филогеномный анализ

Геномную ДНК штаммов, выделенную, как описано выше, оценивали с помощью гель-электрофореза ДНК и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Библиотеку для секвенирования ДНК готовили с помощью наборов Nextera DNA Flex (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) и секвенировали на платформе Illumina MiSeq методом парноконцевых прочтений длиной 150 пар нуклеотидов (п.н.). Строчные прочтения обрезали с помощью программы Trimmomatic 0.39 (Bolger et al., 2014), качество оценивали с помощью программы FastQC 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Отфильтрованные прочтения собирали в контиги с помощью программы SPAdes 3.15.3 (Bankevich et al., 2012). Качество сборки анализировали с помощью программы QUAST версия 5.0.2. Полноту и контаминации генома оценивали с помощью программы CheckM 1.1.3 на основе таксономически специфического рабочего процесса (Parks et al., 2015). Геном аннотировали с помощью пайплайнов NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), Rapid Annotation

using Subsystem Technology (RAST) и Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) (Aziz et al., 2008; Tatusova et al., 2016).

Черновые геномы штаммов *C. amphilecti* NRIC 0815^T, *C. litoralis* NRIC 0814^T, *C. pacifica* NRIC 0813^T, *Cobetia* sp. 1AS1, *Cobetia* sp. 2AS, *Cobetia* sp. 3AK, *Cobetia* sp. 10Alg 146, *Cobetia* sp. 29-18-1, *Cobetia* sp. 2AS1 и *C. amphilecti* KMM 296 размещены в GenBank/EMBL/DDBJ под номерами JASCSA000000000, JARWKV000000000, JASCSB000000000, JARWKU000000000, JARWKQ000000000, JARWKR000000000, JARWKT000000000, JARWKS000000000, JADAZN000000000 и JQJA000000000 соответственно (табл. 4).

Таблица 4 – Номера доступа NCBI и характеристики геномов штаммов *Cobetia* spp.

Штамм	Код доступа ID	Размер генома, п.н.	Г+Ц, mol %	Конт иги	Сборка, %	Контаминация, %	Источник выделения
<i>Cobetia</i> sp. 2AS1	GCF_014876835.1	4248424	62,5	9	95,96	0,9	Прибрежные седименты, Японское море, РФ
<i>Cobetia</i> sp. 2AS	GCF_029846355.1	4247060	62,5	9	99,15	1,3	
<i>Cobetia</i> sp. 1AS1	GCF_029846435.1	4235090	62,5	3	99,27	1,71	Литораль, вода, Японское море, РФ
<i>C. litoralis</i> NRIC 0814 ^T	GCF_029846315.1	4621254	62,5	1	99,15	2,93	Литораль, песок (1 м), Японское море, РФ
<i>Cobetia</i> sp. 29-18-1	GCF_029846405.1	4117019	62,5	0	99,35	1,48	Губка <i>Esperiopsis digitata</i> , Охотское море, РФ
<i>C. amphilecti</i> NRIC 0815 ^T	GCA_030010415.1	4171304	62,5	12	98,54	1,34	Губка <i>Amphilectus digitatus</i> , Аляска
<i>C. amphilecti</i> KMM 296	GCF_000754225.1	3965007	62,5	7	98,29	1,28	Ми́дия <i>C. grayanus</i> , Японское море, РФ
<i>Cobetia</i> sp. 10Alg 146	GCF_029846385.1	4095141	62,5	3	99,44	1,68	Красная водоросль <i>Ahnfeltia tobuchiensis</i> , Охотское море
<i>Cobetia</i> sp. 3AK	GCF_029846335.1	4073243	2,5	8	99,44	1,71	Литораль, вода, Японское море, РФ
<i>C. pacifica</i> NRIC 0813 ^T	GCA_030010515.1	4066371	62,5	2	99,44	1,3	Литораль, песок (1 м), Японское море, РФ
<i>C. marina</i> JCM 21022 ^T	GCF_001720485.1	4176400	62,0		99,51	1,51	Литораль, морская вода, США
<i>Cobetia</i> sp. UCD-24C	GCF_001306765.1	4229986	62,5	1	98,9	1,76	Корни <i>Zostera marina</i> , США
<i>C. amphilecti</i> B2M13	GCF_018860945.1	4289324	62,5	8	95,88	0,91	Альгинатные частицы с 40–100 м глубины, США

Продолжение таблицы 4

Штамм	Код доступа ID	Размер генома, п.н.	Г+Ц, mol %	Конт иги	Сборка, %	Контаминация, %	Источник выделения
<i>C. amphilecti</i> B2M13	GCF_018860945.1	4289324	62,5	8	95,88	0,91	Альгинатные частицы с 40–100 м глубины, США
<i>Cobetia</i> sp. MC34	GCF_018340035.1	4022416	62,5	75	95,47	0,87	Рыбоприемный пункт, Норвегия
<i>Cobetia</i> sp. 1CM21F	GCF_023161745.1	4261659	62,5	4	95,88	0,49	Морская пещера, Португалия
<i>Cobetia</i> sp. 4B	GCF_018831605.1	4325922	62,5		99,41	1,33	Течение Гумбольта, Чили
<i>Cobetia</i> sp. AM6	GCF_009617955.1	4229996	62,5		98,74	1,36	Раковина <i>Abalone</i> , Япония
<i>C. amphilecti</i> N-80	GCF_020217465.1	4160095	62,5		98,74	1,28	Седименты, море Шотландии
<i>Cobetia</i> sp. Dlab-2-U	GCF_024124585.1	4144083	62,5	37	96,63	1,3	Коралл <i>Diploria labyrinthiformis</i> , США, Флорида
<i>Cobetia</i> sp. Dlab-2-AX	GCF_024124625.1	4001795	62,5	0	96,29	1,3	
<i>C. marina</i> 402	GCF_013350055.1	3978956	62,5	32	95,93	0,6	Аквариум, Бразилия
<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	GCF_016495405.1	4209007	62,5		99,45	1,71	Бурая водоросль <i>Sargassum fusiforme</i>
<i>Cobetia</i> sp. MB87	GCF_011319755.1	3101384	62,5	2	81,26	1,58	Кишка морского огурца, Вьетнам
<i>C. pacifica</i> GPM2	GCF_009931455.1	4195186	62,5		99,59	1,33	Красная водоросль <i>Pyropia tenera</i> , Ю. Корея
<i>Cobetia</i> sp. MMG027	GCF_027947415.1	4168882	62,5	7	99,24	1,71	США, Сан-Диего
<i>Cobetia</i> sp. MM1IDA2H -1	GCF_002916775.1	4151052	62,0	8	99,65	1,33	Эулитераль, приливно-отливной водоем, Чили
<i>C. marina</i> MM1IDA2H -1AD	GCF_900119965.1	4155178	62,0	05	99,65	1,33	
<i>Cobetia</i> sp. 5-11-6-3	GCF_013374055.1	4120053	62,5	0	99,44	1,3	Морские водоросли, Япония
<i>C. marina</i> T1	GCF_005144735.1	4177239	62,0	1	99,44	1,28	Соленая вода, Хамптон Бич, США
<i>Cobetia</i> sp. 5-25-4-2	GCF_013374075.1	4118344	62,5	1	99,44	1,3	Морские водоросли, Япония
<i>Cobetia</i> sp. ICG0124	GCF_004006355.1	3345506	63,0		90,85	2,1	Зеленая водоросль <i>Ulva</i> sp., Англия
<i>Cobetia</i> sp. L2A1	GCF_009796845.1	4118938	57,5		98,9	1,28	Бурые водоросли, Северный Ледовитый океан

Продолжение таблицы 4

Штамм	Код доступа ID	Размер генома, п.н.	Г+Ц, mol %	Конт иги	Сборка, %	Контаминация, %	Источник выделения
<i>Cobetia</i> sp. QF-1	GCF_002213105.1	4084184	57,5	1	99,04	0,93	Морская вода, Южно-китайское море
<i>C. crustatorum</i> SM1923	GCF_007786215.1	4215468	57,5	63	98,83	0,82	Поверхностная вода, Конгс-фьорд, Норвегия
<i>C. crustatorum</i> JO1 ^T	GCF_000591415.1	4049952	57,5	38	90,05	0,52	Ферментированная креветка, Япония

Полученные геномы штаммов *P. distincta* 2-2A-13 и *Pseudoalteromonas elyakovii* VKPM В-3905^T депонированы под номерами JANIHL010000000 и JANJFO010000000 соответственно (табл. Б1) (Balabanova et al., 2023). Остальные геномы (табл. 4, табл. Б1) получали из базы данных NCBI референсных последовательностей (RefSeq) с помощью программы NCBI-genome-download версии 0.3.0 (<https://github.com/kblin/ncbi-genome-download>, n = 28).

Пангеном реконструировали с помощью рабочего процесса микробной пан-геномики в anvi'o версии 7.1 (minbit = 0,5; mcl-inflation = 2; min-occurrence = 1) (Eren et al., 2015). Геномы упорядочивали на основе распределения кластеров генов с помощью алгоритма MCL (расстояние: евклидово; сцепление: Уорда). Для расчета средней нуклеотидной идентичности (ANIm) использовали программу 'anvi-compute-genome-similarity' с флагом '-program pyANI'. Значения аминокислотной идентичности (AAI) и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) между штаммами рассчитывали с помощью онлайн-сервера ANI/AAI-Matrix (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016) и платформы TYGS (формула d4), соответственно (Meier-Kolthoff, Göker, 2019). Гибридизацию ДНК-ДНК *in vitro* между исследуемыми и типовыми штаммами проводили спектрофотометрически, начальные скорости ренатурации регистрировали, как описано в работе De Ley et al. (1970).

Для построения филогенетического дерева из пан-генома извлекали и конкатенировали 1432 однокопийных последовательностей коровых генов для каждого штамма (длина композита 465701 п.н.) с помощью программы 'anvi-get-sequences-for-gene-clusters' с флагом '-concatenate-gene-clusters'. Полученные FASTA-файлы очищали путем удаления нуклеотидных позиций, которые имели пробелы более чем в 50% последовательностей, с помощью программы trimAl версии 1.4.1 (Capella-Gutiérrez et al., 2009). Филогению основного генома реконструировали с помощью IQ-TREE версии 2.2.0.3 по модели WAG с непараметрическим бутстреппингом по 100 репликам (Nguyen et al., 2015). Моделирование пан-генома и корового генома оценивали с помощью PanGP v.1.0.1 с использованием модели регрессии по закону Хипа и экспоненциальной

регрессии, соответственно, как описано в работе Tettelin et al. (2008). Филогеномный анализ некоторых штаммов проводили с помощью программы PhyloPhlAn версия 3.0.1 (Asnicar et al., 2020). Геномный анализ ортологичных кластеров и одиночных генов проводили с помощью программ OrthoVenn2 и OrthoVenn3 (<https://orthovenn3.bioinfotoolkits.net/home>) (Sun et al., 2013; Xu et al., 2019).

3.5 Геномный анализ биосинтетических кластеров и генов

Для идентификации углеводов-активных ферментов (CAZymes) использовали мета-сервер dbCAN2 версии 10 с настройками по умолчанию (<http://cys.bios.niu.edu/dbCAN2>, дата обращения: 03.02.2022). Предсказания двух из трех алгоритмов, интегрированных в сервер (DIAMOND, HMMER и dbCAN-sub), считались достаточными для отнесения к семейству CAZy. Аннотирование кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов проводили с помощью сервера antiSMASH версии 6.1.1 (<https://antiSMASH.secondarymetabolites.org/#!/start>, дата обращения 09.12.2023). Относительное содержание кластеров CAZymes и antiSMASH в геномах определяли с помощью тепловых карт и гистограмм с использованием пакетов pheatmap версии 1.0.12 и ggplot2 версии 3.3.5 в RStudio версии 2022.02.0+443 с R версии 4.1.3. Геномные регионы, содержащие кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов (табл. Б3), извлекали из GBK-файлов геномов с помощью программы Geneious Pro версии 4.8 (Kearse et al., 2012). Сгенерированные GBK-файлы модифицировали путем добавления пользовательских классификаторов цветовых признаков в соответствии с общепринятым цветовым обозначением antiSMASH. Попарное сравнение каждого локуса между геномами проводили с помощью BLASTn (BLAST версии 2.11.0+), запущенного в EasyFig версии 2.2.5 (Sullivan et al., 2011). Графики синтении визуализировали с помощью Easyfig с минимальным BLAST-попаданием в 680 п.н. Для визуализации синтении также использовали *clinker* для выравнивания генных кластеров в формате GBK, основанный на Python, и сопутствующую библиотеку визуализации JavaScript – clustermap.js, редактирование осуществляли с помощью Inkscape (Gilchrist et al., 2021; Blin et al., 2023).

Для поиска генов и их продуктов анализировали GTF-файлы всех исследуемых штаммов с помощью скриптов R и bash. Идентификацию оперонной структуры проводили с использованием программ Operon-mapper (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29931111>) и LOFI (<https://github.com/JuliGen/LOFI>). Построение моделей метаболических сетей целых геномов проводили в программе gapseq 1.2 (<https://github.com/jotech/gapseq>, дата обращения 23.07.2023), с использованием автоматически обновляемых биохимических баз данных, модифицированной ModelSEED (Zimmermann et al., 2021), PubChem (Kim et al., 2021) и BioCyc (Karp et al., 2017). Прогнозирование путей, транспортеров и комплексов основано на базе данных

последовательностей белков, полученной из UniProt и TCDB. Геномные острова (Genomic Islands, GIs) предсказывали и анализировали с помощью сервера IslandViewer 4 (Genomic Island Prediction and Genome Visualization Tool) (Bertelli et al., 2017).

Филогенетический анализ ЩФ проводился в программе MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Эволюционная история была выведена с помощью метода максимального правдоподобия (ML) и модели Джонса (w/freq. model) (Tamura et al., 2021). Было выбрано дерево с наивысшим логарифмическим правдоподобием ($-22\,741,47$). Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путём применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, с последующим выбором топологии с наивысшим значением логарифмического правдоподобия. Анализ включал 137 аминокислотных последовательностей. Всего в конечном наборе данных было 880 позиций (Tamura et al., 2021).

Для эволюционного анализа ЩФ был проведен поиск гомологов референсных последовательностей ЩФ *C. amphilecti* среди белков из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>), принадлежащих к разным таксономическим группам (всего 37): архей, бактерий, водорослей, грибов, растений и животных. Из каждой таксономической группы брали по несколько последовательностей с совпадениями выше $1e-10$ ($E < 1e-10$). Неукорененные деревья ML выводились с помощью сервера IQ-Tree (<http://www.iqtree.org/>) с подбором оптимальной модели (LG + G32) с наименьшим значением BIC (Kalyaanamoorthy et al., 2017; Nguyen et al., 2015). ML-дерево строили с помощью процедуры, которая рекомендуется для выравниваний более коротких последовательностей, содержащих много таксонов. Поддержка ветвей определялась с помощью SH-aLRT (approximate likelihood ratio test), теста aBayes (-abayes) и ультрабыстрым бутстрэпом (UFBoot)(«-bb 1000»).

Для выявления геномного окружения последовательности гена ЩФ и визуализации синтении в разных штаммах разработали веб-приложение Syntenome (<https://github.com/glebus-sasha/Syntenome>) на основе фреймворка Shiny на языке R с высокой степенью интерактивности (Balabanova et al., 2024a). Приложение позволяет визуализировать и анализировать данные в формате GTF. Интерактивные возможности библиотеки Shiny позволяют загружать и анализировать данные геномной аннотации из разных источников, включая локальные файлы и публичные базы данных. Приложение разделено на два основных компонента: пользовательский интерфейс и серверную логику. В интерфейсе используются элементы для загрузки данных, настройки параметров визуализации и управления различными фильтрами. Серверная часть приложения обрабатывает данные, применяет фильтры и выполняет построение графиков с использованием пакетов ggplot2 и plotly. Файлы в формате GTF загружали как с локального компьютера, так и использовали встроенные тестовые данные. После загрузки файлы обрабатывали и объединяли в единый датафрейм с использованием пакетов dplyr и tracklayer.

Фильтрацию данных проводили по типу аннотированных элементов (CDS), центрировали данные по заданному гену или продукту (Balabanova et al., 2024a). Для этого использовали скрипты `get_centered_df_by_gene` и `get_centered_df_by_product`, позволяющие фокусировать внимание на выбранных регионах.

3.6 Получение рекомбинантных белков

Для подтверждения функциональной аннотации генов ферментов биотехнологически значимых штаммов (*Cobetia* spp., *Pseudoalteromonas* spp., *Vibrio* spp., *Arenibacter* spp.) и изучения их свойств получали рекомбинантные белки с использованием полноразмерных кодирующих последовательностей (CDS) зрелых белков, полученных с использованием геномной ДНК чистой культуры и геноспецифичных пар праймеров (табл. 5).

Таблица 5 – Олигонуклеотиды для конструирования рекомбинантных плазмид

Гены NCBI RefSeq	Последовательность прямая (5'→3')	Последовательность реверсная (5'→3')
Щелочные фосфатазы ¹		
PhoA (ЩФ CmAP) WP_245163010	TTAACC <u>ATGGC</u> CAGAGATCAAGAA TGTCATTCTGAT	TTAAGAATTCCTTCGCTACCACTGT CTTCAGATACTGTCC
PhoX WP_043336117	TAATGTCGAC <u>ATGTCT</u> CAGCGTGT CATTCTTGTCG	TAATCTCGAGCTATCACTTGAGGCC TCGCGTGGCA
PhoD1 WP_043333989	TATA <u>CCATGGA</u> AGGACGGCGCCC GCGCATGCCCTC	TATAGAGCTCTTAGACACTGGCGGC GGCGGGGGTC
PhoD2 WP_052384691	TAATCCATGGGCGCCTGCCCCGCG TGCTG	TAATGAGCTCCTATCAGCGACGGG GCACAAAGT
PafA WP_043332298	TAATCCATGGTGTCCCGCCCTGGC CTGATCC	TAATGTCGACCTATCAGTTCACCTC TTGAAGATCAGG
Гибридные белки		
ЩФ CmAP ¹ WP_245163010	TATTCCATGGCAGAGATCAAGAA TGTCATTCTGAT	TTAAGAGCTCAGAACCACCACCAC CAGAACCACCACCACCAGAACCAC CACCACCCTTCGCTACCACTGTCTT CAGATACTGTCTT
Порин OmpF ² WP_038824054	TTAAGAGCTCCGAAATCTATAACA AAGATGGCAACA	TTAAGTCGACTTAGAACTGATAAAC CAAGCCAAC
Лектин MBL-AJ ² AAT42221	AGCTGAGCTCTGTCTGACGGCTTG TCCGGAGTTTGT	CAGTGTCGACCTCCAAATGATACTC GATACAGGGAAG
Лектин CGL ² JQ314213	AGCTGAGCTCGATGACGATGACA AGATGACAACGTTTCTTATCAAAC ACAAGGCCAGTG	AGCTGTGCACTTAGGCATAAACTA AAACGCGCTTGTCTTT
CGL _{Asn27Ala} ³	AGTAGCAACCTGCTAACGCCACT AAGTTG	GCAGGACCAACTTAGTGGCGTTAG CAGGGT
CGL _{His37Ala} ³	GTCCTGCATAGCGATATCGCTGAA AGAATG	GGAAGTACATTCTTTCAGCGATATC GCTAT
CGL _{Glu75Ala} ³	AGCTAATCCACCAAATGCCACCA ATATGGTTC	TGATGCAGAACCATATTGGTGGCAT TTGGTG
CGL _{His85Ala} ³	GTTCTGCATCAAGATCGTGCTGAT CGGGCA	GAATAGTGCCCGATCAGCACGATC TTGAT

Гены NCBI RefSeq	Последовательность прямая (5'→3')	Последовательность реверсная (5'→3')
CGL _{Asn119Ala} ³	ATCCCCGAATCCACCGAATGCTAC CGAAACAG	GTATAACTGTTTCGGTAGCATTCGG TGGAT
CGL _{Asp127Ala} ³	CAGTTATACATGGAGCTAAACAT GCAGCCA	GAATTCCATGGCTGCATGTTTAGCT CCATGTA
CGL _{His129Ala} ³	ATACATGGAGATAAAGCTGCAGC CATGGAA	CAAAAATGAATTCCATGGCTGCAG CTTTATCT
Нуклеазы ¹		
CmNuc KGA01652	TATACCATGGTATGGCAGGAGCG CGACTACCAGCA	TATAGAGCTCTCAGTAACGTGATGG CGTACGACTG
CmEEP WP_043333473	TATACCATGGGACTCGACGAGAC GGCACCTCCCCT	TATAGAGCTCTTATGCTAGCCCGAT CGCCTTGC GGCA
Протеазы ¹		
CamClpP	TATCCATGGTAAACGACTTCGACA TCAAGAATGCT	TATAGAGCTCTCACTCCACGTCTGGG ACGGCGTTCC
CamSP	TATACCATGGTACGTGAATTGCCC GACTTCACCCA	TATACTCGAGTCACTTGTCTGCTGTC GGCACGCATG
Хитиназы ¹		
ChiE_B530	TATAGAGCTCCCATGAGTCCGCAA CCCGATCCAC	TATACTCGAGTTAACAGCCAACCA AGG
ChiG_Sgm5	TATAGAGCTCCAGCATGAATATC CAACCTGATCC	TATACTCGAGTTACTGGCAAGAGAT CTCATCCCAG
Гликозидазы ¹		
α-PsGal	ATTACCATGGATGACGACGACAA GGCCGACACTAAATCATTTTATCG ATTAGACA	ACACGTCGACTTACGCTTTGTTGAG CTCAAATATAAGC
α-AlNaGal	TTAACCATGGAAAATCTTTAT TTTCAGGGTGGGGCTAAGTACATG GGCG GTTTTTCTGCT	TTAAGTCGACACCCTGAAAATAAA GATTTTCGCTTACAATATCTAATGG TGCAGTGGT

Примечания: 1. Для получения ПЦР-продуктов полноразмерных генов с адаптированными “липкими” концами (подчеркнуты сайты рестрикции) для лигирования в плазмиду pET-40b(+) (Novogen) использовали инкубационную смесь: 2 мкл буфера 10x, 0,4 мкл 40 mM дезоксинуклеотидов (dNTP), 0,2 мкл каждого праймера 0,5 мкМ, 1 мкл ДНК-матрицы, 0,4 мкл Епсусло ДНК-полимеразы (Евроген, Москва). Режим ПЦР: 95 °С – 2 мин, (95 °С – 15 сек, 63,5–72 °С – 20 сек, 72 °С – 1,5 мин) x 38 циклов, 72 °С – 5 мин (Eppendorf). ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1,2 % агарозе. 2. Гены *OmpF* порина *Y. pseudotuberculosis* и лектинов трепанга *A. japonicus* (MBL-AJ) и мидии *C. grayanus* (CGL) использовали для получения генно-инженерных бифункциональных белков с активностью ЩФ PhoA (CmAP) для детекции связавшихся с лигандами комплексов. Режим получения ПЦР-продуктов: (95 °С – 15 с, 72 °С – 1,2 мин) x 35 циклов, 72 °С – 3 мин (Eppendorf). 3. Режим ПЦР для введения точечных мутаций в ген лектина CGL: (95 °С – 20 с, 64 °С, 3 мин, 72 °С – 2 мин) x 4 цикла. ПЦР-продукт использовали как ДНК-матрицу в ПЦР с праймерами для получения полноразмерного гена CGL: (95 °С – 15 с, 72 °С – 1,2 мин) x 35 циклов, 72 °С – 3 мин (Eppendorf).

В качестве экспрессионного вектора использовали плазмиду pET-40b(+) (Novogen), содержащую шаперон для синтеза водорастворимых рекомбинантных белков в клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3) (Балабанова и др., 2010, 2012, 2014, 2015a,б, 2017a; Noskova et al., 2019, 2023, 2025; Pentekhina et al., 2023). Рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3) выращивали в 25 мл жидкой среды Лурии–Бертани (LB), содержащей 50 мкг/мл канамицина, на шейкере при 200 об/мин в течение 16 ч при 37 °С. Затем клетки помещали в свежую среду LB (1 л), содержащую 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37 °С на шейкере при 200 об/мин до оптической плотности 0,6–0,8 при λ 600 нм. После этого добавляли 0,2 мМ изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) для индукции биосинтеза плазмидных белков и продолжали инкубацию при 18 °С в течение 18 ч при 200 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин при 8 °С, суспендировали в 20 мл 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 8,0 (буфер А) и подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Bandeline (Германия) при мощности 22 кГц (при 0–4 °С) импульсами по 40 сек до осветления суспензии. Суспензию центрифугировали при 11000 об/мин в течение 30 мин при 8 °С, осадок отбрасывали, в полученном экстракте определяли активность фосфатазы SmAP по хромогенному продукту гидролиза пара-нитрофенилфосфата (*p*-НФФ). Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд. Для выделения рекомбинантного белка полученный супернатант наносили на колонку 25 × 3,2 см Ni-IMAC-Sepharose (Cytiva (GE Healthcare) Life Sciences, Buckinghamshire, UK), уравновешенную буфером А, и промывали пятью объемами того же буфера. Рекомбинантный белок элюировали линейным градиентом 0–0,5 М имидазола в буфере А, содержащем 0,5 М NaCl (6 объемов колонки) со скоростью 3 мл/мин. Фракцию, содержащую ЩФ, очищали на колонке 10 × 1,4 см Source 15 Q (Cytiva (GE Healthcare) Life Sciences), уравновешенной буфером А с 2 мМ MgCl₂ (буфер Б), затем белок элюировали линейным градиентом 0–0,5 М NaCl в буфере Б. Ионообменную хроматографию проводили со скоростью 1 мл/мин; объем фракций составлял 1 мл. Собирали фракции, содержащие ЩФ, и обрабатывали энтерокиназой L-NEP в конечной концентрации 1 единица (ЕД) на 1 мг белка в течение 18 ч при 25 °С при постоянном перемешивании на вортексе. Затем раствор белка наносили на колонку HisTrap™ High Performance (Cytiva (GE Healthcare) Life Sciences), предварительно уравновешенную буфером А. Рекомбинантный белок элюировали 10 объемами буфера Б. Фракции, содержащие ЩФ, собирали и концентрировали методом ионообменной хроматографии с использованием ионообменной колонки mono-Q HR (4×0,8 см) (Cytiva (GE Healthcare) Life Sciences, Великобритания), уравновешенной буфером Б, промывали 10× объемами буфера Б, затем белок элюировали линейным градиентом 0–0,5 М NaCl в буфере Б со скоростью 0,5 мл/мин и фракциями по 1 мл. В полученных фракциях определяли активность ЩФ путем добавления 5 мкл образца белкового раствора в 495 мкл 0,1 М Трис-HCl (pH 10,0), буфера, содержащего 0,2 М KCl и 2 мМ *p*-НФФ.

Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Для остановки реакции использовали 2 мл охлажденного 0,5 М NaOH. Количество образовавшегося *n*-НФ определяли спектрофотометрически при длине волны 400 нм. За единицу активности принимали количество фермента, необходимого для образования 1 мкМ *n*-НФ за 1 мин. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Удельную активность рассчитывали по формуле:

$$y.a. = \frac{2,5 \times OD_{400}}{18,6 \times t \times 0,005 \times C}$$
, где OD_{400} – оптическая плотность при λ 400 нм, 2,5 – объем реакционной смеси (мл), 18,6 – коэффициент экстинкции (ϵ) *n*-НФФ, t – время инкубации при 37 °С (мин), 0,005 – объем образца (мл), C – концентрация образца (мг/мл).

Нуклеолитическую активность определяли по кислоторастворимым продуктам реакции, высвобождающихся из одноцепочечной ДНК (ssDNA) или двуцепочечной ДНК (dsDNA). Инкубировали 20 мкл рекомбинантного белка (0,1–0,15 мг/мл) и 10 мкл ДНК (2 мг/мл) в 250 мкл 30 мМ ацетата натрия, pH 4,6, 0,1 М NaCl, 1 мМ ZnSO₄ или 25 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂ при 37 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,5 N HClO₄, центрифугировали смесь при 10000 g в течение 10 мин, концентрацию продуктов реакции измеряли спектрофотометром при λ 260 нм. За единицу активности фермента определяли количество фермента, при котором образуется количество кислоторастворимых продуктов, соответствующее 1,0 ОЕ за 1 ч.

При определении активности рекомбинантной протеазы использовали 1% казеин в качестве субстрата по методу (Oda, Murao, 1974). Раствор рекомбинантной протеазы смешивали с 0,5 мл 50 мМ Трис-HCl буфера, pH 8,0, содержащего 1 % казеина. Смесь инкубировали в течение 20 мин при 50 °С. Реакцию останавливали холодной 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Кислоторастворимые продукты гидролиза определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Для построения стандартной кривой использовали растворы тирозина (Туг) с концентрацией 0–100 мкг/л. Единицу (Ед, U) протеазной активности определяли как количество фермента, высвобождающего 1 мкг Туг·мин⁻¹.

При выделении рекомбинантных хитиназ и гликозидаз в качестве буфера А использовали 10–20 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,5–7,7. В полученных фракциях белков определяли гидролитическую активность с использованием соответствующих субстратов и методик определения активности.

Для определения гликозидазной активности инкубировали 3,3 мМ *n*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид (*n*-НФГП) или *n*-нитрофенил- α -N-ацетилгалактозаминид (*n*-НФ-N-ацетил-ГП) в качестве субстрата с аликвотой раствора рекомбинантного белка в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5, при 20 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,6 мл 1 М Na₂CO₃. За единицу активности α -галактозидазы принимали количество фермента, гидролизующего 1 мкмоль *n*-

НФГП(*n*-НФ-N-ацетил-ГП)·мин⁻¹. Общее количество *n*-НФ определяли спектрофотометром при λ 400 нм ($\epsilon_{400} = 18300 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Для определения хитиноподобной активности использовали метод Шейлза (Schales, Schales, 1941). Раствор белка (50 мкг) разводили фосфатным буфером до объема 405 мкл, добавляли 45 мкл 1%-коллоидного хитина, приготовленного из сухого порошка (Sigma-Aldrich, USA). Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин, центрифугировали при 13 тыс об/мин в течение 10 мин. Далее отбирали 400 мкл супернатанта и добавляли 600 мкл реактива Шейлза, инкубировали 15 мин при 98 °С. После охлаждения измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при λ 400 нм 420 нм. Для построения стандартной кривой использовали стандартный раствор *N*-ацетил- β -D-глюкозаминида (Sigma, USA) (1 мг/мл), реагент Шейлза и Na-фосфатный буфер (Schales, Schales, 1941). Измерение гидролитической активности каждого рекомбинантного белка проводили не менее, чем в трех повторях ($p \leq 0,5$).

Рекомбинантные белки с мутациями получали с помощью ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза с использованием геноспецифичных олигонуклеотидных праймеров с измененными кодонами в местах запланированной замены аминокислотных остатков (табл. 5).

Рекомбинантные диагностические лиганд-связывающие белки, лектины трепанга *A. japonicus* (MBL-AJ), мидии *C. grayanus* (CGL) и порина патогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* (OmpF), получали путем последовательного лигирования ПЦР-продуктов их генов и гена высокоактивной ЩФ семейства PhoA CmAP (табл. 5), клонирования гибридных генов в рекомбинантной плазмиде pET-40b(+) и их экспрессией в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) для синтеза растворимых бифункциональных рекомбинантных белков с активностью ЩФ, которые очищали по описанной выше схеме с применением некоторых модификаций для получения препаратов.

3.7 Исследование свойств рекомбинантных белков

Исследование физико-химических и ферментативных свойств рекомбинантных белков и их гибридных или мутантных аналогов проводили по описанным ранее методикам (Балабанова и др., 2015в; Голотин и др., 2015; Слепченко и др., 2017; Буйновская и др., 2018; Терентьева и др., 2020; Бакунина и др. 2020; Plisova et al., 2005; Balabanova et al., 2010; 2014, 2016, 2018a, 2019; Golotin et al., 2015; Kovalchuk et al., 2015, 2018; Buinovskaya et al., 2018; Bakunina et al., 1998, 2013, 2016; 2018a,б, 2019; Likhatskaya et al., 2018; Noskova et al., 2018, 2019, 2021, 2023; 2025; Utkina et al., 2019, 2021; Seitkalieva et al., 2021; Pentekhina et al., 2023; Adedibu et al., 2024б).

3.7.1 Определение физико-химических и ферментативных свойств

Определение оптимального pH для проявления ферментативной активности изучали в диапазоне pH 3,2–10,0. В экспериментах использовали следующие буферные растворы: 100 мМ

ацетата натрия (рН 3,2–6,2), 100 мМ трис-НСl (рН 6,0–10,0), 100 мМ Na-фосфатный буфер (рН 5,0–10,0). Стабильность при различных значениях рН проверяли, инкубируя фермент в 100 мМ ацетатном буфере при рН 3,0, 3,5 и 4 и в 100 мМ Na-фосфатном буфере при рН 5,6, 7,4, 9,6 и 10,0 в течение 0, 20, 40 и 60 мин, после чего добавляли субстрат и определяли ферментативную активность, как описано выше.

Определение оптимальной ионной силы для проявления активности на активность фермента проводили путем добавления солей NaCl и KCl к стандартной инкубационной смеси в различных концентрациях от 0 до 3 М. Солеустойчивость определяли путем преинкубации раствора фермента в оптимальных условиях с различными концентрациями NaCl от 0 до 3 М в течение 0, 20, 40 и 60 мин, затем измеряли активность фермента, как описано выше.

Влияние температуры на активность фермента определяли путем инкубации стандартной реакционной смеси при температуре от 15 до 65 °С с интервалом 5–10 °С. Температурную стабильность определяли путем предварительной инкубации раствора фермента в оптимальном буфере при различных температурах в течение 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин и последующего добавления субстрата для определения активности фермента стандартным методом, описанным выше.

Влияние ионов металлов, хелатирующих агентов, растворителей и детергентов на ферментативную активность рекомбинантных белков определяли добавлением в стандартную реакционную смесь солей Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Li^{+} в концентрации 2–10 мМ и EGTA (этиленгликоль тетрауксусная кислота), EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), PMSF (фенилметансульфонилфторид), DTT (дителиотреитол), Тритон-X-100, SDS, этанол, изопропанол, глицерин и ацетон в различных концентрациях (2–100 мМ, 1–10 %). Ферментативную активность определяли стандартным методом, в качестве контроля использовали инкубационную смесь, содержащую такое же количество фермента и субстрата без катионов, хелатирующих агентов, растворителей и детергентов.

Субстратную специфичность фермента определяли по относительной скорости гидролиза соответствующих природных и синтетических субстратов в оптимальном буфере: для протеаз - α -бензоил-Arg-*n*-нитроанилид (BAPNA), *N*-сукцинил-L-аланил-L-аланил-L-пролил-L-фенилаланин-*n*-нитроанилид (SAPNA), казеин, бычий сывороточный альбумин (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), мука сои, кукурузы, пшеницы, ржи; для ферментов суперсемейства ЩФ – *n*-НФФ, бис-*n*-НФФ, тимидин-5'-монофосфат-*n*-нитрофенил эфир (5'-*n*-НФФ-ТМФ), *n*-нитрофенил сульфат (*n*-НФС) фосфаты углеводов (α - и β -глицерофосфат) и нуклеиновых кислот (моно-, ди, тринуклеотиды и нуклеозиды, ДНК, РНК), плазмиды, НАДФН (Sigma Aldrich, USA). Относительную ферментативную активность определяли спектрофотометром стандартными

методами, описанными выше, относительно исходного раствора субстрата в том же буфере без добавления фермента.

Кинетические параметры фермента рассчитывали по начальной скорости реакции с использованием диапазона концентраций специфического субстрата с постоянным шагом в оптимальных условиях проведения реакции. Каждую реакцию проводили в течение 5 мин в трех повторностях. Константу Михаэлиса (K_M), максимальную скорость реакции (V_{max}) и число оборота (k_{cat}) определяли путем построения графика Лайнуивера–Берка с помощью программы OriginPro 8.5.

Молекулярную массу рекомбинантного белка определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии натрий додецилсульфата (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) и гель-фильтрации с использованием калиброванной колонки Superdex 200 PG (105×2 см) (Cytiva (GE Healthcare) Life Sciences). Гель-фильтрацию проводили в 50 mM Трис-HCl буфере, pH 8,0, содержащем 0,15 M NaCl со скоростью 0,5 мл/мин. Для калибровки использовали стандартную смесь для гель-фильтрации (Bio-Rad Laboratories, USA), содержащую тиреоглобулин (бычий) 670000 Da, γ -глобулин (бычий) 158000 Da, овальбумин (куриный) 44000 Da, миоглобин (лошадиный) 17000 Da и витамин B12 1350 Da в соответствии с рекомендациями производителя.

3.7.2 Определение лиганд-связывающих свойств

Определение лектинной активности полученных рекомбинантных лектинов проводили методом гемагглютинации крови А (II) положительной группы. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1500 g/мин., отмывали трис-буферным солевым раствором (TBS) 3–5 раз и получали 2-‰ суспензию эритроцитов. В первые лунки круглодонного 96-луночного планшета наносили по 200 мкл образца рекомбинантного лектина, со второго ряда в каждую лунку наносили буфер TBS по 100 мкл во все лунки и титровали образец, в последние лунки наносили контроль (без образца). Далее добавляли во все лунки полученную суспензию эритроцитов по 50 мкл и инкубировали. Через 30 мин визуально оценивали результат, принимая за титр гемагглютинации последнее разведение образца, при котором наблюдалась агглютинация.

Исследование углевод-связывающих свойств рекомбинантного гибридного лектина мидии *C. grayanus* (CGL) проводили методом твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА) с использованием различных концентраций муцина желудка свиньи (porcine stomach mucin, PSM) и онкомаркеров, используемых для диагностики рака ЖКТ (РЭА, СА 19-9, СА 72-4), яичников (СА 125, СА 72-4), предстательной железы (ПСА), печени (АФП) (Хема, Москва), в качестве лигандов. Исследование лиганд-связывающих свойств рекомбинантного гибридного лектина трепанга *A. japonicus* MBL-AJ проводили методом ТЛФА и иммунно-ферментного

анализа (ИФА) с использованием различных концентраций PSM и эмбрионального альфа-1-килового гликопротеина, полученных в Лаборатории неинфекционного иммунитета, ТИБОХ ДВО РАН.

Для сенсibilизации лунок планшета (Nuncstм Maxisorp 96) наносили по 150 мкл раствора лиганда (20 мкг/мл) в буфере 1 (TBS: 0,01 М трис-HCl (pH 9,0), 0,15 М NaCl) и инкубировали в течение 12 ч. при температуре +4 °C. Серийную отмывку планшета (по 10 раз) проводили дистиллированной водой, затем буфером 2 (TBS, 0,05 % Тритон X-100). Для блокировки неспецифических центров связывания в каждую лунку планшета вносили по 300 мкл БСА (1 мг/мл) и инкубировали 1 ч. при 37 °C. Затем проводили еще одну серию отмывок, как описано выше. Далее в первый вертикальный ряд лунок планшета вносили по 300 мкл раствора рекомбинантного гибридного лектина (2–12 мкг/мл) в буфере 2. В остальные лунки вносили раствор рекомбинантного гибридного лектина в серии двукратных разведений в буфере 2. В качестве контроля в последние лунки планшета вносили буферный раствор. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 90 мин., после чего следовала серия отмывок планшета от несвязавшихся белков буфером 2. Далее в лунки вносили по 150 мкл буфера 1 М диэтаноламина (ДЭА), pH 10,3, содержащего 15 мМ *n*-НФФ в качестве субстрата для ЩФ СтАР, входящей в состав гибридного лектина, связавшегося с иммобилизованным на планшете лигандом. Планшет инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 1 М NaOH. Количественный анализ образовавшихся комплексов проводили с помощью спектрофотометра при λ 400 нм методом измерения концентрации хромогенных продуктов реакции (*n*-НФ) и вычисления удельной активности ЩФ, как описано выше.

Специфичность рекомбинантных лектинов в отношении онкомаркеров (простат-специфический антиген (ПСА), раково-эмбриональный антиген (РЭА), альфа-фетопроtein (АФП), онкомаркер рака яичников (СА-125), онкомаркер рака поджелудочной железы (СА-19-9), неспецифический онкомаркер карциномы (СА 72-4) (Хема, Москва), определяли методом ТЛФА (Буйновская, 2023). На 96-луночный микропланшет (Greiner Bio-One, Австрия) адсорбировали по 100 мкл каждого онкомаркера в нескольких разведениях ($n=3$) и инкубировали в течение 16 ч. при 4 °C. Отмывку свободных лигандов и блокировку неспецифических центров связывания белком БСА проводили по методу, приведенному выше. После 10-кратной отмывки БСА промывочным буфером (0,1 мМ трис-HCl (pH 9,0), 0,15 М NaCl, 0,05 % Тритон X-100) и затем тем же буфером без тритона в лунки вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного гибридного лектина (0,5–0,005 мг/мл) с активностью ЩФ СтАР, и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Несвязавшийся рекомбинантный лектин отмывали отмывочным буфером 10 раз по 300 мкл, потом буфером, содержащим 0,1 М трис-HCl (pH 9,0), 0,15 М KCl. Количество

образовавшихся комплексов определяли по активности ЩФ. Для этого в лунки микропланшета добавляли по 100 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис-НCl (pH 9,0), 0,15 М KCl и 2 мМ субстрата ЩФ (*n*-НФФ). После 30 мин инкубации при 37 °С реакцию останавливали добавлением 200 мкл 2 М NaOH. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции *n*-НФ определяли на спектрофотометре (Eppendorf, Germany) при λ 400 нм.

Антигенные свойства рекомбинантного гибридного порина OmpF с активностью ЩФ CmAP определяли методом ИФА с помощью антител к рекомбинантному OmpF-порину, полученных в Лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН (Портнягина и др., 2009). ИФА проводили двумя способами: (1) Лунки микропланшета (Costar, USA) сенсibilизировали мышинной поликлональной специфической сывороткой к рекомбинантному OmpF порину или пуловой сывороткой крови больных псевдотуберкулезом (в разведении 1/800). Планшеты выдерживали в течение ночи при 4 °С, отмывали от несвязавшихся антител, затем в лунки добавляли различные концентрации рекомбинантного гибридного порина (0,625–10 мкг/100 мкл) в буфере 25 мМ трис-НCl, pH 8,5. Инкубацию проводили в течение ночи при 4 °С, затем добавляли раствор субстрата для ЩФ (*n*-НФФ) в концентрации 2 мМ в буфере 0,1 М трис-НCl, 0,2 М KCl (pH 9,5–10,0). Результаты реакции учитывали на спектрофотометре μ Quant BioTek (USA) при λ 405 нм. (2) Лунки микропланшета сенсibilизировали рекомбинантным гибридным белком OmpF в количестве 5 мкг/100 мкл, выдерживали в течение ночи при 4 °С, планшет отмывали от свободного рекомбинантного гибридного порина и добавляли мышинные поликлональные специфические антитела к рекомбинантному OmpF порину или сыворотки крови больных псевдотуберкулезом в серии двойных разведений. Инкубацию проводили в течение ночи при 4 °С, затем добавляли 2 мМ *n*-НФФ, 0,1 М трис-НCl, 0,2 М KCl (pH 9,5–10,0). Результаты ферментативной реакции учитывали на спектрофотометре μ Quant BioTek (США) по образовавшемуся *n*-НФ при λ 405 нм. Количество связавшихся комплексов оценивали по удельной активности ЩФ.

3.7.3 Гомологичное моделирование 3D-структуры и молекулярный докинг

Трехмерные структуры белков и лигандов моделировали и оптимизировали с помощью программы молекулярного моделирования Molecular Operating Environment (MOE) версии 2020.09, разработанной компанией Chemical Computing Group Inc. (1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2020) (Labute, 2008). Гомологическая модель ЩФ CmAP из морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (UniProt ID: Q1W622) была построена на основе кристаллических структур высокого разрешения ($\approx 1,4$ Å) ЩФ *V. splendidus* (VAP) с сокристаллизованными ингибирующими лигандами, сульфатом (PDB: 3E2D) и циклогексиламином (PDB: 6T26) соответственно (Helland et al., 2009; Ásgeirsson et al., 2020).

Модель 3D-структуры кишечной ЩФ человека IAP (Uniprot: P09923) была получена с сервера Swiss-Model с использованием кристаллической структуры плацентарной ЩФ человека PLAP (PDB: 3mk1) в качестве прототипа (Du et al., 2001). Молекулярный докинг проводили с помощью модуля Dock программы MOE. Докинг проводили для сайтов активного центра ЩФ СмАР, тканевой неспецифической ЩФ человека TNAP (PDB: 7yiv) и IAP с использованием функции Score London dG, при этом первоначально генерировали 30 позиций, которые затем уточняли в радиусе 4,5 Å от размещенного лиганда с помощью функции GBVI/WSA dG (Corbeil et al., 2012). Анализ контактов в комплексах проводили с помощью модуля Ligand Interaction программы MOE.

Модель пространственной структуры лектина мидии CGL была построена на основе кристаллической структуры лектина моллюска MytiLec (PDB: 3WMV) (Kovalchuk et al., 2013, 2015; Terada et al., 2016). Анализ контактов, мутагенез *in silico*, молекулярный докинг и визуализацию результатов проводили с помощью модулей Ligand Interaction и Dock-программы MOE 2018.01 (Molecular Operating Environment (MOE), 2018.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.) с использованием кристаллических структур следующих лигандов: галактоза (PDB: 5F8W), галактозамин (PDB: 5F8Y), глоботриоза Gb3 (PDB: 5F90), детерминанта гистогруппы A GalNAc α 1-3Gal [Fuc α 1-2] (PDB: 2WMI), идентичную трисахариду муцина желудка свиньи (PSM) (Tian et al., 2008). Энергия связи лиганда (обобщенная энергия борновского взаимодействия молекулярной механики) представляла собой несвязанную энергию взаимодействия между рецептором и лигандом и включала энергии Ван-дер-Ваальса, Кулона и обобщенную борновскую неявную энергию взаимодействия с растворителем (Labute, 2008). Изменение энергии связывания мутантного белка (mut) с лигандом по сравнению с энергией связывания дикого типа белка (wt) с лигандом рассчитывали как $\Delta E = E_{mut} - E_{wt}$.

Для гомологичного моделирования 3D-структуры лектина трепанга MBL-AJ использовали кристаллическую структуру лектина С-типа CEL-IV из голотурии *Cucumaria echinata*, полученную с разрешением 1,65 Å (PDB: 3ALU). Структура лиганда MBL-AJ, разветвленного маннана α -D-Manp-(1→6)-[α -D-Manp-(1→2)- α -D-Manp-(1→2)]- α -D-Manp(1→6)-D-Manp, была построена и оптимизирована с помощью MOE. Одиночные и двойные мутанты лектина MBL-AJ были сгенерированы *in silico* путем молекулярного докинга и расчета энергии связывания (Labute, 2008) лектина с наибольшим родством к разветвленному маннану. Аффинность (расчетное родство) представляла собой скоринговую функцию GBVI/WSA dG, представленную в ккал/моль (Labute, 2008). Модели структур гибридных белков получали путем добавления последовательности линкера (G₄S)₃ к С-концу СмАР и связывания с N-концом лектинов с помощью программы MOE.

3.7.4 Структурно-функциональные исследования рекомбинантных белков

Функционально значимые аминокислотные остатки в активном центре ферментов и лиганд-связывающих белков (в рекомбинантных гибридных диагностических белках) определяли методом компьютерного моделирования и молекулярного докинга с использованием пакета программ MOE 2018.01 (Molecular Operating Environment (MOE), 2018.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018) по расчетной энергии их связывания с субстратами и лигандами, а также с другими остатками активного центра, участвующих в образовании ионных связей или в общей сети водородных связей в молекуле белка и/или в его комплексах с субстратом или лигандом (Golotin et al., 2015; Kovalchuk et al., 2015, 2018; Likhatskaya et al., 2018). Результаты использовали для проведения ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза, как описано выше (табл. 5), для выявления зависимости ферментативной или лиганд-связывающей активности от структуры активного центра фермента или белка соответственно. Для ЩФ CmAP (WP_245163010) аминокислотные остатки Asp12, Asp64, Asp443, Thr118, Glu268, Asp315, Trp274, His316 и Asp273 заменяли на Gly для разрыва предсказанных водородных связей (Golotin et al., 2015). Для диагностического лектина мидии CGL в составе гибридного белка со ЩФ CmAP проводили последовательный аланиновый мутагенез остатков трименого активного центра H16/P17/G19, H64/P65/G67, H108/P109/G111 (тройная мутация трех консервативных повторов), Asn27, His37, Glu75, His85, Asn119, Asp127, His129 (одиночные мутации в окружении активного центра) для разрыва предсказанных водородных связей (Kovalchuk et al., 2018). Для увеличения лиганд-связывающей активности диагностического лектина трепанга MBL-AJ вводили точечные аминокислотные замены W100A Q103H, A156N, F159K и A156N/F159K с пониженной расчетной энергией связывания согласно результатам молекулярного докинга с маннаном (Balabanova et al., 2014).

3.8 Исследование свойств щелочной фосфатазы CmAP семейства PhoA

3.8.1 Получение и очистка рекомбинантной ЩФ CmAP из клеток *E. coli*

Для синтеза ЩФ морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (CmAP) в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) использовали плазмиду pET-40b(+) (Novagen, США) (рис. 44). Рекомбинантная плазида 40Ph включает NcoI/SacI-фрагмент плазмиды pET-40b(+) (Novagen, США) (рис. 44) и последовательность гена размером 1530 bp (п.н.), кодирующего с 33 по 535 аминокислотный остаток предшественника белка ЩФ CmAP (UniProt ID: Q1W622), согласно результатам анализа его сигнальной последовательности программой SignalP в базе данных UniProt.

Последовательность синтезируемого рекомбинантного белка адаптирована по N-концу для пост-трансляционной модификации периплазматической сигнальной пептидазой *E. coli* в

бактериальной системе экспрессии рЕТ (Балабанова, Рассказов, 2010). Кроме того, экспрессия целевого белка в плазмиде рЕТ-40b(+) осуществляется в составе гибридного белка с фрагментом периплазматической оксидоредуктазы DsbC из суперсемейства тиоредоксинов, обладающей свойствами шаперона, который потом может подвергаться специфическому ферментативному гидролизу по специфическому сайту энтерокиназы (рис. 44).

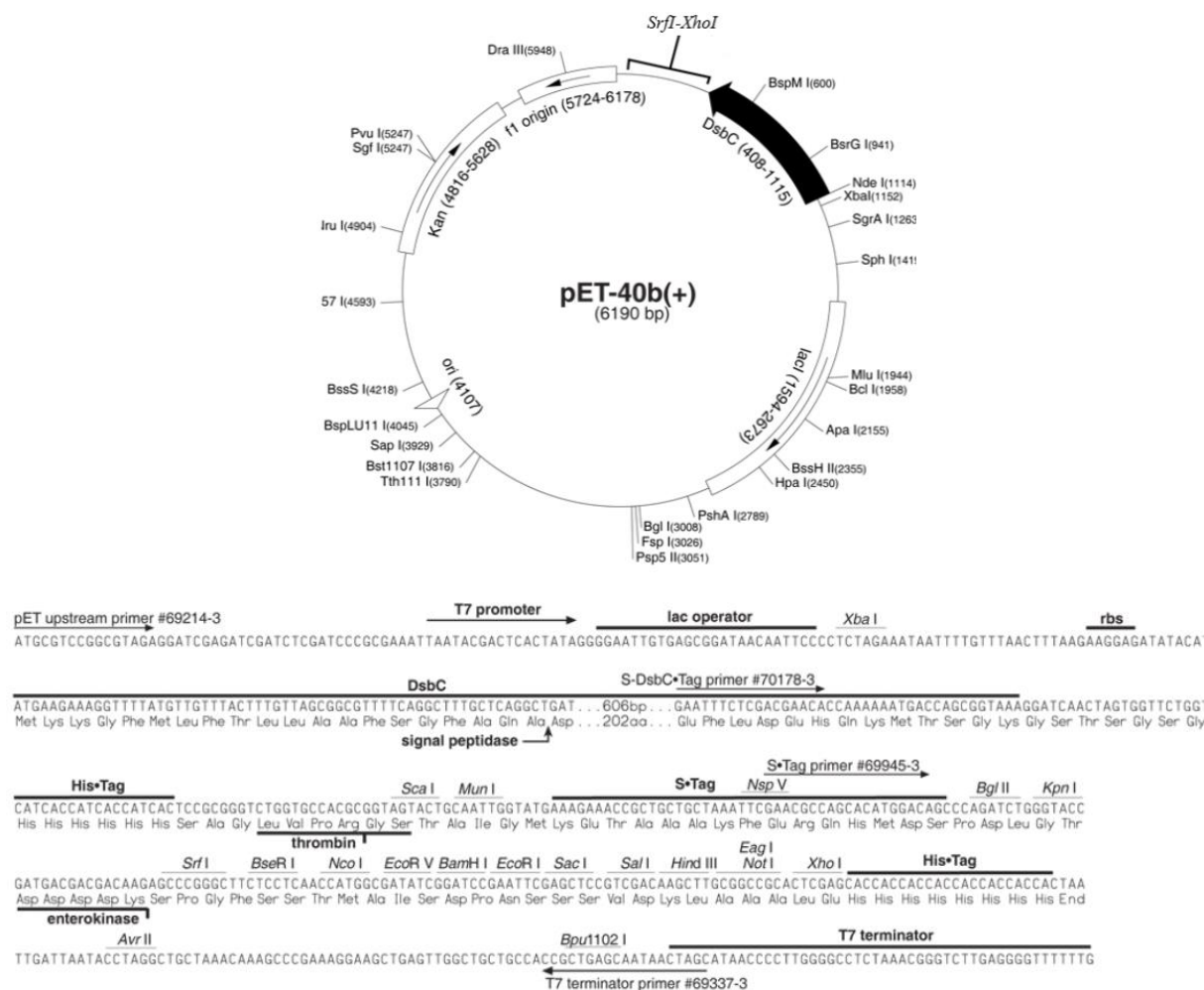


Рисунок 44 – Схема генетической конструкции на основе плазмиды рЕТ-40b(+) (Novagen, США) для экспрессии CDS ЩФ PhoA *C. amphilecti* КММ 296 (СтАР) в клетках *E. coli*. Размер плазмиды и координаты генетических элементов указаны в парах оснований (bp): промотор *T7* (1187–1203), начало транскрипции *T7* (1186), кодирующая последовательность шаперона *DsbC_His*Tag*TM (408–1115) (сайт энтерокиназы выделен скобой), *His*Tag* (369–386), сайты рестрикции для лигирования (*SrfI-XhoI*) (174–250), *His*Tag* (150–173), терминатор *T7* (26–72), *lacI* (1594–2673), точка репликации *ori* плазмиды рBR322 (4107), CDS белка устойчивости к канамицину *Kan* (4816–5628), фаговый *f1 ori* (5724–6178). Лигирование кодирующей последовательности ЩФ СтАР (1530 bp) происходит между сайтами рестрикции *NcoI* и *SacI*. Праймеры для ПЦР-скрининга целевой последовательности указаны стрелками (primer)

Из клонов клеток *E. coli* Rosetta (DE3), трансформированных рекомбинантной плазмидой, (40Ph) выбирали наиболее продуктивные по выходу и ферментативной активности ЩФ, как

описано в главе 2.6., и получали исследовательские банки клеток (ИБК). ИБК представляет собой небольшое количество аликвот (10 пробирок) из единого пула клеток, выросших из единичной колонии, содержащих 15 % глицерина, и замороженных для длительного хранения на -71°C . Все дальнейшие работы с культурами клеток проводились с использованием ИБК.

Для препаративного получения растворимого рекомбинантного белка ЩФ CmAP индукцию экспрессии (2 мМ ИПТГ) проводили в 1 л культуры рекомбинантной *E. coli* Rosetta (DE3), трансформированной плазмидой 40Ph, как описано в главе 2.6. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин, ресуспандировали в 250 мл буфера А, содержащего 20 мМ Трис-НCl (pH 9,0), 5 мМ имидазола, 0,5 М NaCl, 20 % глицерин (Sigma-Aldrich, USA), обрабатывали ультразвуком на ледяной бане до осветления лизата и центрифугировали при 11000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант насыщали сухим сульфатом аммония до 30% и доводили концентрацию NaCl до 0,5 М. Осадок удаляли центрифугированием (11000 об/мин, 4°C , 15 мин). Супернатант собирали, донасыщали сульфатом аммония до 70 % в течение 1 ч для преципитации рекомбинантного белка. Осадок центрифугировали в течение 15 мин при 11000 об/мин при комнатной температуре и ресуспандировали в буфере А. Результирующий супернатант наносили на металлоафинный сорбент (Ni^{2+} -IMAC-Sepharose, V колонки = 160 мл, GE Healthcare), уравновешенный в буфере А. Колонку промывали буфером А, после чего рекомбинантный белок элюировали линейным градиентом 0,005–0,5 М имидазола в буфере А. Элюат диализировали в течение 12 ч против буфера А, содержащего 50 % глицерина (Sigma-Aldrich, USA). Гистидиновый таг (His-tag) рекомбинантного белка (рис. 44) удаляли в течение 12 ч инкубации с энтеропептидазой L-NEP 1–2 ЕД на 1 мг рекомбинантного белка при равномерном перемешивании. После этого, рекомбинантный белок пропускали через металлоафинный сорбент и очищенный от гистидиновых тагов белок концентрировали на ионнообменном сорбенте Sours 15 Q (V колонки = 8 мл, GE Healthcare) со скоростью 5 мл/мин. Элюцию проводили градиентом 0,15–1,0 М NaCl в буфере А при скорости 2 мл/мин. Степень очистки рекомбинантного белка определяли по удельной активности (у.а.) с использованием *p*-НФФ в качестве субстрата и методом ДСН-ПААГ электрофореза (Laemmli, 1970).

Для препаративного получения рекомбинантного белка ЩФ CmAP в тельцах включения в 15 мл среды LB, содержащей 0,5 % глюкозы и 50 мг/мл канамицина, добавляли 15 мкл глицеринового стока (ИБК) и инкубировали в течение 18 ч в термошейкер-инкубаторе при 37°C , 190 об/мин. Затем инокулят (2,5 %) помещали в 500 мл жидкой среды LB, содержащей 0,5 % глюкозы и 50 мг/мл канамицина, инкубировали при 37°C на термошейкер-инкубаторе при 220 об/мин до оптической плотности 0,6–0,8 при λ 600 нм. После этого добавляли 0,5 мМ ИПТГ для индукции экспрессии рекомбинантного белка и продолжали инкубацию при 37°C в течение 4 ч при 220 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин при 8

°C, суспендировали в 17,5 мл 25 мМ трис-HCl-буфера (pH 8,0) и подвергали ультразвуковой обработке с частотой 22 кГц и 0–4 °C с интервалом 30 сек до осветления суспензии. Суспензию центрифугировали при 11000 об/мин в течение 30 мин при 8 °C, в полученном супернатанте проверяли ферментативную активность. Для проведения качественной реакции к 45 мкл клеточного лизата добавляли 5 мкл субстрата – 2 мМ *n*-НФФ в 0,1 М трис-HCl (pH 10,0), 0,2 М KCl и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Для выделения рекомбинантного белка 10 г биомассы *E. coli* дезинтегрировали ультразвуком в 100 мл 50 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, (5 циклов по 25 раз с амплитудой 4 при температуре 6 °C, перерыв 5 мин), центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин при температуре 4 °C. Осветлённый клеточный дезинтегрat отбрасывали, из осадка, содержащего целевой белок, экстрагировали рекомбинантный белок буфером, содержащим 50 мМ трис-HCl, pH 10, 8 М мочевины в соотношении 1:10 при комнатной температуре в течении 60 мин на магнитной мешалке. Далее экстракт центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин при 15 °C. Ренатурацию рекомбинантного белка проводили в течение 18 ч при 5 °C в буфере 50 мМ трис-HCl, pH 10, 8 М мочевины и 20 % глицерина в соотношении 1:20. В ренатурат добавляли энропептидазу L-NEP в соотношении фермент/субстрат 1/15000, смесь инкубировали 18 ч при 5 °C и подвергали хроматографической очистке на аффинном сорбенте с Ni-IMAC Sepfast ($V_{\text{сорб}} = 5$ мл). После нанесения на уравновешенную колонку и промывки буфером А (50 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, pH 8,0) проводили элюцию буфером В (50 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазола, pH 8,0) со скоростью 3 мл/мин. Далее целевую фракцию разводили в 2 раза 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, наносили на уравновешенную буфером для разведения (50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 3 мл/мин) колонку с ионно-обменной смолой Q-SepharoseFF ($V_{\text{сорб.}} = 5$ мл) и элюировали в буфере 50 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, pH 8,0. Концентрирование белка проводили с помощью центрифугирования на ячейке для ультрафильтрации 30 кДа (Amicon Ultra). Степень очистки рекомбинантного белка определяли по удельной активности (у.а.) с использованием *n*-НФФ в качестве субстрата ЩФ и методом ДСН-ПААГ электрофореза (Laemmli, 1970).

Для удаления ЛПС бактериального продуцента препарат белка CmAP наносили на колонку емкостью 0,5 мл (Thermo Scientific™ Pierce™) и очищали по инструкции производителя. Отсутствие ЛПС *E. coli* в конечном препарате CmAP проверяли с помощью хромогенного набора для количественного определения эндотоксина (Thermo Scientific™ Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quant Kit) в соответствии с инструкциями производителя.

3.8.2 Определение ЛПС-дефосфорилирующей активности ЩФ CmAP

Для определения дефосфорилирующей активности ЩФ CmAP использовали ЛПС *E. coli* 0:55 (Sigma-Aldrich, США). Готовили раствор ЛПС с концентрацией 0,2 мг/мл в 0,1 М трис-HCl

буфере, рН 7,7, содержащем 0,1 М КСl, следующими способами: 1) инкубировали ЛПС при 24 °С в течение 12 ч (образец 1), 2) инкубировали ЛПС при 37 °С в течение 12 ч (образец 2), 3) инкубировали ЛПС при 24 °С в течение 12 ч в том же буфере с добавлением триэтиламина (ТЭА), рН 10,0 (образец 3). Для ферментативного гидролиза образцов ЛПС использовали препарат очищенного белка 0,3 мг/мл (у.а. $\approx$ 2000 ед/мг) в отношении субстрата *n*-НФФ.

ЛПС-дефосфорилирующую активность определяли методом количественного анализа фосфора в ЛПС до и после инкубирования с ферментом, проведенного следующим образом. Аликвоты фермента в нескольких концентрациях (0,0003–0,024 мг/мл), полученных путем разведения белкового препарата в буфере 1 М ДЭА, рН 10,3, и различные образцы ЛПС (1–3) смешивали в стеклянных виалах с крышками (общий объем 1 мл) и инкубировали при 37 °С при перемешивании в течение 30 мин, 2 ч, 6 ч и 12 ч. После окончания реакции образцы переносили в диализные трубки (с размером пор 3000 Да) и диализовали против дистиллированной воды в течение 2 сут в холодной комнате для удаления свободного фосфора. Для количественного определения фосфора использовали молибдатный реагент (Vaskovsky et. al, 1975), приготовленный из рабочего раствора: к 5,5 мл исходного реактива добавляли 26 мл 1 Н серной кислоты и доводили объем дистиллированной водой до 100 мл. Реактив сохраняет свои свойства при хранении в темной стеклянной посуде при комнатной температуре в течение одной недели. Аликвоту раствора ЛПС отбирали в пробирку и упаривали досуха в термошкафу при 100 °С. К сухому остатку добавляли 0,05 мл 72 % (или 0,07 % мл 57 %) хлорной кислоты и сжигали в дюралевом блоке при 180–200 °С в течение 20 мин. После охлаждения в пробирку добавляли 0,45 мл молибдатного реагента, тщательно перемешивали вортексом, пробирки помещали в кипящую водяную баню на 15 мин. После образования фосформолибденовой сини пробирки охлаждали и измеряли оптическую плотность образцов в кварцевой кювете ($l = 1$ см) при λ 815 нм на спектрофотометре Specol (Carl Zeiss, Германия). Эксперимент с каждым образцом проводили в трех повторностях. В качестве контроля использовали буфер без ЛПС с той же концентрацией фермента. Поглощение контрольного образца не превышало 0,04–0,05 единиц оптической плотности. Калибровочную кривую для определения фосфора получали с использованием водного раствора $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (AppliChem, Германия) с известной концентрацией (0,03–0,3 мкг/мл).

3.8.3 Определение антибиопленочной активности ЩФ *SmAR* и других рекомбинантных ферментов морских бактерий

Изоляты бактерий *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* выделяли из замороженных пищевых полуфабрикатов (срок хранения 3 мес, -18 °С) и проводили видовую идентификацию стандартными микробиологическими методами (Подволоцкая и др., 2015, 2016; Balabanova 2016, 2017). Штаммы культивировали на

видоспецифических питательных средах в соответствии с руководством аккредитованной лаборатории (ISO/IEC 17025). Колонии чистой культуры каждого бактериального изолята суспендировали в 0,9 % NaCl до достижения стандарта мутности по МакФарланду 0,5 единиц ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) – оптическая плотность в кварцевой кювете ($l = 1$ см) при λ 625 нм (OD_{625}). Суспензии клеток разной плотности (1×10^2 , 10^3 , 10^4 КОЕ/мл) готовили путем серийного десятикратного разведения 200 мкл инокулята (1×10^8 КОЕ/мл) и наносили на тест-пластину 3М™ Petrifilm™ (США) для экспресс-определения колиформных и других специфических видов бактерий. Образование колоний оценивали через 24 ч. Для экспериментов были отобраны штаммы с высокими адгезивными и биопленкообразующими свойствами.

Для формирования биопленки 150 мкл ночной культуры, выращенной в триптическом соевом бульоне (TSB, Merc) с плотностью 1×10^8 КОЕ/мл, помещали в лунку 24-луночного планшета (Cellstar, Greiner Bio-One), содержащую 150 мкл 1%-го пептона, и инкубировали без шейкера при $+ 18$ °C в течение 5 дней.

Для анализа антибиопленочной активности применяли метод, основанный на окрашивании биопленок кристалл виолетом (CV) (O'Toole, 2011), что позволяет быстро определять количество образованных микроорганизмами биопленок в разных условиях культивирования, а также исследовать влияние на этот процесс различных агентов (Nijland et al., 2010). Изучали действие разных концентраций ферментов из морских бактерий: α -галактозидазы (КФ 3.2.1.22) *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 (Балабанова и др. 2012; Терентьева и др., 2020; Balabanova et al., 2010, 2020; Bakunina et al., 2018a), ЦФ PhoD (КФ 3.1.4.1) *C. amphilecti* KMM 296 (Balabanova et al., 2017; Noskova et al., 2019), ЦФ PhoA (КФ 3.1.3.1) *C. amphilecti* KMM 296 (Балабанова, Рассказов, 2010; Терентьева и др., 2020; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015), ДНКазы CmEER (КФ 3.1.21.1) и нуклеазы S1-типа и CmNUC (EC 3.1.30.1) морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (Balabanova et al., 2017). Все эксперименты проводили в 4–8 повторностях. Контролем служила среда с микроорганизмами без добавления ферментов.

Для определения влияния фермента на формирование биопленок 300 мкл суспензии планктонных клеток каждого штамма вносили в стерильные 24-луночные планшеты (Cellstar, Greiner Bio-One) в концентрациях 1×10^2 , 10^3 и 10^4 КОЕ/мл и инкубировали с растворами ферментов (1:1 v) в течение 1–12 ч при температуре 2, 4, 18 и 22 °C. Затем в каждую лунку добавляли по 600 мкл 0,5 % водного раствора CV для инкубации при комнатной температуре в течение 15 мин. После этого планшеты промывали 3–4 раза стерильной дистиллированной водой для удаления остатков красителя и высушивали на воздухе. Затем в каждую лунку добавляли по 600 мкл 96%-ного этанола, содержащего 2 % уксусной кислоты, и переносили в 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One) для измерения OD_{600} с помощью автоматического планшетного ридера (BioRad).

Влияние исследуемых ферментов на биопленки *B. subtilis* и штаммов морских бактерий *Bacillus licheniformis*, *Bacillus aegricola*, *Bacillus berkelegi* из коллекции ФГБУН ТИБОХ ДВО РАН и клинического штамма *Y. pseudotuberculosis* 512pYV+ из коллекции ФГБУ НИИЭМ определяли в течение трех суток по методике O'Toole et al. (2011) (Терентьева и др., 2015, 2020).

Для экспериментов по совместному культивированию использовали штамм *C. amphilecti* КММ 296 и четырнадцать штаммов *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, выделенных из замороженных пищевых полуфабрикатов (Подволоцкая и др., 2015, 2016; Balabanova et al., 2016). Колонии чистой культуры каждого бактериального штамма суспендировали в 0,9 % NaCl до достижения мутности по МакФарланду 0,5 (1×10^8 КОЕ/мл). После этого 2 мл бактериальной культуры и 2 мл суспензии *C. amphilecti* КММ 296 одновременно инокулировали в 16 мл питательной среды, содержащей (г/л): бактопептон – 2,0 г, гидролизванный казеин – 2,0 г, экстракт бакто-дрожжевой – 2,0 г, декстрин – 1,0 г, K_2HPO_4 – 0,02 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 г, агар – 15 г, натуральная морская вода – 500 мл, дистиллированная вода – 500 мл, pH – 7,0. Штаммы, культивируемые отдельно в тех же условиях, служили в качестве контроля. Инкубацию проводили на качалке при 200 об/мин в течение 48, 72 и 96 ч при температуре 28 °C, после чего подсчитывали количество клеток с использованием теста 3М Petrifilm™ (США), как описано выше. Для подсчета количества клеток *C. amphilecti* КММ 296 по 10 мкл из каждого разведения суспензии клеток *C. amphilecti* КММ 296 наносили на морской агар. Образование колоний оценивали через 24 ч. Каждое измерение проводили в четырех повторях.

Для определения влияния метаболитов *C. amphilecti* КММ 296 на рост бактериального изолята культуру КММ 296 (как отдельно, так и совместно культивируемую) центрифугировали при 2000 об/мин при 8 °C и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат КММ 296 (0,5 мл) загружали в лунку диаметром 0,9 см в середине чашки с колумбийским агаром Мюллера-Хинтона (Himedia, Индия) после распределения 2 мл суспензии бактериального изолята по поверхности чашки. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 24 ч, затем при 25 °C в течение четырех суток.

Результаты наблюдали через 24, 48 и 96 ч культивирования. Данные анализировали с помощью *t*-теста в программе SigmaPlot 2000 версии 6.0 (SPSS Inc.). Все эксперименты проводили как минимум с тремя независимыми биологическими повторностями. Статистическая значимость была установлена на уровне $p \leq 0,05$.

3.8.4 Сканирующая электронная микроскопия биопленок

Для изучения влияния рекомбинантных ферментов морских бактерий на зрелые биопленки пленкообразующих штаммов, указанных в предыдущей главе, использовали

сканирующий электронный микроскоп (СЭМ). 3 мл суспензии 3-ех дневной культуры (1×10^8 КОЕ/мл), выращенной как описано выше, наносили на поверхность пластины с агаром Мюллера-Хинтона (Himedia), инкубировали при 37 °С в течение 12 ч, а затем в течение 10 дней при 25 °С до созревания биопленок. После этого на биопленки наносили 30 мкл растворов ферментов различной концентрации и инкубировали при комнатной температуре в течение 12 ч. Для подготовки образцов к сканирующей электронной микроскопии кусочки агара с бактериальными биопленками фиксировали 2,5 % глутаральдегида в 0,1 М какодиловом буфере (pH 7,2) в течение 24 ч. Затем промывали в том же буфере в течение 24 ч, фиксировали 0,5 % OsO₄ в дистиллированной воде в течение 20 мин и промывали пять раз в дистиллированной воде в течение 5 ч. Образцы обезвоживали градуированной серией этанола и помещали в ацетон. После этого образцы высушивали в критической точке в течение 2 ч, прикрепляли к шлейфам СЭМ с помощью двусторонней проводящей ленты и наносили напыление хрома толщиной около 10–15 нм (Q150 TES, Quorum Technologies). Образцы исследовали на микроскопе Evo 40 (Carl Zeiss). Ускоряющее напряжение составляло 29 кВ.

3.8.5 Определение цитотоксической активности ЩФ СтАР

Для определения цитотоксической активности ЩФ СтАР использовали стандартный MTS-метод, основанный на способности живых клеток перерабатывать MTS-реагент 5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4,5-диметилтиазолил)-3-(4-сульфофенил) тетразолий (λ_{max} 382 нм) в формазан (λ_{max} 492 нм) (Barltrop et al., 1991). Клетки (6×10^3 КОЕ в 100 мкл) помещали в лунку планшета и инкубировали в течение ночи в соответствующей клеточной среде. Далее клеточную среду заменяли на свежую (100 мкл), содержащую различное количество единиц активности (2,3, 1,15, 0,15, 0,023, 0,0046 Ед) рекомбинантного белка, затем клетки инкубировали в течение 24–48 ч. В контрольные лунки добавляли 5 мкл буфера 0,25 М трис-HCl, pH 8,5. После этого 20 мкл MTS-реагента добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч. Количество образующегося формазана, соответствующее количеству живых клеток, определяли спектрофотометром μ Quant BioTek (США) при λ 492 и 690 нм (фон). Для вычисления количества живых клеток, оставшихся в экспериментальных лунках, использовали отношение интенсивности поглощения в экспериментальных лунках к аналогичным показателям в контрольных лунках, выраженное в процентах. Цитотоксическую активность представляли, как количество единиц активности фермента, ингибирующего 50 % жизнеспособных клеток (half-maximal inhibition concentration, IC₅₀).

3.8.6 Ингибиторный анализ ЩФ СтАР

Ингибиторный анализ проводили *in silico* и кинетическими методами с использованием 5-азаиндолов из морской губки *Guitarra fimbriata* на основании результатов скрининга

ингибиторной активности природных соединений в отношении ЩФ CmAP (Guzii et al., 2019). Кинетические исследования проводили в сравнении с ЩФ кишечника теленка (CIAP, Invitrogen™ 18009019, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). В реакционную смесь объемом 500 мкл добавляли 5 мкл фермента, 20 мкл ингибитора различной концентрации (0–0,4 мкМ) и 470 мкл буфера, содержащем 0,1 М трис-HCl (pH 10,0), 0,2 KCl, инкубировали в течение 60 мин, после чего инициировали ферментативную реакцию добавлением 5 мкл субстрата *p*-НФФ. Активность ЩФ определяли стандартным методом, описанным выше. Преператы ферментов CmAP (3,22 мг/мл, 2929 Ед/мг) и CIAP (0,99 мг/мл, 647 Ед/мг) разводили буфером 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), содержащим 2 мМ MgCl₂. Результаты представляли в виде процента ингибирования по отношению к контрольной активности (без ингибитора). IC₅₀ для каждого тестируемого соединения определяли как концентрацию соединения, которая подавляла активность фермента на 50 %. Значения IC₅₀ приведены как среднее значение из трех экспериментов ± стандартное отклонение.

Для выяснения типа ингибирования K_M определяли в присутствии наиболее сильных ингибиторов, гитаррина С (52,0 мкМ) и гитаррина D (96,0 мкМ), после предварительного инкубирования с ферментом в течение 60 мин при комнатной температуре (23 °C). Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле: $K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_M)$, где IC₅₀ - функциональная активность ингибитора, [S] - концентрация субстрата в реакционной среде, K_M - константа Михаэлиса (Yung-Chi, Prusoff, 1973). Результаты визуализировали в программе Origin 7.0. Кинетические параметры K_M и V_{max} в присутствии ингибиторов для CmAP и CIAP представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Трехмерные структуры гитарринов С и D были построены и оптимизированы с помощью программы молекулярного моделирования MOE, версия 2020.09 (1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2020) (Labute, 2008). Гомологичная модель ЩФ CmAP морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 построена на основе высококачественных кристаллических структур (1,4 Å) ЩФ *V. splendidus* (VAP) (PDB: 3E2D; 6T26) с сокристаллизованными ингибирующими лигандами сульфатом и циклогексиламином соответственно (Helland et al., 2009; Golotin et al., 2015; Ásgeirsson et al., 2020; Nedashkovskaya et al., 2024). Гомологичная модель кишечной ЩФ IAP (Uniprot ID: P09923) получена с сервера Swiss-Model (Bienert et al., 2017; Waterhouse et al., 2018) с использованием кристаллической структуры плацентарной ЩФ PLAP (PDB ID: 3mk1) в качестве прототипа. Молекулярный докинг проводили с помощью модуля Dock программы MOE. Докинг проводили для активных сайтов ЩФ CmAP, тканевой неспецифической ЩФ TNAP (PDB: 7yiv) (Yu et al., 2023) и кишечной ЩФ IAP с использованием функции Score London dG, при этом первоначально генерировалось 30 позиций, которые затем уточнялись в пределах 4,5 Å от размещенного лиганда с помощью

функции GBVI/WSA dG (Corbeil et al., 2012). Анализ контактов лигандов в комплексах проводили с помощью модуля Ligand Interaction программы MOE.

3.8.7 Определение противовоспалительной активности ЩФ СмАР

Определение наличия противовоспалительного действия ЩФ СмАР проводили с использованием модели хронического язвенного колита при многократном внутрижелудочном введении мышам для оценки перспективности применения бактериального фермента в фармакотерапии патологий, сопровождающихся гиперпроницаемостью кишечника. В качестве контроля использовали рекомбинантный аналог кишечной ЩФ человека (hrecAP), полученную в испытательном центре «ИФАР», с доказанным противовоспалительным действием (Шмыкова и др., 2019). Исследование проводили с использованием самцов СПФ (англ. specified pathogen free, SPF) мышей стока CD-1 (табл. 6) согласно Федеральному закону от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Бунатян, Васильев, 2012).

Таблица 6 – Животные в экспериментальном ДСН-индуцированном колите

Вид	<i>Mus musculus</i> (мышь домовая)
Сток	CD-1
Пол и количество животных	20 ♂
Статус здоровья	СПФ
Возраст к началу исследования	9 недель
Масса животных к началу исследования	От 33,6 до 39,9 г

Содержание и уход за животными, контроль параметров микроклимата, микробиологические и физико-химические испытания корма и воды, адаптацию животных осуществляли согласно инструкциям и стандартным операционным процедурам (СОП). Животных распределяли по группам случайным образом так, чтобы разброс по исходной массе не превышал $\pm 10\%$ от ее среднего значения. Рандомизацию проводили с использованием стандартного генератора псевдослучайных чисел (программа анализа данных AtteStat 12.0.5). Критерий рандомизации – масса тела. После индукции язвенного колита животных повторно взвешивали и формировали две опытные и одну контрольную (К) группы самцов мышей линии CD-1 (n= 10/группа). Использовали метод групповой и индивидуальной идентификации согласно СОП. Каждую группу содержали в отдельной клетке.

Язвенный колит индуцировали введением 3%-го раствора додецил сульфата натрия (ДСН) вместо питьевой воды: 5 дней – ДСН, 5 дней – питьевая вода, 5 дней – ДСН (Чулкина и др., 2019; Randhawa et al., 2014). 3%-ый раствор ДСН готовили в пропорции 3 г ДСН: 97 мл воды питьевой.

Раствор меняли каждые 2–3 дня. Группа интактных мышей употребляла питьевую воду на протяжении всего эксперимента.

Терапию проводили сразу после индукции язвенного колита: мыши контрольной группы (К) ежедневно в течение 7 дней получали пустые кишечнорастворимые альгинатные капсулы, мыши опытной группы получали инкапсулированную ЩФ в дозе 100 Ед (табл. 7) согласно результатам предыдущих исследований (Шмыкова и др., 2019; Tuin et al., 2009).

Таблица 7 – Характеристика тестируемых препаратов для лечения колита

Индикатор	С _т АР/hrecAP, кишечнорастворимые микрокапсулы	Плацебо ЩФ, кишечнорастворимые микрокапсулы
Код	С _т АР/hrecAP	Alg
Состав на 1 капсулу	С _т АР/hrecAP – 100 U (Ед) Диэтиламин – 5,270 мг Натрия альгинат – 0,666 мг Натрий азид – 0,0475 мг Магния хлорид – 0,0002 мг	Диэтиламин – 5,270 мг Натрия альгинат – 0,666 мг Натрий азид – 0,0475 мг Магния хлорид – 0,0002 мг
Описание внешнего вида	Микрокапсулы белого цвета, без запаха	Микрокапсулы белого цвета, без запаха
Микробиологическая характеристика	Нестерильный	Нестерильный

Микрокапсулу с ЩФ (С_тАР или hrecAP) помещали животному на корень языка пинцетом, после чего оральной дозирующей иглой (зондом) проталкивали в пищевод и далее в желудок.

Выявление смертности, общего состояния здоровья и признаков токсичности проводили согласно СОП ежедневно. Клинический осмотр проводили согласно СОП с отметками в индивидуальных картах животных. Эвтаназировали животных методом цервикальной дислокации согласно СОП.

Гематологические исследования проводили с помощью автоматического гематологического анализатора (Abacus Junior Vet, Австрия) согласно СОП: после декапитации у мышей забирали кровь (0,3 мл) самотеком в пробирки с антикоагулянтом согласно СОП и анализировали следующие показатели: общее количество и относительное содержание лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, гранулоцитов, общее количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, тромбоциты, средний объем тромбоцитов (Абрашова, 2013). Анализ количества иммунокомпетентных клеток позволяет оценить наличие и протекание системного иммунного ответа на индукцию язвенного колита, а показатели количества эритроцитов и тромбоцитов необходимы для контроля анемии

(Okba et al., 2019). Все показатели входят в стандартный перечень диагностических критериев язвенного колита (Ивашкин и др., 2017).

Патоморфологические исследования проводили согласно СОП. Для исследования состояния прямой кишки как отдела толстого кишечника, который вовлечен как в патологию язвенного колита у людей (Ивашкин и др., 2017), так и модельную патологию у животных (Чулкина и др., 2019), проводили неполную некропсию тел всех животных. Все отклонения от нормы документировали, после этого кишку разделяли вдоль, одну часть кишки использовали для гистопатологического исследования, другую - для определения концентраций цитокинов. Для гистопатологического исследования у всех вскрытых животных взвешивали часть прямой кишки и фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина (pH 7) согласно СОП. Подготовку микропрепаратов для анализа проводили согласно СОП. Гистологические препараты исследовали при помощи световой микроскопии на микроскопе Axio Lab.A1 («Carl Zeiss», Германия) согласно СОП.

Полуколичественную оценку степени повреждения кишечника проводили по следующей балльной системе (Chen et al., 2007): а) Разрушение эпителия и желез: 0 – отсутствует, 1 – очаговое разрушение эпителиальной поверхности и/или очаговое выпадение крипт, 2 – зональное разрушение эпителиальной поверхности и/или зональная потеря крипт, 3 – диффузное изъязвление и/или изъязвление слизистой оболочки с вовлечением подслизистой оболочки и/или диффузная потеря крипт. б) Расширение железистых крипт: 0 – отсутствует, 1 – фокальное расширение, 2 – зональное расширение, 3 – диффузное расширение. в) Истощение и потеря бокаловидных клеток: 0 – отсутствует; 1 – слегка истощенные бокаловидные клетки, 2 – зональные или умеренно истощенные бокаловидные клетки, 3 – диффузное или полное истощение бокаловидных клеток. г) Инфильтрация воспалительными клетками: 0 – отсутствует, 1 – инфильтрат на уровне субэпителиального слоя и собственной пластинки или оснований крипт, 2 – инфильтрация, достигающая слизистой оболочки, 3 – тяжелая обширная инфильтрация, затрагивает собственную мышечную пластинку. д) Отек: 0 – отсутствует, 1 – очаговый, 2 – зональный и/или умеренно диффузный, 3 – обширный и сильный. е) Кровоизлияния слизистой оболочки: 0 – отсутствуют, 1 – очаговые, 2 – зональные, 3 – диффузные. ж) абсцессы крипт: 0 – отсутствуют, 1 – очаговые, 2 – зональные, 3 – диффузные. з) Дисплазия: 0 – отсутствует; 1 – очаговая; 2 – зональная; 3 – диффузная.

Определение концентраций цитокинов, интерлейкинов ИЛ-1 и ИЛ-6 и фактора некроза опухоли ФНО- α , проводили в гомогенате кишечника и сыворотке крови методом ИФА. В стеклянном гомогенизаторе готовили 10%-ый гомогенат ткани прямой кишки в изотоническом растворе NaCl. Сыворотку для ИФА получали из цельной крови центрифугированием при 1600

g в течение 15 мин. Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя к наборам для ИФА: 1) В лунки планшета помещали по 100 мкл исследуемых и калибровочных образцов для инкубирования с иммобилизованными моноклональными антителами, специфичными к ИЛ-1, ИЛ-6 или ФНО- α , на шейкере-инкубаторе согласно СОП со скоростью вращения платформы 700 об/мин (радиус вращения платформы 1,5 мм) в течение 120 мин при 37 °C; 2) Лунки промывали 5 раз по 350 мкл промывочного раствора из наборов ИФА, добавляли по 100 мкл поликлональных антител человека с биотином из наборов для ИФА (конъюгат №1), специфичных к определяемым цитокинам, на шейкере-инкубаторе согласно СОП в течение 60 мин со скоростью вращения платформы 700 об/мин при 37 °C; 3) Лунки промывали 5 раз по 350 мкл промывочного раствора из наборов для ИФА, добавляли по 100 мкл стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат № 2), инкубировали на шейкере-инкубаторе согласно СОП в течение 30 мин со скоростью вращения платформы 700 об/мин при 37 °C; 4) Лунки промывали 5 раз по 350 промывочного раствора из наборов для ИФА, добавляли по 100 мкл тетраметилбензидина, инкубировали 25 мин в темноте при 18–25 °C; 5) В полученный раствор добавляли по 100 мкл стоп-реагента из наборов для ИФА; 6) В течение 10 мин измеряли оптическую плотность с помощью анализатора иммуноферментных реакций АИФР-01 согласно СОП при λ 450 нм согласно инструкциям к наборам для ИФА. Интенсивность окрашивания считали пропорциональной концентрации содержащегося в образце исследуемого цитокина.

Статистическую обработку данных проводили согласно СОП. В связи с установленным отсутствием нормальности распределения величин измеряемых данных сравнение выборок проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (Глушанко, 2012). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3.8.8 Получение и очистка рекомбинантной ЩФ CmAP из растений табака

Для синтеза ЩФ морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (CmAP) в трансгенных линиях табака использовали плазмиды pHREAC и pEff (Addgene, USA), способствующие эффективной транзиентной сверхэкспрессии рекомбинантных белков в растениях (Adedibu et al., 2024б; Yugaу et al., 2025). Ген ЩФ CmAP, соответствующий белку без сигнального пептида, амплифицировали из геномной ДНК *C. amphilecti* KMM 296 или плазмиды 40Ph, описанной в главе 2.8.1., в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер для ПЦР и полимеразу Encyclo («Евроген», Москва, Россия), с использованием термоциклера Bio-Rad C1000 Touch™ (Bio-Rad, CA, США). Продукты ПЦР ($\approx$ 1500 Кб) визуализировали с помощью электрофореза (1,2 % агарозный гель в буфере 1X TAE). Олигонуклеотидный праймеры CmAP-D (5'-TAT GGT CTC AAA AAA TGG CAG AGA TCA AGA ATG TCA TTC-3') и CmAP-R (5'-TAT GGT CTC TAG CGC TAG CGT CAA

TGG TGA TGG TGC TTC GCT ACC ACT GTC TTC-3') использовали для клонирования гена ЩФ CmAP в векторе pHREAC через сайты BsaI (конструкция pHREAC-CmAP) (рис. 45).

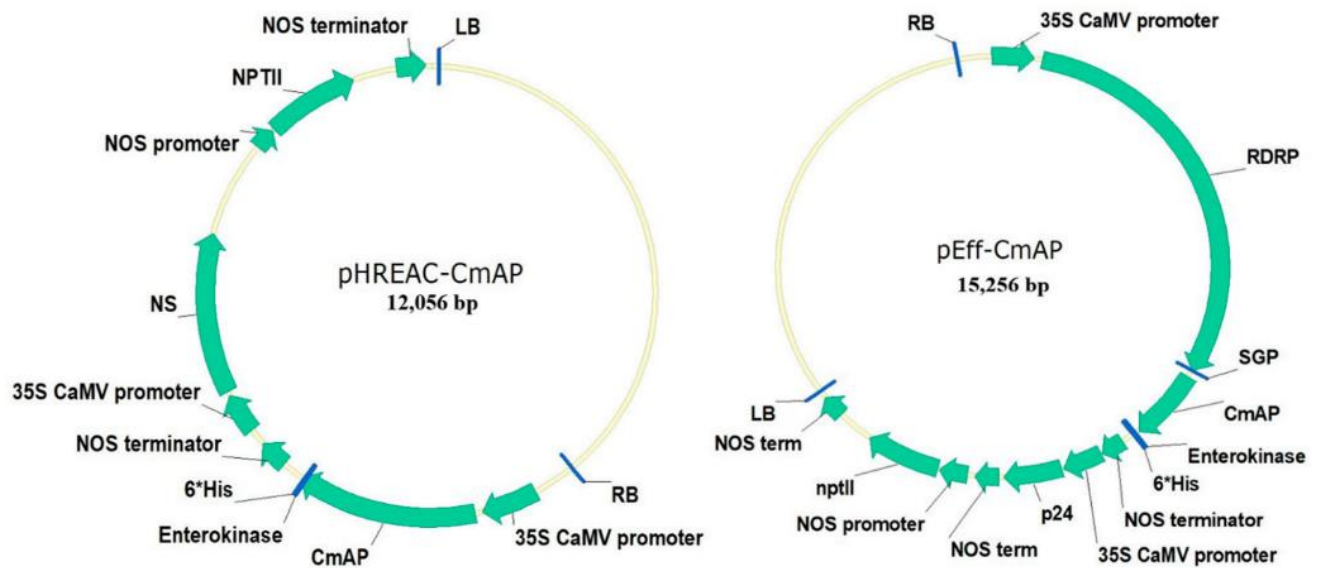


Рисунок 45 – Схематическое изображение генетических конструкций, экспрессирующих ген ЩФ *C. amphilecti* КММ 296 (*alp*), кодирующий рекомбинантный белок rCmAP, в *Nicotiana tabacum*. В конструкциях используется промотор 35S CaMV, обеспечивающий экспрессию rCmAP. Ключевые элементы включают промотор и терминатор NOS для регуляторного контроля, NPTII в качестве селективируемого маркера, а также левую (LB) и правую (RB) пограничные области для трансформации растений, опосредованной *Agrobacterium* spp. Дополнительные компоненты включают вирусные супрессоры сайленсинга PHK (p24 и NS), субгеномную промоторную область (SGP) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RDRP) для репликации РНК. Обе конструкции включают метку 6×His и сайт расщепления энтерокиназы для выделения rCmAP (Adedibu et al., 20246)

Для создания варианта с гистидиновым тагом (6×His) на С-конце и сайтом энтеропептидазы, ген ЩФ CmAP амплифицировали с праймерами CmAP-D и CmAP-R2 (5'-TAT GGT CTC TAG CGC TAG CGT CAA TGG TGA TGG TGA TGG TGC TTG TCG TCG TCA TCC TTC GCT ACC ACT GTC TTC-3') и клонировали также в плазмиду pHREAC по сайтам BsaI (конструкция pHREAC-CmAP-6H). Для лигирования гена ЩФ CmAP в вектор pEff использовали сайты рестрикции AscI и SmaI, прямой праймер pEff-CmAP-D (5'-TAT GGC GCG CCA TGG CAG AGA TCA AGA ATG TCA TT-3') и обратный праймер pEff-CmAP-R (5'-ATA CCC GGG TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CTT GTC GTC GTC ATC CTT CGC TAC CAC TGT CTT-3'), включающий 6×His и сайт энтеропептидазы со стороны С-конца белковой последовательности (конструкция pEff-CmAP-6H) (рис. 45). Каждую конструкцию проверяли путем секвенирования с праймерами, разработанными для плазмид pHREAC и pEff (Addgene, USA), с использованием генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), как описано в предыдущем исследовании (Shkryl et al., 2021).

Генетические конструкции клонировали в бинарный вектор pHREAC (pHREAC-CmAP, pHREAC-CmAP-6H и pEff-CmAP-6H), каждый полученный вектор вводили в бактериальный штамм *Agrobacterium tumefaciens* EHA105/pTiBo542 (Hood et al., 1993) путем электропорации с использованием Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) в соответствии с протоколом производителя. Трансформированные клетки высевали на агаризованную среду LB, содержащую 50 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина, и инкубировали при 28 °C в течение 48 ч. Колонии со вставкой гена ЦФ CmAP подтверждали методом ПЦР с ген-специфическими праймерами и переносили на жидкую среду LB, содержащую канамицин и рифампицин, и выращивали до $OD_{600} \approx 1,0$. Бактериальную культуру центрифугировали при $3000 \times g$ в течение 10 мин и ресуспендировали в 100 мл инфильтрационного буфера (10 mM MES, pH 5,6, 10 mM $MgCl_2$, 200 мкМ ацетосирингона) для достижения конечной $OD_{600} \approx 0,1$. Перед инфильтрацией суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Далее проводили транзientную трансформацию и индукцию каллуса *N. tabacum*. С помощью шприца без иглы клоны *A. tumefaciens* EHA105, несущие векторы с целевым геном, внедряли в листья 4-недельных растений *N. tabacum*, используя буфер для инфильтрации, приготовленный по описанной методике (Degtyarenko et al., 2021). Для индукции роста каллуса использовали метод листовых дисков, следуя установленным протоколам (Horsch et al., 1989; Gallois et al., 1995) с некоторыми модификациями: на молодых здоровых листьях *N. tabacum* делали срезы площадью 3 мм², пересекающие жилки листа. Отдельные клоны *A. tumefaciens* EHA105, каждый из которых содержал различные кассеты экспрессии, использовали для инокуляции листовых дисков в асептических условиях и затем культивировали на среде Murashige, Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962), содержащей 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D), 2 мг/л индол-3-уксусной кислоты (IAA) и 0,5 мг/л бензиламинопурина (BAP). Для создания стабильных трансгенных культур все трансформированные каллусные линии подвергали 3–4 раундам отбора на среде, содержащей 50 мг/л канамицина. После отбора и подтверждения трансгенности культуры растения переносили на среду, не содержащую антибиотики, и выдерживали в течение двух пассажей, прежде чем приступить к дальнейшим экспериментам. Каллус выращивали при 24 °C в условиях 24-часового темного режима. Для проверки трансгенного статуса растений из них выделяли ДНК и проводили ПЦР-анализ на наличие трансгена. Растения дикого типа (WT) использовались в качестве контроля для сопоставления полученных результатов.

Для выделения рекомбинантного белка трансформированные листья собирали через 6 дней после инфильтрации, замораживали в жидком азоте, измельчали в мелкий порошок с помощью пестика и ступки и хранили при -80 °C до дальнейшей экстракции. Аналогичным образом собирали биомассу каллуса из трехнедельных активно растущих культур и подвергали

такой же обработке. Порошкообразную массу взвешивали и ресуспендировали в буфере 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, в соотношении 2:10 (w/v). Суспензию гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора (Bandelin Sonoplus UW 2070, Берлин, Германия) в течение 15 мин (время включения/выключения импульсов 40 с/20 с) в ледяной бане, фильтровали и центрифугировали при 11 000×g в течение 20 мин при 4 °C. Полученную надосадочную жидкость собирали как сырой белковый экстракт. Далее очистку растворимого рекомбинантного белка проводили по схеме, описанной для растворимого рекомбинантного белка, полученного в клетках *E. coli* (глава 2.8.1.).

Сравнительный анализ чистоты препаратов ЩФ SmAP, выделенных и очищенных из рекомбинантных клеткок *E. coli* и трансгенного табака *N. tabacum*, проводили методом электрофореза в 12%-ом ПААГ и окрашивания ионами серебра. В качестве контроля использовали раствор ЛПС *E. coli* O55:B5 (Sigma, USA). Гель после электрофореза ЛПС и белков фиксировали в смеси 40%-ного этанола в 5%-ной уксусной кислоты (AcOH, 200 мл) в течение ночи. Далее выдерживали 5 мин в окисляющем растворе (0,7 % HJO₄ в смеси 40%-ного этанола в 5%-ной AcOH). Затем пластинку окрашивали 10 мин в 150 мл свежеприготовленного реагента, содержащего 2 мл NH₄OH (28 %), 28 мл 0,1 н. NaOH, 5 мл 20 % AgNO₃, 115 мл H₂O. После каждой процедуры гель тщательно отмывали водой (4–6 раз по 15 мин в 250 мл H₂O бидист.). Пластинку геля проявляли в 200 мл 5 % лимонной кислоты с добавлением 100 мкл 37 % формальдегида. Окрашивали в течение 2–5 минут.

Для разработки эффективных биотехнологических продуцентов рекомбинантных белков и вторичных метаболитов также использовали плазмиду pMF230 для широкого круга хозяев (псевдомонад) и растительную плазмиду pSAT с полилинкером и бинарный вектор pPZR для котрансформации гена устойчивости к гигромицину В (*hph*) и зеленого флуоресцентного белка (GFP) в штаммах полисахарид-деградирующих морских и наземных микромицетов, способных утилизировать для своего роста дешевые растительные субстраты (Балабанова и др. 2017, 2018; Balabanova et al., 2018b, 2019, 2022a, б).

3.8.9 Определение влияния гетерологичной экспрессии гена ЩФ SmAP на фенотип растений в условиях абиотического стресса

Для подтверждения регуляторной функции ЩФ семейства PhoA SmAP морской бактерии *S. amphilecti* КММ 296 изучали влияние экспрессии ее гена на фенотип растений в условиях абиотического стресса (оксидативного, солевого, дефицита фосфатов). Трансгенные линии табака, экспрессирующие ген высокоактивной ЩФ SmAP, получали путем его клонирования в бинарный вектор pHREAC, который вводили в штамм *A. tumefaciens* EHA105 методом электропорации (Adedibu et al., 2024b). Первичные каллусы получали с использованием

агробактериальной трансформации растительных эксплантов *N. tabacum*, затем индуцировали регенерацию целых растений на питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2 мг/л нафтилуксусной кислоты, 0,1 мг/л бензиламинопурина и 50 мг/л канамицина. Для проверки трансгенного статуса растений из них выделяли ДНК и проводили ПЦР-анализ на наличие трансгена. Растения дикого типа (WT) использовали в качестве контроля.

Всхожесть семян, развитие корневой системы, определение активности пероксидазы, содержания H_2O_2 , нейтрализации свободных радикалов (антиоксидантной активности), целостность мембран и утечку электролитов в трансгенных и контрольных растениях *N. tabacum*, культивируемых в условиях абиотического стресса оценивали методами, подробно описанными ранее (Yugay et al., 2025). Выделение тотальной РНК и синтез первой цепи кДНК для проведения ПЦР в режиме реального времени проводили в соответствии с протоколом (Shkryl et al., 2021; Yugay et al., 2025). Отделенные листья *N. tabacum* использовали для оценки уровней экспрессии мРНК гена ЩФ СmAP (*CaAP*). В анализ были включены три биологические повторности, полученные из отдельных экстракций РНК, при этом каждая биологическая повторность была оценена в трех технических повторностях. Количественную ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили с использованием системы Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) и 2× BioMaster RT-PCR SYBR Blue («Биолабмикс», Новосибирск, Россия) (Yugay et al., 2025). Эффективность амплификации определяли с помощью анализа стандартной кривой. Референсный ген β -актина *N. tabacum* служил внутренним контролем. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода 2^{−ΔΔCt}. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения CFX Manager Software (версия 3.1, Bio-Rad Laboratories).

3.9. Статистический анализ

Все количественные результаты представлены в данной диссертационной работе в виде среднего значения со стандартной ошибкой (SE). Нормальность данных проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для статистической оценки использовали *t*-критерий Стьюдента для сравнения двух независимых групп. Для сравнения множественных данных применяли дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей процедурой множественного сравнения. Для межгрупповых (попарных) сравнений использовали апостериорный критерий Фишера (наименьшая значимая разность, LSD-тест). Все эксперименты проводили как минимум с тремя независимыми биологическими и техническими повторностями. Результат считался статистически значимым, если наблюдаемое *p*-значение $\geq 0,05$.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Морские аэробные и факультативно-анаэробные гетеротрофные бактерии широко распространены во всех экологических нишах Мирового океана и характеризуются большим генотипическим и фенотипическим разнообразием внутри одного таксона, что приводит к невозможности разделения их близкородственных изолятов и штаммов классическими методами видовой идентификации – по анализу последовательностей генов 16S рРНК и фенотипу (Weisburg et al., 1991; Nedashkovskaya et al., 2021, 2024; Noskova et al., 2021; Balabanova et al., 2023, 2024a). Способность к существованию в условиях с разной аэрацией, источниками питания и в различных местообитаниях, от грунта и толщи воды до поверхностей и внутренних тканей водорослей и животных, неизбежно ведет к широкому географическому распространению отдельных видов космополитов и расширению у них арсенала альтернативных метаболических путей (Балабанова и др., 2016; Giovannoni et al., 2005; Balabanova et al., 2016, 2023; Nedashkovskaya et al., 2021, 2024). Это означает, что эволюционно успешные микроорганизмы могут быстро перестраивать свой геном и эффективно регулировать переключение центральных метаболических путей для выживания. При колонизации новых поверхностей для успешной конкуренции за источники питания с другими бактериями и грибами в микробиомах эти пути могут включать аэробное и анаэробное дыхание, альтернативные способы питания, хемотаксис, образование биопленок и биосинтез ряда вторичных метаболитов, включая пигменты, витамины и антимикробные пептиды и фунгициды (Терентьева и др., 2020; Balabanova et al., 2016, 2017, 2020, 2021, 2022a, 2023, 2024a; Bosi et al., 2017; Skouri-Panet et al., 2018; Vermassen et al., 2019; Hettle et al., 2019; Doing et al., 2020; Averianova et al., 2020; Lidbury et al., 2022; Parrilli et al., 2021; Shi et al., 2022; Pentekhina et al., 2023). Наиболее распространенными источниками питания для морских гетеротрофных микроорганизмов, как бактерий, так и микромицетов, являются полисахариды водорослей и растворенные в морской воде органические остатки (Балабанова и др., 2018; Balabanova et al., 2018b; Nedashkovskaya et al., 2018, 2023; Pentekhina et al., 2023). Альтернативные метаболические пути морских сапрофитов обусловлены разнообразием их нуклеаз, протеаз, липаз, полисахарид-деградирующих ферментов и транспортных белков, что обеспечивает возможность транслокации через мембрану молекул с разными структурами и размерами (Слепченко и др., 2017; Балабанова и др., 2015, 2023; Бакунина и др., 2020; Терентьева и др., 2020; Balabanova et al., 2010, 2017, 2020; Golotin et al., 2015; Bakunina et al., 2013, 2016, 2018a, б; Likhatskaya et al. 2018; Noskova et al. 2018, 2019, 2021; 2023; Pentekhina et al., 2023). Таким образом, уникальные структуры ферментов, транспортных белков и регуляторов транскрипции их генов могут служить молекулярными таксономическими маркерами морских микроорганизмов (Noskova et al. 2021; Balabanova et al., 2024a). Использование новых технологий секвенирования геномов и методов полногеномного анализа расширило возможности

идентификации микроорганизмов и понимание механизмов их адаптации к быстро меняющимся условиям обитания в морской среде.

В данной исследовательской работе были охарактеризованы новые представители родов гамма-протеобактерий *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, альфа-протеобактерия нового рода *Rhodalgimonas*, флавобактерии родов *Arenibacter*, *Polaribacter* и *Flavobacterium* как продуценты перспективных для биотехнологии и медицины щелочных фосфатаз (ЩФ), нуклеаз, протеаз и полисахарид- и олигосахарид-деградирующих ферментов (Балабанова и др., 2015, 2016, 2017, 2019; Голотин и др., 2015; Слепченко и др., 2017; Буйновская и др., 2018; Бакунина и др., 2020; Терентьева Н. и др., 2020; Golotin et al., 2015; Kovalchuk et al., 2015, 2018; Bakunina et al., 2016, 2018, 2018a, 2019; Balabanova et al., 2016, 2018, 2020, 2023, 2024a; Noskova et al., 2018, 2019, 2023; Utkina et al., 2019, 2021; Nedashkovskaya et al., 2021, 2023, 2024; Pentekhina et al., 2023; Seitkalieva et al., 2024; Adedibu et al., 2024b; Yugay et al., 2025). Согласно биохимическим тестам, для большинства штаммов морских гетеротрофных бактерий, относящихся к различным таксонам, характерны признаки высокой активности щелочной фосфатазы (ЩФ). Однако по результатам скрининга уровня ферментативной активности ЩФ среди штаммов, хранящихся в КММ ТИБОХ ДВО РАН (<https://kmm644.ru>), в качестве объекта исследования ЩФ был выбран штамм КММ 296 морских гетеротрофных бактерий рода *Cobetia* (Ivanova et al., 1994).

4.1 Геномный, пангеномный и фенотипический анализ штаммов морских гетеротрофных гамма-протеобактерий рода *Cobetia*

Род *Cobetia* впервые был выделен в самостоятельный род в результате реклассификации вида гамма-протеобактерий *Halomonas marina*, который филогенетически тесно связан с представителями родов *Halomonas* и *Chromohalobacter* из семейства *Halomonadaceae* (порядок *Oceanospirillales*) (Arahal et al., 2002a, б). Кроме типового вида *C. marina* (типовой штамм ATCC 25374^T = DSM 4741^T) в род *Cobetia* вошли еще 4 вида, *C. amphilecti*, *C. crustatorum*, *C. pacifica* и *C. litoralis*, выделенные из различных морских источников, включая грунт, морскую воду, беспозвоночных и водоросли (Arahal et al., 2002б; Kim et al., 2010; Romanenko et al., 2013; Tang et al., 2017). Они представляют собой грамотрицательные, аэробные, гетеротрофные, галофильные и палочковидные бактерии, которые могут передвигаться с помощью одного полярного жгутика и/или двух-семи боковых жгутиков (Arahal et al., 2002б; Kim et al., 2010; Romanenko et al., 2013). Многие штаммы рода *Cobetia* являются источниками биологически активных веществ и ферментов, представляющих биотехнологический интерес (Plisova et al., 2005; Nasu et al., 2012, Ugbenyen et al., 2014; Lv et al., 2018; Fernández-Juárez et al., 2021). На основе геномного анализа некоторых штаммов *Cobetia* spp. показан их высокий потенциал для биосинтеза биосурфактантов, деградации ароматических углеводов, фиксации неорганического углерода, синтеза и производства полигидроксиалканоатов, деградации альгинат-содержащих

поверхностей бурых водорослей и колонизации корней морской травы *Z. marina* (Alexiev et al., 2016; Ibacache-Quiroga et al., 2017; Tang et al., 2017; Cheng et al., 2020b; Moriya et al., 2020; Christensen et al., 2021; Liu et al., 2022; Balabanova et al., 2024a). Кроме того, биопленки, образованные *C. marina*, могут оказывать влияние на вторичную колонизацию беспозвоночных и водорослей (Tang et al., 2017).

К *Halomonas*-подобным бактериям, обитающим в различных районах северо-западной части Тихого океана, нами был отнесен штамм КММ 296, выделенный из целомической жидкости мидии *C. grayanus*, собранной в Японском море (Ivanova et al., 1994, 2005). Согласно результатам скрининга ферментативной активности штамм КММ 296 был отмечен как наиболее активный продуцент ЩФ среди других изолятов данного региона и идентифицирован как представитель вида *C. marina* (ранее *Deleya marina* (Cobet et al. 1970) Baumann et al. 1983) (Ivanova et al., 1994; Plisova et al., 2005). Позднее результаты филогенетического анализа, основанного на выравнивании последовательностей генов рРНК 16S, указали на более близкое родство штамма КММ 296 с типовым штаммом вида *C. amphilecti* NRIC 0815^T (100 % идентичности). Геном штамма КММ 296 (NCBI ID: NZ_JQJA000000.1) был секвенирован и исследован в данной диссертационной работе благодаря его способности продуцировать высокоактивную периплазматическую щелочную фосфатазу CmAP с уникальными свойствами, относящуюся к структурному семейству щелочных фосфатаз PhoA (Балабанова и др., 2016; Balabanova et al., 2017, 2024a; Adedibu et al., 2024b). Несмотря на изученные структурные, биохимические и каталитические свойства CmAP, физиологическая роль этого фермента остается неизвестной из-за наличия в геноме КММ 296 нескольких генов, кодирующих ЩФ различной структуры (Балабанова и др., 2016; Balabanova et al., 2024a). Кроме того, было установлено, что CmAP проявляет дефосфорилирующую активность в отношении бактериальных ЛПС, подобно другим ЩФ PhoA беспозвоночных, млекопитающих и человека (Yang et al., 2012; Hamarneh et al., 2014; Buinovskaya et al., 2018; Kühn et al., 2020; Balabanova et al., 2024a, б). Кишечная ЩФ человека IAP обеспечивает врожденную защиту от эндотоксинов, устранения их пирогенности, что приводит к общему снижению интенсивности воспалительных процессов. Таким образом, новые данные о ЛПС-дефосфорилирующей способности фермента морской бактерии CmAP могут привести к разработке нового терапевтического препарата для нейтрализации эффектов бактериальных эндотоксинов, таких как болезнь Крона, эндотоксический шок, старение и т.д. (Hamarneh et al., 2014; Buinovskaya et al., 2018; Kühn et al., 2020).

В данной диссертационной работе уточнено таксономическое положение штамма КММ 296 как представителя вида *C. amphilecti* и предложено новое описание вида *C. amphilecti* на основании результатов филогеномного анализа, фенотипической характеристики и экспериментов по ДНК-ДНК гибридизации между штаммами КММ 296 и *C. amphilecti* NRIC

0815^T. Поскольку генетический маркер 16S рПНК не обеспечивает достаточного разрешения для разграничения видов рода *Cobetia* (Romanenko et al., 2013; Noskova et al., 2021), огромное количество опубликованных геномов рода *Cobetia* в базе данных NCBI могут быть неверно отнесены к существующим видам. До недавнего времени точная идентификация близкородственных штаммов *Cobetia* spp. оставалась сложной задачей, в основном, из-за отсутствия геномных последовательностей типовых штаммов *C. litoralis*, *C. pacifica* и *C. amphilecti* (Noskova et al., 2021). Поэтому в данной работе представлены данные по секвенированию и анализу геномов типовых штаммов NRIC 0814^T, NRIC 0815^T и NRIC 0813^T (табл. 4). Сравнение геномных последовательностей и фенотипических характеристик позволяет предположить, что виды *C. amphilecti* и *C. litoralis* относятся к одному виду. Кроме того, на основании данных, полученных в настоящем исследовании, предложено рассматривать виды *C. marina* и *C. pacifica* как представителей одного вида. В соответствии с правилами приоритета предложено *C. litoralis* переклассифицировать как более поздний гетеротипический синоним *C. amphilecti*, а *C. pacifica* – как более поздний гетеротипический синоним *C. marina*. Также предлагаются дополненные описания видов *C. amphilecti* и *C. marina*.

4.1.1 Морфологическая, биохимическая и физиологическая характеристика штамма KMM 296 и *Cobetia amphilecti* NRIC 0815^T

Штамм KMM 296 представляет собой аэробную, гетеротрофную, грамотрицательную и подвижную бактерию, которая образует колонии желтоватого оттенка на морском агаре (МА) и требует NaCl или морскую воду для роста. Бактерия показала положительные результаты теста на наличие цитохромоксидазы и каталазы, не гидролизовала агар, казеин, желатин, крахмал, Tween 80, ДНК, мочевины и хитин (табл. 8). Штаммы KMM 296 и *C. amphilecti* NRIC 0815^T имели много общих фенотипических признаков, таких как дыхательный тип метаболизма, подвижность с помощью 1–2 полярных и/или 2–3 латеральных жгутиков, способность расти при температуре 4–42 °C, наличие каталазы, оксидазы, щелочной фосфатазы, эстеразы (C4), эстеразы-липазы (C8), лейцин-ариламидазы, кислой фосфатазы и α-глюкозидазы, а также усвоение сахарозы, мальтозы, малоната натрия, гликогена, D-маннита, D-глюкозы, 3-гидроксимасляной кислоты и L-пролина (табл. 8). В то же время оба штамма не синтезировали аргинин дигидролазу, липазу (C14), цистин ариламидазу, α-химотрипсин, N-ацетил-β-глюкозаминидазу, β-глюкозидазу, α-галактозидазу, β-глюкуронидазу, α-маннозидазу или α-фукозидазу, не гидролизовали агар, хитин, эскулин, желатин, крахмал, мочевины или Tween 80, не производили кислоту из D-маннозы, мелибиозы, раффинозы, L-рамнозы, D-рибозы, N-ацетилглюкозамина, инозита, D-сорбита, глицерина или D-маннита, не восстанавливали нитрат до нитрита и не могли ассимилировать L-арабинозу, D-маннозу, N-ацетилглюкозамин, адипат, фенилацетат, итаконовую кислоту, ацетат натрия, пропионовую кислоту, тринатрий цитрат или 4-гидроксibenзойную кислоту. Однако штамм

КММ 296 можно отличить от его ближайшего филогенетического родственника по нескольким фенотипическим признакам, таким как способность ассимилировать каприновую и валериановую кислоты, неспособность производить кислоту из некоторых углеводов (табл. 8) и ассимилировать D-глюкозу, D-маннит, мальтозу, D-глюконат, L-малат, L-рамнозу, N-ацетилглюкозамин, D-рибозу, инозит, субериновую кислоту, молочную кислоту, L-аланин, 5-кетоглюконат калия, 3-гидроксibenзойную кислоту, L-серин, салицин, мелибиозу, L-фукозу, L-арабинозу, L-гистидин и 2-кетоглюконат калия (табл. 8).

Таблица 8 – Отличительные фенотипические характеристики штамма КММ 296 (1) и ближайшего родственника *C. amphilecti* NRIC 0815^T (2)

Характеристика	(1)	(2)
Источник и место выделения	Мидия <i>C. grayanus</i> , Японское море	Губка <i>A. digitatus</i> , Аляска, Тихий океан
Пределы солёности для роста (% NaCl)	0,5–19	0–20
Редукция нитратов	-	+
Гидролиз:		
Tween 80	-	+
ДНК	-	+
Продукция кислоты из:		
D-фруктозы, D-лактозы, L-арабинозы,	-	+
D-мелибиозы, L-рамнозы	+	-
Ассимиляция:		
Амигдалин, мальтоза, малонат натрия, гликоген, каприновая и валериановая кислоты, 3-гидроксibuтириновая кислота, L-пролин	+	-
N-ацетилглюкозамин, L-серин	-	+
Ферментативная активность:		
Валин-ариламидаза, цистеин-ариламидаза	-	+
Трипсин	+	-
Содержание Г+Ц в ДНК (моль%)	62,5	62,5

Примечание – Оба штамма показали положительные результаты в следующих тестах: дыхательный тип метаболизма, подвижность, желтоватый цвет колоний, рост при 4–42 °С, гидролиз тирозина и Tween 20 и 40, каталаза, оксидаза, щелочная фосфатаза, эстераза (C4), эстераза-липаза (C8), лейцин-ариламидаза, кислая фосфатаза, активность нафтол-AS-BI-фосфогидролазы и α-глюкозидазы (тест PNPG), производство кислоты из D-галактозы, D-глюкозы и D-маннозы, усвоение L-арабинозы, D-мелибиозы, L-рамнозы, сахарозы, мальтозы и D-маннита (D-маннитола), чувствительность к ампициллину, карбенициллину, цефалексину, цефазолину, хлорамфениколу, эритромицину, гентамицину, канамицину, налидиксовой кислоте, неомицину, офлоксацину, полимиксину, рифампицину, стрептомицину, тетрациклину и ванкомицину, и устойчивость к бензилпенициллину, линкомицину, олеандомицину и оксациллину. Оба штамма показали отрицательные результаты в следующих тестах: аргинин-дигидролаза, липаза (C14), α-химотрипсин, N-ацетил-β-глюкозаминидаза, α-галактозидаза, β-галактозидаза, β-глюкозидаза, β-глюкуронидаза, α-маннозидаза и α-фукозидаза, гидролиз эскулина, агара, казеина, хитина, желатина, крахмала и мочевины, производство кислот из раффинозы, D-рибозы, D-ксилозы, сахарозы, трегалозы, D-целлобиозы, N-ацетилглюкозамина, глицерина, инозита, D-сорбита, ацетата натрия, тринатрия цитрата и D-маннита, производство H₂S и индола.

Полученные результаты позволят расширить фенотипические характеристики вида *C. amphilecti* (Romanenko et al., 2013) после обоснования принадлежности штамма КММ 296 к этому виду.

4.1.2 Клеточный состав жирных кислот, полярных липидов и дыхательных хинонов штамма КММ 296 и *Cobetia amphilecti* NRIC 0815^T

Преобладающими жирными кислотами (>5 % от общего количества) в штамме КММ 296 являются: C16:1 ω 7c, C16:0, C12:0 3-ОН, C18:1 ω 7c, C12:0 и C17:0 циклокислота (табл. 9, рис. 46).

Таблица 9 – Профили жирных кислот (%) штаммов КММ 296 (1) и *C. amphilecti* NRIC 0815^T (2)

Жирная кислота	(1)	(2)
C10:0	3,2	4,3
C12:0	11,0	8,7
C16:0	21,6	21,9
C17:0 cyclo	5,2	9,4
C16:1 ω 7c	38,2	32,5
C18:1 ω 7c	14,9	12,7
C19:1 ω 6c	1,6	Сл.
C12:0 3-ОН	15,8	20,3

Примечание – Сл., следовые количества (≤ 1 %).

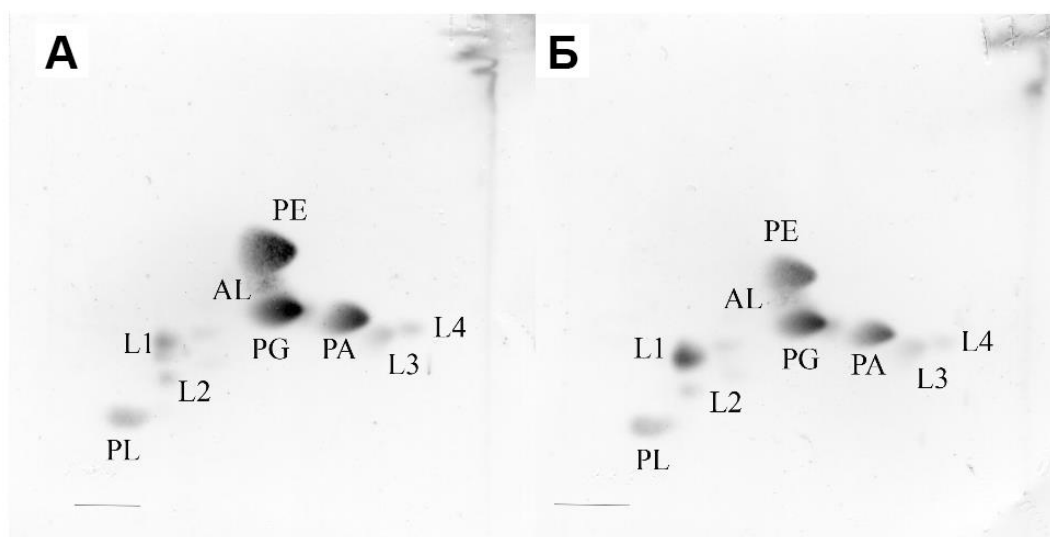


Рисунок 46 – Двумерные тонкослойные хроматограммы полярных липидов, выделенных из штаммов КММ 296 (А) и *C. amphilecti* КММ 638^T (Б). PE – фосфатидилэтаноламин, PG – фосфатидилглицерин, PC – фосфатидилхолин, PA – фосфатидная кислота, AL – неидентифицированный аминолипид, L – неидентифицированный липид, PL – неизвестный фосфолипид

Профиль полярных липидов как штамма КММ 296, так и типового штамма NRIC 0815^T, характеризуется наличием фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидной кислоты, неидентифицированного аминлипида, неидентифицированного фосфолипида и неидентифицированных липидов (рис. 46 А, Б). Основным дыхательным хиноном является Q-8, что характерно для представителей класса *Gammaproteobacteria*.

4.1.3 Филогенетический анализ генов 16S рРНК штаммов КММ 296, *Cobetia marina* JCM 21022^T и *Cobetia amphilecti* NRIC 0815^T

Филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК, полученных в результате ПЦР с геноспецифическими праймерами показал, что штамм КММ 296 имеет 99,5 % сходства с *C. marina* LMG 2217^T (=JCM 21022^T), тогда как с типовым штаммом *C. amphilecti* NRIC 0815^T, охарактеризованным позже, он показал 100 % идентичности (Noskova et al., 2021; Romanenko et al., 2013). Это позволило предположить, что штамм КММ 296, ранее идентифицированный как *C. marina*, не является представителем типового вида *Cobetia*, и может быть отнесен к виду *C. amphilecti* (Балабанова и др., 2016; Ivanova et al., 1994, 2005; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015). Кроме того, источниками выделения бактерий вида *C. marina* преимущественно являются деградированные талломы водорослей, а изоляты вида *C. amphilecti* часто встречаются в тканях морских беспозвоночных (табл. 4) (Ivanova et al., 2005; Tang et al., 2017; Lv et al., 2018; Noskova et al., 2021). Кроме того, сравнительный анализ геномов *C. marina* JCM 21022^T и КММ 296 и филогенетический анализ семейства *Halomonadaceae*, проведенный Tang et al. (2017), показал значительные различия между ними, которые являются результатом вставок и делеций геномных последовательностей и хромосомной рекомбинации.

4.1.4 Содержание Г+Ц штамма КММ 296 и *Cobetia amphilecti* NRIC 0815^T

По данным геномного секвенирования содержание Г+Ц штамма КММ 296 составило 62,5 моль% (табл. 4) (Балабанова и др., 2016). Это несколько ниже значения, полученного методом термической денатурации (62,7 мол. %) (De Ley et al., 2070). Родство общей ДНК между изолятом КММ 296 и типовым штаммом *C. amphilecti* NRIC 0815^T, определенное методом экспериментальной ДНК-ДНК гибридизации, составило 92 %. Это значение превышало 70%-ый порог, используемый для отнесения бактериальных геномов к штаммам одного вида (Wayne et al., 1987), и убедительно свидетельствовало о принадлежности двух штаммов к одному виду – *C. amphilecti*. Кроме того, рассчитанные ранее с помощью сервера EzBioCloud (Noskova et al., 2021) филогенетические расстояния между генами 16S рРНК типовых штаммов видов *C. amphilecti* и *C. litoralis* (99,93 % сходства), с одной стороны, и *C. marina* и *C. pacifica* (100 % сходства), с другой стороны, позволяют предполагать, что это всего лишь разные подвиды двух соответствующих видов.

Однако сравнение последовательностей целых геномов *Cobetia* spp., которые в настоящее время депонированы в базе данных NCBI GenBank (табл. 4), показало, что каждый геном содержит до семи генов 16S рРНК с уровнем сходства 99,86–100 % как внутри одного генома, так и между геномами разных видов (табл. А1). В связи с этим, для демаркации видов *Cobetia* spp. необходим комплексный анализ с использованием полноразмерных геномов.

4.1.5 Филогения и анализ штаммов рода *Cobetia* на основе полногеномных данных

Всего для филогенетического и сравнительного анализа геномов было отобрано 36 штаммов рода *Cobetia*, 10 из которых были секвенированы в данном исследовании (3 типовых штамма NRIC 0814^T, NRIC 0815^T, NRIC 0813^T, и 7 изолятов KMM 296, 2AS1, 2AS, 1AS1, 29-18-1, 3AK и 10Alg 146) (табл. 4) (Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2024). Остальные 26 геномов *Cobetia* spp. были извлечены из базы данных RefSeq NCBI (табл. 4). Набор геномных данных включал геномы типовых штаммов пяти видов рода *Cobetia* в соответствии с прежней таксономической классификацией (Arahal et al., 2002a, б; Kim et al., 2010; Romanenko et al., 2013), девяти штаммов *Cobetia* spp. с видовыми названиями и двадцати двух неклассифицированных изолятов, отнесенных к роду *Cobetia*. Общие характеристики геномов приведены в таблице 4. Размер генома варьировал от 3,1 до 4,6 Мбп (мегабаз пар), содержание Г+Ц варьировало незначительно и составляло 62–63 %, за исключением четырех штаммов со значением данного показателя 57–57,5 %, включая типовой штамм *C. crustatorum* JO1^T (табл. 4). Такой разброс в значениях может быть обусловлен различиями в глубине секвенирования геномов некоторых штаммов (качество секвенирования, количество контигов и пр.). По данным анализа качества NCBI (CheckM) (Parks et al., 2015), сборки геномов имели полноту 81,26–99,65 % и контаминацию 0,49–2,93 % (табл. 4).

Для оценки филогенетических связей штаммов *Cobetia* spp. была использована филогения основного генома (рис. 47). Согласно филогенетическому дереву, штаммы делятся на четыре клады с субкладами и максимальной статистической поддержкой ветвей (значение бутстреп-репликации = 100). Первая клада включает три субклады и содержит 19 штаммов, среди которых два типовых штамма, *C. litoralis* NRIC 0814^T и *C. amphilecti* NRIC 0815^T, кластеризуются в одной субкладе. Вторая клада состоит из 13-ти штаммов, включая типовые штаммы *C. pacifica* NRIC 0813^T и *C. marina* JCM 21022^T. Третья клада характеризуется разной длиной ветвей и состоит из двух штаммов вида *C. crustatorum* и двух неизвестных изолятов *Cobetia* spp. Согласно полученной топологии филогенетического дерева очевидно, что пять описанных ранее видов *Cobetia* на самом деле могут представлять только три вида (рис. 47). Значения филогеномных метрик ANI_b, AAI и dDDH являются дополнительным подтверждением необходимости видовой реклассификации рода *Cobetia* (табл. А1). Для четырнадцати штаммов, образующих общую

кладу со штаммами *C. litoralis* NRIC 0814^T и *C. amphilecti* NRIC 0815^T (рис. 47), получены значения ANIb – 96,43–96,95 %, AAI – 97,64–99,99 %, и dDDH – 70,1–100 %. Группа из 13-ти штаммов, объединенных в кладе с типовыми штаммами *C. pacifica* NRIC 0813^T и *C. marina* JCM 21022^T (рис. 47), показала похожие диапазоны значений ANIb (97,14–98,19 %), AAI (98,2–99,99 %) и dDDH (80,4–100 %). Значения этих показателей между штаммами *C. crustatorum* JO1^T, *C. crustatorum* SM1923 и *Cobetia* sp. QF-1 (рис. 47) составили 98,4–98,9 %, 98,44–99,18 % и 89,5–91,7 % соответственно (Nedashkovskaya et al., 2024). С остальными *Cobetia* spp. штамм *Cobetia* sp. L2A1 имел 80,8–85,7 % ANIb, 86,27–90,89 % AAI и 24,4–29,3 % dDDH (рис. 47).

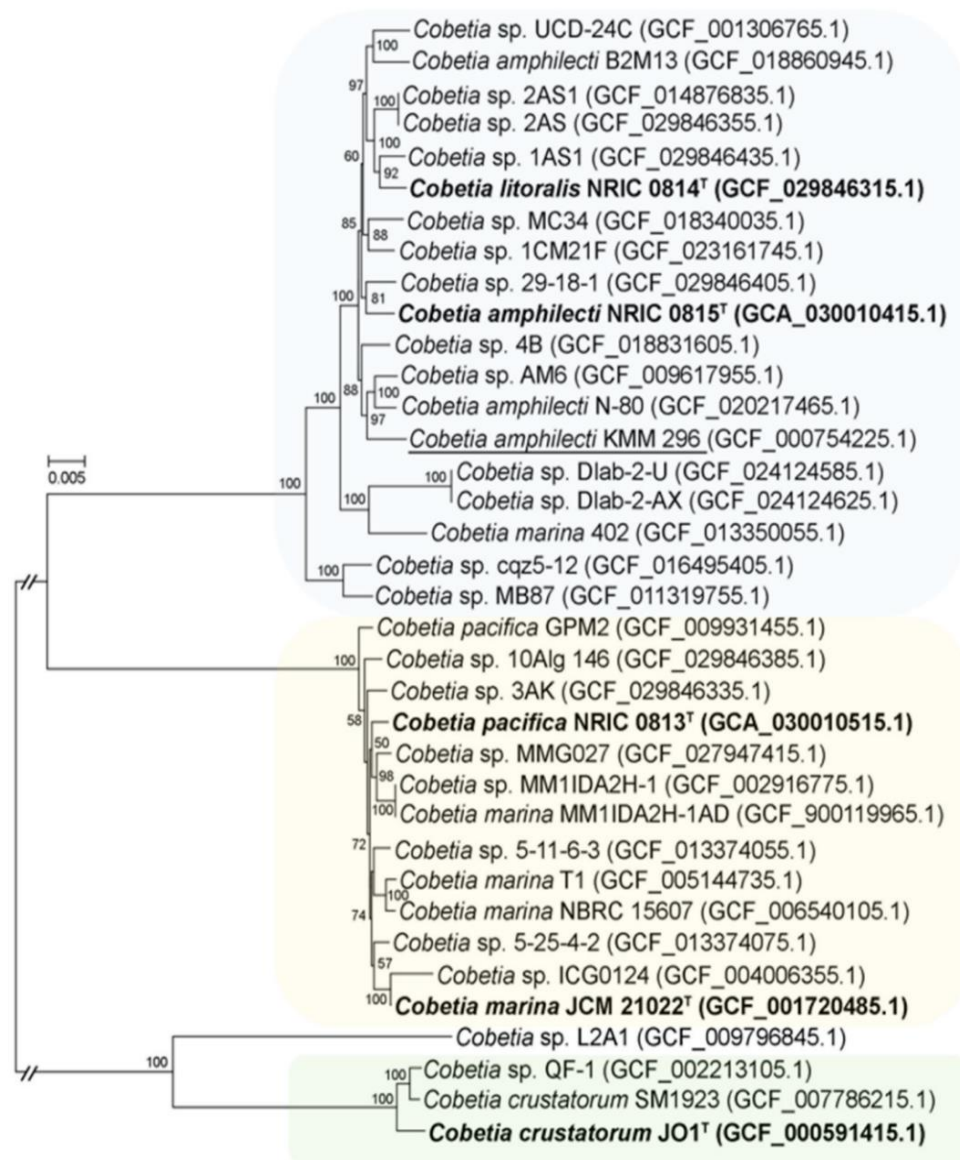


Рисунок 47 – Филогеномное дерево максимального правдоподобия (ML – maximum likelihood) представителей рода *Cobetia* на основе анализа 1432 конкатенированных однокопийных генов кора с непараметрическим бутстреппингом и использованием 100 реплик, шкала – 0,005 на аминокислотную позицию. Номера доступа к геномам – в скобках. Типовые штаммы ранее классифицированных видов *Cobetia* выделены жирным шрифтом, штамм KMM 296 подчеркнут. Кластеры валидных видов выделены оттенками (Nedashkovskaya et al., 2024)

Поскольку принятыми пороговыми значениями для демаркации видов являются 95–96 % ANI, 95–96 % AAI и 70 % для dDDH, расчетные значения этих показателей для типовых штаммов *C. litoralis* NRIC 0814^T и *C. pacifica* NRIC 0813^T показали, что они не принадлежат к первоначально выделенным видам (Romanenko et al., 2013). Высокие значения показателей видовой демаркации близкородственных штаммов и изолятов подтверждают филогеномную кластеризацию штаммов рода *Cobetia* на два, а не четыре отдельных вида согласно прежней классификации на основе анализа 16S рПНК (рис. 47). Видовая принадлежность штаммов и изолятов *C. crustatorum* не вызывают сомнений ни по результатам филогеномного анализа, ни по результатам анализа последовательностей 16S рПНК и мультилокусного ПЦР-анализа генов ферментов (табл. А1, рис. А1), так как этот вид не является близкородственным по отношению к другим видам *Cobetia* spp (Noskova et al., 2021). Однако филогеномные показатели кластеризованного с ним штамма *Cobetia* sp. L2A1 оказались ниже отсекающих значений для видовой демаркации, что указывает на его вероятную принадлежность к новому виду рода *Cobetia* (рис. 47).

4.1.6 Филогения и анализ штаммов рода *Cobetia* на основе пангенома

Пангеномный анализ рода *Cobetia* был проведен для определения его генетической гетерогенности и подтверждения филогенетических связей (рис. 48). Пангеном представлен набором кластеров генов (КГ), среди которых выделяются консервативные гены кора, переменные гены оболочки и синглтоны облака (рис. 48). Гены кора встречаются в ≥ 95 % геномов, гены оболочки – в более чем 10 % и менее чем 95 % геномов, а гены облака – в ≤ 10 % геномов. Более того, однокопийные гены (SCGs), входящие в состав кора, встречаются у всех штаммов, в то время как уникальные гены (синглтоны) из облака штаммоспецифичны. Пангеном 36-ти штаммов рода *Cobetia* включает в себя 6648 КГ (123892 генов), в том числе 2471 КГ в коровых геномах (93289 генов), 1469 КГ в оболочке (26722 гена) и 2708 КГ в облаке (3881 ген), включая 1902 КГ (1920 генов) синглтонов. Интересно, что 62 КГ были обнаружены исключительно в штаммах, сгруппированных с типовым штаммом *C. crustatorum* JO1^T, а 20 КГ в штаммах, сгруппированных с типовыми штаммами *C. pacifica* NRIC 0813^T и *C. marina* JCM 21022^T (рис. 48). В то же время, лишь один КГ оказался общим для 14-ти штаммов, объединенных в группы с *C. litoralis* NRIC 0814^T и *C. amphilecti* NRIC 0815^T, что указывает на высокую скорость внутривидовой геномной реорганизации в их популяциях и диверсификацию на подвиды, которая, вероятно, зависит от свободного (у изолятов *C. litoralis*) или ассоциированного с хозяином (у изолятов *C. amphilecti*) образа жизни (Noskova et al., 2021).

Кластеры основных и уникальных генов были аннотированы по категориям базы данных Кластеров Ортологичных Групп (COG) (рис. 48, 49).

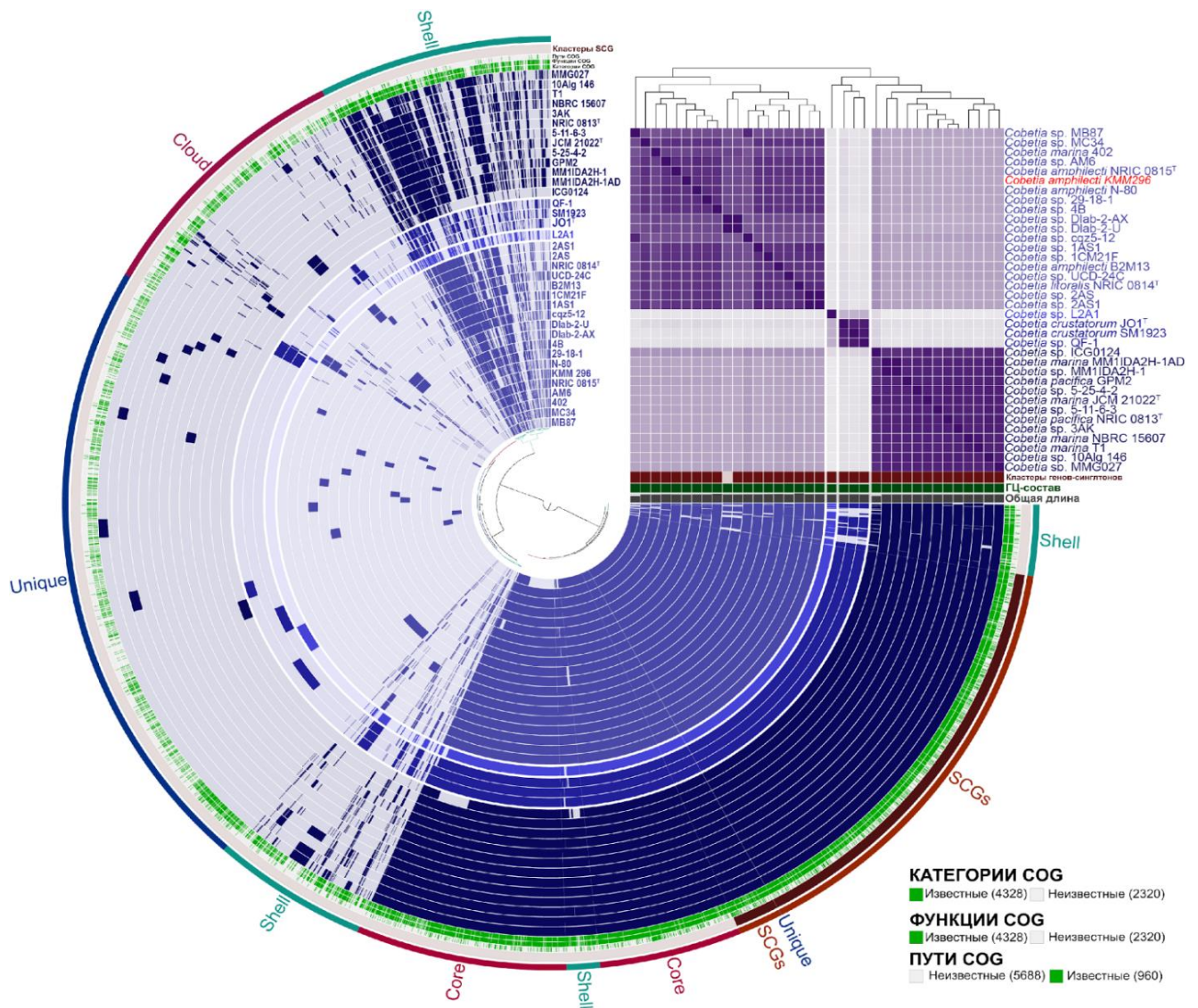


Рисунок 48 – Пангеном 36-ти штаммов *Cobetia* spp. Круговые столбики – наличие/отсутствие 6648 пангеномных кластеров в каждом геноме. КГ организованы в виде ядра (Core, SCGs), оболочки (Shell) и облачных генов (Cloud, Unique), мера сходства – евклидово расстояние, кластеризация методом Уорда. Тепловая карта кластеризации геномов из NCBI – по значениям ANI (%). *C. amphilecti* KMM 296 отмечен красным цветом (Nedashkovskaya et al., 2024)

Гены корового генома относились, в основном, к следующим категориям COG: трансляция и биогенез рибосом (10,48 %), транспорт и метаболизм аминокислот (9,58 %), синтез клеточной оболочки (7,35 %), производство и преобразование энергии (6,95 %), транскрипция (6,65 %), углеводный обмен и транспорт (6,35 %), липидный обмен (6,06 %), транспорт и метаболизм неорганических ионов (5,91 %), метаболизм коферментов (5,46 %), посттрансляционные модификации (5,21 %), репликация и репарация (4,42 %), трансдукция сигналов (3,82 %). Гены метаболизма и транспорта нуклеотидов, синтеза вторичных метаболитов, защитных механизмов, контроля клеточного цикла, внутриклеточного оборота и секреции оказались в коровом геноме в меньшинстве (1,24–3,07 %) (рис. 49).

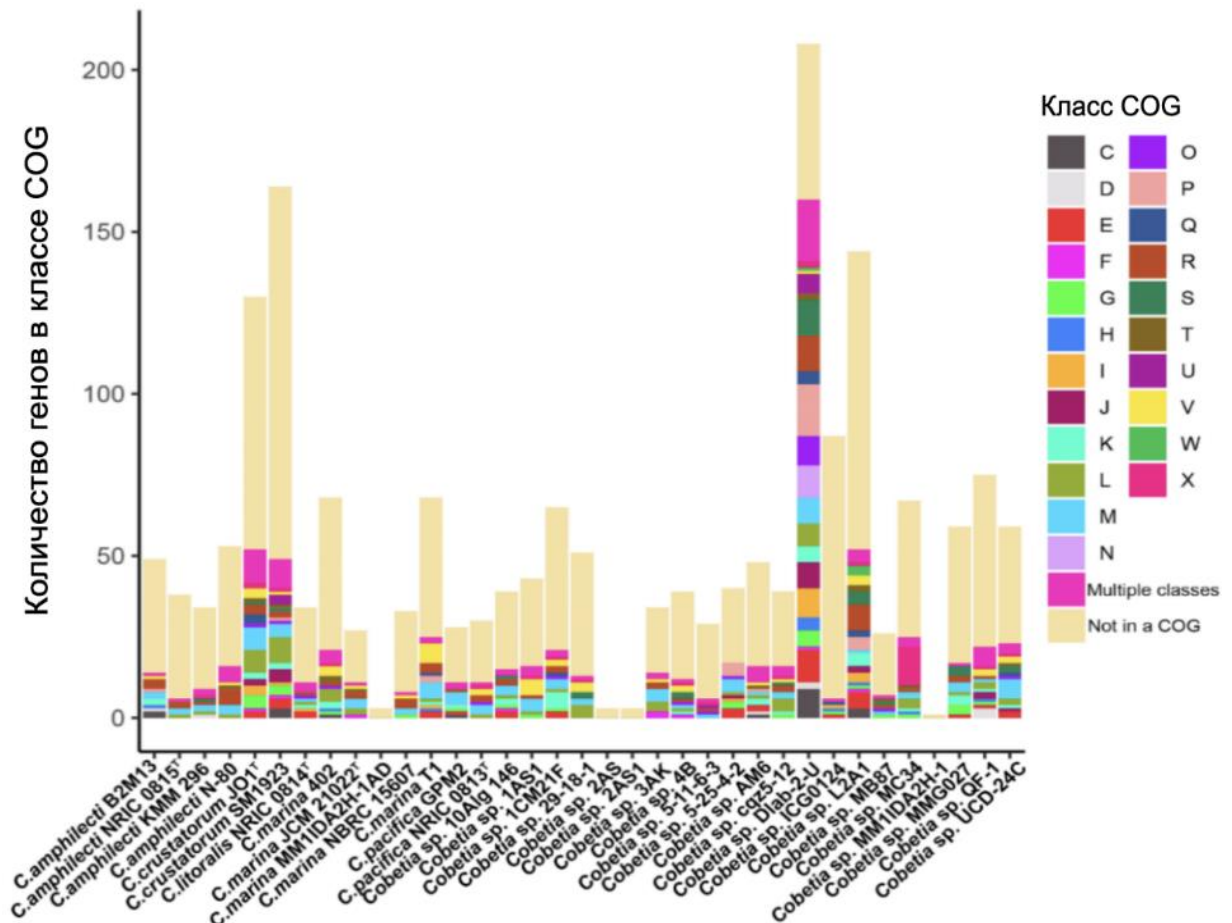


Рисунок 49 – Количество уникальных генов, отнесенных к функциональным категориям COG, в геномах штаммов *Cobetia* spp.: C, производство и преобразование энергии, D, контроль клеточного цикла и митоз, E, метаболизм и транспорт аминокислот, F, метаболизм и транспорт нуклеотидов, G, метаболизм и транспорт углеводов, H, метаболизм коферментов, I, метаболизм липидов, J, трансляция, K, транскрипция, L, репликация и репарация, M, биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки, N, клеточная подвижность, O, посттрансляционная модификация, оборот белка, функции шаперона, P, транспорт и метаболизм неорганических ионов, Q, вторичная структура, R, только общее функциональное предсказание, S, функция неизвестна, T, трансдукция сигнала, U, внутриклеточный трафик и секреция, V, защитные механизмы, W, внеклеточные структуры, X, мобилома: профаги, транспозоны, «Multiple classes» - разные категории COG, «Not in a COG» – категория не определена (Nedashkovskaya et al., 2024)

Стоит отметить, что каждый из геномов *Cobetia* spp. содержит от одного до двухсот восьми уникальных генов (синглтонов) (рис. 49). Наибольшее количество синглтонов наблюдалось в геномах *Cobetia* sp. Dlab-2-U (208 генов), *C. crustatorum* SM1923 (164), *Cobetia* sp. L2A1 (144) и *Cobetia* sp. QF-1 (130). Наименьшее количество уникальных генов приходится на геномы *C. marina* MM1IDA2H-1AD (3), *Cobetia* sp. 2AS (3), *Cobetia* sp. 2AS1 (3) и *Cobetia* sp. MM1IDA2H (1). Остальные геномы содержат от 26 до 87 штаммоспецифичных генов. Согласно аннотации COG наиболее распространенными функциональными категориями синглтонов являются биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки (14,12 % от общего числа уникальных

КГ), общее функциональное предсказание (10,63 %), репликация и репарация (9,8 %), защитные механизмы (6,98 %), метаболизм и транспорт аминокислот (6,48 %) и транскрипция (6,15 %) (рис. 49).

Согласно моделированию размеров пан- и кор-геномов при добавлении новых геномов в набор данных пангеном *Cobetia* spp. является открытым со значением γ , равным 0,43 (рис. 50 А). Кривая регрессии, наилучшим образом подходящая для пангенома, поднимается вверх, что означает расширение пангенома, в то время как кривая основного (корового) генома стремится к плато (Tettelin et al., 2008). Более того, симуляция кривой в соответствии со степенной зависимостью показала, что количество новых генных кластеров, обнаруженных с добавлением каждого нового генома, добавит 52 и 29 генов к пангеному, как и было предсказано для секвенированных геномов, 37-го и 100-го соответственно (рис. 50 Б) (Tettelin et al., 2008).

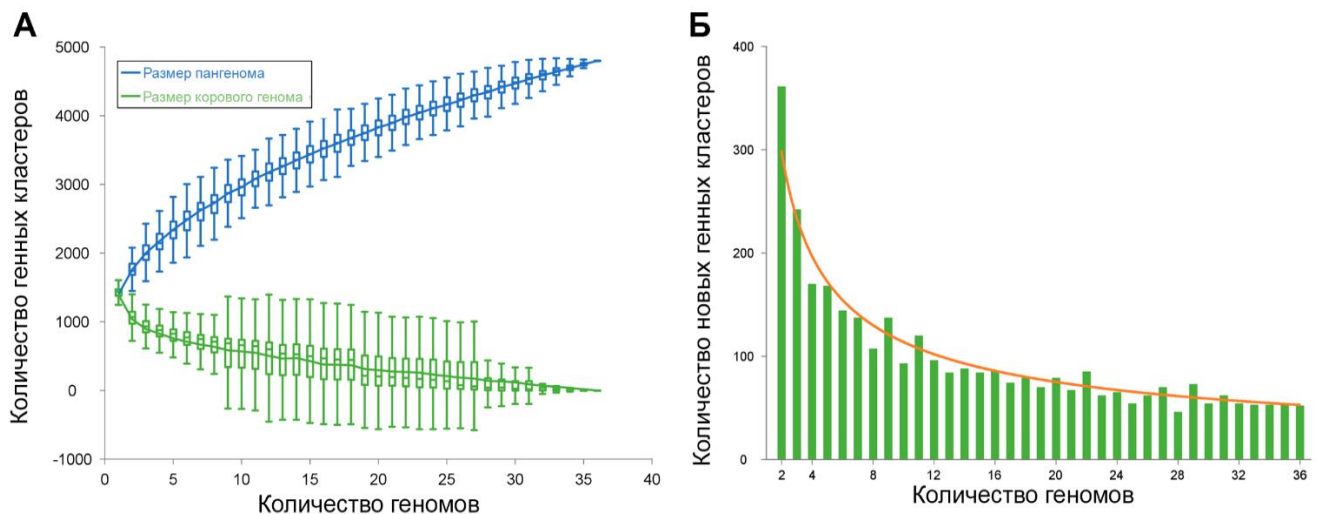


Рисунок 50 – Моделирование пангенома из 36 геномов *Cobetia* spp. (А) Кривые накопления генов пангенома ($y=889,06x^{0,43}+535,51$) и основного генома ($y=1250,45e^{-0,07x}-29,77$). (Б) Зависимость новых ГК от количества геномов ($y=452,537x^{-0,6}$) (Nedashkovskaya et al., 2024)

Таким образом, высокая степень идентичности генов 16S рРНК между видами *C. amphilecti* и *C. litoralis*, а также между видами *C. marina* и *C. pacifica*, затрудняет видовую идентификацию изолятов рода *Cobetia* (табл. А1). Данные по секвенированию и анализу геномов типовых штаммов *C. amphilecti*, *C. litoralis* и *C. pacifica* в виде филогеномного и пангеномного анализа общедоступных геномов рода *Cobetia* подтверждает таксономический статус только трех видов: *C. marina*, *C. amphilecti* и *C. crustatorum*, а также принадлежность штамма КММ296 к виду *C. amphilecti*. Штамм *Cobetia* sp. L2A1 достоверно относится к новому виду (рис. 47, 48). Кроме того, уточнен таксономический статус всех штаммов и изолятов *Cobetia* spp. (Nedashkovskaya et al., 2024).

4.1.7 Анализ биосинтетических кластеров близкородственных типовых штаммов *Cobetia amphilecti*, *Cobetia litoralis*, *Cobetia marina* и *Cobetia pacifica*

Результаты анализа биосинтетических генных кластеров (БГК) близкородственных типовых штаммов рода *Cobetia* (Arahal et al., 2002a, б; Romanenko et al., 2013) подтверждают их видовую демаркацию, основанную на полногеномном и пангеномном анализе настоящего исследования (рис. 47, 48) (Balabanova et al., 2024a; Nedashkovskaya et al., 2024). При рассмотрении основных БГК в геномах *C. amphilecti*, *C. litoralis*, *C. marina* и *C. pacifica* стоит выделить высокий уровень сходства как расположения генов в БГК, так и первичной структуры белков и ферментов (рис. 51, 52).

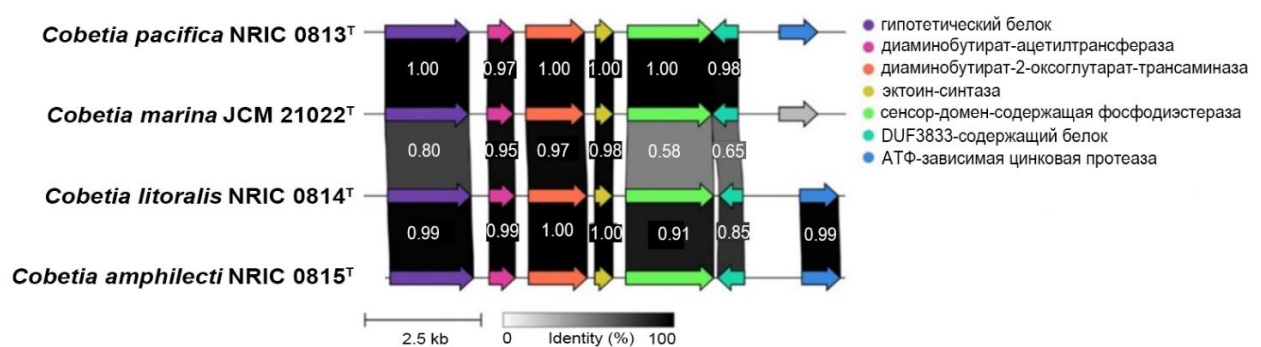


Рисунок 51 – Синтения кодирующих последовательностей генов БГК, ответственных за биосинтез эктоина у типовых штаммов рода *Cobetia*. Функциональная аннотация для каждого гена представлена на панели справа. Степень идентичности гомологичных генов (стрелки одного цвета) при попарном сравнении штаммов показана в виде градиента серого цвета и значениями идентичности (%), идентичные гены обозначены черным блоком. Серая стрелка гена указывает на идентичность ниже порогового значения 0,3 (30 %) (Balabanova et al., 2024a)

Тем не менее, на уровне родоспецифичных БГК можно выделить маркерные последовательности, объединяющие типовые штаммы *C. amphilecti* и *C. litoralis* в один вид, и отличающие их от штаммов *C. marina* и *C. pacifica* (рис. 51, 52). В частности, БГК эктоина дополнительно дифференцирует виды *C. amphilecti* и *C. marina* за счет снижения идентичности последовательностей генов сенсорной системы, таких как дигуанилатциклаза/фосфодиэстераза, а также домен-содержащий белок DUF3833 с неизвестной функцией (рис. 51). Как известно, дигуанилатциклаза/фосфодиэстераза участвует в сигнальном метаболическом пути, который лежит в основе чувствительности бактерий к концентрации циклического дигуанозинмонофосфата (c-di-GMP) – универсального вторичного мессенджера, контролирующего рост клеток, биопленок и производство вторичных метаболитов, включая, по всей видимости, биосинтез эктоина в условиях высокосолевого среды (Noskova et al., 2019; Liu et al., 2021a).

Другой родоспецифичный БГК кодирует метаболический путь Ni-сидерофоров, необходимых бактериям для извлечения труднорастворимого железа (Fe^{3+}) и никеля из окружающей среды (рис. 52).

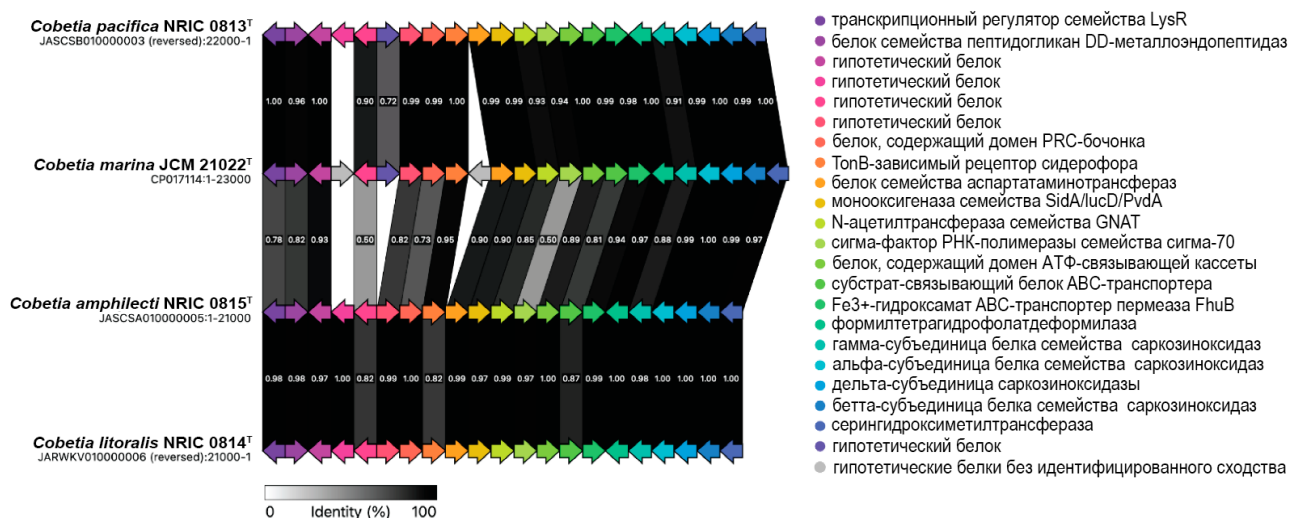


Рисунок 52 – Синтения кодирующих последовательностей генов БГК Ni-сидерофоров типовых штаммов рода *Cobetia*. Функциональная аннотация для каждого гена представлена на панели справа. Различия между генами отражены градиентом серого цвета и значениями идентичности (%). Идентичные гены выделены черными блоками. Гены в виде серых стрелок указывают на идентичность ниже порогового значения 0,3 (30 %) (Balabanova et al., 2024a)

Большинство генов БГК Ni-сидерофоров также слабо различаются между близкородственными видами *Cobetia*, кроме генов одного гипотетического белка (идентичность 0,5) и фактора транскрипции РНК-полимеразы семейства сигма-70 (идентичность 0,5 (рис. 52). Эти гены могут служить дополнительными видоспецифичными маркерами для разграничения двух видов *C. amphilecti* (*C. littoralis*) и *C. marina* (*C. pacifica*) в соответствии с новой классификацией (рис. 47, 48, 52) (Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2024). Высокая степень идентичности БГК Ni-сидерофоров указывает на высокую значимость поглощения железа при росте бактерий в окислительных или желездефицитных условиях, в том числе для включения $\text{Fe}^{2+/3+}$ в активные центры специфических ферментов в качестве кофактора, таких как, например, щелочная фосфатаза/фосфодиэстераза PhoD у *C. amphilecti* KMM 296 (Rodriguez et al., 2014; Noskova et al., 2019). Однако гены фактора транскрипции РНК-полимеразы семейства сигма-70, аспаратаминотрансферазы и монооксигеназы, которые входят в БГК синтеза Ni-сидерофора у всех штаммов рода *Cobetia* (рис. 52), у штамма *C. amphilecti* KMM 296 не обнаружены, что может относиться к штаммоспецифическому характеру метаболизма металлосвязывающих белков (рис. A2).

В отличие от схожих у всех изолятов родоспецифичных БГК эктоина и Ni-сидерофоров, последовательность и состав БГК поликетидсинтазы 1-го типа (T1PKS), по-видимому, является строго штаммоспецифичным признаком (рис. 53). Значения идентичности (%) генов в области синтенности БГК T1PKS типовых штаммов подробно представлены на рисунке А3. Несколько ключевых и консервативных генов, кодирующих синтетазу капсульного полисахарида, НАД(Ф)-зависимую оксидоредуктазу семейства SDR, поликетидсинтазу типа I, оксидоредуктазу семейства DsbA (рис. 53, рис. А3), которые участвуют в синтезе внеклеточных полисахаридов, встречаются во всех геномах, и их дивергенция также совпадает с новой таксономической классификацией рода *Cobetia* (Nedashkovskaya et al., 2024).

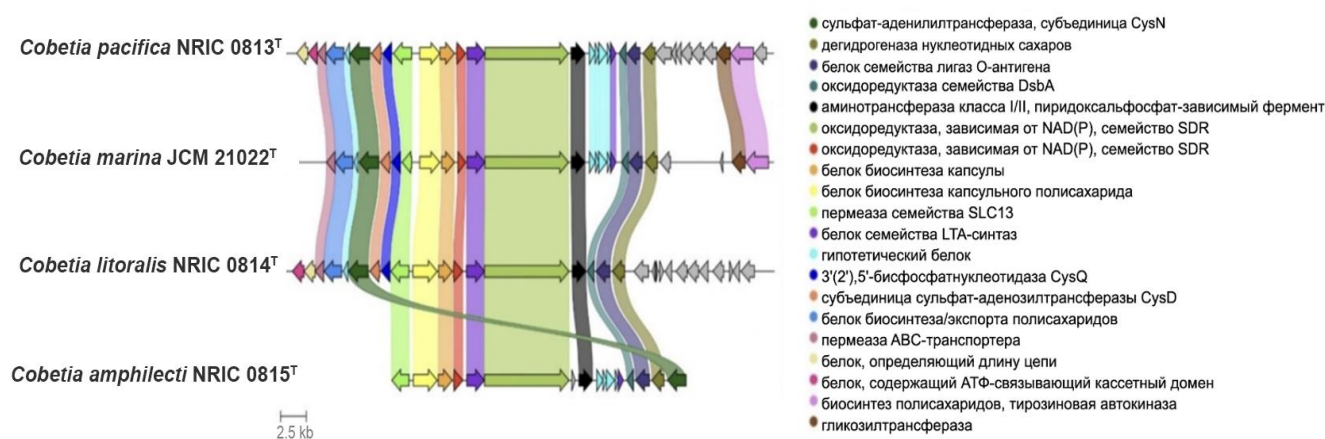


Рисунок 53 – Синтения БГК T1PKS типовых штаммов рода *Cobetia*, ответственных за синтез сульфатированных штаммоспецифичных полисахаридов (Balabanova et al., 2024a)

Установлено, что штаммы *C. pacifica* KMM 3789^T, KMM 3878 и *C. littoralis* KMM 3880^T продуцируют сульфатированные О-полисахариды, состоящие из повторяющихся трисахаридных единиц, включающие D-глюкозу 3-сульфат и D-галактозу 3-сульфат, D-галактозу 2,3-дисульфат и 2-кето-3-дезоксид-D-манно-октановую кислоту 5-сульфат соответственно (Kokoulin et al., 2016, 2022). Для капсульного полисахарида подвида *C. pacifica* показано антипролиферативное действие и ингибирование колоний клеток DLD-1 (аденокарциномы толстой кишки человека) и MCF-7 (рака молочной железы человека) (Kokoulin et al., 2022). В то же время ЛПС как основной компонент клеточной стенки *C. littoralis* KMM 3880^T и его фрагмент – деацетилированный О-полисахарид – подавляли образование колоний клеток меланомы человека SK-MEL-28 и колоректальной карциномы HTC-116 (Kokoulin et al., 2016).

4.1.8 Анализ кодирующих последовательностей ферментов разных функциональных категорий для идентификации близкородственных изолятов *Cobetia*

Несмотря на то, что все изоляты *Cobetia* spp. проявляли активность ЩФ (табл. 8), идентифицировать биотехнологически значимый продуцент высокоактивной ЩФ невозможно без анализа кодирующих последовательностей (CDS) на основе полногеномного секвенирования

штаммов или физико-химических характеристик выделенных и очищенных ферментов (Ivanova et al., 1995, 2004; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015). В отсутствие возможностей полногеномного секвенирования ранее, для дифференциации биотехнологических продуцентов высокоактивных СмАР-подобных ЩФ среди близкородственных штаммов *Cobetia* spp. был предложен метод мультилокусного анализа ПЦР-продуктов генов, кодирующих ключевые гидролазы референсного штамма *C. amphilecti* КММ 296 с охарактеризованным геномом и ЩФ СмАР (табл. 4, табл. А2, рис. А1) (Балабанова и др., 2016; Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2017, 2018a; Noskova et al., 2018a, 2019, 2021, 2023, 2024).

В качестве идентификационных маркеров из аннотированного генома *C. amphilecti* КММ 296 (NCBI ID: JQJA000000000.1) были выбраны CDS ключевых ферментов на основе иерархической классификации широко распространенных семейств белковых доменов, связанных с молекулярными функциями (Lu et al., 2019; Wang et al., 2023): ЩФ структурных семейств PhoA (DQ435608) и PhoD (WP_043333989) (Golotin et al., 2015; Noskova et al., 2019), ЕЕР-подобная (DNaseI-подобная) нуклеаза (WP_084589364) и неспецифическая (S1-подобная) эндонуклеаза ДНК/РНК (WP_043334786), АТФ-зависимая протеаза Clp (KGA03297), фосфолипаза А (WP_084589432) и периплазматическая сериновая пептидаза с трипсиноподобным пептидазным доменом семейства Do/DeqQ (KGA03014) (табл. А2, рис. А1). Сериновые пептидазы семейства Do/DeqQ выполняют функцию шаперона при низких температурах и протеолитическую активность при повышенных температурах, защищая бактерии от термических и других стрессов (Rawlings et al., 2018; Noskova et al. 2023). Clp-протеазы участвуют в ряде клеточных процессов, таких как деградация неправильно сформированных белков, регуляция короткоживущих белков и удаление нефункциональных белков, контроль клеточного роста и функции ДНК-связывающего белка голодных клеток (Rawlings et al., 2018; Noskova et al. 2021). Большое суперсемейство белков, содержащих домен ЕЕР (экзонуклеаза/эндонуклеаза/фосфатаза) (структурное семейство: cl00490), включает разные ферменты, в том числе апуриновые/апиримидиновые (АР) эндонуклеазы EhoIII, инозитолполифосфат-5-фосфатазы (INPP5) и дезоксирибонуклеазу I (DNaseI), которые имеют общий каталитический механизм расщепления фосфодиэфирных связей, причем субстраты варьируют от нуклеиновых кислот до фосфолипидов и, возможно, белков. Неспецифические (S1-подобные) эндонуклеазы ДНК/РНК, принадлежащие к структурному семейству «cl00089: NUC», могут расщеплять как двух-, так и одноцепочечные ДНК и РНК, домен которой может присутствовать в фосфодиэстеразах (Lu et al., 2019; Wang et al., 2023). Таким образом, выбранные для мультилокусного анализа ферменты являются основополагающими для выживания всех прокариот (Noskova et al., 2018, 2019, 2021, 2023, 2025; Rawlings et al., 2018; Zeng et al., 2022; Wang et al., 2023).

Результаты анализа ПЦР-продуктов, полученных с использованием геноспецифичных праймеров ферментов (табл. А2) и ДНК разных изолятов *Cobetia* spp., показали высокий уровень видоспецифичности для *C. amphilecti*. Так, штаммы *Cobetia* sp. 2AS1 (=KMM 7005) и *C. amphilecti* KMM 296 согласно анализу их генов 16S рРНК и геномов принадлежат к одному виду – *C. amphilecti* (рис. 47, табл. А1). Они имеют высокий уровень сходства CDS выбранных для сравнительного анализа ферментов и, следовательно, одинаковую картину профиля и распределения продуктов ПЦР в агарозном геле после электрофореза, за исключением штаммоспецифической ЩФ семейства PhoA (DQ435608) (рис. А1) (Noskova et al., 2021).

При использовании тех же самых олигонуклеотидов в ПЦР (табл. А2) и ДНК изолятов других видов, включая типовые штаммы *C. litoralis*, *C. pacifica* и *C. marina* (прежняя классификация), результаты статистически значимо отличаются от результатов типового штамма и других изолятов *C. amphilecti* (рис. А1). Таким образом, наличие гена ЩФ семейства PhoA является штаммоспецифическим признаком *C. amphilecti* и отсутствует у штаммов *C. litoralis*, в связи с чем существует вероятность разделения вида *C. amphilecti* (новая классификация) на два подвида (рис. А1 (А) и (В)).

Группа изолятов *C. marina/C. pacifica* (KMM 7508, 7515, 6816, 6818, 7505 и 6731) имеет 100%-ую идентичность генов 16S рРНК и результаты, полученные предложенным методом ПЦР-анализа, соответствуют картине, присущей типовому штамму *C. pacifica* KMM 3879^T (рис. А1 (Б) и (Г)). Различия отпечатков на дорожках 1, 4 и 5, может также указывать на принадлежность изолятов к двум разным подвидам – *C. marina* и *C. pacifica* (рис. А1 (Б) и (Г)). Наконец, изолят *C. crustatorum* KMM 6817 и типовой штамм *C. crustatorum* JCM 15644^T значительно отличаются по наличию и распределению ПЦР-продуктов от изолятов других видов *Cobetia* spp., что соответствует результатам анализа генов 16S рРНК и геномов (рис. 47, рис. А1, табл. А1).

Для подтверждения функциональной аннотации CDS ЩФ структурных семейств PhoA (DQ435608) и PhoD (WP_043333989), ЕЕР-подобной (DNaseI-подобная) нуклеазы (WP_084589364), неспецифической (S1-подобной) эндонуклеазы ДНК/РНК (WP_043334786), АТФ-зависимой протеазы Clp (KGA03297), фосфолипазы А (WP_084589432) и периплазматической сериновой пептидазы семейства Do/DeqQ (KGA03014) были получены рекомбинантные белки в клетках *E. coli* и исследованы их физико-химические и ферментативные свойства (Balabanova et al., 2017; Noskova et al., 2018a, 2019, 2021, 2023).

Таким образом, основываясь на результатах геномных, филогенетических, фенотипических и хемотаксономических исследований, предложено отнести вид *C. litoralis* к виду *C. amphilecti*, а вид *C. pacifica* – к виду *C. marina*. В соответствии с правилами приоритета *C. litoralis* должен быть переклассифицирован как более поздний гетеротипический синоним *C.*

amphilecti, а *C. pacifica* – как более поздний гетеротипический синоним *C. marina*. В результате настоящего исследования предложены дополненные описания видов *C. amphilecti* и *C. marina*.

4.1.9 Измененное описание вида *Cobetia amphilecti* (Romanenko et al., 2013)

Описание вида *C. amphilecti* приведено по Romanenko et al. (2013) со следующими изменениями. Клетки оксидазоположительны и подвижны с помощью 1–2 полярных и/или 2–5 латеральных жгутиков. Некоторые штаммы могут требовать для роста морскую воду или NaCl. Преобладающими жирными кислотами (>5 % от общего количества жирных кислот) являются C16:1 ω 7с, C12:0 3-ОН, C16:0, C18:1 ω 7с, C17:0 циклокислота и C12:0. Профиль полярных липидов характеризуется наличием фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидной кислоты, неидентифицированного аминлипида, двух неидентифицированных фосфолипидов и четырех неидентифицированных липидов. Основной дыхательный хинон – Q-8. Содержание Г+Ц в геномной ДНК составляет 62,5 моль. %.

4.1.10 Измененное описание вида *Cobetia marina* (Cobet et al., 1970, Arahall et al., 2002, Romanenko et al., 2013)

Описание вида *C. marina* приведено по Arahall et al. (2002б) и Romanenko et al. (2013) со следующими изменениями. Клетки оксидазоположительны и подвижны с помощью 1–2 полярных и/или 2–5 латеральных жгутиков. Преобладающими жирными кислотами (>5 % от общего количества жирных кислот) являются C16:1 ω 7с, C12:0 3-ОН, C16:0, C17:0 циклокислота, C18:1 ω 7с и C12:0. Профиль полярных липидов характеризуется наличием фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидной кислоты, неидентифицированного аминлипида, двух неидентифицированных фосфолипидов и четырех неидентифицированных липидов. Основной дыхательный хинон – Q-8. Содержание Г+Ц в геномной ДНК составляет 62,2–62,4 моль%.

Таким образом, фенотипическое сходство и геномная гетерогенность штаммов *Cobetia* spp. доказала необходимость анализа их полноразмерного генома для видовой идентификации, на основании которого проведена таксономическая реклассификация и внесение дополнений к описанию ранее установленных видов *C. amphilecti* (Romanenko et al., 2013) и *C. marina* (Arahall et al. 2002б; Romanenko et al. 2013).

4.2 Геномный, пангеномный и фенотипический анализ штаммов морских гетеротрофных гамма-протеобактерий рода *Pseudoalteromonas*

Другой биотехнологически важный представитель морской микробиоты – гамма-протеобактерия *Pseudoalteromonas* sp. штамм КММ 701 (=16-SW-7) (семейство *Pseudoalteromonadaceae*, порядок *Alteromonadales*), был выделен из морской воды и подробно исследован из-за способности продуцировать уникальную высокоактивную альфа-

галактозидазу, превращающую эритроциты группы В (III) в эритроциты “универсальной” группы О (I) в физиологичных для них условиях (оптимумы pH 7,7 и 22 °C) (Слепченко и др., 2017; Bakunina et al., 1998, 2016, 2018, 2018a, 2019; Balabanova et al., 2010, 2020; Utkina et al., 2019, 2021; Nedashkovskaya et al., 2021). Точная видовая идентификация биотехнологического штамма КММ 701 долгое время была недоступна по той же причине – отсутствие геномных данных большинства типовых штаммов многочисленного рода *Pseudoalteromonas*. Кроме того, видовая классификация бактерий рода *Pseudoalteromonas* постоянно пересматривается из-за высокой внутривидовой фенотипической и геномной дивергентности изолятов, собранных в различных морских средах обитания (Bosi et al., 2017; Nedashkovskaya et al., 2021; Balabanova et al., 2023).

Род *Pseudoalteromonas* был предложен Gauthier и др. (1995) путем деления рода *Alteromonas* на два таксона в связи с его высокой степенью гетерогенности. До 2022 года род *Pseudoalteromonas* включал 49 валидно установленных видов, в том числе *P. haloplanktis* в качестве типового вида. Бактерии рода описаны как грамотрицательные, аэробные, хемоорганотрофные, не образующие спор, прямые и изогнутые палочки или яйцевидной формы, подвижные за счет одного полярного жгутика. Все виды рода были оксидазоположительными, требовали морской воды для роста и не накапливали поли-*n*-гидроксibuтират. Впоследствии род был расширен благодаря полученным новым данным, которые включали наличие у новых изолятов полярных, биполярных или латеральных жгутиков, способность к гидролизу желатина и Tween 80, к ферментации глюкозы и способность к размножению почкованием (Ivanova et al., 2002a,б,в, 2004; Hwang et al., 2016; Beurmann et al., 2017). Кроме того, содержание Г+Ц в геномной ДНК было увеличено до 37–55 моль% (Park et al., 2016). В настоящее время содержание Г+Ц в геномной ДНК варьирует от 34,8 моль% у *Pseudoalteromonas denitrificans* DSM 6059^T до 54,9 моль% у *Pseudoalteromonas aestuarii* DB-2^T (Park et al., 2016).

Представителей полифилетического рода *Pseudoalteromonas* часто выделяют из таких морских сред, как поверхностные и глубинные морские воды, осадки и образцы морского льда, асцидии, кораллы, поверхностная слизь иглобрюха, мидии, бурые и зеленые водоросли, диатомовые водоросли и галофитные растения (Bowman, 1998; Sawabe et al., 2000; Egan et al., 2001; Ivanova et al., 2002a,б,в, 2004; Romanenko et al., 2003; Park et al., 2005; Matsuyama et al., 2014; Wu et al., 2017; Navarro-Torre et al., 2020). В связи с таким разнообразием мест обитания, бактерии рода *Pseudoalteromonas* легко адаптируются к условиям локальных морских экосистем, характеризующихся крайними значениями температур. Они способны продуцировать метаболиты разной структуры, имеющие биотехнологическое значение, включая ферменты, разлагающие полисахариды водорослей, и биологически активные соединения с высокой антимикробной и противоопухолевой активностью (Bosi et al., 2017; El-Naggar et al., 2017; Hettle

et al., 2019; Parrilli et al., 2021; Chau et al., 2021). Пангеном рода *Pseudoalteromonas*, рассчитанный Bosi et al. (1917), включал две основные группы: пигментированные и непигментированные штаммы. Авторы отметили значительную геномную гетерогенность даже у близкородственных изолятов рода *Pseudoalteromonas* (Bosi et al., 2017). Было высказано предположение, что пигментация у *Pseudoalteromonas* spp., особенно выделенных из морских беспозвоночных, связана с обогащением генома гибридными кластерами генов, кодирующих синтетазы нерибосомальных пептидов и синтазы поликетидов (NRPS/PKS), и производством биологически активных соединений, таких как альтерохромид, псевдоальтеробактин, альтерамид А, тиомаринолы, индолмицин, пентабромпсевдилин и псевдохелин (Chau et al., 2021).

В настоящем исследовании был охарактеризован непигментированный штамм 16-SW-7, выделенный из морской воды Охотского моря, собранной возле о. Парамушир (Курильские острова) (Nedashkovskaya et al., 2021). Предварительное исследование таксономического положения штамма с помощью секвенирования гена 16S рРНК по Сэнгеру показало его наиболее близкое родство с типовыми штаммами признанных видов, *P. distincta* и *P. paragorgicola*, со сходством 99,9 % по данным EzBioCloud (Yoon et al., 2017). Кроме того, в данной работе были проанализированы общедоступные и новые секвенированные геномы штаммов, предположительно принадлежащих к виду *P. distincta*, выделенных из различных экологических ниш, таких как морская вода, беспозвоночные и водоросли. Для выяснения их видовых особенностей и таксономического положения среди других представителей рода *Pseudoalteromonas* был секвенирован и депонирован в базу данных GenBank (NCBI) типовой штамм нового вида *Pseudoalteromonas elyakovii* из-за отсутствия его валидного генома (Balabanova et al., 2023). Неразличимые фенотипы, хемотаксономические признаки, последовательности белков и метаболические пути потребовали также разграничения видов *P. distincta* и *P. arctica* на основе анализа их полных геномов. Кроме того, полногеномные последовательности были использованы для определения вклада *P. distincta* в пангеном рода *Pseudoalteromonas* для реконструкции штаммоспецифических метаболических путей, в частности, каротиноидов и меланинов в пигментированных штаммах, для предсказания БГК экзополисахаридов и биологически активных соединений, определяющих их внутривидовую геномную и фенотипическую гетерогенность и активную видовую диверсификацию (Balabanova et al., 2023).

4.2.1 Фенотипические характеристики штаммов *Pseudoalteromonas distincta*

До недавнего времени штаммы вида *P. distincta* относили к разным видам полифилетического рода *Pseudoalteromonas*, таким как *P. haloplanktis* (штаммы AC163, TB25, TAE79, TAE80, ANT/505) и *P. elyakovii* (штамм SM1926) (табл. Б4). Вид *Pseudoalteromonas*

paragorgicola с желто-оранжевой окраской колоний, включающий единственный типовой штамм КММ 3548^T, также был нами недавно переклассифицирован в *P. distincta* КММ 3548 (Nedashkovskaya et al., 2021). В то же время типовой штамм *P. distincta* КММ 638^T – единственный представитель вида, который характеризовался наличием черного меланинового пигмента (Romanenko et al., 1995; Ivanova et al., 2004) (рис. 54).

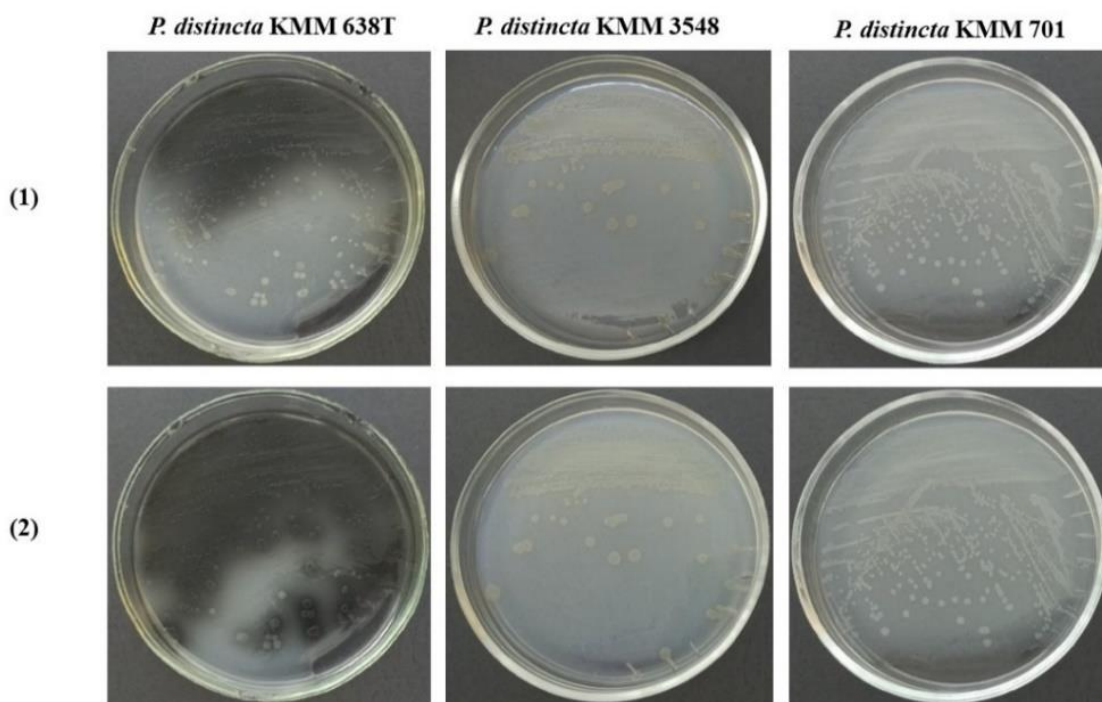


Рисунок 54 – Штаммы *P. distincta* КММ 638^T (слева, диффузная черная пигментация), *P. distincta* КММ 3548 (ранее *P. paragorgicola* КММ 3548^T) (в центре, слабая желто-оранжевая пигментация), *P. distincta* КММ 701 (справа, белые колонии) при культивировании на МА в течение 7 (1) и 9 (2) суток при 24 °С и естественном освещении (Balabanova et al., 2023)

Описанные штаммы *P. distincta* были выделены преимущественно из объектов холодных морских местообитаний: губок, горгоний, водной толщи, донных осадков, а также с поверхности бурых водорослей (Romanenko et al., 1995; Ivanova et al., 2000; Bosi et al., 2017; Hettle et al., 2019).

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК показал, что непигментированный штамм 16-SW-7 (=КММ 701) (рис. 54), выделенный из морской воды, относится к классу *Gammaproteobacteria* рода *Pseudoalteromonas* (Nedashkovskaya et al., 2021). Его ближайшими филогенетическими соседями являются штаммы *P. distincta* КММ 638^T, *P. paragorgicola* КММ 3548^T и *P. arctica* A 37-1-2^T (Balabanova et al., 2023). Кроме того, в каждом геноме *Pseudoalteromonas* spp. с отличающимися фенотипами обнаружены множественные паралоги 16S рРНК (до 12 генов) с межвидовой идентичностью до 99,87–100 % (табл. Б1), что исключало возможность видовой идентификации штамма 16-SW-7 и нового изолята 2-2А-13 (=КММ 6257) классическим методом, основанном на анализе гена 16S рРНК (рис. 3, табл. 10).

Таблица 10 – Различия фенотипических характеристик штаммов: (1) KMM 638^T (Romanenko et al., 1995); (2) 16-SW-7 (= KMM 701) (Nedashkovskaya et al., 2021); (3) KMM 3548 (Ivanova et al., 20026); (4) 2-2A-13 (=KMM 6257); (5) *P. arctica* A 37-1-2^T (Khudary et al., 2008)

Характеристика	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Источник выделения	Губка	Морская вода	Горгонария (коралл)	Морская звезда	Морская вода
Цвет колонии	Белые	Белые	Светло-оранж	Светло-оранж	Светло-оранж
Температура для роста (°C)	4–30	4–34	4–30	4–37	4–25
Соленость для роста (% NaCl)	1–6	1–10	0,5–8	0,5–10	0–9
Потребность в морской воде для роста	+	-	-	-	-
Продукция меланина	+	-	-	-	-
Продукция ацетона	-	-	-	w	-
Продукция H ₂ S	+	-	+	+	-
Гидролиз:					
Казеин	-	Сл.	Сл.	+	+
Желатин	+	+	+	+	-
Крахмал	-	-	+	+	-
Образование кислоты из:					
Целлобиозы, мальтозы	-	+	+	+	+
Галактозы	-	+	+	-	+
Глюкозы, лактозы, ксилозы	-	+	+	-	-
Раффинозы	-	+	-	-	-
Маннитола	+	+	-	+	+
Ассимиляция:					
Цитрат	-	+	Сл.	Сл.	+
Гликоген	+	+	+	-	-
Итаконовая кислота, L-гистидин	-	+	-	-	НД
D-Глюкоза, сахароза, ацетат натрия, L-аланин, L-серин, каприновая кислота	+	+	+	-	+
Цитрат натрия, L-пролин, пропионовая кислота, валериановая кислота	+	+	+	-	НД
2-Кето-глюконат калия, салицин,	-	+	-	-	-
D-Мелибиоза	-	+	+	-	+
D-Сорбитол	-	+	+	-	-
Цитрат	-	+	Сл.	Сл.	+
Чувствительность к:					
Ампициллину, ванкомицину	+	-	+	+	НД
Бензилпенициллину, цефалексину, цефазолину,	-	-	-	+	НД
Олеандомицину,	-	+	+	+	НД
Стрептомицину,	+	+	+	-	НД
Тетрациклину	-	-	+	+	НД
Содержание Г+Ц в ДНК (моль%)	39,2	39,3	39,2	39,2	39,1

Примечание – Положительный: +; отрицательный: -; слабая реакция: Сл.; нет данных: НД. Общее: аэробное дыхание, подвижность, гидролиз эскулина, образование кислоты из сахарозы; отрицательны по нитратредукции, гидролизу агара и мочевины, образованию кислоты из арабинозы, фруктозы, маннозы, L-рамнозы, рибозы, трегалозы, N-ацетилглюкозамина и глицерина, ассимиляции L-арабинозы, L-фукозы, L-рамнозы и N-ацетилглюкозамина.

Выявленная межвидовая неоднородность фенотипических и геномных характеристик при крайне высокой консервативности гена 16S рРНК продиктовала необходимость ревизии таксономической структуры всего рода *Pseudoalteromonas* (Balabanova et al., 2023). Так, исследуемые в данной работе штаммы вида *P. distincta* и типовой штамм *P. arctica* А 37-1-2^Т имели много общих фенотипических свойств, определенных микробиологическими и биохимическими методами (табл. 10). Ряд фенотипических характеристик для штамма *P. arctica* А 37-1-2^Т в таблице 10 отсутствует, так как в первоначальном описании вида не проводилось тестирование с использованием панелей API ID 32 GN, API ZYM (bioMérieux, Франция) и определение антибиотикорезистентности (Al Khudary et al., 2008).

Состав клеточных жирных кислот у штаммов *P. distincta* КММ 638^Т, КММ 701 и КММ 3548 оказался сопоставим с данными для *P. arctica* А 37-1-2^Т (табл. 11).

Таблица 11 – Жирнокислотный состав (%) штаммов *P. distincta* и *P. arctica* А 37-1-2^Т: (1) КММ 638^Т; (2) КММ 701; (3) КММ 3548; (4) *P. arctica* А 37-1-2^Т (Al Khudary et al., 2008)

Жирные кислоты	1	2	3	4
Насыщенные				
C12:0	Сл.	2,8	Сл.	2,4
C14:0	Сл.	3,9	1,3	1,1
C15:0	4,7	2,5	3,0	2,2
C16:0	15,4	18,2	16,0	12,7
C17:0	10,3	6,1	5,8	1,5
C18:0	1,8	1,9	1,4	-
Ненасыщенные				
C15:1 ω8с	4,3	2,7	4,9	1,8
C16:1 ω7с	29,0	30,6	32,1	40,2
C17:1 ω8с	17,9	11,7	15,3	5,5
C18:1 ω7с	5,2	11,0	7,5	7,8
Разветвленные				
изо-C16:0	Сл.	1,0	Сл.	-
Гидрокси				
C10:0 3-ОН	Сл.	Сл.	Сл.	1,2
C11:0 3-ОН	Сл.	Сл.	Сл.	1,1
C12:0 3-ОН	6,3	4,8	7,5	6,4
C13:0 3-ОН	1,2	Tr	1,0	-

Примечание – Сл., следовые количества (<1,0 %); -, нет данных.

Преобладание жирных кислот C16:1 ω7с (29–40,2 %), C16:0 (12,7–18,2 %), C17:1 ω8с (15,3–17,9 %), C18:1 ω7с (5,2–11 %) и C12:0 3-ОН (4,8–7,5 %) в новом штамме КММ 6257 (=2-2А-13) и *P. arctica* А 37-1-2^Т соответствует данным, полученным ранее для штаммов вида *P. distincta* (Romanenko et al., 1995; Ivanova et al., 2002a, б, в; Nedashkovskaya et al., 2021), за исключением того, что *P. arctica* А 37-1-2^Т характеризуется более низким содержанием C17:0 и C17:1 ω8с (табл. 11). Очевидно, что окончательное уточнение таксономического статуса представителей рода *Pseudoalteromonas*, вне зависимости от степени их фенотипического

сходства или различия, достижимо лишь с использованием методов полногеномного профилирования.

4.2.2 Внутривидовые филогенетические связи *Pseudoalteromonas distincta*

Как было показано в предыдущей главе, разграничение видов внутри рода *Pseudoalteromonas* остается затруднительным вследствие значительной фенотипической пластичности (табл. 10, 11, рис. 54) и отсутствия дискриминирующих хемотаксономических маркеров. Ситуация осложняется наличием множественных копий гена 16S рРНК (табл. Б1), характеризующихся как высокой межвидовой идентичностью, так и внутривидовой гетерогенностью (Sawabe et al., 2000).

Для идентификации природных изолятов широко применяется полифазный подход, который, наряду с хемотаксономическими и фенотипическими методами, включает филогеномный анализ и оценку индексов геномного родства, таких как средняя идентичность нуклеотидов (ANI), средняя идентичность аминокислот (AAI) и цифровая ДНК-ДНК гибридизация (dDDH). Таким образом, на основе всестороннего сравнительного геномного анализа представительной выборки штаммов *Pseudoalteromonas* была продемонстрирована значительная геномная гетерогенность как на уровне рода в целом, так и внутри групп близкородственных видов (Bosi et al., 2017). В связи с этим особый интерес представляло уточнение филогенетического положения нового штамма 2-2А-13 (=КММ 6257) и ревизия таксономической структуры рода *Pseudoalteromonas*. С помощью программного обеспечения PhyloPhlAn 3.0 (Asnicar et al., 2020) было сконструировано филогенетическое дерево на основе 400 конкатенированных белковых последовательностей 65 типовых штаммов рода *Pseudoalteromonas* (рис. 55, рис. Б1). Как видно из рисунков 55 и Б1, штамм 2-2А-13 кластеризуется с типовым штаммом *P. distincta* ATCC 700518^T, что подтверждает его принадлежность к данному виду. Значения индексов ANI, AAI и dDDH между штаммами 2-2А-13 и ATCC 700518^T составили 98,12 %, 97,99 % и 82,4 % соответственно. Полученные показатели ANI и dDDH существенно превышают общепринятые пороговые значения (95 % и 70 % соответственно), рекомендуемые для разграничения видов бактерий (Richter, Rosselló-Móra, 2009).

Ввиду отсутствия в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ на момент проведения исследования (дата обращения 05.10.2022) валидных геномных последовательностей вида *Pseudoalteromonas elyakovii*, типовой штамм *P. elyakovii* VKPM В-3905^T был секвенирован в настоящей работе и депонирован под номером доступа JANJFO000000000 (табл. Б2). Согласно филогенетическому анализу, штамм VKPM В-3905^T образует монофилетическую ветвь с высокой поддержкой (bpp = 1,00 или 100 %) в одном кластере с *P. shioyasakiensis* JCM 18891^T

(рис. 55, рис. Б1). Значения индексов ANI, AAI и dDDH между *P. elyakovii* VKPM B-3905^T и *P. shioyasakiensis* JCM 18891^T составили 96,78 %, 97,22 % и 73,6 % соответственно. Полученные значения индексов ANI и dDDH превышают пороговые значения (95 % и 70 % соответственно), рекомендованные для демаркации видов бактерий (Richter, Rosselló-Móra, 2009; Meier-Kolthoff et al., 2013). Таким образом, штаммы *P. elyakovii* и *P. shioyasakiensis* следует рассматривать в составе одного вида (рис. 55, рис. Б1). С учетом приоритетности дат описания (*P. elyakovii* был описан в 2000 г., а *P. shioyasakiensis* – в 2014 г.; Sawabe et al., 2000; Matsuyama et al., 2014), название *P. shioyasakiensis* может быть предложено в качестве позднего субъективного синонима *P. elyakovii*. В остальном топология реконструированного филогенетического дерева (рис. 55, рис. Б1) и взаимное расположение ветвей видов *Pseudoalteromonas* согласуются с данными, полученными ранее Bosi et al. (2017).

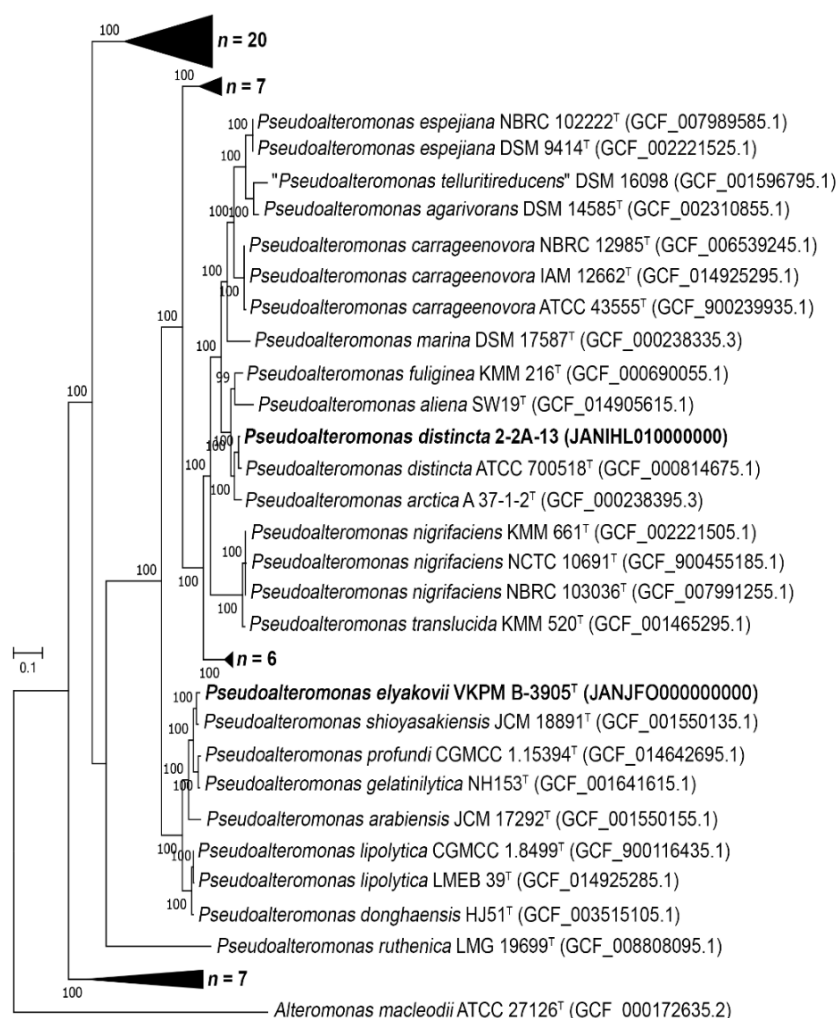


Рисунок 55 – Усеченное филогенетическое дерево ML типовых штаммов *Pseudoalteromonas* spp. (бутстреп из 100 повторов, шкала – 0,1 на позицию). Номера доступов геномов указаны в скобках, жирным шрифтом выделены геномы, собранные в данном исследовании (Balabanova et al., 2023)

Сравнительный геномный анализ и статистические данные, полученные с использованием ресурсов портала EzBioCloud (дата обращения: 05.10.2022), позволили выявить в базе данных GenBank (NCBI) дополнительные геномы, ошибочно депонированные под иными названиями (табл. Б4). Стоит отметить, что EzBioCloud является признанным аналитическим ресурсом в области таксономии, геномики и экологии бактерий и архей (Yoon et al., 2017). Кроме того, анализ кластеров ортологичных групп генов (OGGs) показал, что штамм *P. arctica* A 37-1-2^T фактически принадлежит к виду *P. distincta* (рис. 56).



Рисунок 56 – Матрица попарного сравнения геномов (OrthoVenn2). Тепловая карта отображает количество общих идентифицированных кластеров для каждой пары исследуемых геномов (Balabanova et al., 2023)

Таким образом, применение филогеномного профилирования и попарного сравнения геномов в OrthoVenn2 (Xu et al., 2019) продемонстрировало отсутствие чётких генетических оснований для разграничения видов *P. distincta* и *P. arctica* (рис. 55, 56)

4.2.3 Пангеном штаммов филогеномного кластера *Pseudoalteromonas distincta*

Для детального анализа связей между близкородственными видами рода *Pseudoalteromonas* был проведен пангеномный анализ, включающий 11 доступных геномов вида *P. distincta* (в том числе последовательность нового штамма 2-2A-13) и типовые штаммы видов, входящих в общую филогеномную кладу с *P. arctica* A 37-1-2^T и *P. distincta* ATCC 700518^T (рис. 55, 57). Реконструированный пангеном *Pseudoalteromonas* spp., включающий данные 21 генома, был разделен на следующие фракции: консервативный кор (Core) – гены, присутствующие во всех геномах; "мягкий" кор (Soft-core) – гены, выявленные в 95 % геномов; распределенный

геном (Shell) – гены, обнаруженные более чем в двух, но менее чем в 95 % геномов; и уникальный геном (Cloud) – гены, присутствующие не более чем в двух геномах (рис. 57). Из 10 045 генных кластеров (включающих 84 968 генов) пангеномное ядро (core genome) исследуемых штаммов составило 2 219 кластеров генов (КГ). При этом "мягкий" кор содержит 469 КГ, а вспомогательный геном (accessory genome) представлен 2 316 КГ во фракции Shell и 5 041 КГ – во фракции Cloud (рис. 57)

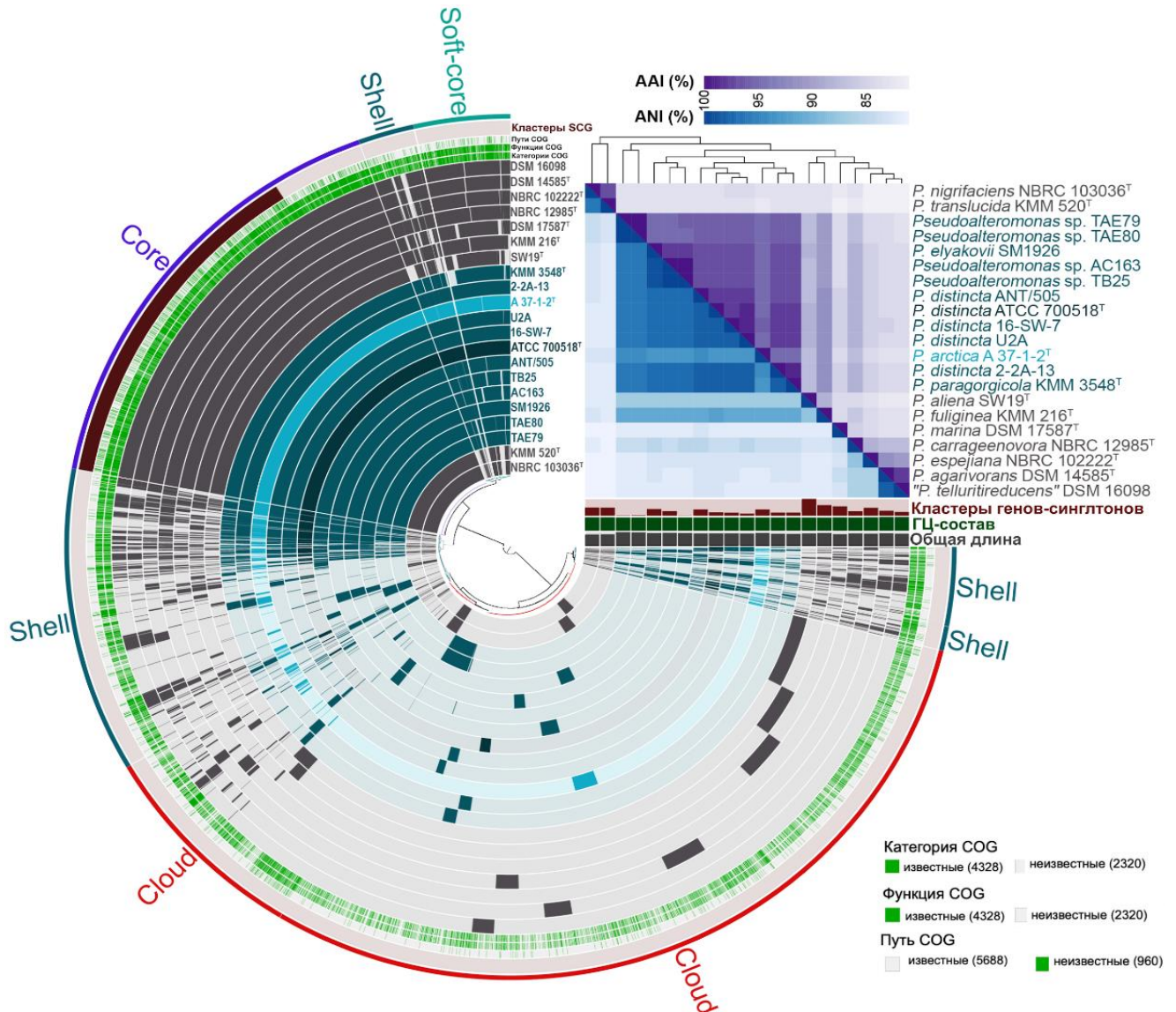


Рисунок 57 – Пангеном 21 штамма видов *Pseudoalteromonas*, принадлежащих к общей филогеномной кладе. Генные кластеры принадлежат к коровому геному (Core), "мягкому" кору (Soft-core), оболочке (Shell) и облаку (Cloud). Цвета геномов: *P. distincta* ATCC 700518^T (темно-синий), *P. distincta* (синий), *P. arctica* 37-1-1^T (голубой), *Pseudoalteromonas* spp. (серый). Тепловая карта отображает ANI и AAI в процентах (Balabanova et al., 2023)

Рассчитанные внутривидовые значения индексов ANI, AAI и dDDH для штаммов *P. distincta* составили 95,67–100 %, 94,57–100 % и 63,60–100 % соответственно (рис. 57). Полученные показатели превышают общепринятые пороги (95 % для ANI и 70 % для dDDH),

рекомендуемые для демаркации видов бактерий (Richter, Rosselló-Móra, 2009; Meier-Kolthoff et al., 2013). Исключение составил штамм *P. distincta* KMM 3548, для которого зафиксировано более низкое значение dDDH (рис. 57)

Существенные различия в значениях dDDH для штаммов *P. distincta* могут быть обусловлены разным уровнем качества сборки их геномов (табл. Б2). Следует отметить, что из всех проанализированных последовательностей только штаммы *P. distincta* 16-SW-7 (GCF_005877035.1) и *P. arctica* A 37-1-2^T (GCF_000238405.3) имеют завершённые геномы (уровня Complete Genome). Каждый из них представлен двумя кольцевыми хромосомами; у штамма *P. arctica* A 37-1-2^T дополнительно присутствует одна плазмида (табл. Б2).

Значения индексов ANI, AAI и dDDH между *P. arctica* A 37-1-2^T и 11-ю штаммами *P. distincta* составили 93,29–94,25 %, 94,70–95,51 % и 52,7–56,9 % соответственно (рис. 57). В то же время при сравнении *P. arctica* A 37-1-2^T с представителями других видов рода *Pseudoalteromonas* эти показатели варьировали в пределах 81,98–90,64 % (ANI), 83,49–91,66 % (AAI) и 25,0–39,1 % (dDDH) (Balabanova et al., 2023). Таким образом, полученные для *P. arctica* A 37-1-2^T значения находятся ниже пороговых уровней (95 % для ANI и 70 % для dDDH), рекомендуемых для демаркации видов бактерий (Richter, Rosselló-Móra, 2009; Meier-Kolthoff et al., 2013).

Таким образом, *P. arctica* и *P. distincta* представляют собой самостоятельные виды, находящиеся на стадии недавней диверсификации и неполной дивергенции от общего предка. Наличие предковой популяции подтверждается высокой степенью филогенетического родства их геномов. В то же время значительная внутривидовая гетерогенность генотипов и фенотипов *P. distincta* указывает на высокую скорость видообразования в данной группе (рис. 54–57). Подобное разнообразие может быть обусловлено реализацией различных адаптивных стратегий: накоплением нуклеотидных замен в результате рекомбинаций и мутаций, множественными дупликациями функционально важных генов, а также регуляцией размера генома и содержания Г+Ц. Кроме того, адаптация может сопровождаться оптимизацией использования кодонов в условиях конкуренции или сосуществования членов популяции в зависимости от факторов окружающей среды (Okie et al., 2020). Однако приобретение адаптивных генов и аллелей может позволить клетке-реципиенту занять новую экологическую нишу с последующей клональной экспансией. Это ведет к формированию рекомбинационного барьера по отношению к родительской популяции и, в конечном итоге, к обособлению нового вида. Недавно было показано, что предковые популяции морских микроорганизмов способны претерпевать множественные акты видообразования в течение всего нескольких десятков тысяч лет (Wang et al., 2022). Вновь формирующиеся популяции – особенно перешедшие к симбиозу или подвергшиеся иным формам локальной изоляции – характеризуются выраженной генетической обособленностью, что указывает на наличие строгого барьера для рекомбинации. Быстрая

эволюция бактерий в морской среде приводит к филогенетической несогласованности (неконгруэнтности) между отдельными генами и их локусами, а также к существенным перестройкам генных кластеров в геномах недавно дивергировавших видов (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020; Wang et al., 2022)

4.2.4 Филогения штаммов *Pseudoalteromonas distincta* на основе корового генома

Результаты филогенетического анализа корового генома на основе конкатенированных последовательностей 1369 однокопийных генов (1 320 659 п.н.) подтвердили топологию дерева, полученного при пангеномном анализе (рис. 57, 58).

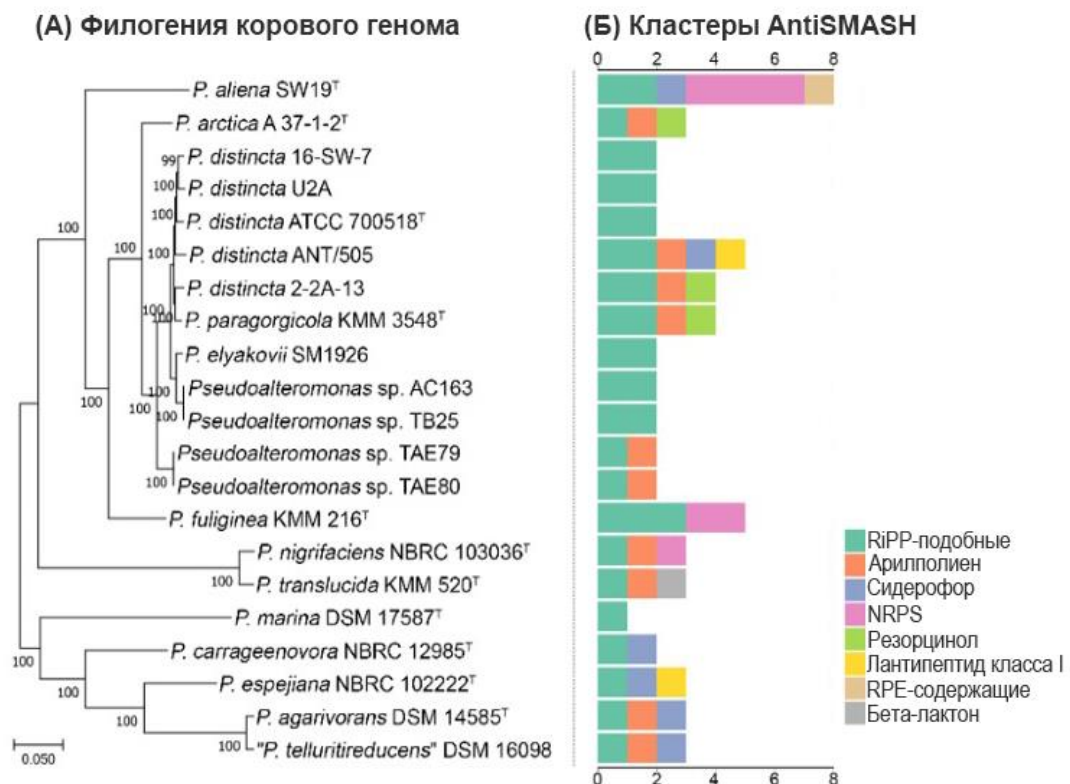


Рисунок 58 – Филогенетическая реконструкция корового генома и метаболический потенциал *Pseudoalteromonas* spp. (А) Филогеномное дерево (ML) для 21 штамма *Pseudoalteromonas* spp. на основе 1369 генов кора с использованием IQ-TREE. (Б) Пути биосинтеза вторичных метаболитов, идентифицированные в геномах (Balabanova et al., 2023)

Установлено, что все штаммы *P. distincta* образуют общую кладу с *P. arctica* A 37-1-2^T как наиболее близкородственным видом (рис. 55, 58 А). В пределах этой группы выделяются три субклады, характеризующиеся высокими значениями бутстреп-поддержки (рис. 58 А). Первая субклада включает типовой штамм *P. distincta* ATCC 700518^T и штаммы 16-SW-7, U2A, ANT/505, 2-2A-13 и KMM 3548. Вторая объединяет штаммы SM1926, AC163 и TB25, а в третью вошли штаммы TAE79 и TAE80 (рис. 58 А)

В целом род *Pseudoalteromonas* можно разделить на группы пигментированных и непигментированных видов. Наличие пигментации, как правило, коррелирует со способностью к синтезу широкого спектра биоактивных молекул, включая антибиотики, токсины/антитоксины, а также противоопухолевые соединения широкого спектра действия или высокой специфичности (Bosi et al., 2017). В то же время непигментированные виды *Pseudoalteromonas* характеризуются высокой ферментативной активностью (в частности, каррагиназной, хитиназной и альгиназой) и обладают более широкой толерантностью к факторам окружающей среды (температуре, активности воды и pH). Кроме того, по сравнению с пигментированными видами они способны использовать значительно более широкий спектр питательных субстратов для обеспечения своего роста (Parrilli et al., 2021). Данный факт может указывать на функциональную специализацию пигментированных представителей рода *Pseudoalteromonas* в сторону ассоциативного образа жизни (симбиотического или патогенного). Вероятно, это стало возможным после формирования развитого арсенала факторов вирулентности и систем антиоксидантной защиты, в том числе за счет синтеза пигментов, позволяющих противостоять иммунному ответу хозяина (Schöner et al., 2016; Grammbitter et al., 2019; Johnston et al., 2021; He et al., 2020; Grammbitter et al., 2020; Balabanova et al., 2023).

4.2.5 Анализ биосинтетических генных кластеров *Pseudoalteromonas* spp.

С помощью сервера antiSMASH в исследуемых геномах *Pseudoalteromonas* spp. идентифицировано множество БГК вторичных метаболитов, а именно: рибосомно синтезируемые и посттрансляционно модифицируемые пептиды (RiPPs), арилполиены (синтезируемые поликетидсинтазами, PKS), нерибосомные пептидсинтазы (NRPS), сидерофоры, арилполиеновые производные резорцина (гибридные кластеры PKS/NRPS), лантипептиды I класса, RiPP-узнающие элементы (RRE-содержащие) и бета-лактоны (рис. 58 Б) (Blin et al., 2023). Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее для рода *Pseudoalteromonas* (Bosi et al., 2017).

Пути синтеза RiPPs широко распространены у представителей *Pseudoalteromonas* spp. и включают от одного до трех БГК на геном (рис. 58 Б, 59). В целом БГК RiPPs у *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T проявили гомологию с кластерами, кодирующими флавин-зависимый биосинтез биологически активных нуклеозидов (4'-фтор-3'-О-β-глюкозиладенозина и О-5'-сульфамиладенозина), продуцируемых почвенной бактерией *Streptomyces calvus* (Feng et al., 2021). Другие выявленные кластеры RiPPs у исследуемых штаммов имели низкую степень сходства с БГК почвенного патогена человека *Nocardia terpenica*, кодирующим синтез известного иммуносупрессора – бразиликардина А (рис. 59). Данное соединение характеризуется

необычным анти/син/анти-пергидрофенантеновым скелетом с углеводной боковой цепью и аминокислотным мотивом строго определенной структуры (Botas et al., 2021) (рис. 59).

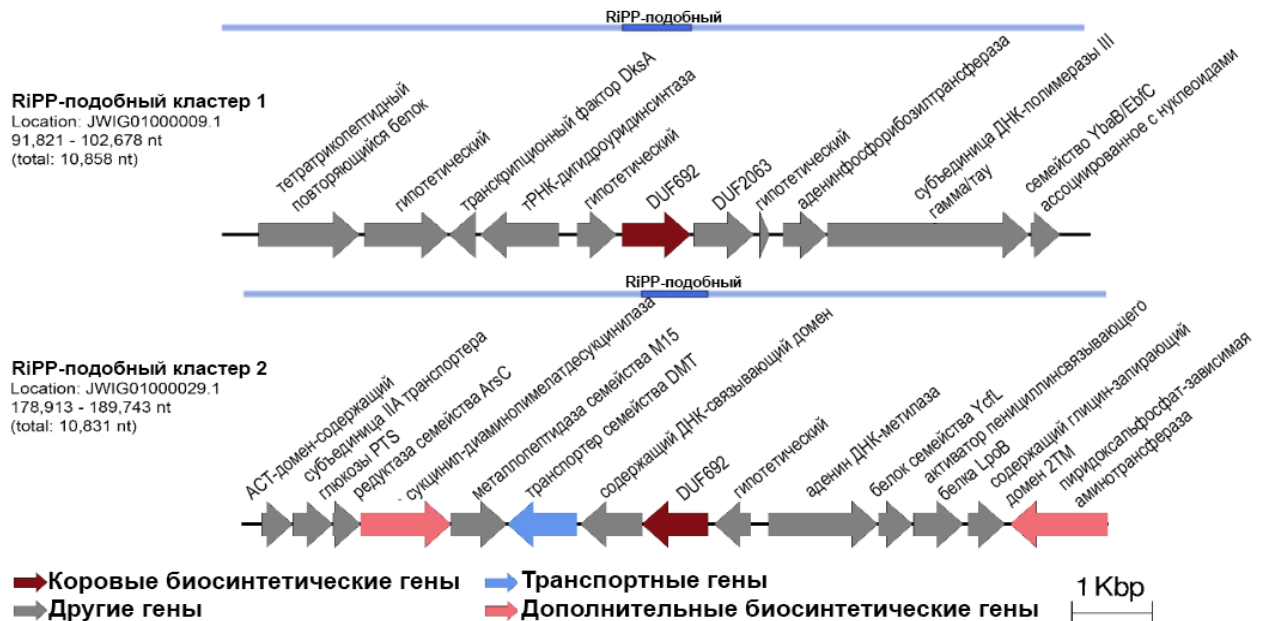


Рисунок 59 – Предполагаемые кластеры генов биосинтеза RiPP-подобных пептидов (1 кластер: нуклеотидин-подобный, 2 кластер: бразиликардин-подобный) у штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T (Balabanova et al., 2023)

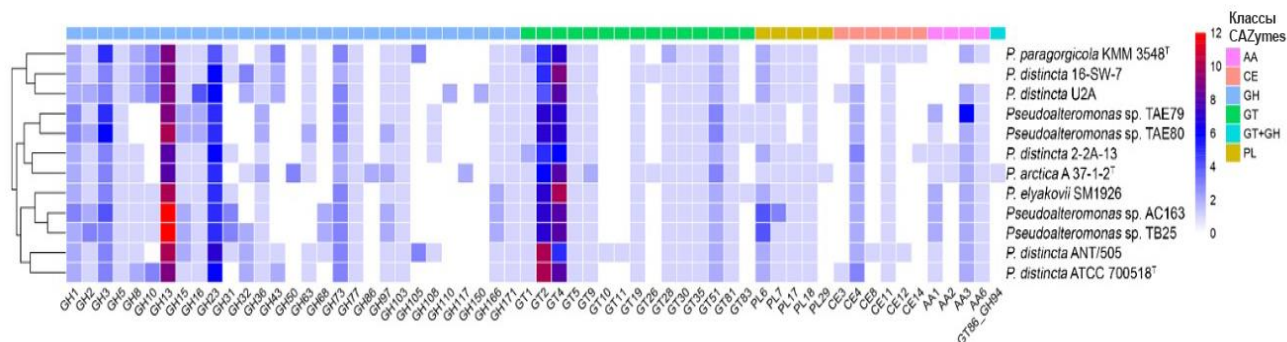
Еще один примечательный кластер генов, кодирующих поликетидсинтазу (PKS), был обнаружен в геномах штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T. Данный кластер участвует в биосинтезе пигментов арилполиенового типа (*ape* BGC) (рис. 58 Б, 60). Арилполиены структурно близки к широко известным каротиноидам. Установлено, что каротиноиды способны модулировать текучесть мембраны при понижении температуры, в то время как арилполиеновые пигменты, подобно каротиноидам, защищают клетки от активных форм кислорода (АФК) (Chattopadhyay, 2006; Schöner et al., 2016; Botas et al., 2021).

Как видно на графике синтении, из 21 исследованного генома арилполиеновые кластеры (*ape* BGC) обнаружены лишь в 10-ти, включая геномы *P. arctica* A 37-1-2^T, *P. distincta* ANT/505, *P. distincta* 2-2A-13, *P. paragorgicola* KMM 3548^T, *Pseudoalteromonas* spp. TAE79 и TAE80, *P. nigrifaciens* NBRC 103036^T, *P. translucida* KMM 520^T, *P. agarivorans* DSM 14585^T и "*P. telluritireducens*" DSM 16098 (рис. 60). В БГК арилполиенов наблюдаются штаммоспецифические различия в протяженности кластера и его геномном составе, особенно в количестве ключевых биосинтетических генов (рис. 60, табл. Б3). В частности, гибридный кластер *ape* BGC, содержащий резорциновый блок (PKS/NRPS), обнаружен только у трех штаммов: *P. distincta* 2-2A-13, *P. distincta* KMM 3548 (ранее *P. paragorgicola* KMM 3548^T) и *P. arctica* A 37-1-2^T, что согласуется с наличием у них желто-оранжевой пигментации (табл. 10, рис. 54, 60).

энтомопатогенных нематод. Установлено, что арилполиены не только защищают клетки от окислительного стресса, но и способствуют формированию биопленок. Подавляющее большинство продуктов синтеза кластеров NRPS и PKS/NRPS у *X. doucetiae* направлено на подавление иммунитета насекомых, обеспечивая инвазию хозяина-нематоды, тогда как лактоны используются бактерией для конкуренции в почвенном микробиоме.

4.2.6 Ферменты углеводного обмена штаммов *Pseudoalteromonas distincta*

Классификация ферментов углеводного обмена, основанная на их структурной организации и субстратной специфичности, представлена в международной базе данных CAZy; такие белки называются углевод-активными ферментами (CAZymes). Они участвуют в синтезе, модификации и расщеплении углеводов и объединены в следующие семейства: гликозид-гидролазы (GH), гликозилтрансферазы (GT), полисахарид-лиазы (PL), углеводные эстеразы (CE), ферменты со вспомогательной активностью (AA) и углеводно-связывающие модули (CBM) (The CAZypedia Consortium, 2018). Ферменты штаммов *Pseudoalteromonas* spp., адаптированные к катализу при низких температурах, находят широкое применение в различных отраслях промышленности: производстве биотоплива и биологически активных моющих средств, переработке пищевых продуктов, бумажном производстве, биodeградации ксенобиотиков в условиях холодного климата, а также в молекулярной и структурной биологии (табл. 1). Распределение классов CAZy, закодированных в геномах *Pseudoalteromonas* spp., представлено на рисунке 61.



согласно данным dbCAN2, выявлено у *P. distincta* 2-2A-13 (72). Суммарно в 11 геномах *P. distincta* было идентифицировано 29 семейств гликозид-гидролаз (GH), 15 – гликозилтрансфераз (GT), 5 – полисахарид-лиаз (PL), 6 – углеводных эстераз (CE) и 4 – ферментов со вспомогательной активностью (AA)

Доминирующими были семейства GH13, GH23, GH3, GT2, GT4, PL6, CE4 и AA3 (рис. 61). Согласно базе данных CAZy (<http://www.cazy.org>; дата обращения: 10.11.2022), ферменты данных семейств аннотированы как гликозидазы широкого спектра действия в отношении субстратов с α -гликозидными связями: α -амилазы, пептидогликан-лиазы, хитиназы, β -D-гликозидазы, β -D-ксилозидазы, α -L-арабинофуранозидазы, β -N-ацетил-D-глюкозаминидазы и альгинат-лиазы. Семейства GT2 и GT4 представляют собой ключевые полиспецифические гликозилтрансферазы. Семейство CE, представленное четырьмя эстеразами, катализирует деацилирование полисахаридов. Семейство AA3 широко распространено и катализирует окисление спиртов или углеводов с одновременным образованием пероксида водорода или гидрохинонов. Подобное разнообразие ферментных комплексов у *P. distincta* и *P. arctica* свидетельствует о высоком потенциале данных штаммов к процессам гликозилирования и деградации сложных углеводов (рис. 61)

Кроме того, штаммы *P. distincta* ATCC 700518^T, KMM 3548, 16-SW-7 и U2A обогащены эндо-1,4- β -ксилазазами и β -ксилозидазами семейств GH1, GH3, GH5, GH8, GH10 и GH43 (Li et al., 2021). Это свидетельствует о способности к эффективной утилизации гемицеллюлозы наземных растений и водорослей, в то время как семейства GH8, GH10 и GH43 отсутствуют у штаммов TAE79 и TAE80 (рис. 61). Штамм *P. distincta* U2A, как и ожидалось, обладает дополнительными гидролазами, способными деградировать поли- и олигосахариды водорослей, такими как GH110 (α -галактозидаза) и GH150 (ι -каррагиназа) (Hettle et al., 2019). Несмотря на то, что штаммы *P. distincta* не проявляют агаролитической активности в условиях культивирования, у штамма *P. arctica* A 37-1-2^T с помощью сервера dbCAN был обнаружен ген агаразы семейства GH50 (рис. 61)

Ряд штаммов *P. distincta*, включая 2-2A-13, ANT/505, TAE79 и TAE80, обладают структурными доменами семейства GH108, ответственного за гидролиз (1 $\rightarrow$ 4)- β -связей между остатками *N*-ацетилмуравовой кислоты и *N*-ацетил-D-глюкозамина в пептидогликанах, а также между остатками *N*-ацетил-D-глюкозамина в хитодекстринах (рис. 61). Данные гены могут кодировать синтез лизоцима, обладающего антимикробной активностью (преимущественно в отношении грамположительных бактерий и микроскопических грибов). Благодаря низкой токсичности для человека подобные ферменты находят широкое применение в обеспечении безопасности пищевых продуктов, предотвращая порчу плодоовощной, мясной и молочной продукции (Khorshidian et al., 2022).

В геномах штаммов KMM 3548 и ANT/505 идентифицировано семейство GH105 (ненасыщенные рамногалактуронил-гидролазы или Δ -4,5-ненасыщенные глюкуронил-гидролазы). Ферменты этого семейства проявляют субстратную специфичность к рамногалактуронану-I, ульвану и арабиногалактану, декорирующим белки клеточной стенки и гликаны растений. Подобная активность характерна для кишечной микробиоты, в частности для бактерий типа *Bacteroidota* (Munoz-Munoz et al., 2017).

4.2.7. Анализ уникальных генов штаммов *Pseudoalteromonas distincta*

Варибельная часть пангенома включает вспомогательные и уникальные гены, характерные для нескольких или отдельных штаммов соответственно. Она обуславливает метаболическую изменчивость и экологическую дифференциацию внутри вида или популяции, что приводит к «микроразнообразию» фенотипических признаков (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020; Koch et al., 2020; Chen et al., 2020b). Примечательно, что каждый из исследованных геномов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T содержит от 7 до 210 уникальных генов, ортологи которых отсутствуют в других геномах *Pseudoalteromonas* spp. (рис. 62).

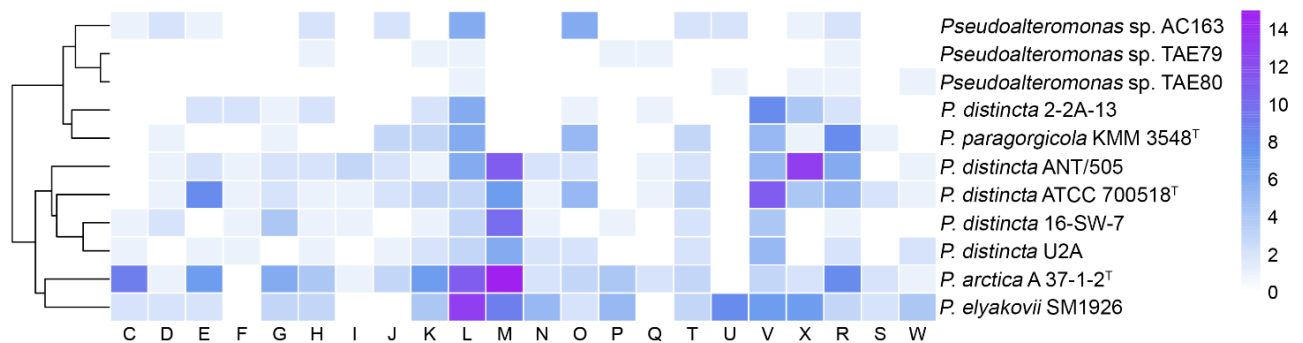


Рисунок 62 – Функциональная аннотация уникальных генов штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T (ортологи для *P. distincta* TB25 не установлены) согласно категориям COG: С – производство и преобразование энергии; D – контроль клеточного цикла и митоз; E – метаболизм и транспорт аминокислот; F – метаболизм и транспорт нуклеотидов; G – метаболизм и транспорт углеводов; H – метаболизм коферментов; I – метаболизм липидов; J – трансляция; K – транскрипция; L – репликация и репарация; M – биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки; N – клеточная подвижность; O – посттрансляционная модификация, оборот белков, функции шаперонов; P – транспорт и метаболизм неорганических ионов; Q – вторичная структура; T – трансдукция сигналов; U – внутриклеточный трафик и секреция; V – защитные механизмы; X – мобилом: профаги, транспозоны; R – только общее функциональное предсказание; S – функция неизвестна; W – внеклеточные структуры

Наибольшее количество уникальных генов выявлено у следующих штаммов (в порядке возрастания): *P. distincta* ATCC 700518^T (107 генов), *Pseudoalteromonas* sp. AC163 (142), *P. arctica* A 37-1-2^T (195), *P. distincta* ANT/505 (196) и *P. distincta* SM1926 (в базе NCBI – *P. elyakovii* SM1926; 210 генов). Для штаммов *P. distincta* 2-2A-13, KMM 3548, 16-SW-7, U2A, TAE79, TAE80

и TB25 количество уникальных генов составило 97, 97, 94, 66, 15, 11 и 7 соответственно. Согласно аннотации COG у уникальных генов наиболее распространенными функциональными категориями были следующие: репликация, рекомбинация и репарация (13,59 % от общего числа уникальных кластеров генов), защитные механизмы (13,59 %), биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки (12,99 %), общая функция (8,15 %), мобилом: профаги, транспозоны (6,94 %), посттрансляционная модификация, оборот белков, шапероны (6,04 %), транскрипция (5,13 %), транспорт и метаболизм аминокислот (4,83 %), транспорт и метаболизм углеводов (3,93 %), механизмы сигнальной трансдукции (3,92 %). По-видимому, эти гены могут быть ответственными за фенотипические различия между штаммами *P. distincta* (рис. 62). В целом анализ пангенома, включающего геномы близкородственных штаммов и видов *Pseudoalteromonas*, выявил высокий процент уникальных генов, что согласуется с данными, полученными Bosi et al. (2017). Примечательно, что большинство уникальных генов *Pseudoalteromonas* являются штаммоспецифичными, за исключением семи генов, общих для штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T (рис. 62).

Вариабельный генетический репертуар часто локализован в эквивалентных генных локусах разных штаммов – геномных островках (GI), которые характеризуются наличием активных механизмов генетического обмена (Bertelli et al., 2017; Koch et al., 2020). Известно, что GI влияют на нишевую специализацию цианобактерий, актинобактерий, розеобактерий и морских гамма-протеобактерий, регулируя углеродный метаболизм, продукцию сидерофоров, бактериоцинов и сборку жгутиков (Koch et al., 2020; Wang et al., 2022).

В геномных островках одиннадцати штаммов *P. distincta* и штамма *P. arctica* A 37-1-2^T было идентифицировано 587 генов, большинство из которых относятся к следующим функциональным категориям COG: транспозазы (60 генов), транслоказы (6), регуляторы транскрипции (39), фосфатный обмен (40), ДНК-связывающие и модифицирующие белки (24); транспортеры (23 гена, включая транспорт витамина B₁₂, рибофлавина (B₂), глицин-бетаина, малата); метилтрансферазы (19), гены множественной лекарственной устойчивости и устойчивости к металлам (12), сульфатный метаболизм (11), 50S рибосомальные белки (9), сенсоры (6), жгутик-ассоциированные белки (6), системы секреции типов I, II и III (6), ферредоксин-подобные белки (5), хинон-редуктазы (5); пермеазы (5 генов, включая пермеазы ксантина, урацила, раффинозы и фосфата); интегразы (4); экспортеры (5 генов, включая экспорт липополисахаридов, треонина/гомосерина, меди); тирозиновые и сериновые рекомбиназы для сайт-специфической рекомбинации (3), нуклеазы и белки нуклеотидной ассоциации (20), протеазы (10) и стрессовые белки (4 гена, включая белки холодового, теплового и фагового шока у свободноживущего штамма KMM 701) (Averianova et al., 2020; Balabanova et al., 2021, 2023).

Многие вспомогательные гены были связаны с метаболизмом липидов и жирных кислот (фосфатидилэтаноламинтрансфераза, фосфолипаза, липопротеинтрансферазы, диацилглицеролкиназа и др.). Примечательно, что 16 биосинтетических генов участвуют в продукции псевдоуридина РНК и тРНК, ГМФ, гликанов, рибофлавина, фолатов и терпенов. Двадцать один уникальный ген кодирует дегидрогеназы, вовлеченные в метаболизм лактата, глутарата, ксантина, спиртов, фосфоната, треонина, аспартата, эритроната, длинноцепочечных альдегидов, ацетальдегида, глицерина и глицеральдегидфосфатов, глицина, шикимата, глутатиона, альдоз, D-бета-гидроксibuтирата и инозитола. Двенадцать аннотированных генов кодируют белки с гидролитическими функциями по отношению к S-формилглутатиону, гидроксиацилглутатиону, оксамату, АДФ, дезоксиуридин-5-трифосфату и 5-гидроксиизоурату.

Исключительно в геномных островках (GI) штамма *P. distincta* U2A, выделенного из бурой водоросли *Fucus* sp. и адаптированного к ферментации водорослевых полисахаридов, были найдены две каррагиназы, одна ульван-активная сульфатаза и четыре α -1,3-галактозидазы. Гены экспорта липополисахаридов и сенсорная киназа адаптивного ответа SasA, отвечающая за связывание с гликопротеиновыми рецепторами врожденного иммунитета при колонизации эпителиальных тканей хозяина, обнаружены только у штамма ATCC 700518^T. Предполагается, что данный штамм может быть патогеном морских губок (Nedashkovskaya et al., 2021; Balabanova et al., 2023). Несмотря на то, что большинство штаммов *P. distincta* не гидролизуют мочевины (табл. 10), такие факторы вирулентности, как уреазы (субъединицы альфа и бета) и вспомогательные белки (кластер из 7 генов), выявлены только в GI *P. distincta* ATCC 700518^T. Это указывает на приобретенный характер способности к биodeградации мочевины у данного штамма (Nedashkovskaya et al., 2021). Гены уреазной системы часто имеют происхождение от цианобактерий, которые широко используют эти системы и находят все большее применение в биотехнологиях утилизации отходов, CO₂ и мочевины (Veaudor et al., 2019).

Примечательно, что пептидогликан-ассоциированные липопротеины присутствовали у всех изолятов *P. distincta*, ассоциированных с морскими животными. Однако гидролаза УДФ-2,4-диацетамидо-2,4,6-тридезокси- β -L-альтропиранозы, участвующая в биосинтезе псевдаминовой кислоты (компонента полисахаридов некоторых кишечных патогенов; Chidwick et al., 2021), выявлена лишь у штаммов КММ 3548 и 2-2A-13 с каротиноидподобными фенотипами (табл. 10, рис. 54). Ряд других генов, связанных с метаболизмом УДФ-сахаров и синтезом полисахаридов (включая сиаловые кислоты и подобные им производные псевдаминовой кислоты, используемые для модификации флагеллина), локализован в геномных островках штаммов с каротиноидным фенотипом (Wang et al., 2018). В штамме *P. distincta* 2-2A-13 обнаружен ген 8-амино-3,8-дидезокси-манно-октилозонат-цитидилилтрансферазы, участвующий в синтезе предполагаемого

холодоспецифичного липоолигосахарида, который ранее был описан у *Shewanella* sp. NM13, выделенной из кишечника ставриды (Casillo et al., 2019).

Кодирующая последовательность 3-аминобутирил-КоА-аминотрансферазы, участвующей в альтернативном пути ферментации лизина в пищеварительном тракте многих организмов (Perret et al., 2011), представлена только у штаммов каротиноидного типа КММ 3548 и 2-2А-13, выделенных из морских животных (табл. 4, 10). В целом в G1 многих штаммов *P. distincta* локализовано несколько дополнительных генов биосинтеза лизина (диаминопимелатный путь, DAP), обеспечивающего превращение аспартата в лизин: диаминопимелатэпимераза, диаминопимелатдекарбоксилаза и N-ацетилдиаминопимелатдеацетилаза (Perret et al., 2011).

Примечательно, что в геномных островках *P. distincta* не обнаружено генов биосинтеза арилполиенов или других кластеров синтеза пигментов – все они имеют стабильную хромосомную локализацию. Исключение составляет ген гомогентизат-1,2-диоксигеназы у штамма AC163 из арктической губки; этот фермент участвует в катаболизме фенилаланина и тирозина, что может приводить к образованию меланиноподобных пигментов (El-Naggar et al., 2017).

4.2.8 Анализ метаболических путей штаммов *Pseudoalteromonas distincta*

Реконструкцию метаболических путей штаммов *P. distincta* проводили с использованием программы gapseq, которая является эффективным инструментом для предсказания фенотипических признаков бактерий на основе их генотипа (рис. 63). Согласно сравнительным исследованиям, gapseq демонстрирует высокую точность в предсказании ферментативной активности, спектра используемых источников углерода, продуктов ферментации и метаболических взаимодействий. Эффективность алгоритма подтверждена экспериментальными данными для 14 931 бактериального фенотипа (Zimmermann et al., 2021).

У штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-1^T идентифицировано от 66 до 100 % генов, относящихся к 81 идентичному и 86 отличительным метаболическим путям, которые были определены программой как достоверные («True pathway») (рис. 63). Данные бактерии способны использовать гликолиз (путь Эмдена – Мейергофа – Парнаса), глюконеогенез, глиоксилатный цикл, путь декарбоксилирования 2-оксоглутарата до сукцинил-КоА (цикл Кребса) и путь β -окисления жирных кислот. Показано, что глиоксилатный шунт является для морских гетеротрофных бактерий важной стратегией акклиматизации в условиях лимитирования по железу (Koedooder et al., 2018). В дополнение к многочисленным путям метаболизма аминокислот, нуклеиновых кислот и кофакторов, способность *P. distincta* и *P. arctica* расщеплять жирные кислоты и нейтрализовать АФК обеспечивает им конкурентное преимущество при адаптации к различным экологическим нишам (Pavoncello et al., 2022) (рис. 63).

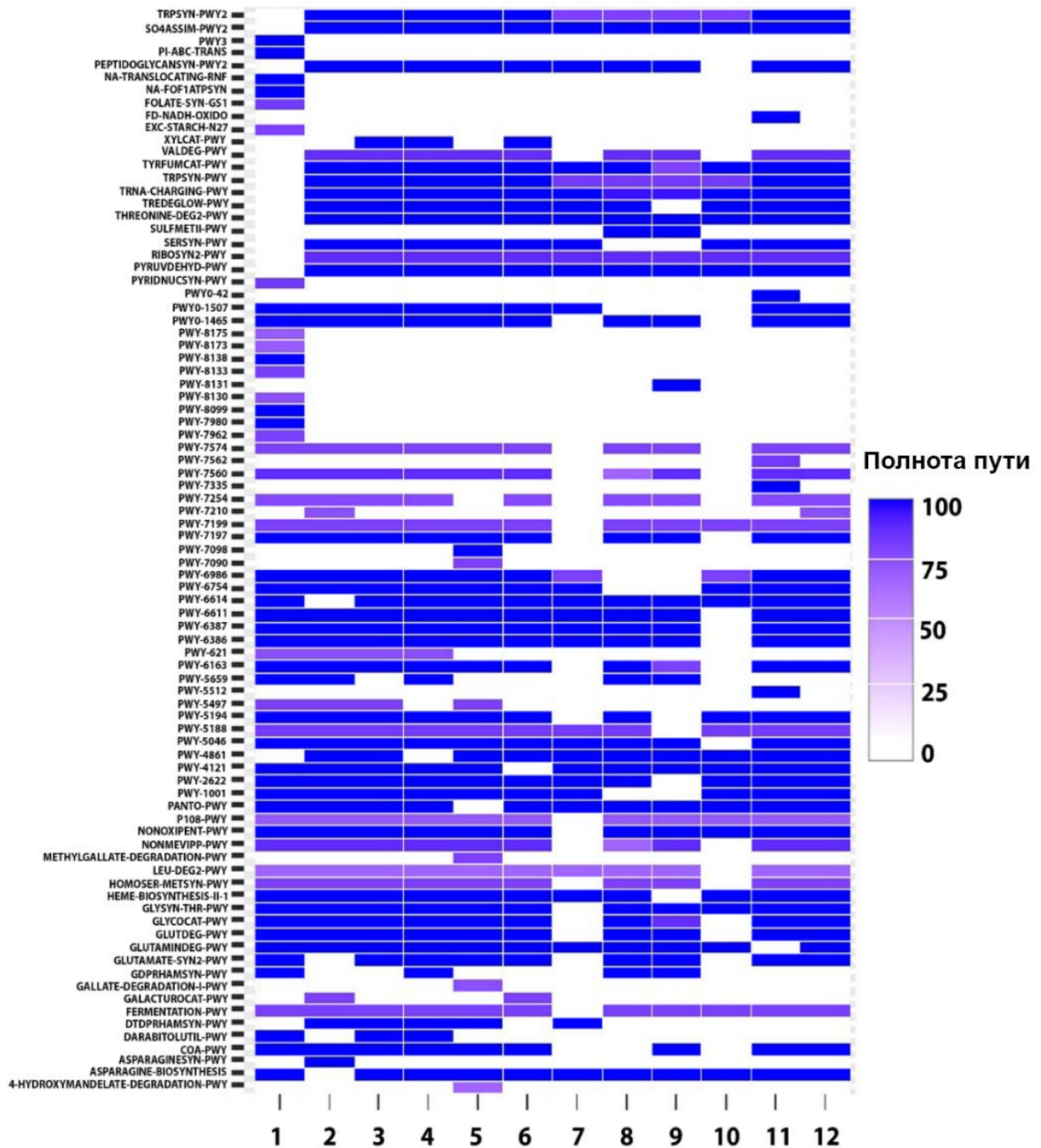


Рисунок 63 – Штаммоспецифические метаболические пути *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T (обозначения путей соответствуют базе данных MetaCyc: <https://metacyc.org>): 1 – *P. distincta* 16-SW-7 (GCA_005877035.1, морская вода); 2 – *P. distincta* ANT 505 (GCA_000212655.3, морская вода); 3 – *P. distincta* ATCC 700518^T (GCA_000814675.1, морская губка); 4 – *P. distincta* U2A (GCA_008370225.1, бурые водоросли); 5 – *P. elyakovii* SM1926 (GCA_007786285.1, поверхностная морская вода); 6 – *P. paragorgicola* KMM 3548 (GCA_014918315.1, морской коралл горгонария); 7 – *Pseudoalteromonas* sp. AC163 (GCA_000497935.1, морская губка); 8 – *Pseudoalteromonas* sp. TAE79 (GCA_000498015.1, морская вода); 9 – *Pseudoalteromonas* sp. TAE80 (GCA_000498035.1, морская вода); 10 — *Pseudoalteromonas* sp. TB25 (GCA_000497995.1, антарктическая морская губка); 11 – *P. arctica* A 37 1 2^T (GCA_000238395.4, морская вода); 12 – *P. distincta* 2-2A-13^T. Градиент цвета отражает полноту метаболического пути (процент идентифицированных генов) (Balabanova et al., 2023)

Несмотря на то, что представители видов *P. distincta* и *P. arctica* являются строгими аэробами в условиях культивирования (табл. 10), они обладают метаболической гибкостью и способны выживать в микроаэрофильных нишах (например, в донных осадках или внутри тканей хозяина). Это подчеркивает их симбиотический или патогенный потенциал. К их путям адаптации к дефициту кислорода или анаэробным условиям относятся: V_{12} -зависимая утилизация этаноламина, биосинтез 3-метилтиопропионата, ферментация пирувата до пропаноата (путь I), биосинтез этилена (путь III), образование ацетата и АТФ из ацетил-КоА (путь II), расщепление цианида, пути деградации сульфоацетальдегида (I) и глутатионзависимого окисления формальдегида (II), расщепление холина (II), биосинтез глицин-бетаина (I), полиглутамилирование фолиевой кислоты, биосинтез полиаминов, расщепление сахарозы (путь IV с участием фосфорилазы), накопление полифосфатов, ассимиляционное восстановление сульфатов и катаболизм ароматических соединений (рис. 63). Некоторые из этих путей ранее были описаны для галофильных архей и морских бактерий (Kaval et al., 2018; Chiu, Paszkowski, 2019). Примечательно, что геномы всех штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T на 88 % укомплектованы генами, кодирующими путь синтеза стрепторубина В. Данное соединение относится к продигининам – семейству трипиррольных антибиотиков (красных пигментов), вызывающих повреждение ДНК (рис. 63). Гены биосинтеза стрепторубина В, обнаруженные у актиномицетов и других эубактерий, ассоциированы с выраженной противоопухолевой, иммуносупрессивной, противовоспалительной, противомаларийной, антигельминтной, противогрибковой и антибактериальной активностью. Предполагается, что этот высокотоксичный метаболит вызывает запрограммированную гибель клеток и регулирует морфологический переход от мицелиального роста к спорообразованию у *Streptomyces* spp. (Tenconi et al., 2018).

К штаммоспецифичным свойствам *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T относится метаболизм полисахаридов (рис. 63). Вариации в составе углеводных остатков О-антигенов обуславливают широкое разнообразие серотипов у разных видов и штаммов. Биосинтез УДФ-N-ацетил- α -D-маннозаминуроната характерен для *P. arctica*, тогда как путь биосинтеза УДФ- α -D-галактуроната I (из УДФ-D-глюкуроната) обнаружен у *P. distincta*, за исключением штаммов 16-SW-7 (КММ 701) и U2A (рис. 63). Путь нуклеотид-активированного переноса D-рамнозы на липид А в составе ЛПС отсутствовал только у штамма ТВ25. При этом биосинтез ГДФ-маннозы, как и биосинтез сукциногликана, выявлен исключительно у свободноживущего штамма 16-SW-7 (рис. 63). Бактериальный сукциногликан может использоваться в качестве вязкотекучего и эмульгирующего агента в пищевой промышленности, а также при упаковке гравия или в качестве агента для контроля потери жидкости (Halder et al., 2017). Путь биосинтеза УДФ-N-ацетилмурамоил-пентапептида II (лизин- и мезо-диаминопимелатсодержащий гликан),

необходимый для построения пептидогликанов клеточной стенки, отсутствовал только у штамма ТВ25. Путь биосинтеза УДФ-N-ацетил-D-галактозамина I (компонент муциноподобных гликопротеинов) выявлен исключительно у *P. arctica*. Путь биосинтеза дТДФ-β-L-рамнозы заложен в геномах штаммов *P. distincta* U2A, SM1926 и AC163 (рис. 63). Практически у всех штаммов обнаружены сигнатуры путей биосинтеза УДФ-β-L-арабинозы I (из УДФ-α-D-ксилозы), УДФ-α-D-глюкуроната (из УДФ-глюкозы), ЦМФ-3-дезоксид-D-манно-октилозоната, целлюлозы и трегалозы (путь IV) (рис. 63). Нуклеотид-сахара – активированные формы моносахаридов – являются необходимыми субстратами для синтеза полисахаридов в составе сложных молекул, катализируемого гликозилтрансферазами. Они участвуют в гликозилировании сигнальных рецепторов, образовании связей между коровыми белками протеогликанов, синтезе и модификации гликопротеинов и липополисахаридов клеточных стенок, обеспечивая жизнеспособность и вирулентность многих микроорганизмов (Wang et al., 2018; van der Beek et al., 2019). В связи с этим пути биосинтеза нуклеотид-сахаров *de novo* представляют интерес для биотехнологии, разработки лекарственных средств, косметологии и промышленности (Mikkola, 2020; Wang et al., 2022).

Пути деградации сахаров и полисахаридов, а также метаболизм аминокислот, витаминов и кофакторов существенно различались у штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T (рис. 63). Несмотря на то, что в геномах *P. distincta* идентифицировано немного генов семейства полисахарид-лиаз (PL) (рис. 61), путь деградации альгината является консервативным признаком для большинства изученных штаммов. Исключение составляют *P. distincta* TAE79 и TAE80, образующие отдельную кладу на филогеномных деревьях (рис. 55, 57, 58 А). Исключительно у *P. arctica* A 37-1-2^T обнаружен путь деградации 3,6-ангидро-α-L-галактопиранозы. Этот метаболический путь имеет биотехнологическое значение для переработки полисахаридов красных водорослей (агарозы и порфирана) как возобновляемой биомассы для производства биотоплива и ценных химических соединений (Balabanova et al., 2023).

Наибольшее количество дополнительных метаболических путей (19) идентифицировано у предположительно свободноживущего штамма *P. distincta* 16-SW-7 (КММ 701) (рис. 63). Напротив, у него отсутствуют общие для других штаммов пути декарбоксилирования пирувата до ацетил-КоА (путь I), биосинтеза флавина (I) и L-серина (I), деградации L-треонина (II) и трегалозы (путь I, активный при низкой осмолярности), а также пути биосинтеза L-триптофана, деградации L-тирозина (I) и L-валина (I) (рис. 63).

В то же время только у штамма 16-SW-7 предсказаны внеклеточная деградация крахмала, утилизация D-арабитола и сахарозы (путь III, сахарозоинвертаза), биосинтез ГДФ-маннозы и сукциногликанов, деградация 4-гидроксиманделата (метаболизм ароматических соединений) и метаболизм полифосфатов. Также выявлены пути биосинтеза жирных кислот с *антеизо*- и *изо*-

разветвленными цепями (обеспечение «гомеовязкой адаптации» мембран), биосинтез АТФ и НАД *de novo* (из аспартата, путь I), расщепление 5'-дезоксиаденозина (I), наличие лейциламинопептидазы (у цианобактерий связана с устойчивостью к УФ-излучению), Na^+ -транслоцирующая АТФаза, комплекс ферредоксин:НАД⁺-оксидоредуктазы и система рециркуляции тетрагидроптеридина (рис. 63). Кроме того, штамм *P. distincta* 16-SW-7 (КММ 701), по-видимому, способен синтезировать аденозилкобинамид-ГДФ из кобирината *a,c*-диамида на поздних этапах биосинтеза витамина В₁₂, что критично для выживания в открытом океане. В этой точке объединяются «ранний» и «поздний» пути включения кобальта (Balabanova et al., 2021). В данном метаболическом пути нижнее лигандное основание (обычно 5,6-диметилбензимидазол) связывается с корриновым кольцом посредством нуклеотидной петли, включающей 1-амино-2-пропанол, фосфатную группу и остаток рибозы (Balabanova et al., 2021).

Дополнительные пути аэробного катаболизма ароматических соединений – деградация метилгаллата и галлата (путь II), ванилина и ваниллата (путь II), основными источниками которых являются растительный лигнин и танины – обнаружены у штамма *P. distincta* SM1926 (рис. 63). Совокупность этих признаков может обуславливать высокую устойчивость к факторам окружающей среды и наличие значительного репертуара факторов вирулентности (Wang et al., 2018).

Путь деградации L-тирозина (I) может приводить к выработке меланина (эумеланина или пиомеланина). В частности, этот путь характерен для типового штамма *P. distincta*, образующего черный диффузный пигмент (рис. 54, табл. 10), тогда как у непигментированного свободноживущего штамма *P. distincta* 16-SW-7 (КММ 701) сигнатуры данного пути в геноме отсутствуют. Другой причиной отсутствия пигментации может быть наличие тетрагидробиоптерина (ВН₄), синтез которого предсказан только для штамма 16-SW-7 (рис. 63). ВН₄ способен неконкурентно ингибировать тирозиназу за счет специфического связывания пиримидинового кольца птеридиновой молекулы с её регуляторным доменом; в результате образование L-допахинона и последующий синтез меланина блокируются (Wood et al., 2004). Однако штамм 16-SW-7 может компенсировать отсутствие антиоксидантной меланиновой или каротиноидной пигментации (табл. 10) за счет рециклизации тетрагидробиоптерина, учитывая его способность к авто- и фотосенсибилизированному окислению в присутствии молекулярного кислорода в возбужденном синглетном (¹O₂) и основном триплетном (³O₂) состояниях (Balabanova et al., 2023).

Кроме того, в результате анализа генов путей метаболизма пигментов у штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T были предсказаны следующие пути биосинтеза предшественников каротиноидоподобных соединений: немевалонатный изопреноидный путь (путь метилэритритфосфата, МЕР II), биосинтез геранилдифосфата и биосинтез *транс,транс*-

фарнезилдифосфата (полнота путей составила 88, 100 и 66 % соответственно), за исключением штаммов AC163 и TB25. Среди предполагаемых каротиноидных путей, подтвержденных результатами BLAST-анализа (Balabanova et al., 2023), в геномах выявлены ключевые гены-кандидаты (кодирующие 4,4'-диаполикопендиаль- и 4,4'-диапонейроспоренальсинтазы/дегидрогеназы). На основании этого наиболее вероятным для *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T является биосинтез 4,4'-диаполикопендиоата и/или стафилоксантина из (2*E*,6*E*)-фарнезилдифосфата (C₁₅-изопреноида). Было показано, что эти ферменты участвуют в биосинтезе относительно редких каротиноидов C₃₀ (тритерпеноидов), к которым относится желто-оранжевый стафилоксантин *S. aureus*. Данный пигмент играет важную роль в вирулентности и детоксикации АФК, генерируемых врожденной иммунной системой хозяина. К этой же группе относится 4,4'-диаполикопеновая кислота метилотрофов рода *Methylomonas* (Kim, Lee, 2012). Оба каротиноидных пути протекают сходным образом: диаполикопеновая оксигеназа активирует оба конца молекулы с образованием альдегидных групп, которые затем окисляются 4,4'-диаполикопендиаль-дегидрогеназами до карбоксильных групп. Заключительный этап пути – модификация с образованием гликозилдиэфира 4,4'-диаполикопендиоата – у *Methylomonas* spp. пока не охарактеризован. Напротив, у морской бактерии *Planococcus maritimus* с ортологичным кластером генов показано опосредованное гликозилтрансферазой образование аналогичного глюкозила C₃₀-каротиноида (Takemura et al., 2021). Тем не менее, функции всех обнаруженных генов, кодирующих ферменты предполагаемого пути биосинтеза C₃₀-каротиноидов у *P. distincta* и *P. arctica*, требуют экспериментального подтверждения.

Таким образом, на основании комплексной геномной и фенотипической характеристики штаммы ATCC 700518^T (=KMM 638^T), 16-SW-7 (=KMM 701), KMM 3548, 2-2A-13 (=KMM 6257), U2A, AC163, TB25, TAE79, TAE80, ANT/505 и SM1926 отнесены к виду *P. distincta*. Описание вида дополнено, в частности, расширен температурный диапазон роста (от 4 до 37 °C). Фенотипические и хемотаксономические признаки, последовательности гена 16S рРНК, метаболические пути, кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов, пангеном-специфичные гены и белковые последовательности (94,70–95,51 % ANI) являются общими для штаммов *P. distincta* и *P. arctica* A 37-1-2^T. Однако низкие значения индексов цифровой гибридизации ДНК (dDDH 52,7–56,9 %) указывают на четкое разграничение видов (порог ≤ 70 %). Несмотря на то, что все штаммы обладают генами биосинтеза метилэритритфосфата (путь MEP II), 4,4'-диаполикопеналя (C₃₀-каротиноиды) и кластерами биосинтеза арилполиенов (*are* BGC), каротиноидная пигментация характерна лишь для трех штаммов: *P. distincta* KMM 3548, KMM 6257 и *P. arctica* A 37-1-2^T. Это коррелирует с наличием в их геномах гибридного кластера PKS/NRPS, кодирующего синтез арилполиена, этерифицированного резорцином (рис. 58 Б, 60).

4.2.9 Измененное описание вида *Pseudoalteromonas distincta* (Romanenko et al., 1995, Ivanova et al., 2000, Nedashkovskaya et al., 2022)

Описание вида *P. distincta* приведено в работах Romanenko et al. (1995), Ivanova et al. (2000) и Nedashkovskaya et al. (2022) со следующими изменениями и дополнениями. Температура для роста варьирует от 4 до 37 °С. В тест-системе API ID 32GN большинство штаммов проявляют положительную ассимиляцию D-глюкозы, мальтозы, сахарозы, D-маннита, ацетата натрия, цитрата натрия, L-аланина, L-серина, L-пролина, гликогена, а также пропионовой, валериановой и каприновой кислот. Продукция ацетона варьирует в зависимости от штамма. Содержание Г+Ц в геномной ДНК составляет 39,1–39,3 мол. %. Типовым штаммом является КММ 638^T (=ATCC 700518^T), выделенный из морской губки, собранной на глубине 350 м вблизи Командорских островов (Россия). Номер доступа к сборке генома типового штамма в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ – GCA_000814675.1.

4.3 Геномный, пангеномный и фенотипический анализ штаммов морских гетеротрофных альфа-протеобактерий нового рода *Rhodalgimonas*

Штамм морской бактерии 10Alg 79^T был выделен из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*, собранной у острова Парамушир (Курильские острова, Охотское море, Россия). В данном исследовании он описан как представитель морских гетеротрофных протеобактерий, принадлежащий к классу *Alphaproteobacteria* (тип *Pseudomonadota*, порядок *Rhodobacterales*, семейство *Roseobacteraceae*). По результатам анализа гена 16S рРНК в базе EzBioCloud штамм 10Alg 79^T показал наибольшее сходство (97,40 %) с '*Tropicibacter alexandrii*' LMIT003^T, за ним следуют *Shimia sediminis* ZQ172^T (97,33 %), *Shimia aestuarii* DSM 15283^T (96,75 %) и *Aliishimia ponticola* MYP11^T (96,75 %) (Yoon et al., 2017). Однако филогенетические деревья 16S рРНК, реконструированные с помощью алгоритмов ML (рис. В1), MP и NJ, продемонстрировали низкую поддержку ветвей и топологическую несогласованность (Nedashkovskaya et al., 2023). При этом филогенетическое дерево ML, построенное на основе 43 последовательностей белков RpoC (рис. В2), показало, что 10Alg 79^T образует слабо поддерживаемую кладу с представителями других родов семейства *Roseobacteraceae* – *M. arenosa* KCTC 52189^T, *A. porphyridii* L1 8-17^T и *L. algarum* DSM 24677^T (Nedashkovskaya et al., 2023). В связи с этим типовые штаммы *A. porphyridii* JCM 31543^T и *M. arenosa* KCTC 52189^T были использованы в качестве референсных в параллельных тестах (табл. В1). Для сравнительного анализа фенотипических характеристик штамма *L. Algarum* ZXM100^T, соседствующего с новым изолятом на геномном древе, использовали литературные данные (Li et al., 2012) (рис. 64, табл. В1).

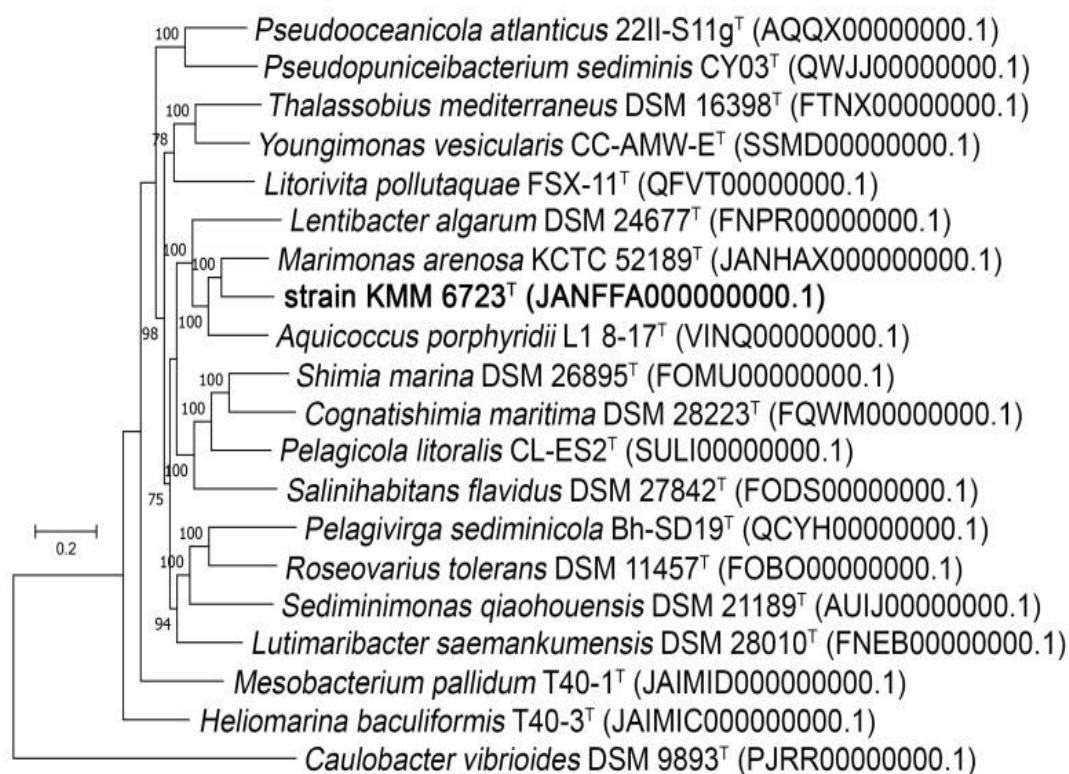


Рисунок 64 – Филогеномное дерево (ML), отражающее филогенетические отношения между штаммом 10Alg 79^T (=KMM 6723^T) и другими представителями семейства *Roseobacteraceae*. Представлены значения бутстреп-поддержки выше 50 % (100 реплик). Шкала соответствует 0,2 замены на аминокислотную позицию. Штамм *Caulobacter vibrioides* DSM 9893^T использован в качестве внешней группы. В скобках указаны номера доступа в базах данных GenBank/EMBL/DBJ (Nedashkovskaya et al., 2023)

Значения ANI/AAI между геномами штамма 10Alg 79^T и представителей трех близкородственных родов – *M. arenosa* KCTC 52189^T, *A. porphyridii* L1 8-17^T и *L. algarum* DSM 24677^T – составили 78,15–73,08 %, 77,85–71,35 % и 75,63–67,41 % соответственно. Кроме того, геном 10Alg 79^T продемонстрировал низкие значения dDDH (формула *d4*) с геномами *M. arenosa* KCTC 52189^T (19,4 %), *A. porphyridii* L1 8-17^T (19,8 %) и *L. algarum* DSM 24677^T (18,8 %). Эти показатели существенно ниже порогов демаркации видов (Richter, Rosselló-Móra, 2009; Colston et al., 2014). Значения AAI между 10Alg 79^T и представителями других родов находились в пределах 67,41–73,08 %, что не превышает порога разграничения родов (80 %; Luo et al., 2014). Таким образом, филогеномный анализ однозначно подтвердил, что 10Alg 79^T представляет собой новый вид нового рода в семействе *Roseobacteraceae* (ранее *Rhodobacteraceae*).

Примечательно, что поиск последовательностей 16S рРНК, гомологичных 10Alg 79^T, в базах данных NCBI, Greengenes, EzBioCloud и SILVA выявил лишь два гена (JQ215453.1 и JQ212029.1) с идентичностью 99 %. Оба они принадлежат клонам некультивируемых бактерий, выделенных от дельфина *Tursiops truncatus* в 2011 и 2013 годах. Таким образом, штамм 10Alg

79^T представляет новый вид бактерий редкого рода семейства *Roseobacteraceae*, названного *Rhodalgimonas* (*Rho.do.al.gi.mo'nas*. Gr. adj. *Rhodos* – красный, розовый; L. fem. n. *alga* – морская водоросль; L. fem. n. *monas* – монада, единица; N.L. fem. n. *Rhodalgimonas* – монада, выделенная из красной морской водоросли) (Nedashkovskaya et al., 2023).

4.3.1 Геномные характеристики и родоспецифичные особенности *Rhodalgimonas*

Проект генома штамма 10Alg 79^T был собран *de novo* в 73 контига со значением *N*50, равным 702 161 п.н., и значением *L*50, равным двум. Размер генома оценивается в 3 754 741 п.н. при общем содержании ГЦ-пар 62,1 %. Выделенная из генома последовательность гена 16S рРНК идентична (100 %) последовательности, полученной методом ПЦР-амплификации. Геном содержит 3739 кодирующих последовательностей (CDS), 41 ген тРНК и 4 гена рРНК (по одному гену 16S и 23S, а также два гена 5S). Сравнение характеристик генома 10Alg 79^T с типовыми штаммами близкородственных родов представлено в таблице В1. Данные показатели удовлетворяют минимальным стандартам, предложенным для таксономии бактерий (Chun et al., 2018).

Для выяснения генетических особенностей рода *Rhodalgimonas* проведен пангеномный анализ штамма 10Alg 79^T и представителей трех близкородственных родов с использованием ортологичной кластеризации на серверах OrthoVenn2 и OrthoVenn3 (Sun et al., 2013; Xu et al., 2019). Анализ выявил 3374 ортологичных кластера (семейства генов), из которых 1602 являются однокопийными и представлены во всех исследованных линиях. Коровый (core) и вспомогательный (accessory, без учета уникальных генов) геномы состоят из 2167 и 1022 ортологичных кластеров соответственно (рис. 65). Большинство кластеров штаммов 10Alg 79^T, *M. arenosa* KCTC 52189^T (141) и *A. porphyridii* L1 8-17^T (116) являются общими (рис. 65). Эти результаты согласуются с положением 10Alg 79^T на филогеномном дереве: штаммы *M. arenosa* KCTC 52189^T и *A. porphyridii* L1 8-17^T проявляют более близкое генетическое родство с новым изолятом, чем *L. algarum* DSM 24677^T (рис. 64). В общей сложности 185 кластеров идентифицированы как специфичные для нового рода (рис. 65).

Из 16163 генов, идентифицированных в пангеноме штаммов исследуемых родов, образующих общую кладу (рис. 64), 2312 были отнесены к синглтонам, не имеющим ортологов. Из них 413 синглтонов обнаружены в геноме 10Alg 79^T; за ним следуют *L. algarum* DSM 24677^T (410), *A. porphyridii* L1 8-17^T (713) и *M. arenosa* KCTC 52189^T (775). Анализ уникальной части каждого генома показал, что большинство этих генов аннотированы как гипотетические белки (более 60 %). Аннотированные синглтоны чаще всего относятся к транспортным системам, регуляторам транскрипции и ферментам (рис. 65).

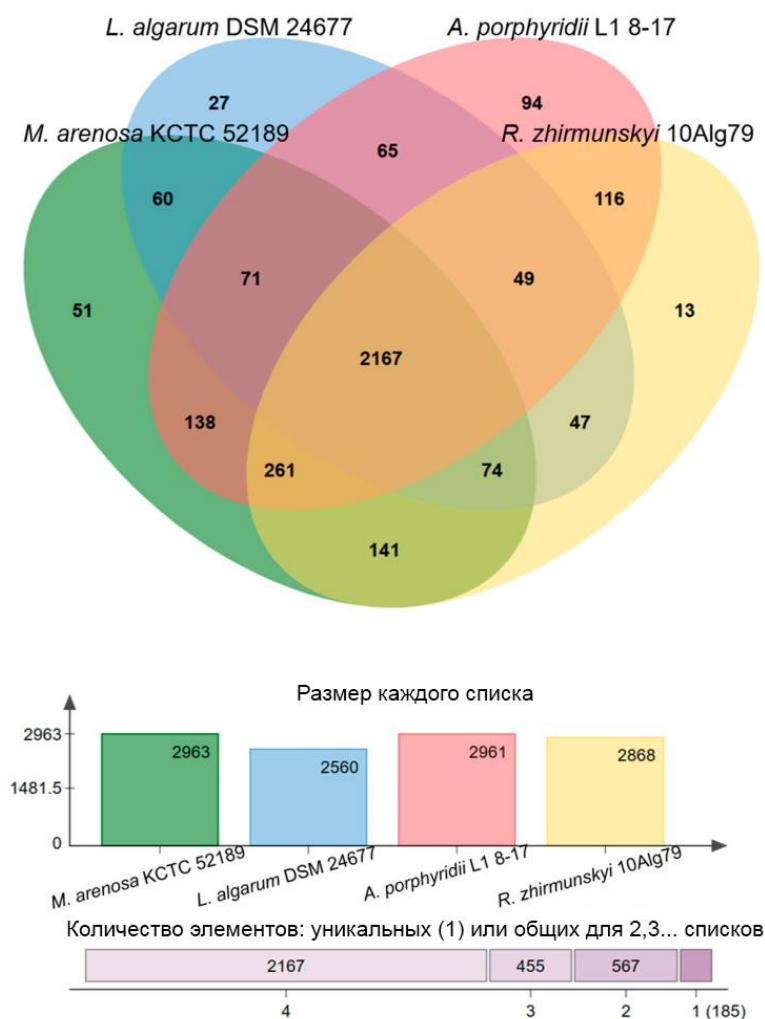


Рисунок 65 – Диаграмма Венна, отражающая распределение общих ортологичных кластеров между геномами штаммов 10Alg 79^T, *A. porphyridii* L1 8-17^T, *M. arenosa* KCTC 52189^T и *L. algarum* DSM 24677^T. Ортологичные кластеры сформированы на основе белков, предсказанных с помощью сервера RAST (Aziz et al., 2008). Общее количество ортологичных кластеров для каждого генома представлено на вертикальной гистограмме

Для реконструкции метаболизма штамма 10Alg 79^T и представителей ближайших родов геномы были проверены на наличие генов центрального и периферического углеродного обмена в связи с их способностью расти на различных источниках углерода (табл. B1). Согласно аннотации в базе KEGG, геномы содержат гены путей гликолиза и глюконеогенеза, за исключением ключевого гена, кодирующего 6-фосфофруктокиназу (EC 2.7.1.11), в пути Эмдена – Мейергофа – Парнаса. Однако модифицированный метаболизм может включать пентозофосфатный путь (PPP) благодаря наличию генов трансальдолазы (EC 2.2.1.2) и транскетолазы (EC 2.2.1.1). Кроме того, были обнаружены гены пути Энтнера – Дудорова (EDP) (за исключением *L. Algarum* DSM 24677^T), которые могут обеспечивать превращение глюкозо-6-фосфата в глицеральдегид-3-фосфат и пируват. Все исследованные геномы лишены гена *gnd*,

кодирующего 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (ЕС 1.1.1.44), участвующую в окислительной фазе PPP-пути. Полуфосфорилирующий и нефосфорилирующий пути EDP представлены неполным набором генов. Это указывает на то, что данные бактерии не способны утилизировать глюкозу каноническими путями и производить НАДФН в окислительной ветви PPP-пути. Все геномы кодируют полный цикл трикарбоновых кислот (ТЦК). Примечательно, что геном *M. arenosa* KCTC 52189^T также кодирует полный цикл Кальвина – Бенсона – Бассема, в котором ключевой фермент RuBisCO (ЕС 4.1.1.39) кодируется генами *rbcLS* и сопровождается молекулярными шаперонами *cbbQ* и *cbbO* для повышения эффективности фиксации CO₂ (Tsai et al., 2015). Все четыре генома содержат общие гены и опероны, участвующие в фосфатном обмене: *pstSCAB* (высокоаффинный фосфат-специфичный транспортер, ТС 3.A.1.7.1), *phnCDE* (фосфонатный ABC-транспортер, ТС 3.A.1.9.1), *phnGHIJLNM* (комплекс углерод-фосфорной лиазы), *ugpBAEC* (транспортер глицерол-3-фосфата), *ugpQ* (глицерофосфорилдиэфир-фосфодиэстераза, ЕС 3.1.4.46), *prx* (экзополифосфатаза, ЕС 3.6.1.11), *ppa* (пирофосфатаза, ЕС 3.6.1.1) и *prk* (полифосфаткиназа, ЕС 2.7.4.1).

Все четыре генома (табл. B1) обладают набором ортологичных генов, участвующих в ассимиляции аммиака: *gdh* (глутаматдегидрогеназа, ЕС 1.4.1.2 и ЕС 1.4.1.4), *glnA* (глутаминсинтетаза, ЕС 6.3.1.2), *gltBD* (глутаматсинтаза, ЕС 1.4.1.13), *gltB* (ферредоксинзависимая глутаматсинтаза, ЕС 1.4.7.1) и *nadE* (аммонийзависимая НАД-синтетаза, ЕС 6.3.1.5). При этом ни один из геномов не обладает полным набором генов для денитрификации. Геномы *A. porphyridii* L1 8-17^T и *M. arenosa* KCTC 52189^T кодируют ферменты для восстановления нитритов, оксида азота и закиси азота. Геном 10Alg 79^T содержит гены только для восстановления нитритов и закиси азота, тогда как у *L. algarum* DSM 24677^T указанные гены отсутствуют. Вместе с тем в геноме *L. Algarum* DSM 24677^T присутствует ген *ncd2*, кодирующий нитронат-монооксигеназу (ЕС 1.13.12.16), которая катализирует окисление нитроалканов до нитритов.

Кроме того, для сравнения потенциала утилизации углерода штаммами 10Alg 79^T, *A. porphyridii* L1 8-17^T, *M. arenosa* KCTC 52189^T и *L. algarum* DSM 24677^T с помощью сервера dbCAN2 (Zhang et al., 2018) были предсказаны гены, кодирующие углевод-активные ферменты (CAZymes) (рис. 66). Геном штамма 10Alg 79^T содержит 60 кодирующих последовательностей CAZymes, включая 15 гликозид-гидролаз (GH), 36 гликозилтрансфераз (GT), три углеводные эстеразы (CE), семь белков со вспомогательной активностью (AA) и один углевод-связывающий модуль (CBM) (рис. 66).

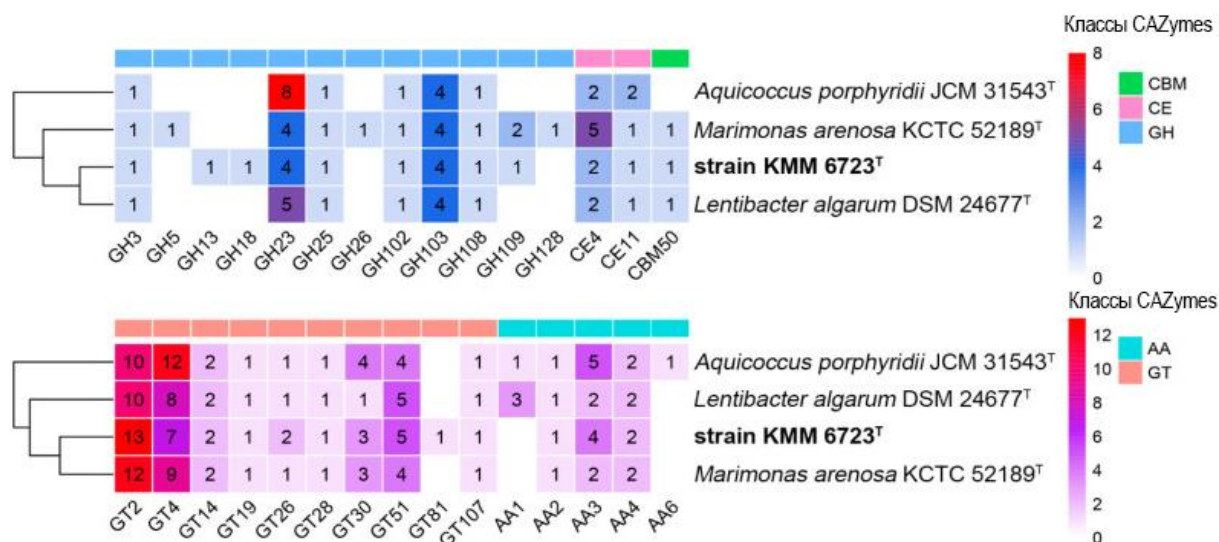


Рисунок 66 – Распределение углевод-активных ферментов (CAZymes) в геномах штамма 10Alg 79^T (=KMM 6723^T) и близкородственных видов. Тепловая карта отражает количество генов, отнесенных к отдельным семействам CAZy. Строки кластеризованы на основе евклидовых расстояний. Сокращения: GH – гликозид-гидролазы; GT – гликозилтрансферазы; CE – углеводные эстеразы; AA – белки со вспомогательной активностью; CBM – углевод-связывающие модули

Анализ генома 10Alg 79^T на наличие биосинтетических генных кластеров (БГК) вторичных метаболитов выявил пять кандидатов: пути синтеза нерибосомальных пептидов (NRPS-подобные синтетазы), поликетидов (гибридный БГК PKS/NRPS; рис. 67) и рибосомно синтезируемых и посттрансляционно модифицируемых пептидов (RiPPs) с DUF692-доменом метанобактина.

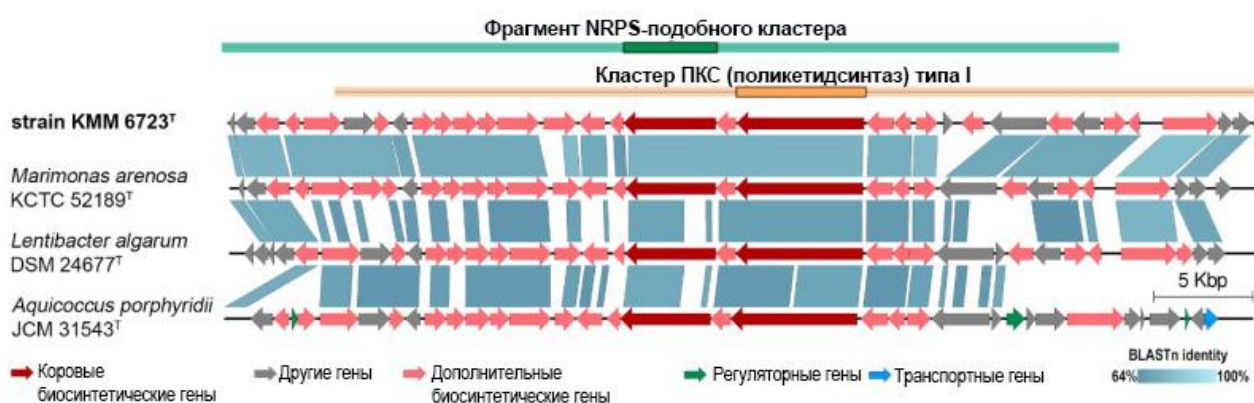


Рисунок 67 – Синтения NRPS-подобных фрагментов и БГК типа I PKS в геномах штамма 10Alg 79^T (=KMM 6723^T) и близких родственников. Гены окрашены в соответствии с их аннотацией (на панели внизу). Области локусов: NOI20_03420 – NOI20_03580 в геноме KMM 6723^T, NO357_05410 – NO357_05560 в геноме *M. arenosa* KCTC 52189^T, BLV93_RS04080 – BLV93_RS03920 в геноме *L. algarum* DSM 24677^T и FLO80_RS04395 – FLO80_RS04560 в геноме *A. porphyridii* JCM 31543^T

Также обнаружены два БГК гомосеринлактонов (*hserlactone*) и кластер синтеза осмопротектора эктоина. Большинство из этих БГК характерны и для близкородственных родов *Mameliella*, *Litoreibacter* и *Ahrensia*. Так, согласно результатам сервера antiSMASH (Blin et al., 2021), штамм 10Alg 79^T разделяет до 90 % генов, кодирующих гибридную систему PKS/NRPS, с уровнем идентичности генов 50–88 % (рис. 67).

Чтобы проиллюстрировать новизну генома 10Alg 79^T, проведен детальный анализ его синглтного генома. В отличие от *A. porphyridii* L1 8-17^T, *M. arenosa* KCTC 52189^T и *L. algarum* DSM 24677^T, геном 10Alg 79^T обладает дополнительными генами, кодирующими периплазматическую глицерофосфодиэстеразу (GlpQ, EC 3.1.4.46) и пермеазу транспортной системы *sn*-глицерол-3-фосфата (*g3p*) (UgpA, TC 3.A.1.1.3), участвующую в транспорте и гидролизе органического фосфора (Franceus et al., 2017). Кроме того, этот геном содержит шесть синглтонов фосфатного метаболизма и один ортолог, кодирующий ЩФ (EC 3.1.3.1), что указывает на значительную роль нового рода в реминерализации органического фосфора. Для сравнения, геном *M. arenosa* KCTC 52189^T представляет пять ортологичных генов и один синглтон ЩФ, за ним следуют *L. algarum* DSM 24677^T с двумя ортологичными генами и *A. porphyridii* L1 8-17^T с одним ортологичным геном ЩФ (Nedashkovskaya et al., 2023).

Азотный метаболизм сравниваемых штаммов заслуживает особого внимания ввиду наличия у них многочисленных систем синглтонных генов. Примечательно, что геном 10Alg 79^T содержит два уреазных оперона для катаболизма мочевины. Первый оперон, *ureDABCEFG*, является общим для геномов трех других исследованных видов. Второй оперон – *ureEFACGD* – состоит из синглтонных генов, гомологичных одному из уреазных оперонов *Salipiger* spp. (идентичность аминокислотных последовательностей составляет около 80 %). Этот второй оперон деградации мочевины сопровождается дополнительным опероном транспорта *utrABCDE*, аналогичным таковому у *Salipiger* spp., что свидетельствует о горизонтальном переносе генов в прошлом. Кроме того, геном 10Alg 79^T содержит синглтоны, кодирующие *N*-метилгидантоиназы А и В (EC 3.5.2.14), участвующие в метаболизме азотсодержащих соединений (Nedashkovskaya et al., 2023).

Важно отметить, что геном 10Alg 79^T кодирует ферменты пути утилизации метаболита фитопланктона – диметилсульфониопропионата (DMSP). Помимо гена *dddP*, штамм обладает дополнительным геном *dddL* для расщепления DMSP, что указывает на значимую роль этого микроорганизма в глобальном цикле серы в океане. Кроме того, можно предположить, что синглтоны, кодирующие CAZymes семейств GH13_18 (EC 2.4.1.7), GH18 (EC 3.2.1.-) и GT81 (EC 2.4.1.266), определяют родоспецифичные признаки 10Alg 79^T. Следует подчеркнуть, что фермент семейства GH13_18 может являться 2-О-глюкозилглицератфосфорилазой (GgaP, EC 2.4.1.352) на основании характерных мотивов GgaP в петле А (PYELN) и кислотно-основной петле (TETN)

(Brzoska et al., 1988). Эта новая фосфорилаза катализирует обратимый фосфорилиз глюкозилглицерата и обладает высоким потенциалом для синтеза ценных фосфогликозидов (Franceus et al., 2017).

4.3.2 Морфологические, физиологические и биохимические характеристики

Штамм 10Alg 79^T обладает рядом общих свойств с близкородственными видами (табл. B1). Все они представлены строго аэробными гетеротрофными неподвижными палочками, продуцирующими щелочную фосфатазу, эстеразу (C4), эстеразу-липазу (C8), лейцин-ариламидазу, кислую фосфатазу, нафтол-AS-BI-фосфогидролазу, каталазу и оксидазу. У данных микроорганизмов отсутствует липаза (C14), цистин-ариламидаза, трипсин, α -химотрипсин, α -галактозидаза, β -галактозидаза, β -глюкуронидаза, α -глюкозидаза, β -глюкозидаза, *N*-ацетил- β -глюкозаминидаза, α -маннозидазу, α -фукозидазу, агаразу и казеиназу. Новый изолят отличается от ближайших филогенетических соседей минимальной температурой роста и способностью к продукции амилазы. Набор фенотипических признаков, включающий способность расти в отсутствие NaCl или морской воды, восстанавливать нитраты до нитритов, продуцировать ацетон и сероводород, гидролизовать эскулин, желатин, тирозин, а также Tween 40 и 80, наряду с различиями в спектре утилизируемых углеводов, служит надежным критерием для дифференциации штамма 10Alg 79^T (табл. B1).

4.3.3. Хемотаксономия

Состав жирных кислот штамма 10Alg 79^T и штаммов *A. porphyridii* JCM 31543^T, *M. arenosa* KCTC 52189^T и *L. algarum* ZXM100^T приведен в таблице 12.

Таблица 12 – Профили жирных кислот штамма 10Alg 79^T (1) и типовых штаммов родственных родов *A. porphyridii* JCM 31543^T (2), *M. arenosa* KCTC 52189^T (3), *L. algarum* ZXM100^T (4)

Жирные кислоты	(1)	(2)	(3)	(4)
C _{15:0}	1,3	Сл.	-	-
C _{16:0}	8,2	7,7	4,5	12,0
C _{17:0}	1,6	1,5	-	2,0
C _{18:0}	Сл.	2,3	3,9	20,0
Ненасыщенные				
C _{16:1} ω 7c	1,3	Сл.	Сл.	1,0
C _{18:1} ω 7c	82,1	81,8	80,6	60,0
11-метил C _{18:1} ω 7c	Сл.	4,3	4,1	2,0
Гидроксильированные				
C _{10:0} 3-ОН	-	-	-	2,0
C _{12:0} 3-ОН	4,5	1,0	4,0	-
C _{12:1} 3-ОН	-	1,2	-	-

Примечание – Значения указаны в % от общего количества жирных кислот. Сл. – следовое количество (<1 %).

Преобладающими жирными кислотами штамма 10Alg 79^T являются C_{18:1} ω7с (82,1 %) и C_{16:0} (8,2 %). Жирнокислотный профиль изучаемого штамма в целом схож с таковым у референсных штаммов, однако имеются различия в количественном соотношении отдельных компонентов (табл. 12). Профиль полярных липидов штамма 10Alg 79^T включает фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, а также неидентифицированные фосфолипид, аминоклипид и липид, что соответствует характеристикам референсных видов (табл. 12, рис. В3). Однако наличие неидентифицированного фосфолипида отличало изолят 10Alg 79^T от *M. arenosa* КСТС 52189^T и *L. algarum* ZXM100^T. Кроме того, штамм 10Alg 79^T отличается от *M. arenosa* КСТС 52189^T отсутствием неидентифицированного гликолипида (табл. 12). Преобладающим респираторным хиноном является убихинон Q-10.

4.3.4 Описание *Rhodalgimonas* gen. nov.

Rhodalgimonas (Rho.do.al.gi.mo'nas. Gr. adj. *rhodos* – красный, розовый; L. fem. n. *alga* – морская водоросль; L. fem. n. *monas* – монада, единица; N.L. fem. n. *Rhodalgimonas* – монада, выделенная из красной морской водоросли).

Клетки грамотрицательные, аэробные, палочковидные, не образующие спор и неподвижные. Проявляют положительную реакцию на каталазу и оксидазу. Преобладающими жирными кислотами (>5 %) являются C_{18:1} ω7с и C_{16:0}. Полярные липиды представлены фосфатидилэтаноламином, фосфатидилглицерином, фосфатидилхолином, а также неидентифицированными аминоклипидом, фосфолипидом и липидом. Основным дыхательным хиноном является убихинон Q-10. Филогенетически род относится к семейству *Roseobacteraceae* (ранее *Rhodobacteraceae*), классу *Alphaproteobacteria* и типу *Pseudomonadota*.

Типовой вид – *Rhodalgimonas zhirmunskyi*.

4.3.5 Описание *Rhodalgimonas zhirmunskyi* sp. nov.

Rhodalgimonas zhirmunskyi (zhir.mun'skyi. N.L. gen. Masc. N. *zhirmunskyi* – назван в честь академика А.В. Жирмунского за большой вклад в развитие морской биологии на Дальнем Востоке России).

Клетки представляют собой гетеротрофные аэробные неподвижные грамотрицательные палочки шириной 0,3–0,7 мкм и длиной 0,8–2,1 мкм. На морском агаре (МА) колонии круглые, блестящие, слегка выпуклые, с ровными краями, диаметром 1–2 мм, бежевого цвета. Рост происходит при температуре 4–40 °C (оптимум — 30–32 °C) и значении pH 6,0–9,0 (оптимум — 7,0–8,0), а также в присутствии 0–5 % (w/v) NaCl (оптимум — 1,5–3 % NaCl). Для роста необходима натуральная или искусственная морская вода. Каталаза и оксидаза положительны. Аргининдигидролаза, лизиндекарбоксилаза, орнитиндекарбоксилаза и триптофандеаминаза отсутствуют. Эскулин, крахмал, а также твины (Tween 20, 40 и 80) гидролизуются; агар, казеин,

желатин, хитин, КМ-целлюлоза, ДНК, L-тирозин и мочевины не гидролизуются. Кислота не образуется при ферментации L-арабинозы, D-целлобиозы, D-фруктозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-лактозы, мальтозы, маннозы, мелибиозы, раффинозы, L-рамнозы, рибозы, сахарозы, трегалозы, D-ксилозы, N-ацетилглюкозамина, маннита, глицерина, сорбита или цитрата. Рост наблюдается на L-арабинозе, D-целлобиозе, D-фруктозе, D-галактозе, D-глюкозе, D-лактозе, мальтозе, D-маннозе, D-мелибиозе, D-раффинозе, L-рамнозе, D-трегалозе, D-ксилозе, N-ацетилглюкозамине, L-аланине, L-аспарагине, L-гистидине, L-метионине, L-пролине, L-триптофане, L-треонине, L-тирозине и L-валине.

4.4 Геномный и пангеномный анализ штаммов морских гетеротрофных флавобактерий рода *Arenibacter*

Данный род флавобактерий (тип *Bacteroidota*) выбран для геномного анализа как перспективный источник высокоактивных гликозидаз (Балабанова и др., 2015в; Бакунина и др., 2020). Типовой штамм *A. latericius* KMM 426^T (= VKM B-2137D^T = LMG 19694^T = CIP 106861^T) является продуцентом α -галактозидазы, изменяющей групповую специфичность крови человека А (II) (Балабанова и др., 2014, 2015в). Этот фермент относится к α -N-ацетилгалактозаминидазам структурного семейства GH27 (α -AlNaGal). Фермент эффективно инактивирует серологическую активность как А₁-, так и А₂-эритроцитов при pH 7,0–8,0, превращая их в клетки универсальной группы О (I). При этом он не вызывает гемолиза и агглютинации, что выгодно отличает его от других изоферментов (Балабанова и др., 2014, 2015в).

Штаммы грамотрицательных палочковидных неподвижных аэробных бактерий *A. latericius*, содержащих темно-оранжевый пигмент, были выделены из образцов песчаных отложений Южно-Китайского моря, из голотурии *A. japonicus* (Японское море) и из бурой водоросли *Chorda filum* (Охотское море) (Ivanova et al., 2001). Фенотипические данные свидетельствуют о том, что данные бактерии являются хемоорганотрофами, для роста которых требуется среда на основе морской воды. Основным компонентом полярных липидов (27 % от общего экстракта) является фосфатидилэтаноламин; преобладающие жирные кислоты представлены насыщенными и ненасыщенными цепями с разветвлением: *i*-C_{15:0}, *i*-C_{15:1}, *a*-C_{15:0}, C_{15:0}, C_{16:1(n-7)}. Содержание Г+Ц пар в ДНК составляет 37,5 мол. %. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК типового штамма *A. latericius* KMM 426^T подтвердил наличие отдельной филетической линии рода *Arenibacter* в кладе семейства *Flavobacteriaceae* (Ivanova et al., 2001). Тем не менее представители *Arenibacter* spp. до сих пор остаются малоизученными как с точки зрения видового разнообразия, так и биотехнологического потенциала, ввиду отсутствия данных филогеномных исследований и анализа биосинтетических кластеров.

Данные о биохимических свойствах представителей рода предполагают их участие в деградации сложных полисахаридов и полициклических углеводов, а также наличие антимикробных и фунгицидных свойств. В связи с этим в настоящем исследовании проведен комплексный анализ таксономического положения и биотехнологического потенциала штаммов рода *Arenibacter* методами сравнительной геномики. Тридцать четыре генома, депонированные в базе данных NCBI как *Arenibacter* spp., были использованы для построения филогенетического дерева (метод ML) на основе корового генома и проведения пангеномного анализа (рис. 68, 69).

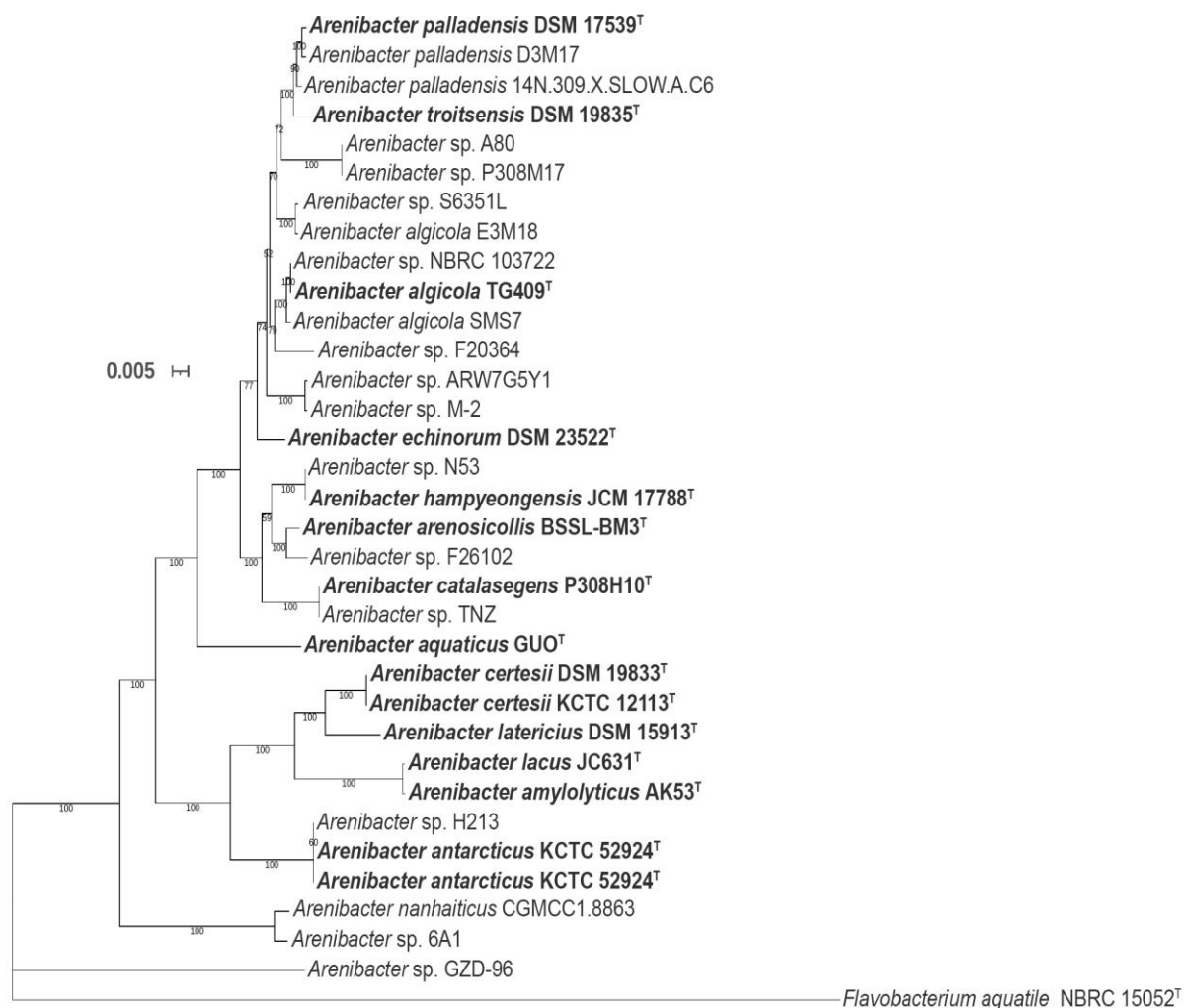


Рисунок 68 – Филогеномное дерево (ML), построенное на основе 1369 генов корового генома 33 штаммов *Arenibacter* spp. (сем. *Flavobacteriaceae*) (IQ-TREE 2.0.7). Типовые штаммы валидно описанных видов рода *Arenibacter* выделены жирным шрифтом. В узлах дерева указаны значения бутстреп-поддержки выше 50 % (1000 реплик). Шкала соответствует 0,005 замены на аминокислотную позицию. Штамм *Flavobacterium aquatile* NBRC 15052^T использован в качестве внешней группы

По результатам анализа в программе anvio, в пангеном вошло 142 402 гена, организованных в 16 419 генных кластеров (ГК). Из них 2118 кластеров входят в коровый геном

(core), 1729 – во вспомогательный геном (shell) и 12 572 кластера составляют «облачные» гены (cloud). Малый размер корового генома и значительное количество уникальных генов (синглтонов) свидетельствуют о высокой генетической гетерогенности и адаптивности изолятов *Arenibacter* spp. (рис. 68, 69).

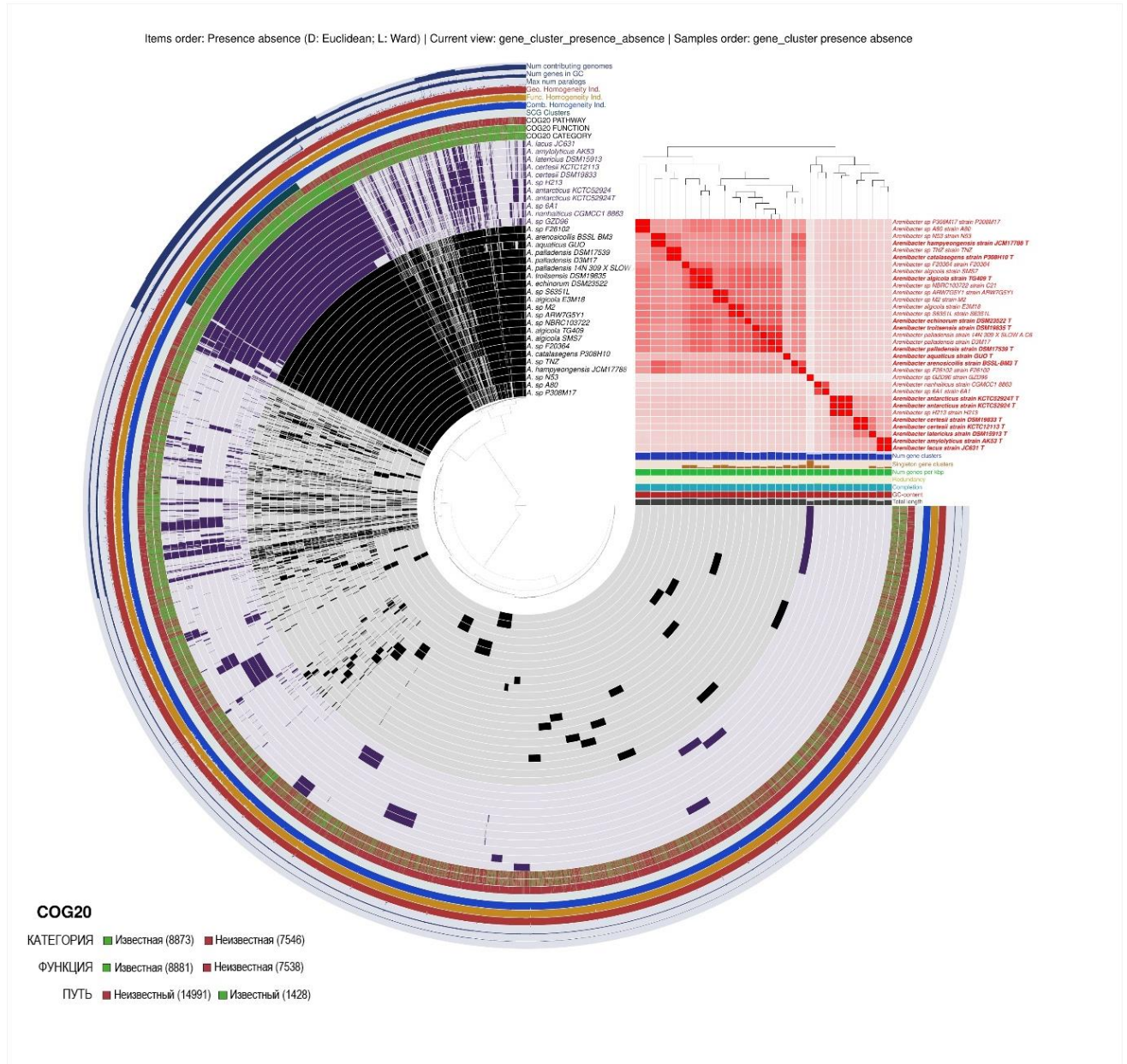


Рисунок 69 – Пангеном 33 штаммов флавобактерий рода *Arenibacter*. Теплокарта отображает значения ANI и AAI в процентах. На панели справа красным полужирным шрифтом указаны валидно описанные типовые штаммы *Arenibacter* spp. Кластеры генов, соответствующие отдельным видовым таксонам и экологическим группам, выделены красными квадратами

Как видно из рис. 69, типовые штаммы *A. hampeyongensis*, *A. catalasegenes*, *A. algicola*, *A. echinorum*, *A. troitsensis*, *A. palladensis*, *A. aquaticus*, *A. arenosicollis*, *A. antarcticus*, *A. certesii*, *A. latericius* и *A. amycolyticus* образуют 12 отчетливых кластеров, соответствующих валидно

описанным видам. При этом штаммы *A. echinorum* DSM 23522^T, *A. aquaticus* KCTC 23348^T (или GUOT) и *A. latericius* DSM 15913^T на данный момент являются единственными представителями своих видов (рис. 68, 69). Штаммы *A. amylolyticus* AK53^T и *A. lacus* JC631^T являются близкородственными и могут представлять один вид (рис. 68, 69). Пять кластеров относятся к новым, еще не описанным видам; при этом штамм GZD-96, вероятно, представляет новый род, учитывая значения $dDDH \leq 17,9$ %. Кроме того, *A. antarcticus*, *A. certesii*, *A. latericius* и *A. amylolyticus* образуют отдельную кладу. В целом кластеризация штаммов в пангеноме совпадает с топологией ветвей геномного дерева, что подтверждает наличие 17 таксонов в составе рода (рис. 68, 69). Однако результаты *in silico* ДНК-ДНК гибридизации (*dDDH*) и расчета ANI геномов указывают на необходимость ревизии таксономии рода *Arenibacter* на видовом и родовом уровнях (рис. 69).

График зависимости общего количества генов и количества консервативных генов от числа исследованных геномов показал, что пангеном рода *Arenibacter* является открытым, так как кривая общего числа генов не достигла плато (рис. 70).

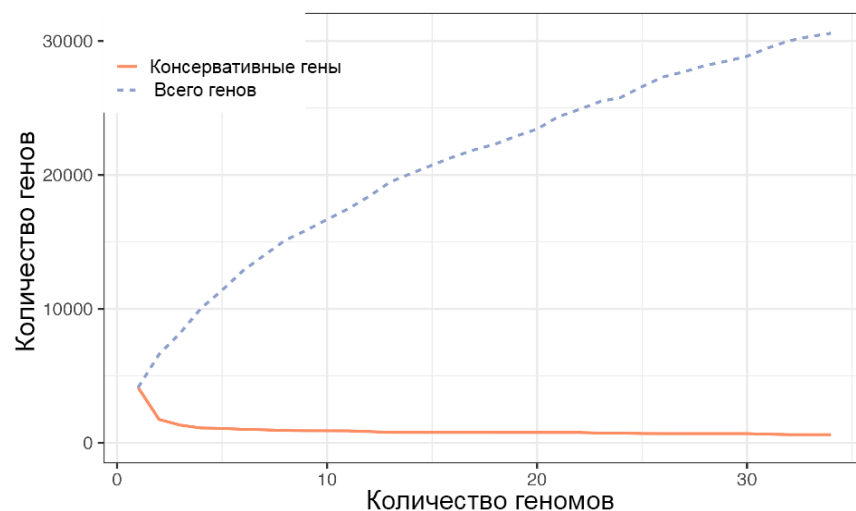


Рисунок 70 – Зависимость общего числа генов (пунктирная кривая) и количества коровых (консервативных) генов (сплошная кривая) от числа исследованных геномов в пангеноме рода *Arenibacter*. Анализ выполнен с помощью ПО Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary>). По оси *x* – количество геномов, по оси *y* – количество генов

Закрытый пангеном часто характерен для видов, обитающих в изолированных экологических нишах или находящихся в состоянии покоя. Напротив, метаболически активные виды, обладающие пластичным геномом и способные к интенсивной рекомбинации и горизонтальному переносу генов, как правило, характеризуются открытым пангеномом. Объем видового и надвидовых таксонов (суперпангенома) может увеличиваться пропорционально числу секвенированных штаммов либо быстро достигать насыщения. В этой связи открытый

характер пангенома рода *Arenibacter* может также свидетельствовать о том, что значительная часть генетического разнообразия данной таксономической группы еще не описана.

Результаты анализа геномов *Arenibacter* spp. с использованием пайплайнов antiSMASH и BAGEL позволили выявить 165 БГК (биосинтетических генных кластеров) вторичных метаболитов. В их число входят: 11 кластеров NRPS (нерибосомные пептидсинтазы), из которых 3 являются синглтонами; 91 кластер PKS (поликетидсинтазы), включая 2 синглтона; 25 кластеров ТЗPKS (поликетидсинтазы III типа); 1 уникальный кластер RiPPs (рибосомно синтезируемые и посттрансляционно модифицированные пептиды) и 2 БГК фосфонатов (рис. 71).

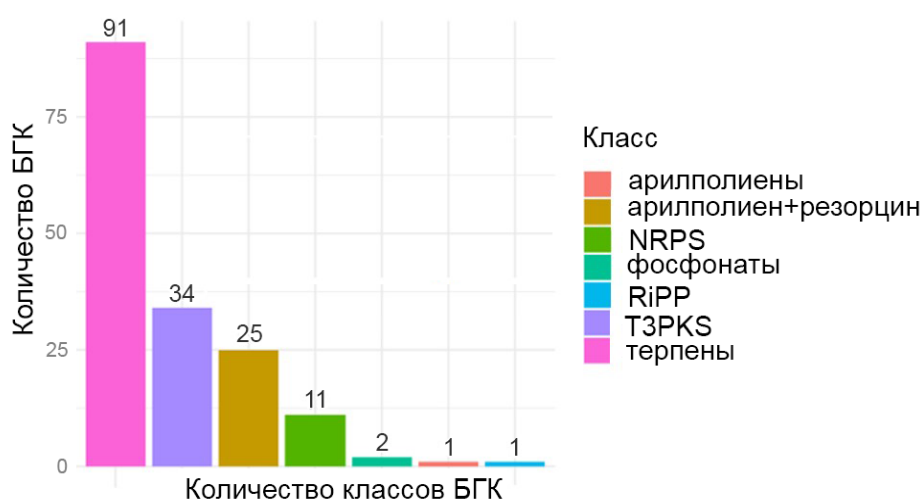


Рисунок 71 – БГК вторичных метаболитов в геномах рода *Arenibacter*. Классы БГК обозначены на цветовой панели справа

В геноме *A. latericius* DSM 15913 (= KMM 426^T) предсказан уникальный кластер (27 950–39 404 п.н.) синтеза RiPP-пептидов, содержащий в своем составе фаговую интегразу и проявляющий низкую идентичность с известными БГК. Обнаруженные в геномах *A. latericius* KMM 426^T и ряда других изолятов кластеры NRPS имеют высокое сходство (60–70 %) с известными БГК антибактериального трипептида севацидина (из патогена медоносных пчел *Paenibacillus larvae*) и термоактиноамида А (из почвенного патогена человека *Thermoactinomyces vulgaris*). Учитывая, что данные соединения ингибируют синтез бактериальной клеточной стенки, продукты выявленных БГК *Arenibacter* spp. могут обладать антибактериальными свойствами. Это делает их перспективными объектами для разработки генно-инженерных штаммов-продуцентов новых антимикробных соединений (рис. 72).

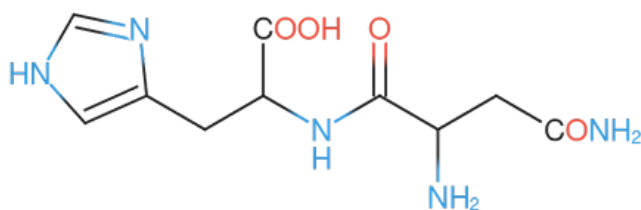


Рисунок 72 – Коровая структура продукта (L-гистидил-L-аспарагин) БГК нерибосомального пептида (NRPS) *A. latericius* DSM 15913^T (координаты: 1241–39342), предсказанная программой antiSMASH 7.0 без учета модифицирующих реакций

4.5 Филогенетический анализ и оценка функционального потенциала щелочной фосфатазы семейства PhoA морских гетеротрофных бактерий

Бактериальные ЩФ можно разделить по первичной структуре на три основных семейства – PhoA, PhoD и PhoX, относящихся к ортологам COG1785, COG3540 и COG3211 по классификации базы данных COG (Кластеры ортологичных групп белков), что означает их происхождение от разных предковых генов, участвующих в фосфатном обмене (Zeng et al., 2022). Первыми были изучены структуры ферментов семейства PhoA, к которому относится классическая ЩФ – фосфомоноэстераза *E. coli* (Yang et al., 2012). Впоследствии у различных бактерий окружающей среды были обнаружены другие ферменты, не гомологичные ЩФ *E. coli*, но имеющие сходные физиологические функции (Sebastian, Ammerman, 2009; Golotin et al., 2015; Ragot et al., 2016; Noskova et al., 2019; Srivastava et al., 2021; Lidbury et al., 2022). Высокая вариабельность белковых последовательностей характерна как для представителей разных семейств ЩФ, так и внутри одного семейства, в зависимости от таксономической принадлежности их микробных продуцентов (Ragot et al., 2016; Zeng et al., 2022). Несмотря на низкую степень идентичности последовательностей между представителями семейств PhoA, PhoD и PhoX, их основным общим свойством является производство P_i (неорганического фосфата) при истощении его запасов в окружающей среде, и, следовательно, их экспрессия и ферментативная активность подавляются высокими концентрациями P_i по принципу обратной связи (Ghyoot et al., 2015; Lidbury et al., 2022). Однако, в отличие от Mg^{2+} -активируемых и Zn^{2+} -содержащих фосфомоноэстераз семейства PhoA, представители семейств PhoD и PhoX проявляют максимальную активность в присутствии ионов Ca^{2+} или Co^{2+} и в отношении более широкого спектра субстратов, как фосфомоно-, так и диэфиров (Sunden et al., 2016, Ragot et al., 2016; Noskova et al., 2019). Кроме того, некоторые щелочные фосфатазы/фосфодиэстеразы PhoD в своих биметаллических активных центрах вместо Zn^{2+} содержат Fe^{3+} , как например, щелочная фосфатаза (фосфодиэстераза) D почвенной грамположительной бактерии *B. subtilis* (PDB: 2YEQ)

(Rodriguez et al., 2014; Noskova et al., 2019). Несмотря на низкую степень сходства (20,5 % идентичности и 38 % подобия), этот белок является пока единственным структурным прототипом щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы CamPhoD из штамма морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (NCBI: WP_043333989.1), активность которой повышалась в присутствии ионов Co^{2+} и Fe^{3+} (рис. А4) (Noskova et al., 2019). Такая необычная архитектура активного центра и его Fe^{3+} -специфичность могли возникнуть как адаптация бактерии к выживанию в условиях дефицита цинка. Вероятно, этот фермент возник у почвенных бактерий из растительной $\text{Zn}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -зависимой пурпурной кислой фосфатазы PАР благодаря горизонтальному переносу ее гена (Rodriguez et al., 2014).

Некоторые авторы включают в классификацию бактериальных ЩФ четвертое семейство конститутивных высокоактивных Ca^{2+} -зависимых ферментов PafA, с широкой субстратной специфичностью и неизвестной метаболической функцией. Они распространены в геномах флавобактерий (тип *Bacteroidota*), ассоциированных с ризосферой растений. В отличие от других ЩФ, экспрессия ЩФ PafA не подвержена действию известных индукторов, а их ферментативная активность не подавляется избытком P_i в окружающей среде (Lidbury et al., 2022; Zeng et al., 2022). Было показано, что наличие неиндуцибельной и неингибируемой ЩФ PafA у флавобактерий способствует быстрой реминерализации органофосфатов и накоплению P_i , что обеспечивает вторичный рост других видов бактерий в микробиомах (Lidbury et al., 2022). Кроме того, PafA-подобные ЩФ могут проявлять активность в отношении фосфодиэфирной связи, что заметно расширяет их роль в круговороте фосфора в природе (Barrozo et al., 2015; Lidbury et al., 2022). Однако представители семейств PhoD, PhoX и PhoA могут проявлять похожие свойства (Barrozo et al., 2015; Sunden et al., 2016; Srivastava et al., 2021; Lidbury et al., 2022). Например, высокоактивный и каталитически эффективный фермент CmAP семейства PhoA из морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 не снижал активность в присутствии большой концентрации P_i (Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015). Рекомбинантный аналог ЩФ PhoA из морской бактерии *A. mediterranea* показывал широкую субстратную специфичность в отношении фосфоди-, триэфиров и сульфатов при низких значениях концентрации субстратов, в то время как высокую фосфомоноэстеразную каталитическую эффективность фермент проявлял в присутствии высоких концентраций фосфомоноэфиров (Srivastava et al., 2021). В связи с этим, структурная классификация ферментов ЩФ является условной и относится лишь к вопросу их происхождения и адаптационной эволюции для выполнения одних и тех же функций в микроорганизме и/или микробиоме (Sebastian, Ammerman, 2009; Ragot et al., 2016; Zeng et al., 2022).

4.5.1 Филогенетический анализ щелочной фосфатазы CmAP морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296, относящейся к семейству PhoA

Для количественного и структурного анализа ЩФ использовали файлы формата GTF (*Gene Transfer Format*), полученные с помощью инструмента визуализации геномных данных IGV (*Integrative Genomics Viewer*). Поиск гомологов и ортологов референсной последовательности высокоактивной ЩФ CmAP семейства PhoA из *C. amphilecti* КММ 296 (UniProt: KGA01942) проводили среди 36 доступных геномов *Cobetia* spp. (табл. 4, табл. А3) (Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2024). Анализ данных таблицы А3 показал, что среди продуктов (*product*) неклассифицированных генов (N/A) и транскриптов (*unassigned_transcript*) в штаммах *Cobetia* spp. присутствуют белки с тремя типами аннотации: «alkaline phosphatase», «alkaline phosphatase family protein» и «alkaline phosphatase D family protein». Согласно результатам мультивыравнивания и филогенетического анализа, они образуют несколько отдельных групп гомологов (табл. А3). В первую группу вошла большая часть ЩФ семейства PhoD с аннотацией «alkaline phosphatase D family protein» (табл. А3).

Гомологи ЩФ CmAP (UniProt: KGA01942) семейства PhoA были отнесены к небольшой группе из 10 белков с аннотацией «alkaline phosphatase» (табл. А3). В группы белков с аннотацией «alkaline phosphatase family protein» вошли структуры с неизвестными функциями (табл. А3). Установлено, что ряд неклассифицированных белков принадлежит к семейству PhoD, так как они являются гомологами ЩФ CamPhoD (рис. А4), выделенной из того же штамма *C. amphilecti* КММ 296 (NCBI: WP_043333989.1), и её структурного прототипа – щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы PhoD из *B. subtilis* (PDB ID: 2YEQ), обладающей уникальной структурой и металлозависимостью ($\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) (Rodriguez et al., 2014; Noskova et al., 2019). В связи с этим последовательность CamPhoD (WP_043333989.1) послужила референсной структурой PhoD1 для классификации $\text{Ca}^{2+}(\text{Co}^{2+})/\text{Fe}^{3+}$ -зависимых фосфатаз/фосфодиэстераз PhoD в геномах других штаммов *Cobetia* spp. (табл. 13, табл. А4). Остальные неидентифицированные ЩФ были отнесены к структурному семейству PhoX (табл. 13, табл. А4).

Найденные идентификаторы ЩФ *Cobetia* spp. (*protein_id*) (табл. А3) были использованы для множественного выравнивания и проведения филогенетического анализа методом ML с референсными последовательностями известных ЩФ в программе MEGA 11 (Tamura et al., 2021) (табл. А4, рис. 73). Выполненный анализ включал также референсные ЩФ из *E. coli* (NP_414917, NP_311634, NP_417233) (Балабанова и др., 2023; Millán et al., 2006; Dong et al., 2022), ЩФ с известными ЛПС-детоксицирующими свойствами из кишечника человека *Homo sapiens* (NP_001622.2, P09923.2) (Yang et al., 2012; Ghosh et al., 2020) и из фотофора кальмара *E. scolopes* (AER46070, AER46069) (Rader et al., 2012, 2017) как классические белки структурного семейства PhoA. Кроме того, в анализ была включена ЩФ VAP семейства PhoA из морской бактерии *V.*

splendidus (ранее *Vibrio* sp. G15-21) (Q93P54) (Helland et al., 2009) как наиболее близкий структурный аналог ЩФ SmAP из *C. amphilecti* KMM 296 (UniProt: KGA01942; NCBI: WP_284726808.1) (табл. 13, табл. A4, рис. 73).

Таблица 13 – Распределение генов ЩФ в KMM 296 и типовых штаммах *Cobetia* spp.

Название штамма (NCBI)	Вид бактерии ¹	Код доступа генома (NCBI)	Код доступа ЩФ (NCBI)	ЩФ	Источник выделения
<i>C. marina</i> JCM 21022 ^T	<i>C. marina</i>	GCF_001720485.1	WP_240499655.1 WP_084208519.1 WP_240499593.1	PhoD PhoX PhoD	Прибрежная вода (США)
<i>C. pacifica</i> NRIC 0813 ^T	<i>C. marina</i>	GCA_030010515.1	WP_284728477.1 WP_240704267.1 WP_084208519.1	PhoD PhoX PhoX	Морской песок (Россия, Японское море)
<i>C. litoralis</i> NRIC 0814 ^T	<i>C. amphilecti</i>	GCF_029846315.1	WP_249330383.1 WP_279830791.1 WP_279833222.1 WP_279832006.1	PhoD PafA PhoX PhoD	Морской песок (Россия, Японское море)
<i>C. amphilecti</i> NRIC 0815^{T (2)}	<i>C. amphilecti</i>	GCA_030010415.1	WP_284726718.1 WP_284726808.1 WP_284726995.1 WP_284727213.1 WP_284727576.1	PhoD PhoA PhoX PhoD PafA	губка <i>A. Digitatus</i> (Охотское море, о. Сахалин, Пильтун)
<i>C. amphilecti</i> KMM 296⁽²⁾	<i>C. amphilecti</i>	GCF_000754225.1	WP_043332298.1 WP_043333989.1 WP_245163010.1 WP_043336117.1 WP_052384691.1	PafA PhoD1 PhoA PhoX PhoD2	Целомическая жидкость мидии <i>C. grayanus</i> (Россия, Японское море)
<i>C. crustatorum</i> JO1^{T (2)}	<i>C. crustatorum</i>	GCF_000591415.1	WP_248623642.1 WP_282705494.1 WP_282705495.1 WP_024952594.1	PhoA PhoD PhoD PhoX	Ферментированные креветки (Ю. Корея)

Примечание: 1. – Видовое название соответствует новой классификации (Nedashovskaya et al., 2024). 2. – Штаммы, содержащие в геноме ген *phoA* (выделены жирным шрифтом).

Кроме того, для филогенетического анализа использовали ЩФ PhoA из генома морской гамма-протеобактерии *Moritella* sp. 5 (QUM82918) – штамма с доказанной вирулентностью и патогенностью в отношении морских рыб. У *Moritella* sp. 5 обнаружена специфическая неиммуногенная структура ЛПС с длиной ацильных цепей C₁₆, в отличие от ЛПС невирулентных штаммов *Moritella* spp. с обычной для гамма-протеобактерий длиной ацильных цепей C₁₄ (Komazin et al., 2019; Gauthier et al., 2021, 2022). Было показано, что только C₁₄-содержащие ЛПС штаммов *Moritella* spp. индуцировали иммунный ответ в виде активации пути TLR4/NF-κB врожденного иммунитета в эпителиальных клетках HEK293-BLUE (Gauthier et al., 2021).

В данном исследовании выдвинуто предположение, что бактериальная ЩФ семейства PhoA является потенциальным фактором вирулентности в тех случаях, когда она способна снижать воспаление в тканях хозяина. Это может давать преимущество патогену, симбионту или комменсальной бактерии-космополиту при колонизации ниш, подобно тому, как противовоспалительная ЩФ человека и беспозвоночных, структурно схожая с PhoA, способствует закреплению резидентной микрофлоры (Yang et al., 2012; Rader et al., 2012). Для выявления у *Cobetia* spp. гомологов ЩФ нового семейства PafA, обнаруженного у растительных почвенных флавобактерий, в филогенетический анализ были включены белки штаммов *Flavobacterium* spp. (WP_073408805, WP_011921542 и др.) (рис. 73)

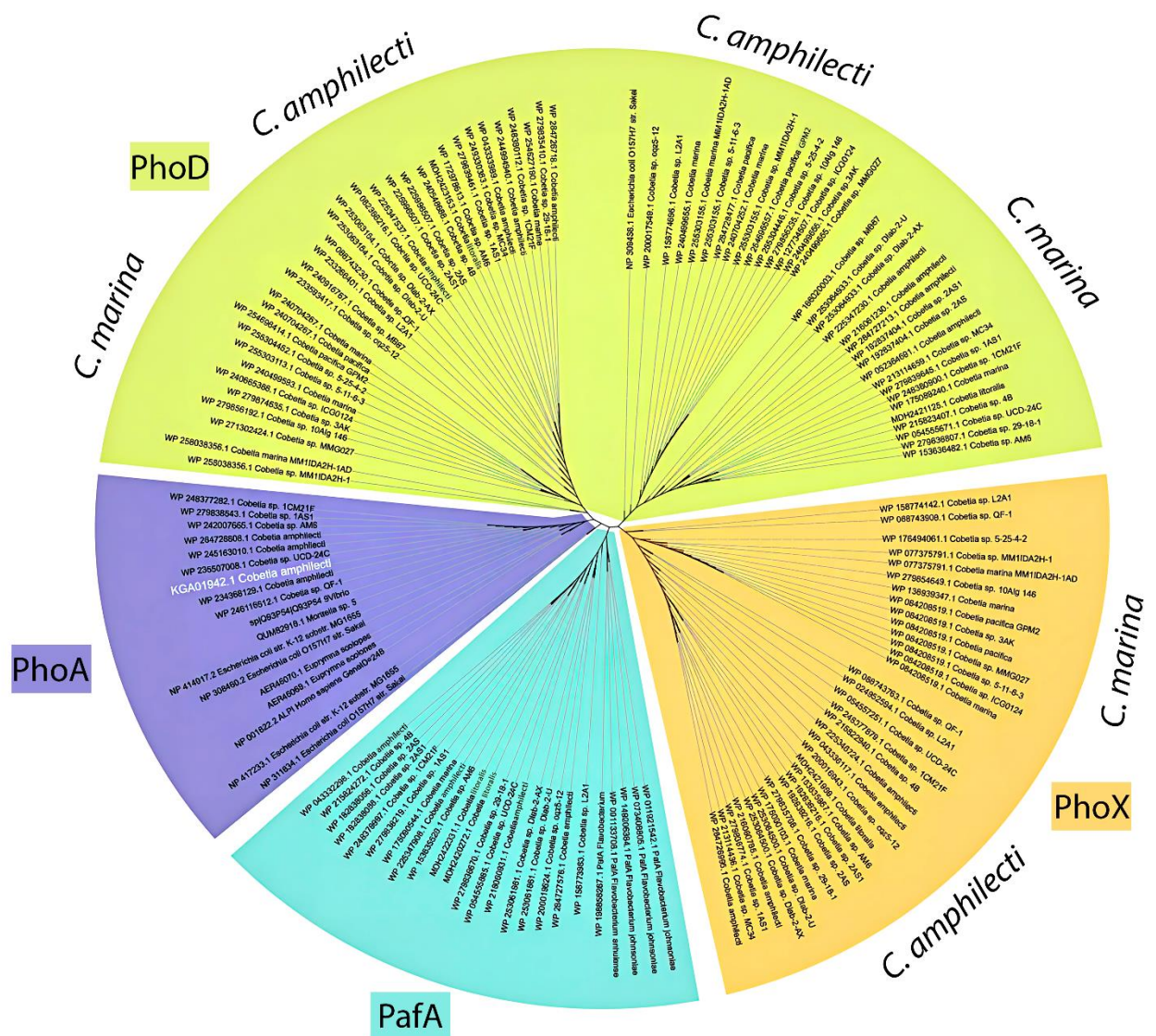


Рисунок 73 – Филогенетическое дерево (ML), построенное на основе белков ЩФ *Cobetia* spp. в программе MEGA 11. Номера доступа NCBI указаны перед названиями штаммов. Значения бутстреп-поддержки не менее 50 %; масштаб – 0,5 замен на позицию. ЩФ сгруппированы по семействам: PhoD, PhoA, PafA и PhoX. ЩФ *C. amphilecti* KMM 296 CmAP (KGA01942) выделена белым шрифтом в кластере семейства PhoA

Поиск гомологов высокоактивной ЩФ *C. amphilecti* KMM 296 CmAP, принадлежащей к семейству PhoA (UniProt: KGA01942), среди 36 геномов *Cobetia* spp. (табл. 4) позволил идентифицировать эту последовательность в геноме *C. amphilecti* KMM 296 (GCF_000754225.1) под номером доступа WP_245163010.1, а также еще 9 гомологичных последовательностей в других штаммах (табл. 13, табл. A4). Как видно из таблиц 13 и A4, несмотря на принадлежность штаммов *C. amphilecti* и *C. litoralis* к одному виду *C. amphilecti* согласно их фенотипу (табл. 8, табл. A1, рис. A1) и результатам реклассификации на основе полногеномного анализа (рис. 47, 48, 51, 52), данный вид может быть разделен на две генотипические группы на основании состава их ЩФ (табл. 13, табл. A4) (Balabanova et al., 2024; Nedashkovskaya et al., 2024). Так, штамм *C. amphilecti* KMM 296 из мидии, типовой штамм *C. amphilecti* NRIC 0815^T из губки и изолят 1AS1 (=KMM 7516) содержат в геноме 5 белков с аннотацией ЩФ, включая PhoA. В отличие от них, *C. litoralis*-подобные штаммы NRIC 0814^T (=KMM 3880^T), 29-18-1 (=KMM 7000), 2AS (=KMM 7514) и 2AS1 (=KMM 7005), выделенные преимущественно из грунта и воды, имеют только 4 общих белка ЩФ и лишены последовательностей семейства PhoA (табл. 4, табл. A1, A4, рис. A1) (Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2024). Таким образом, общее количество и наличие генов ЩФ семейства PhoA являются штаммоспецифическими признаками вида *C. amphilecti*, вероятно, обусловленными экологической нишей: ассоциацией с морскими животными или свободноживущим образом жизни (табл. 13, табл. A1, A4, рис. 73).

Установлено, что последовательности PhoA штаммов *C. amphilecti* формируют единый филогенетический кластер с эукариотическими ЛПС-детоксицирующими ЩФ человека и кальмара (рис. 73) (Yang et al., 2012; Rader et al., 2012, 2017). Кроме того, гомологи ЩФ семейства PhoA были обнаружены у типового штамма *C. crustatorum* JO1^T из ферментированной креветки, а также у двух штаммов из поверхностной морской воды – *C. crustatorum* SM1923 и *Cobetia* sp. QF-1 (табл. 13, 14; табл. A4), которые согласно новой классификации отнесены к виду *C. crustatorum* (рис. 47, 49).

Таблица 14 – Результаты анализа первичной структуры ЩФ PhoA в геномах *Cobetia* spp.

Название штамма_ код доступа генома	Замены кодонов
<i>Cobetia amphilecti</i> B2M13_GCF_018860945.1	240F>Y, 308F>Y
<i>Cobetia amphilecti</i> NRIC_0815T_GCA_030010415.1	240F>Y, 308F>Y, 372E>G, 399A>T
<i>Cobetia crustatorum</i> JO1T_GCF_000591415.1	Сдвиг старт-кодона (+45 а.о.), потеря ключевого остатка 21D (относительно CmAP), идентичность 89 % (413/466 а.о.)
<i>Cobetia crustatorum</i> SM1923_GCF_007786215.1	Идентичность 456/511 (89 %)
<i>Cobetia</i> sp_1AS1_GCF_029846435.1	240F>Y, 308F>Y
<i>Cobetia</i> sp_1CM21F_GCF_023161745.1	240F>Y, 308F>Y
<i>Cobetia</i> sp_AM6_GCF_009617955.1	240F>Y, 308F>Y, 419A>V, 422P>L
<i>Cobetia</i> sp_UCD-24C_GCF_001306765.1	240F>Y, 308F>Y, 390G>D

В кодирующих последовательностях гомологов ЩФ PhoA обнаружены нуклеотидные замены: у *C. amphilecti*-подобных изолятов их уровень составил около 1%, тогда как у штаммов *C. crustatorum* – около 11% (табл. 14). Установлено, что выявленные замены не затрагивают каталитически важные остатки активного центра, за исключением штамма *C. crustatorum* JO1^T. В белковой последовательности ЩФ (*product*) этого штамма отсутствует ключевой остаток Asp (табл. 14), что с высокой вероятностью указывает на функциональную инактивацию гомолога ЩФ CmAP (Балабанова и др., 2023; Golotin et al., 2015). Тот факт, что данные изоляты *C. crustatorum* происходят из сапрофитных сред (ферментированный продукт, морская вода), где отсутствует иммунное давление со стороны живого макроорганизма, подтверждает, что активная функция ЩФ PhoA не является критически важной для их выживания в этих нишах.

Анализ файлов GTF (табл. A3) показал, что каждый геном *Cobetia* spp. содержит от 2 до 5 последовательностей CDS, принадлежащих к разным структурным семействам ЩФ (табл. 13, рис. 73). В целом распределение структур ЩФ видоспецифично, однако в каждом геноме обязательно присутствуют по два паралога PhoD или PhoX (табл. 13, табл. A4, рис. 73). Каждая структура PhoD и PhoX специфична для конкретного вида, но происходит от разных гомологичных линий (рис. 73). Например, штамм *C. amphilecti* КММ 296 содержит две последовательности PhoD (WP_043333989.1 и WP_052384691.1; табл. 13), расположенные на разных ветвях кластера PhoD, что указывает на их происхождение от разных предковых генов (рис. 73). Штаммы вида *C. marina* также содержат по два гена PhoD, кластеризующихся на тех же ветвях, что и PhoD *C. amphilecti*, что свидетельствует об их общем происхождении от данных предковых линий (рис. 73). Однако, в отличие от *C. amphilecti*, общее количество ЩФ у *C. marina* ограничено тремя кодирующими генами: двумя паралогами PhoD и одним PhoX (табл. 13, табл. A4). *C. pacifica* также обладает тремя генами ЩФ, но отличается от *C. marina* наличием двух паралогов PhoX и лишь одного гена PhoD (табл. 13, табл. A4, рис. 73).

Щелочные фосфатазы семейств PhoD и PhoX широко распространены у морских и почвенных бактерий (Sebastian, Ammerman, 2009; Ragot et al., 2016). Семейство PhoD чаще встречается у почвенных микроорганизмов, тогда как PhoX более характерно для морских бактерий, включая цианобактерии. Последние, тем не менее, могут экспрессировать ген *phoX* и в почвенном микробиоме в ответ на увеличение общего содержания органики. В связи с этим в морских метагеномных базах данных доминируют последовательности PhoX (Sebastian, Ammerman, 2009; Ragot et al., 2016). Каждая дивергентная ЩФ могла возникнуть в процессе адаптации родительской популяции к меняющимся условиям обитания, таким как концентрация и состав фосфатов в окружающей среде, для повышения эффективности метаболизма фосфора и обеспечения выживаемости (Tendulkar et al., 2021; Boden et al., 2024; Torcello-Requena et al., 2024).

Добавление референсных последовательностей из флавобактерий *Flavobacterium* spp. (тип *Bacteroidota*), принадлежащих к новому семейству ЩФ PafA (Lidbury et al., 2022; Zeng et al., 2022), позволило идентифицировать PafA-подобные неклассифицированные ЩФ в изолятах *Cobetia* spp., которые кластеризуются отдельно от других семейств (табл. 13, А3, А4; рис. 73). Примечательно, что гены PafA были обнаружены только в геномах вида *C. amphilecti*, включая обе его линии – *C. amphilecti* и *C. litoralis* (табл. 13, табл. А1, А4; рис. 73). Это может указывать на наличие у данных штаммов свойств, характерных для PafA-содержащих фитопатогенных или ассоциативных флавобактерий, например способности к синтезу ростостимулирующих факторов или колонизации тканей растений (Lidbury et al., 2022). Действительно, штамм *Cobetia* sp. UCD-24C (= *C. amphilecti* UCD-24C) был выделен из корней морской травы *Z. marina* (табл. 4, рис. 47) и, как и другие изоляты линии *C. amphilecti*, содержит гены обоих семейств – PhoA и PafA (табл. 13, табл. А4; рис. 73).

Однако присутствие структур ЩФ семейства PhoA в морских метагеномах может служить показателем наличия в образцах представителей типа *Bacteroidota*, которые становятся многочисленными во время цветения фитопланктона (Sebastian, Ammerman, 2009; Srivastava et al., 2021). Таким образом, полный спектр биологических функций паралогов ЩФ в организмах как прокариот, так и эукариот остается до конца не изученным. Тонкие различия в структуре и, соответственно, в физико-химических свойствах изоферментов ЩФ могут свидетельствовать об их функциональной диверсификации для усвоения различных по структуре органофосфатов в условиях дефицита P_i и при меняющихся параметрах среды, таких как соленость, металлоспецифичность, pH, температура и др. (Балабанова и др., 2023; Skouri-Panet et al., 2018; Srivastava et al., 2021).

4.5.2 Анализ гомологов и ортологов щелочной фосфатазы семейства PhoA морских гетеротрофных бактерий

Примечательно, что поиск гомологов ЩФ в геномах морских гетеротрофных бактерий, принадлежащих к другим таксонам, таким как *Pseudoalteromonas* spp., *Moritella* spp., *Vibrio* spp., *Rhodalgimonas* sp. и *Arenibacter* spp., и их филогенетический анализ с использованием в качестве референсов ЩФ *Cobetia* spp. (рис. 73, табл. А4) продемонстрировали аналогичную кластеризацию белков, при которой последовательности PhoA формируют обособленную филогенетическую линию (рис. 73).

В геноме изолята патогена *Moritella viscosa* (GCF_900120065.1), вызывающего зимние язвы у атлантического лосося, обнаружены две классифицированные ЩФ – PhoD (WP_075471433.1) и PhoA (WP_045110161.1), а также одна неидентифицированная ЩФ (WP_045111916.1, alkaline phosphatase family protein) (табл. А5). Последняя, согласно кластеризации с референсными белками *Cobetia* spp. (рис. 73), отнесена к семейству PhoX и

имеет предсказанную функцию COG1524 («пирофосфатаза или фосфодиэстераза Npp1»). Похожий профиль ЩФ выявлен у другого психрофильного штамма *Moritella dasanensis* ArB 0140^T (GCF_000276805.1) – две структуры PhoD и одна PhoA. В то же время у пьезофильного штамма *Moritella uyanosii* DB21MT 5 (GCF_900465055.1), выделенного из донных отложений Марианской впадины (глубина 10 тыс. м), обнаружены одна ЩФ PhoA и одна предполагаемая ЩФ семейства PhoX (табл. A5).

На сегодняшний день недостаточно полногеномных данных по иммуногенным и неиммуногенным изолятам *Moritella* spp., чтобы достоверно подтвердить корреляцию профиля ЩФ со способностью индуцировать иммунный ответ (Gauthier et al., 2021). Тем не менее, можно отметить, что в геномах исследованных штаммов *Moritella* spp., выделенных из морской воды или донных отложений, всегда присутствует CDS щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы PhoD (характерная для почвенных бактерий) или её морской ортолог PhoX (табл. A5). Кодированная последовательность ЩФ PhoA является распространенным признаком для данного рода, за исключением вида *Moritella marina*. Типовой штамм этого вида на сегодняшний день считается непатогенным и используется как промышленный источник полиненасыщенных жирных кислот (Kautharapu, Jarboe, 2012). Геном *M. marina* ATCC 15381MP-1^T содержит два гена PhoX и один PhoD, что аналогично профилю изолятов *C. marina* из морской воды и водорослей, которые также не были обнаружены в ассоциации с животными (табл. 13, табл. A4).

Однако ЩФ PhoX впервые была описана как мономерный фермент *V. cholerae* – возбудителя холеры, тяжелого инфекционного заболевания (Majumdar et al., 2005). Этот факультативный патоген обладает полностью секвенированным геномом, состоящим из двух хромосом (2 948 589 и 1 140 710 п.н.) и плазмиды (41 113 п.н.). Ген единственной для данного вида ЩФ PhoX (WP_001131708.1) локализован в меньшей хромосоме II (табл. A5). При детальном анализе аннотации CDS данного белка в базе данных RefSeq (NCBI) обнаружено, что белок с молекулярной массой 105,4 кДа содержит домен мономерной с-di-AMP-специфичной фосфодиэстеразы/нуклеотидпирофосфатазы AtaC. Этот домен участвует в регуляции уровня с-di-AMP, ответе на ионный стресс и дифференциации у бактерий со сложным жизненным циклом, например *Streptomyces* spp. (Latoscha et al., 2020). Как оказалось, такой домен присутствует во всех ЩФ PhoX морских гетеротрофных бактерий, за исключением паралога PhoX1 патогенной бактерии *V. splendidus* (табл. A5). Белок PhoX *V. cholerae* формирует отдельный филогенетический кластер с PhoX1 *V. splendidus*, что указывает на общее происхождение их генов. Примечательно, что в структуре PhoX *V. cholerae* идентифицирован уникальный регион (170–378 а.о.) – CIS_TMP (Contractile injection system tape measure protein) (табл. A5). Данный полипептидный участок характерен для сократительных инъекционных систем патогенов, имеющих фаговое происхождение (Jiang et al., 2019). Вероятно, это обеспечивает с-di-AMP-

специфичной фосфодиэстеразе *V. cholerae* возможность направленного воздействия на сигнальные системы эпителиальных клеток хозяина для модуляции их метаболизма, что повышает эффективность колонизации кишечника. Вследствие высокой специализации к паразитическому образу жизни *V. cholerae* могла утратить другие гены ЩФ, так как адаптация эффективного паразита к хозяину часто сопровождается редукцией генома и упрощением собственных путей нуклеинового обмена (Крылов, 1992; Majumdar et al., 2005; McDonough et al., 2016).

Гетеротрофные гамма-протеобактерии вида *V. splendidus* повсеместно встречаются в океане как в тесной ассоциации с морскими животными (вызывая вспышки вибриоза), так и в качестве «экологически пластичных» микроорганизмов, выполняющих роль первичных колонизаторов и деструкторов хитиновых частиц, что закладывает основу для формирования морского микробного сообщества (Iffland-Stettner et al., 2023). Обладая схожим профилем ЩФ и высокой степенью идентичности PhoA гомологам из *C. amphilecti*, морская бактерия *V. splendidus* способна успешно размножаться в разнообразных экосистемах морской среды (табл. 13, табл. A5) (Ásgeirsson et al., 2020; Balabanova et al., 2024a).

Сравнительный анализ геномов бактерий близкородственных видов рода *Vibrio*, выделенных из различных географических точек в течение длительного периода, не подтвердил гипотезу о том, что приобретение или потеря генов способствуют их видообразованию (Ke et al., 2018). Более того, на примере штаммов *V. jasicida* и *V. hyugaensis* было показано, что экологическая диверсификация при смене образа жизни со свободноживущего на патогенный также не ведет к видообразованию. На основании полученных результатов авторы сделали вывод, что видообразование у представителей клады *Harveyi* является следствием стохастической диверсификации локальных популяций под влиянием множества эволюционных факторов, включая события локального вымирания (Ke et al., 2018).

Однако видо- или штаммоспецифичный состав генов различных семейств ЩФ у морских гетеротрофных бактерий может коррелировать с источником их выделения (ткани животных, растений или водорослей), что указывает на их адаптацию к колонизации этих субстратов (т. е. на адгезивность, вирулентность и/или патогенность). Так, у морских гамма-протеобактерий *Moritella* spp. и *Vibrio* spp., чьи изоляты были выделены исключительно из воды, грунта или рыб, не встречается ген ЩФ *PafA*, характерный для растительных ассоциативных флавобактерий и гамма-протеобактерий *C. amphilecti* (табл. 13; табл. A4, A5). Помимо наличия ЩФ *PhoA*, у всех морских оппортунистов обнаружены и другие геномные и фенотипические признаки патогенности. В частности, у неиммуногенных штаммов *Moritella* spp. выявлены сокращенные ацильные цепи в составе ЛПС для «обхода» иммунной системы хозяина, а у *Vibrio* spp. и *Pseudoalteromonas* spp. – высокоактивные ферменты деградации хитина морских

беспозвоночных (Pentekhina et al., 2023). Также отмечены признаки синтеза пигментов (табл. 10, рис. 54) и иммуносупрессоров (рис. 59), предназначенных для угнетения синтеза или нейтрализации АФК, вырабатываемых врожденной иммунной системой хозяина (Gauthier et al., 2021; Balabanova et al., 2021, 2022а, 2023, 2024а, б).

В отличие от патогенов рыб, у гамма-протеобактерий *Pseudoalteromonas* spp. и *Cobetia* spp., выделенных из морских губок, кораллов и моллюсков, обнаружено больше копий генов ЩФ, многие из которых являются паралогами. При этом ЩФ PhoA и PafA являются видо- и штаммоспецифичными признаками, как и широкий профиль гидролитических ферментов GH (табл. 13, табл. А4, А5, рис. 61) (Bosi et al., 2017). В одной ветви филогенетического дерева с ЩФ PhoA *C. amphilecti* (CmAP) были обнаружены белки типовых штаммов рода *Pseudoalteromonas*: *P. amylolytica*, *P. byunsanensis*, *P. rubra*, *P. caenipelagi*, *P. aurantia*, *P. citrea*, *P. luteoviolacea*, *P. maricaloris*, *P. piscicida*, *P. flavipulchra*, *P. galathea*, *P. peptidolytica*, *P. ulvae*, *P. piratica*, *P. spongiae*, *P. denitrificans*, *P. phenolica*. У *P. piratica* и *P. rubra* выявлено по два паралога PhoA, относящихся к ветви ЩФ CmAP.

Однако внутри рода *Pseudoalteromonas* кластер ЩФ PhoA разделяется на две отдельные гомологичные ветви. Во вторую ветвь вошли белки типовых штаммов *P. arctica*, *P. elyakovii*, *P. distincta*, *P. aliena*, *P. fuliginea*, *P. marina*, *P. issachenkonii*, *P. tetraodonis*, *P. undina*, *P. nigrifaciens*, *P. translucida*, *P. agarivorans*, *P. espejiana*, *P. haloplanktis*, *P. mariniglutinosa*, *P. prydzensis*, *P. ostreae*, *P. rhizosphaerae*, *P. neustonica*, *P. arabiensis*, *P. gelatinilytica*, *P. profundus*, *P. shioyasakiensis*, *P. donghaensis*, *P. lipolytica*, *P. ruthenica*, *P. flavipulchra*, *P. maricaloris*, *P. piscicida*, *P. galathea*, *P. peptidolytica*, *P. luteoviolacea*, *P. rubra*, *P. amylolytica*, *P. byunsanensis*, *P. caenipelagi*, *P. aurantia*, *P. citrea*, *P. phenolica*, *P. tunicata*, *P. ulvae*, *P. denitrificans*, *P. piratica*, *P. spongiae*, а также *A. macleodii*.

К последовательности ЩФ PafA *C. amphilecti* ближе всего находятся белки *P. rhizosphaerae*, *P. arctica*, *P. aliena*, *P. peptidolytica*, *P. prydzensis*, *P. mariniglutinosa*, *P. haloplanktis*, *P. aurantia*, *P. rubra* (один из паралогов PafA), *P. amylolytica*, *P. spongiae*, *P. piratica* и *P. luteoviolacea*. Однако в апикальной части ветвей кластера ЩФ PafA расположены последовательности *P. distincta*, *P. elyakovii*, *P. fuliginea*, *P. arctica*, *P. nigrifaciens*, *P. translucida*, *P. aliena*, *P. issachenkonii*, *P. tetraodonis*, *P. undina*, *P. agarivorans*, *P. marina*, *P. haloplanktis*, *P. mariniglutinosa*, *P. prydzensis*, *P. ostreae*, *P. rhizosphaerae*, *P. neustonica*, *P. maricaloris*, *P. piscicida*, *P. flavipulchra*, *P. galathea*, *P. tunicata*, *P. gelatinilytica*, *P. profundus* и *P. shioyasakiensis*.

Большинство штаммов *Pseudoalteromonas* spp., имеющих ЩФ PhoA, содержат и ЩФ PafA, аналогично штаммам *C. amphilecti* (табл. 13, табл. А4). Вероятно, наличие ЩФ PhoA и PafA является признаком космополитичности бактерий. Такие представители прокариот могут быть в том числе симбионтами морских беспозвоночных, среди которых обнаружено много

пробиотических штаммов *Pseudoalteromonas* spp. и *Cobetia* spp. (Bosi et al., 2017; Lv et al., 2019; Moriya et al., 2020; Christensen et al., 2021; Fernández-Juárez et al., 2022; Israel et al., 2023; Rosado et al., 2023; Barno et al., 2024). Для симбионтов (как комменсалов, так и мутуалистов), так же, как и для патогенных бактерий, важно обладать надежными факторами колонизации тканей хозяина. К таким факторам могут относиться определенные пигменты, иммуносупрессоры и, вероятно, высокоактивная ЩФ PhoA. Этот фермент способен быстро гидролизовать АМФ до аденозина, который, в свою очередь, обладает противовоспалительным эффектом и модулирует (или подавляет) активность иммунных клеток хозяина (Balabanova et al., 2024a, б; Seitkalieva et al., 2024). Наличие множественных генов-паралогов ЩФ может служить дополнительным маркером эволюционно успешных и наиболее приспособленных космополитичных видов морских гетеротрофов, способных расти даже в наземных условиях, в частности в отсутствие соли (табл. 8, 10). В связи с этим отдельные виды таких морских бактерий можно рассматривать как перспективные для разработки биопрепаратов, направленных на минерализацию органофосфатов при выращивании сельскохозяйственных культур, а также для очистки окружающей среды (Ram et al., 2019; Srivastava et al., 2021; Zhou et al., 2021; Lidbury et al., 2022; Zeng et al., 2022).

Однако наиболее известными симбионтами как животных, так и водорослей и морских трав являются неподвижные представители семейства *Flavobacteriaceae* типа *Bacteroidota*. У морских флавобактерий *Arenibacter* spp. нами обнаружено еще большее количество и разнообразие типов ЩФ (до 9 генов в одном геноме), включая специфичные для *Bacteroidota* ЩФ PafA и штаммоспецифичные PhoA у некоторых видов, а также новое семейство ЩФ с доменом сульфатазы (семейство YncE) (Bakunina et al., 2013; Балабанова и др., 2015в; Tatusova et al., 2016).

Геном альфа-протеобактерии нового рода *R. zhirmunskyi* 10Alg 79^T содержит до шести предсказанных родоспецифичных (или штаммоспецифичных) генов ЩФ, а также один ортологичный ген, обнаруженный в пангеноме близкородственных видов (Nedashkovskaya et al., 2023). Тем не менее в GTF-файлах неподвижных бактерий филогруппы *R. zhirmunskyi* 10Alg 79^T и *M. arenosa* KCTC 52189^T (рис. 64) достоверно аннотированы лишь два гена ЩФ из семейств PhoX и PhoD (рис. A5). Вероятно, это связано с низкой степенью идентичности геномов и отсутствием изученных продуктов генов для новых таксонов. В общей филогенетической кладе с *R. zhirmunskyi* 10Alg 79^T и *M. arenosa* KCTC 52189^T находятся более отдаленные штаммы: *L. algarum* DSM 24677^T, обладающий четырьмя паралогами ЩФ PhoX, и *A. porphyridii* L1 8-17^T с тремя паралогами ЩФ PhoD (рис. 64, 65, рис. A5). Все указанные бактерии ассоциированы с водорослями или донными отложениями (Nedashkovskaya et al., 2023). Представитель типового вида рода *Cognatishimia* (типовой вид – *C. maritima*) семейства *Roseobacteraceae* из другой клады

того же геномного дерева (рис. 64), вероятно, являющийся консументом кораллов, содержит два паралога ЩФ PhoA и один ортолог семейства PhoD (рис. A5). Таким образом, структурная и функциональная диверсификация белков ЩФ затронула многие типы и виды морских аэробных гетеротрофных прокариот, что свидетельствует об их длительной адаптационной истории в условиях дефицита P_i и изменчивых параметров среды (Балабанова и др., 2023; Srivastava et al., 2021; Skouri-Panet et al., 2018).

С целью оценки филогенетического родства ЩФ морских гетеротрофных бактерий с ЩФ других организмов был проведен поиск гомологов ЩФ *C. amphilecti* среди белков архей, бактерий, водорослей, грибов, растений и животных с использованием базы данных NCBI (CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) (рис. 74). Как видно из рисунка 74, ЩФ PhoA широко представлены у грибов и животных, включая беспозвоночных и млекопитающих. Очевидно, что белки грибов возникли независимо от остальных ЩФ PhoA, общий предок которых дивергировал перед возникновением современных белков аэробных галоалкалифильных архей из гиперщелочных озер и всех прочих прокариот и эукариот. Патогенные альфа-протеобактерии рыб кластеризуются вместе с галофильными металлоторантными аэробными и факультативно анаэробными бациллами из прибрежных песчаных почв и аэробными флавобактериями из консорциума цветущего фитопланктона (рис. 74). Примечательно, что ЩФ PhoA аэробных гамма-протеобактерий (включая *C. amphilecti*) кластеризуются вместе с анаэробными пропионогенными бактериями из микробиома кишечника животных. В более глубоких ветвях дерева последовательно расположены кластеры аэробных цианобактерий и некультивируемых бактерий *Candidatus*, патогенных бета-протеобактерий человека и растений, а также кластеры пресноводных альфа-протеобактерий и эукариот (рис. 74).

ЩФ PhoD1 преобладают у грибов (которые, по-видимому, имеют независимое происхождение), растений, метаногенных архей, цианобактерий, динофлагеллят и актиномицетов. Гомологи второй линии PhoD (PhoD2) распространены у актиномицетов, цианобактерий, бацилл и протеобактерий. Одни белки PhoX у альфа- и бета-протеобактерий кластеризуются независимо; для другой группы PhoX из альфа- и гамма-протеобактерий, цианобактерий, бацилл, некоторых грибов (мукоровые) и флавобактерий предполагается наличие общего предка. PafA-подобные ЩФ встречаются у грибов (аскомицеты), растений, флавобактерий, бета-протеобактерий, актиномицетов, гамма- и альфа-протеобактерий, но отсутствуют у бацилл.

В отличие от ЩФ PhoA, гомологи ЩФ семейств PhoD1, PhoD2, PhoX и PafA из *C. amphilecti* (рис. 73) не встречаются у большинства беспозвоночных, насекомых и млекопитающих (рис. 74).

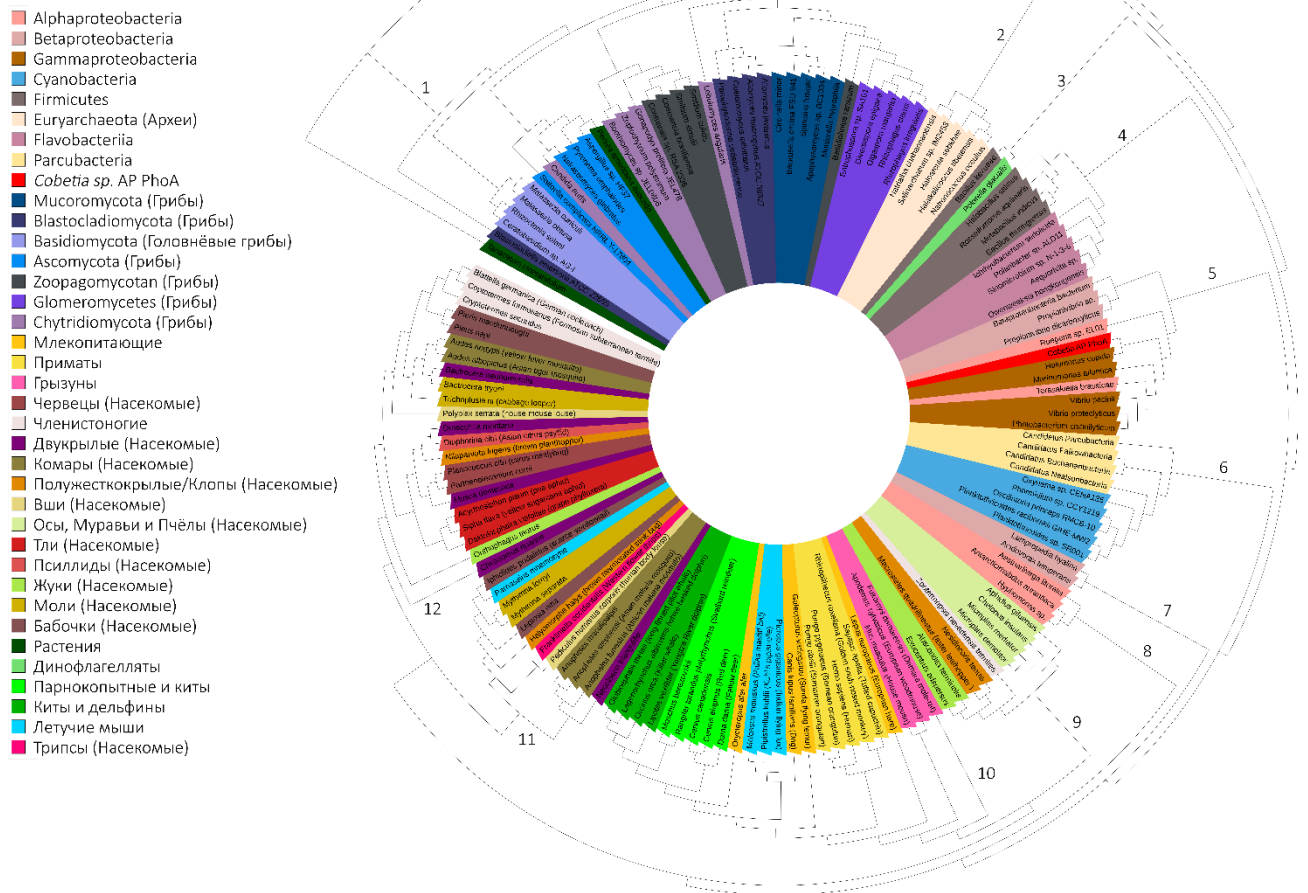


Рисунок 74 – Филогенетическое распределение гомологов ЩФ PhoA среди таксономических групп прокариот и эукариот. Кластеры белков пронумерованы (1–12): 1. Грибы и растения; 2. Аэробные галоалкалифильные археи и водоросли; 3. Динофлагеллаты и аэробные бациллы; 4.

Факультативно-анаэробные галофильные металлоторантные бациллы (почвы), альфа-протеобактерии (патогены рыб) и флавобактерии (консорциум фитопланктона); 5. Анаэробные пропионогенные бактерии и аэробные гамма-протеобактерии (ЩФ PhoA CmAP обозначена красным цветом); 6. Аэробные цианобактерии и некультивируемые бактерии *Candidatus*; 7. Аэробные бета-протеобактерии (патогены человека и растений); 8. Пресноводные альфа-протеобактерии; 9. Насекомые-эндопаразиты (тли и термиты); 10. Млекопитающие; 11. Двукрылые насекомые (кровососущие и вредители растений); 12. Членистоногие (сапрофитные жуки, мухи, эктопаразиты, морские беспозвоночные). Различными цветами обозначены ветви внутри таксономических групп (обозначения на панели слева)

4.5.3. Локализация щелочной фосфатазы PhoA в хромосоме *Cobetia* spp.

Для выявления генного окружения *phoA* в геномах *Cobetia* spp. использовали веб-приложение Syntenome (<https://github.com/glebus-sasha/Syntenome>) (Balabanova et al., 2024a). Приложение позволяет визуализировать и анализировать данные в формате GTF. В GTF-файлах десяти геномов *Cobetia* spp. идентифицирован неаннотированный ген, кодирующий ЩФ,

гомологичную СмАР *C. amphilecti* KMM 296 (KGA01942). У большинства штаммов этот ген располагался вблизи гена *metG* (± 2 позиции), кодирующего метионил-тРНК-синтетазу MetRS (рис. А6). По результатам анализа была составлена таблица, в которой каждая ячейка содержит название гена и продукта в формате «gene | product» (например, *metG* | methionine-tRNA ligase) (рис. А6). СмАР-подобный продукт гена *phoA* (гомолог KGA01942) представлен в таблице как «NA | alkaline phosphatase», поскольку название гена на карте не обозначено (NA – *not assigned*). Лишь 10 штаммов *Cobetia* spp. имеют гены *phoA* в непосредственной близости от гена *metG*; в большинстве других геномов рода *Cobetia* наблюдаются сходные по составу *metG*-регионы, но без генов, кодирующих ЩФ. Геномы *Cobetia* sp. UCD-24C (GCF_001306765.1), *C. crustatorum* JO1^T (GCF_000591415.1), *C. marina* NBRC 15607 (GCF_006540105.1) и *Cobetia* sp. 10Alg146 (GCF_029846385.1) имеют штаммоспецифичный характер генного окружения *metG* (рис. А6). Анализ синтении регионов локализации генов *phoA* и *metG* в штаммах *Cobetia* spp. также подтвердил штаммоспецифичность организации генов в данном регионе (рис. 75).

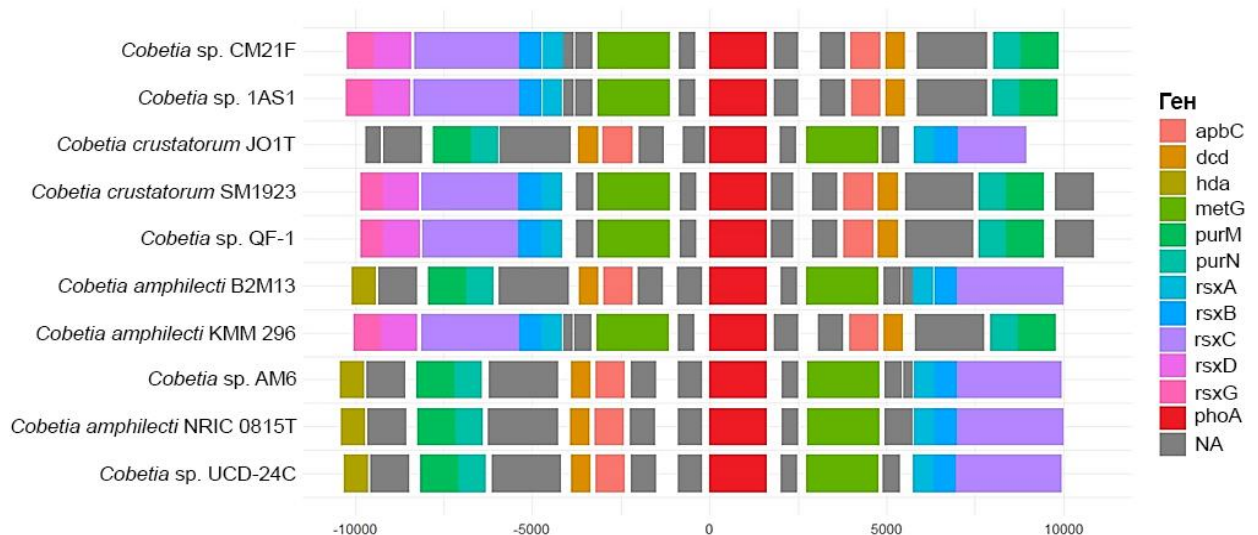


Рисунок 75 – Организация и синтения генных кластеров *phoA* у штаммов *C. amphilecti* (1CM21F, 1AS1, QF-1, B2M13, KMM 296 (=KGA01942), AM6, NRIC 0815^T и UCD-24C) и *C. crustatorum* (JO1^T, SM1923). На панели справа обозначены гены: *rsxABCD* – НАДН-зависимые белки электронно-транспортного комплекса R_{sx}ABCD (дыхание, синтез АТФ, транспорт H⁺/Na⁺); *purN*, *purM* – фолат-зависимая фосфорибозилглицинамид-формилтрансфераза PurN и АТФ-зависимая аминоксидазолрибонуклеотид-синтетаза PurM (биосинтез пуринов *de novo*); *metG* – метионил-тРНК-синтетаза MetRS (биосинтез белков); *hda* – регулятор АТФ-зависимого инициатора репликации ДНК (DnaA) семейства АТФазы AAA⁺ (негативная регуляция клеточного цикла); *dcd* – дЦТФ-деаминаза (биосинтез пиримидинов *de novo*); *apbC* – белок-переносчик железо-серного [4Fe-4S] кластера ArpC (регуляция окисления НАДН). NA (*not assigned*) – функциональная аннотация отсутствует. Размеры анализируемых регионов выше и ниже стартового кодона *phoA* указаны в аминокислотных остатках (длина транслируемых продуктов) на оси ОХ. Для проверки функциональной аннотации выравнивание проводилось для всех CDS, входящих в кластер (Balabanova et al., 2024a)

Помимо *metG*, в ближайшем окружении *phoA* у штаммов *C. amphilecti* и *C. crustatorum* находятся гены путей энергетического обмена, кодирующие субъединицы мембранных белков электронно-транспортного комплекса RxD, RxC, RxB, RxA, белка-переносчика железо-серного [4Fe-4S] кластера ArpC, играющего роль в регуляции окисления НАДН, дЦТФ-деаминазы (образующей дУМФ), участвующей в синтезе пиримидинов (рис. 75).

Кроме того, к кластеру *phoA* можно отнести гены белка устойчивости к теллуриту семейства TerB, участвующего в детоксикации ксенобиотиков и биоцидов, а также в репарации ДНК (Anantharaman et al., 2012); гены неаннотированной гидролазы клеточной стенки, псевдоуридинсинтазы и гидролазы семейства SGNH/GDSL (протеазы и липазы), содержащей домен автотранспортера (рис. A6). Согласно функциональной аннотации NCBI (контиг JQJA01000018) штамма *C. amphilecti* KMM 296, в регион *phoA* ЩФ СмАР входят гены синтазы оксида азота (NOS) – флавин/ Ca^{2+} -зависимой оксидоредуктазы, а также глицераткиназы глиоксилатного цикла (пути глюконеогенеза). Продукт реакции фермента NOS – оксид азота (NO), образующийся с участием НАДФН, выполняет функции регулятора транспорта через плазматическую мембрану и обеспечивает защиту от патогенов (*Cobetia amphilecti* strain KMM 296 contig00018, whole genome shotgun sequence). Рядом располагается ген полифосфаткиназы, являющейся генератором энергетического запаса в виде полифосфатов (polyP), которые стимулируют деградацию белков и адаптацию клетки к среде, обедненной аминокислотами (ответ на стресс и регуляция вирулентности) (Singh et al., 2016). Кроме того, polyP участвует в регенерации кофактора НАДФН из НАДН при анаболических процессах (Sraans et al., 2015). Остальные гены кластера *phoA* в геномах *C. amphilecti* и *C. crustatorum* на сегодняшний день не идентифицированы (N/A); к ним относятся, например, белок с доменом DUF3465 с неустановленной функцией и другие гипотетические белки (рис. 75, рис. A6).

Таким образом, генные кластеры *phoA* у *Cobetia* spp. локализованы в непосредственной близости от оперона, кодирующего Rxs(Rnf)-комплекс – систему переноса электронов, сопряженную с транспортом Na^+ (или H^+) и энергозатратным восстановлением ферредоксина (Burschel et al., 2019). Установлено, что данные системы (в частности, у *Rhodobacter capsulatus* и энтеробактерий) участвуют в поддержании редокс-гомеостаза и перестройке клеточного фенотипа в ответ на окислительный стресс или дефицит железа и серы (Vermassen et al., 2019; Lee et al., 2022). Совместная локализация *phoA* с генами Rnf-комплекса может указывать на их сопряженную роль в адаптации к стрессовым условиям внешней среды.

Установлено, что мембранный комплекс RxsABCDGE, впервые описанный у *E. coli*, играет ключевую роль в регуляции активности транскрипционного фактора SoxR, отвечающего за ответ на окислительный стресс (супероксид-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$) и воздействие оксида азота (II).

Данный комплекс использует НАДН в качестве донора электронов и является гомологом системы Rnf (*Rhodobacter nitrogen fixation*), широко распространенной у факультативных и облигатных анаэробов (Boullet, Meynial-Salles, 2018; Lee et al., 2022).

В исследуемых кластерах также обнаружен ген метионил-тРНК-синтетазы (MetRS). Этот фермент не только обеспечивает элонгацию полипептидной цепи, но и катализирует аминокислотирование инициаторной тРНК (тРНК^{fMet}), уровень которой коррелирует с устойчивостью бактерий к антибиотикам (Wood et al., 2024). Кроме того, MetRS участвует в метаболизме модифицированного гомоцистеина – важного интермедиата центрального метаболизма (Wood et al., 2024). Совместная локализация этих генов с *phoA* у *Cobetia* spp. может свидетельствовать о функциональной интеграции процессов фосфорного обмена, редокс-контроля и белкового синтеза при адаптации к стрессу.

Ферменты PurN (фосфорибозилглицинамид-формилтрансфераза) и PurM (аминоимидазолрибонуклеотид-синтаза) катализируют последовательные стадии превращения глицинамидрибонуклеотида (GAR) в формилглицинамидрибонуклеотид (fGAR) и аминокислотрибонуклеотид (AIR). Эти реакции являются ключевыми этапами (3-м и 5-м соответственно) пути биосинтеза пуринов *de novo*, ведущего к образованию инозинмонофосфата (ИМФ) – общего предшественника аденозин-5'-монофосфата (АМФ) и гуанозин-5'-монофосфата (ГМФ) (Zhang et al., 2008). Помимо участия в метаболизме, для PurN была выявлена регуляторная роль: у *S. aureus* данный фермент существенно влияет на экспрессию генов вирулентности, гемолитическую активность, формирование биопленок и устойчивость к антибиотикам (Peng et al., 2022). Стабильное присутствие этих генов в составе единого локуса у всех 10 исследованных штаммов может свидетельствовать о формировании консервативного метаболического кластера, характерного для видов *C. amphilecti* и *C. crustatorum*. Такая организация генома, объединяющая биосинтез пуринов (*purN/M*), фосфатный обмен (*phoA*), трансляцию (*metG*) и редокс-контроль (*rsx*), вероятно, обеспечивает быструю адаптивную реакцию бактерий рода *Cobetia* на стрессовые условия морской среды, в частности, помогает координировать ответ на дефицит ресурсов (энергии и фосфора).

Наконец, регуляторный продукт гена *hda* обеспечивает строгое соблюдение клеткой правила репликации – "одна инициация за один клеточный цикл". Функционирование белка Hda (семейство AAA+) основано на системе RIDA (регуляторная инактивация DnaA). Белок Hda взаимодействует с нагруженным на ДНК зажимом реплиасомы и образует комплекс с DnaA, создавая эффективный каталитический центр для гидролиза АТФ, связанного с DnaA. Перевод DnaA-АТФ в неактивную форму DnaA-АДФ предотвращает повторную инициацию репликации (негативный контроль). Стоит отметить, что DnaA прокариот и ключевые факторы инициации

репликации эукариот, такие как комплекс распознавания начала репликации (ORC), белки Cdc6 и MCM, являются эволюционно родственными и относятся к суперсемейству АТФаз AAA+ (Kato, Katayama, 2001). Это означает, что у *Cobetia* в одном локусе собраны гены, отвечающие за фундаментальные процессы жизни клетки: энергетику, синтез предшественников нуклеиновых кислот, контроль деления и защиту от окисления. Такая «супер-группировка» генов может объяснять высокую скорость адаптации *Cobetia* к меняющимся условиям среды (например, приливно-отливные зоны или смена солености), так как клетка может координированно регулировать темпы своего деления и метаболизма.

Таким образом, локализация гена *phoA* в едином консервативном кластере с ключевыми метаболическими генами позволяет предположить участие ЩФ PhoA в координации клеточного цикла, редокс-гомеостаза и белкового синтеза у морских гетеротрофных бактерий. Подобная функциональная интеграция находит параллели у морских одноклеточных диатомовых водорослей, у которых экспрессия *phoA* сопряжена с ограничением синтеза белков центрального метаболизма, фотосинтеза и подавлением клеточного роста (Zhang et al., 2021a).

Наличие у ЩФ PhoA гипотетической функции регулятора метаболического статуса может объяснить универсальные биологические ответы различных бактерий, проявляющиеся в подавлении роста, разрушении биопленок и дозозависимом снижении численности КОЕ при воздействии препарата ЩФ *C. amphilecti* КММ 296 СмАР (Balabanova et al., 2016, 2017). Таким образом, роль PhoA может выходить за рамки простой утилизации фосфатов, охватывая глобальные механизмы адаптации бактерий к изменениям окружающей среды.

4.5.4 Предсказание метаболической функции щелочной фосфатазы PhoA на основе анализа метаболических путей *Cobetia* spp.

На сегодняшний день точная метаболическая функция ЩФ *C. amphilecti* КММ 296 (СмАР) и её гомологов остается недостаточно изученной. Тем не менее, в результате геномного анализа с использованием программного комплекса gapseq для СмАР и её гомологов был предсказан путь конверсии НАДФН (NADPH) в НАДН (NADH) (рис. 76). Данный метаболический путь был выявлен в геномах всех исследованных штаммов *Cobetia* spp., при этом он реконструировался даже при наличии низкоконсервативных гомологов СмАР (*Expect* > 1, *Identities* < 50 % или длина < 100 а.к.) (табл. 13, табл. А4, рис. 73). Важно отметить, что в базе данных BioСус, лежащей в основе алгоритмов gapseq, этот путь закреплен не за классической щелочной фосфатазой (ЕС 3.1.3.1), а за бифункциональной НАДФН 2'-фосфогидролазой (ЕС 3.1.3.108) (рис. 76). Этот фермент играет ключевую роль в регуляции внутриклеточного баланса НАДН/НАДФН как у прокариот, так и у эукариот (Kawai, Murata, 2008; Estrella et al., 2019). Так, у млекопитающих митохондриальный фермент ноктюрин регулирует метаболизм в рамках

циркадных ритмов, поддерживая необходимый уровень НАДФН (Estrella et al., 2019). В то же время архейный гомолог из *Methanocaldococcus jannaschii* проявляет преимущественно НАД-киназную активность (ЕС 2.7.1.23), обеспечивая перевес концентрации НАДФ⁺ над НАДФН (Kawai, Murata, 2008)».

Коферменты НАДН и НАДФН являются центральными кофакторами окислительно-восстановительных реакций во всех живых клетках. Их функционально активной частью служит никотинамидное кольцо, способное обратимо присоединять электроны и протоны. В зависимости от редокс-статуса клетки эти молекулы существуют в окисленной (НАД⁺, НАДФ⁺) или восстановленной (НАДН, НАДФН) формах. Несмотря на структурное сходство, их метаболические роли четко разделены: НАД⁺ выступает в качестве основного акцептора электронов в катаболических процессах, направленных на генерацию АТФ, тогда как НАДФН служит главным донором восстановительных эквивалентов в реакциях анаболизма (биосинтеза) и системах антиоксидантной защиты (рис. 76).

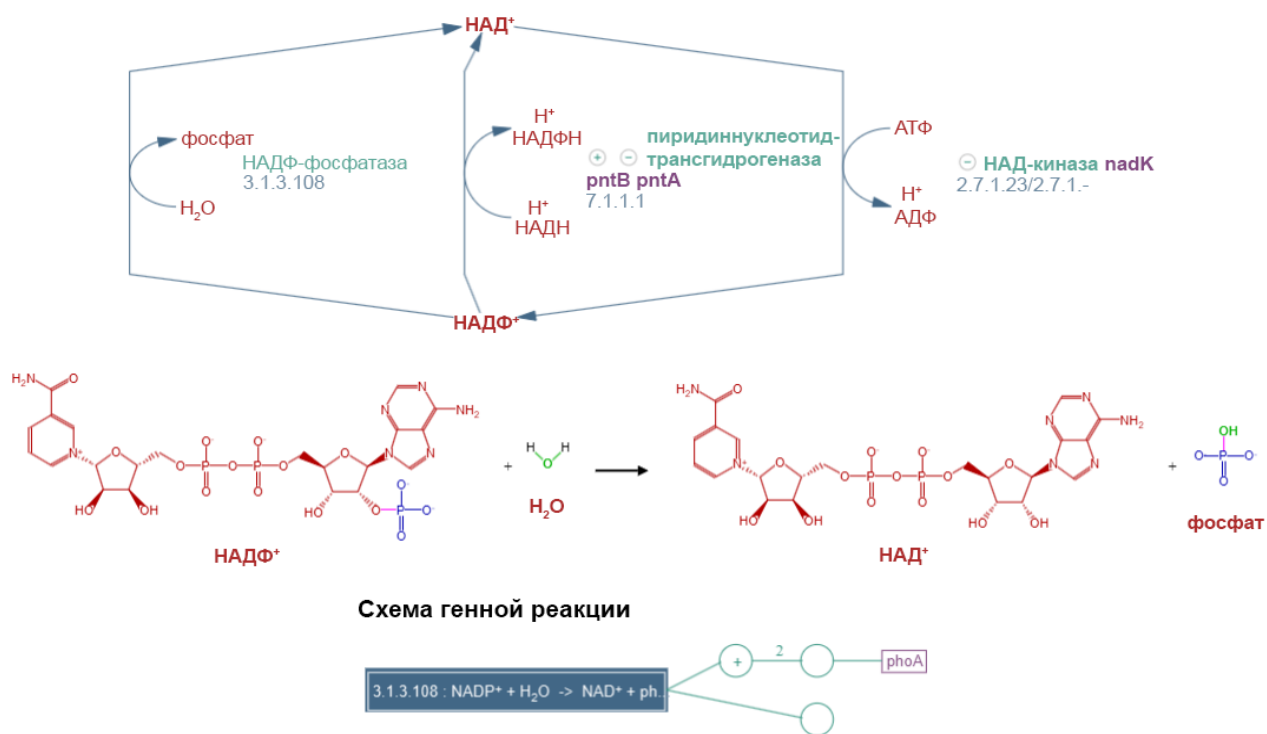


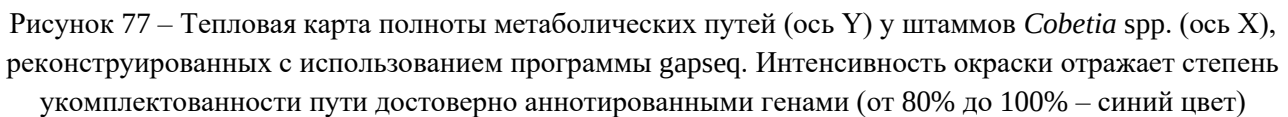
Рисунок 76 – Метаболический путь конверсии НАДФ⁺ в НАД⁺ с участием ЩФ PhoA *Cobetia* spp., реконструированный в программе gapseq на основе данных BioCyc Genome Database Collection (<https://biocyc.org/>; дата обращения: 03.11.2025)

Пентозофосфатный путь является основным источником НАДФН в клетках *E. coli*, наряду с реакциями, катализируемыми изоцитратдегидрогеназой (Icd) и трансгидрогеназой PntAB (Sauer et al., 2004). Несмотря на ключевую роль этих молекул, механизмы регуляции взаимопревращения НАДФ(Н) и НАД(Н) путем фосфорилирования и дефосфорилирования

остаются недостаточно изученными. Известно, что растворимая трансгидрогеназа SthA и мембранно-связанный протонный насос PntAB обеспечивают перенос восстановительных эквивалентов между пулами НАД и НАДФ в зависимости от редокс-статуса метаболизма (Sauer et al., 2004; Kawai, Murata, 2008). Однако, в отличие от хорошо охарактеризованных НАД-киназ, обеспечивающих биосинтез НАДФ⁺ (Grose et al., 2006), специфические эубактериальные НАДФ⁺-фосфатазы (НАДФазы) до сих пор не идентифицированы на генетическом уровне. Так, продукт гена *cysQ* у *E. coli*, несмотря на высокую активность *in vitro*, не был признан истинной НАДФазой в условиях *in vivo* (Kawai, Murata, 2008). В связи с этим обнаруженная нами в геномах *Cobetia* spp. потенциальная способность ЩФ PhoA катализировать дефосфорилирование НАДФ(Н) открывает новые перспективы в понимании регуляции пула пиридиннуклеотидов у морских бактерий. Если ЩФ PhoA (CmAP) способна превращать НАДФН в НАДН (как предсказал garseq), то она буквально переключает режим клетки с «созидания и защиты» (анаболизм/антиоксиданты) на «энергогенерацию» (катаболизм). Это объясняет, почему после обработки клеток препаратом ЩФ CmAP (Balabanova et al., 2016, 2017) наблюдается замедление роста и подавление биопленок – клетка из-за изменения баланса кофакторов может «думать», что находится в условиях жесткого энергодифицита.

Таким образом, совокупность полученных данных – геномная локализация *phoA* (рис. 75), широкая субстратная специфичность и каталитическая пластичность (catalytic promiscuity) ЩФ, в том числе в отношении НАДФН (Plisova et al., 2005; Balabanova et al., 2023, 2024a; Seitkalieva et al., 2024), а также реконструированные метаболические пути в геномах *Cobetia* spp. (рис. 76, 77) – позволяют сформулировать следующую гипотезу. Неспецифичная фосфомоноэстераза PhoA может участвовать в дефосфорилировании внеклеточного НАДФН для модуляции редокс-баланса в условиях повышенной потребности клетки в НАДН (например, при окислительном стрессе). При этом следует учитывать классическую внеклеточную (периплазматическую) локализацию ЩФ PhoA, что ограничивает её доступ пулом внеклеточных субстратов. Тем не менее, геномный скрининг штаммов *Cobetia* spp. подтвердил наличие множества альтернативных путей поддержания фонда пиридиннуклеотидов, включая биосинтез *de novo* и пути спасения (NAD salvage pathways) из внешних источников (рис. 77). Это указывает на то, что PhoA может быть важным звеном в утилизации экзогенных предшественников НАД, обеспечивая клетку энергетическими эквивалентами в стрессовых условиях.

В геномах *Cobetia* spp. идентифицировано в общей сложности 17 биосинтетических и НАДН-зависимых путей, характеризующихся различной степенью полноты (укомплектованности) достоверно аннотированными генами (рис. 77)



К ним относятся: 1) пути биосинтеза и утилизации НАД: *de novo* синтез (из аспартата – 83 %, из 2-амино-3-карбоксимуконатного полуальдегида – 100 %) и пути спасения (*salvage pathways*) из никотинамида (NAM, 50 %) и никотинамидрибозида (NAR, 33–50 %); 2) пути переноса электронов (дыхание): две изоформы НАДН–цитохром *b_d*-оксидазы I и II (анаэротолерантность, 100 % и 50 %), НАДН:менахинон-6 оксидоредуктаза (100 %), две изоформы НАДН–цитохром *b_o* оксидазы (аэробное дыхание, 100 % и 50 %); 3) анаэробные пути: НАДН–фумаратное дыхание (50 %) и НАД-зависимый Na⁽⁺⁾-транслоцирующий ферредоксин:НАД⁽⁺⁾ оксидоредуктазный комплекс R_{sx}(R_{nf}) (100 %). Таким образом, *Cobetia* spp. обладают генетическим потенциалом как для аэробного, так и для некоторых путей анаэробного дыхания. В частности, наличие анаэробного R_{sx}(R_{nf})-комплекса, сопряженного с транспортом ионов Na⁺ и производством АТФ, важно для поддержания ионного баланса и, возможно, для фиксации CO₂ (рис. 75, 77).

Окислительно-восстановительный баланс при различных типах метаболизма регулируется внутриклеточной концентрацией НАД⁺/НАДН. Повышение уровня НАД⁺ может обеспечиваться за счет усиления экспрессии периплазматической ЩФ PhoA, которая, предположительно, расщепляет экзогенный НАДФН (рис. 75–78). Соседство *phoA* с генами других регуляторных и катаболических систем (контроль роста, биопленки) подтверждает гипотезу о возможности быстрого метаболического переключения бактерий между аэробным, микроаэробным и анаэробным дыханием в ответ на изменения условий среды.

Аналогичная метаболическая перестройка описана для космополитной бактерии *P. aeruginosa* при переходе от аэробного планктонного фенотипа к микроаэробному образу жизни в составе биопленки. В таких сообществах клетки разных фенотипов продолжают коммуницировать, обмениваясь витаминами и метаболитами – продуктами аэробных и анаэробных путей (Balabanova et al., 2021).

Помимо анаэробного дыхания, в геномах *Cobetia* spp. идентифицировано еще 16 путей, функционирующих в анаэробных условиях и вовлеченных в морфогенез биопленок, а также деградацию ароматических соединений. К ним относятся пути катаболизма антранилата (III), L-фенилаланина (II), бензоата, бензоил-КоА (III), галлата, нафталина, фторглюцинола, а также циклогексан-1-карбоксилата и ацетилена. Кроме того, выявлены пути расщепления пуриновых оснований (II) и L-лактальдегида. Биосинтетический потенциал включает синтез жирных кислот (гондоата, олеата IV), 5-метоксибензимидазола (нижний лиганд витамина B12; Balabanova et al., 2021) и тиазола (I). Особый интерес представляет наличие полного набора генов анаэробного цикла трикарбоновых кислот (*Helicobacter*-типа) (рис. 77). Более того, во всех геномах *Cobetia* spp. с помощью *gapseq* идентифицированы полные пути (100%) автотрофной фиксации CO₂, характерные для облигатных олиготрофов. Также выявлены биосинтетические локусы, не

обнаруженные при первичном скрининге программой antiSMASH, включая гены синтеза трипептида офтальмата – ключевого биомаркера окислительного стресса, и ферменты деградации акрилата, участвующего в метаболизме производных микропластика (рис. 77).

Наличие разветвленной системы утилизации, биосинтеза и взаимопревращения НАДН/НАДФН (включая оксидазы и трансгидрогеназы) свидетельствует о существовании у *Cobetia* spp. прецизионного механизма контроля редокс-гомеостаза. Это необходимо для оперативного переключения метаболизма между аэробным и анаэробным режимами. Данный генетический репертуар обеспечивает выживание в широком спектре экологических ниш – от эвтрофных зон, богатых кислородом, до глубоководных анаэробных осадков с дефицитом питательных веществ. Высокое метаболическое разнообразие морских гетеротрофов рода *Cobetia* подтверждает их статус бактерий-космополитов, способных к эффективной адаптивной перестройке в ответ на динамические изменения условий окружающей среды.

В данном исследовании предложена функциональная схема организации белков генного кластера, вовлеченных в регуляцию энергетического обмена у морских гетеротрофных бактерий (рис. 78). ЩФ PhoA созревает в периплазме и секретируется в окружающую среду, где катализирует гидролиз органофосфатов с высвобождением неорганического фосфата (P_i). Поступление P_i в периплазму через порины (OMP) способствует буферизации периплазматического пространства хемиосмотическими катионами (H^+/Na^+) и обеспечивает последующий импорт фосфатов в цитозоль через системы транспорта цитоплазматической мембраны (Kamenskaya et al., 2022; Balabanova et al., 2024a). Ключевым звеном системы является мембраносвязанная НАД(Ф)⁺-трансгидрогеназа (рис. 78). Этот фермент использует энергию ионного градиента (протон- или натрий-движущую силу) для поддержания необходимого баланса между восстановительными пулами НАД(Н) и НАДФ(Н). Данный механизм обеспечивает обратимую связь между энергетическим статусом клетки и её антиоксидантным потенциалом (рис. 78). Данные процессы, сопряженные с дыханием, обеспечивают синтез АТФ и последующее поддержание пула ГТФ, которые служат универсальными источниками энергии и регуляторными молекулами. Белковый комплекс ГТФазы/АТФазы катализирует гидролиз нуклеозидтрифосфатов, обеспечивая энергией энергозатратные защитные механизмы. К ним относятся системы противовирусной защиты (в том числе антифаговый иммунитет) и процессы репарации ДНК, поврежденной в результате воздействия ксенобиотиков, протекающие с участием специализированных ГТФ-зависимых белков, в частности TerB (рис. 78). В процессе дыхания основные пулы НАД(Н) и НАДФ(Н) генерируются в цикле трикарбоновых кислот и сопряженных реакциях. Однако клетка способна использовать экзогенный НАДФН (через пути утилизации НАД(Ф)Н), который является природным субстратом для неспецифической ЩФ (Plisova et al., 2005; Seitkalieva et al., 2024). Таким образом, в условиях высокой активности

внеклеточной ЩФ PhoA, продукты дефосфорилирования экзогенного НАДФН могут приводить к росту внутриклеточной концентрации НАД(Н). Смещение редокс-баланса в сторону накопления НАД(Н) способствует активации катаболических процессов и перестройке энергетического статуса клетки (рис. 78).

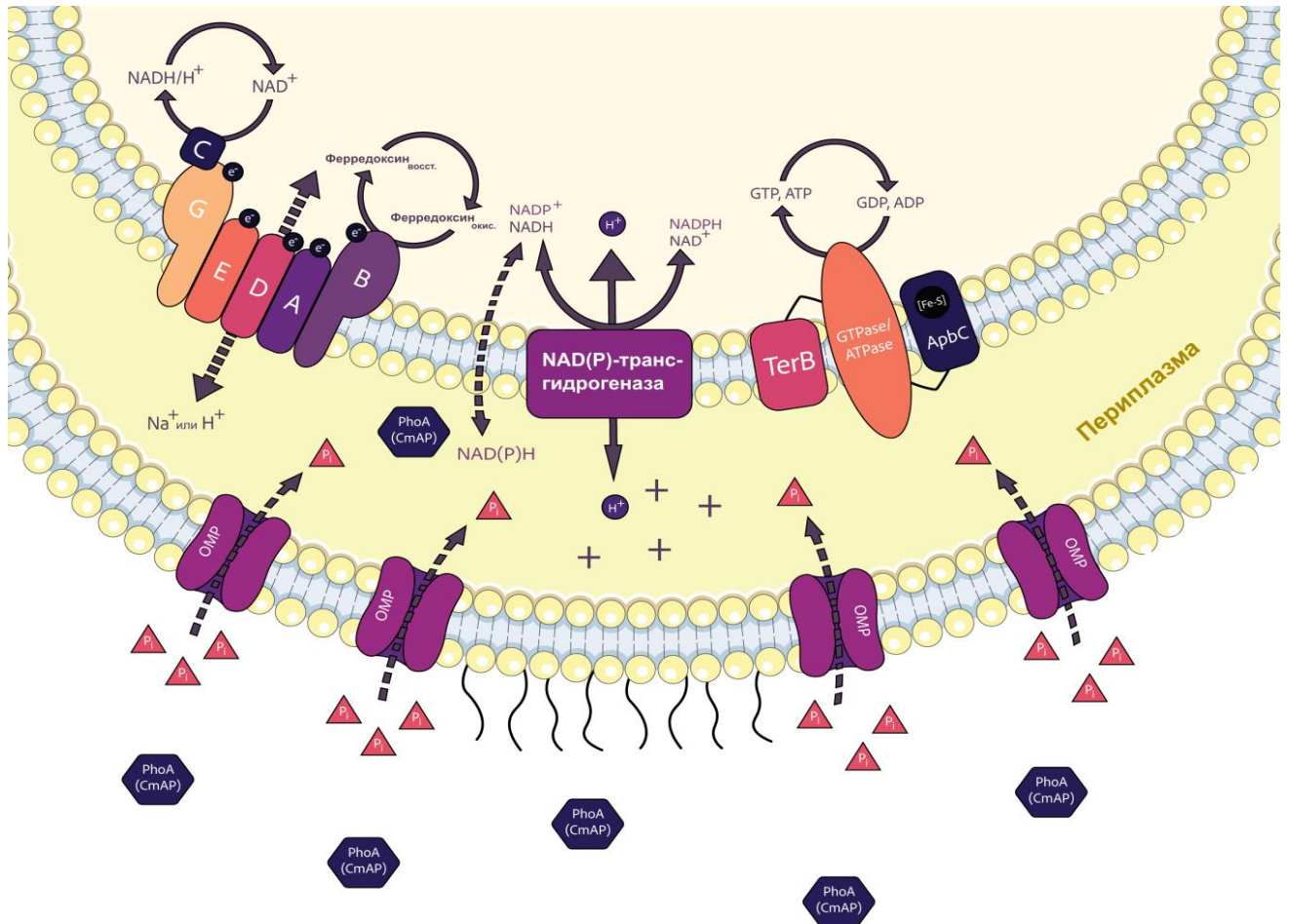


Рисунок 78 – Предполагаемая схема участия щелочной фосфатазы PhoA в поддержании редокс-гомеостаза и энергетического баланса у морских бактерий *Cobetia* spp.: PhoA (CmAP) (темно-синий шестиугольник) – ЩФ семейства PhoA; Pi (красные треугольники) – неорганические фосфат-анионы; OMR (фиолетовые каналы) – внешние порины; RsxABCDGE (разноцветные фигуры) – субъединицы мембранного комплекса, сопряженного с интерконверсией НАД(Н)/НАД⁺ и восстановленного/окисленного ферредоксина; NAD(P)⁺-трансгидрогеназа (фиолетовый прямоугольник) – гипотетический DUF3465-содержащий белок мембраносвязанной Si-специфичной НАД(Ф)⁺-трансгидрогеназы; NADPH (в периплазме) – внеклеточный НАДФН; GTPase/ATPase (оранжевый овал) – мультиферментный комплекс ГТФазы/АТФазы; TerB (красный прямоугольник) – ГТФ-зависимый белок семейства TerB (Balabanova et al., 2024a)

Известно, что кофактор НАД(Н) преимущественно сопряжен с катаболическими процессами и генерацией энергии, тогда как НАДФ(Н) обеспечивает анаболические реакции

(биосинтез жирных кислот, нуклеотидов и др.) и поддержание антиоксидантного потенциала в ответ на образование АФК (Spraans et al., 2015; Balabanova et al., 2024a, б).

Вероятно, экспрессия бактериальной ЩФ семейства PhoA возрастает при усилении окислительного стресса, возникающего в результате активного аэробного метаболизма. Напротив, её уровень снижается при необходимости возобновления анаболических процессов, например, при переходе к анаэробной фазе роста. В этих условиях для генерации энергии используется Rnf (Rsx)-опосредованный транспорт электронов, сопряженный с транслокацией ионов Na^+ и формированием электрохимического градиента (рис. 75, 78). Подобная негативная регуляция ЩФ PhoA в отношении биосинтеза тетрапирролов, белков редокс-систем, транспортеров железа и процессов деления клеток была ранее выявлена у диатомовых микроводорослей при анализе транскриптома в условиях варьирования концентрации фосфатов (Zhang et al., 2021a).

Отсутствие консервативной оперонной структуры у всех исследованных щелочных фосфатаз (включая PhoD1, PhoD2, PhoX и PafA), согласно результатам анализа с использованием Operon-mapper и LOFI, а также специфический состав генных кластеров (ГК), в которых локализованы их CDS, могут указывать на дифференциальную регуляторную роль каждой из ЩФ в зависимости от типа метаболизма, используемого микроорганизмом в определенных экологических условиях (рис. 75, рис. A7–10).

Несмотря на низкую степень гомологии белков морских бактерий с ферментами, имеющими экспериментально подтвержденную функцию, использование программы Syntenome, разработанной специально для данного исследования (Balabanova et al., 2024a), позволило реконструировать геномное окружение и предсказать функции других генов ЩФ, в частности *phoD1* (Noskova et al., 2019), *phoD2*, *phoX* и *pafA* (рис. A7–10).

Вероятно, ГК *phoD1* и *phoD2*, подобно кластеру *phoA*, вовлечены в регуляцию метаболического ответа на окислительный и осмотический стресс. В их состав входят гены *katE*, кодирующие две гем-содержащие каталазы НРП (гидропероксидазы II), катализирующие разложение H_2O_2 до воды и молекулярного кислорода. Кроме того, идентифицированы гены сенсорного белка семейства DJ-1/Pfp1, чувствительного к редокс-дисбалансу, и трансмембранного стресс-реактивного белка семейства GlsB/YeaQ/YmgE. Наличие в кластере Na^+ -зависимых симпортеров семейства SSS (*solute:sodium symporter*), обеспечивающих транспорт сахаров, аминокислот, витаминов и ионов железа, а также ряда белков с неизвестной функцией (содержащих домены DUF2927 и DUF924), указывает на комплексный характер адаптации, координируемой данными локусами (рис. A7).

Дифференциация последовательностей PhoX и PafA в рамках данного анализа оказалась затруднительной ввиду отсутствия на сегодняшний день четко определенных молекулярных

маркеров для дискретной классификации этих структурных семейств ЩФ. Тем не менее, для указанных белков было выявлено четыре типа биогеохимических кластеров (БГК) с уникальной генетической архитектурой, вовлеченных в метаболизм критически важных элементов (рис. А8–А10).

Первый тип БГК *phoX/pafA* включает гены глобального регулятора углеродного обмена Cra (*catabolite repressor/activator*), субъединиц ABC-молибдатного транспортера, фосфодиэстеразы ACP и азот-метаболической фосфотрансферазной системы. Наличие в кластере транспортеров фруктозосодержащих углеводов и 1-фосфофруктокиназы указывает на прямую связь данной ЩФ с регуляцией гликолиза. Дополнительно идентифицированы гены белка-переносчика серы MOSC, глутатион-S-трансферазы и металлопептидазы семейства M90 (рис. А8).

Второй тип БГК *phoX/pafA* содержит ABC-транспортную систему и, вероятно, ассоциирован с работой оксидоредуктаз семейства GMC (глюкоза-метанол-холин) и дегалогеназ. Присутствие фосфатаз семейства HAD и 2-фосфо-L-лактат-трансферазы CofD (участника глюконеогенеза) предполагает роль этого кластера в адаптации к абиотическому стрессу и поддержании редокс-баланса (рис. А9).

Третий тип БГК *phoX/pafA* характеризуется наличием генов ABC-транспортеров и HD-доменных металлобелков. Особый интерес представляет наличие α -кетоглутарат-зависимой диоксигеназы семейства TauD/TfdA. Этот фермент катализирует оксигенолитическое высвобождение сульфита при катаболизме таурина и играет важную роль в адаптации к гипоксии и модуляции транскрипционной активности (рис. А10).

Четвертый тип БГК *phoX/pafA* включает гены биосинтеза сульфатированных капсульных полисахаридов, поликетидсинтазы I типа (PKS-I) и НАД(Н)-зависимой оксидоредуктазы семейства SDR. Такая организация локуса предполагает его участие в переходе к биопленочному фенотипу в условиях микроаэрофилии или анаэробнозиса (рис. А10).

Таким образом, точное количество типов ЩФ, которое может быть закодировано в бактериальном геноме, остается до конца не установленным. Однако БГК каждой ЩФ-подобной последовательности характеризуется специфическим набором оксидоредуктаз и сопутствующих регуляторных белков (рис. 75, 78, рис. А7–А10). Очевидно, что данные локусы кодируют функциональные блоки мембранных белков, вовлеченных в определенные типы энергетического обмена (дыхание или биологическое окисление). Эти процессы неизбежно сопряжены с развитием окислительного стресса и/или активным хемоосмотическим транспортом, что требует строгого контроля для предотвращения деполяризации мембраны и последующей гибели клетки.

Пять последовательностей ЩФ (PhoD1, PhoD2, PhoX, PafA и PhoA), идентифицированных в геноме *C. amphilecti* КММ 296, пространственно и функционально

соответствуют пяти генным кластерам (БГК) мембранных белков, вовлеченных в различные типы энергетического обмена. Данные локусы включают компоненты электронтранспортных цепей (ЭТЦ) для НАД(Н)-зависимого мембранного окисления: 1) НАДН:цитохром *b_d*-оксидазу I (функционирует в микроаэробных условиях при низком уровне O₂); 2) НАДН:менахинон-6-оксидоредуктазу (основное аэробное дыхание); 3) НАДН:цитохром *b_o*-оксидазу I (активна при высоком насыщении среды O₂); 4) НАДН-фумаратредуктазный комплекс (обеспечивает анаэробное дыхание); 5) ферредоксин:НАД⁺-оксидоредуктазу (Rsx/Rnf-комплекс). Последний комплекс характерен для анаэробных процессов (таких как ацетогенез), где восстановление CO₂ сопряжено с использованием молекулярного водорода в качестве донора электронов (табл. 13, рис. 75, 77, 78, A7–A10).

Комплекс Rsx(Rnf) представляет собой одну из наиболее архаичных электронтранспортных цепей (ЭТЦ), поскольку восстановление CO₂ водородом является ключевой характеристикой метаболизма древних метаногенных архей и ацетогенных бактерий (Rosenbaum et al., 2021). Тем не менее, ЩФ PhoA была выделена из морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 при культивировании в аэробных условиях (Иванова и др., 1994), когда для дыхания использовалась O₂-зависимая цитохром- или менахинон-содержащая протон-транслоцирующая ЭТЦ (рис. 77, 78). Известно, что ацетогены способны существовать на энергетически бедных субстратах, потенциала которых достаточно лишь для восстановления НАД⁺. В этом случае комплекс Rnf используется ими для генерации восстановленного ферредоксина, необходимого для анаболических реакций (Rosenbaum et al., 2021). Предполагается, что мембранные комплексы Rsx(Rnf) и цитохром/хинон-содержащие гидрогеназы у таких бактерий могут быть состыкованы в мембране для обеспечения электронной бифуркации (рис. 78). Примером такого механизма является комплекс FixABCX, который катализирует окисление НАДН, сопряженное с одновременным восстановлением ферредоксина и хинона (Ledbetter et al., 2017).

Таким образом, можно предположить, что экспрессия ЩФ PhoA *C. amphilecti* КММ 296 инициируется в аэробных условиях, когда функционирует менахинон-содержащая ЭТЦ окислительного фосфорилирования, а комплекс Rsx(Rnf) деактивирован (рис. 75, 77, 78). Последний обеспечивает протекание карбонатного дыхания, сопряженного с анаэробным гликолизом и путем Энтнера-Дудорова (KDFG-путь), продуктами которых являются ацетат и восстановительные эквиваленты НАДФН для анаболических реакций (Kuhns et al., 2020).

Экспериментально установлено, что уровень биосинтеза рекомбинантной ЩФ PhoA *C. amphilecti* КММ 296 при гетерологичной экспрессии в *E. coli* всегда отрицательно коррелирует с общим выходом клеточного белка (Голотин, 2014; Balabanova et al., 2014). Это может свидетельствовать о реализации механизма отрицательной регуляции клеточного роста под

действием PhoA в аэробных условиях, когда анаболизм поддерживается гликолизмом и пентозофосфатным путем (PPP). Здесь прослеживается четкая аналогия с механизмами отрицательной регуляции анаболизма у эукариотических микроводорослей: при повышении экспрессии ЩФ PhoA клетки переходили от активного деления и биосинтеза белков (включая компоненты аэробной ЭТЦ) к режиму сохранения энергии (АТФ) и снижения продукции АФК (рис. 42).

Вероятно, по сходному принципу могут функционировать и другие типы бактериальных ЩФ (рис. А7–А10). Это особенно актуально при попадании бактерий в микроаэробные или анаэробные условия, требующие оперативного переключения метаболических путей и изменения стратегии энергетического обмена. Тем не менее, конкретный молекулярный механизм сопряжения экспрессии генов ЩФ с регуляцией окислительного метаболизма и скорости клеточного роста остается предметом дальнейших экспериментальных исследований

4.6. Структурно-функциональные особенности ЩФ семейства PhoA морской бактерии *Cobetia amphilecti* и ее рекомбинантных аналогов

4.6.1 Пространственная структура и каталитические свойства ЩФ PhoA *C. amphilecti* KMM 296, конструирование генно-инженерных белков и диагностических тест-систем

Анализ аминокислотной последовательности ЩФ CmAP морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (UniProt: Q1W622) в программной среде МОЕ показал, что оптимальным прототипом для построения её высокоточной 3D-модели (рис. 79, 80) и комплексов с лигандами является кристаллическая структура ЩФ VAP морской бактерии *V. splendidus* (PDB: 3E2D), установленная с разрешением 1,4 Å (Helland et al., 2009; Golotin et al., 2015; Likhatskaya et al., 2018; Seitkalieva et al., 2024). Суперпозиция α -атомов модели CmAP и прототипа VAP продемонстрировала величину среднеквадратичного отклонения (RMSD) 0,43 Å. Столь низкое значение подтверждает высокое качество модели и возможность её использования для исследования механизмов связывания фермента с субстратами и ингибиторами, а также для установления архитектуры металл-связывающих сайтов методами *in silico* (рис. 79, 80). Экспериментальный мутагенез подтвердил наличие консервативных для семейства PhoA остатков: каталитического нуклеофила Ser65 (соответствует Ser92 тканенеспецифической ЩФ человека), субстрат-связывающего остатка Arg129 (Arg166), а также Trp274 (His317), Tyr325 (Tyr367) и His277, координирующих субстрат и два иона Zn^{2+} в активном центре при участии молекул воды, и Asp12 (Asp42 в человеческой ЩФ), который играет ключевую роль в координации иона Mg^{2+} , димеризации и термостабильности (Балабанова и др., 2023; Millán et al., 2006; Golotin et al., 2015; Ásgeirsson et al., 2020; Hjörleifsson et al., 2021) (рис. 79, 80).

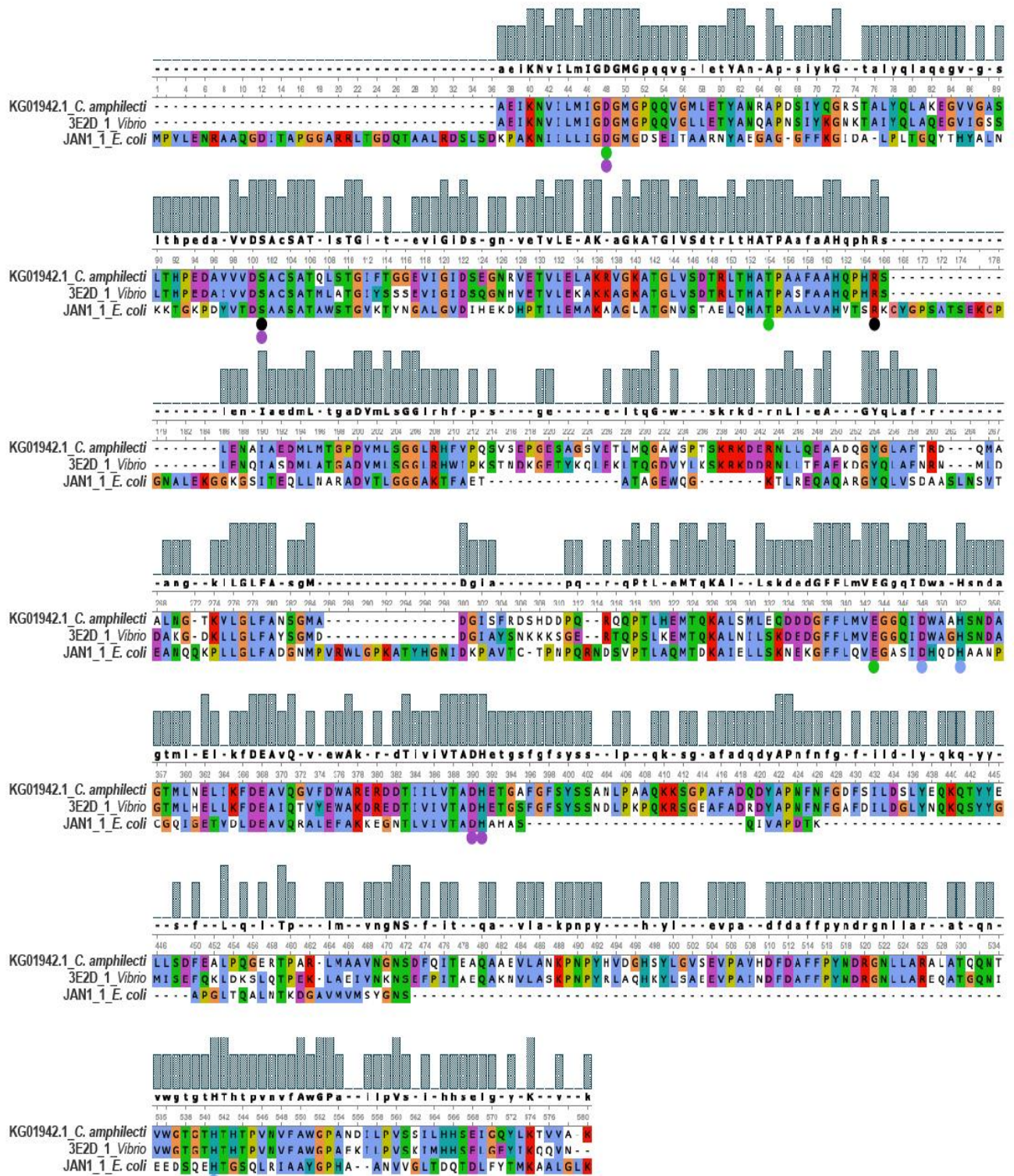


Рисунок 79 – Выравнивание последовательностей бактериальных ЩФ PhA: CmAP (*C. amphilecti*), VAP (*V. splendidus*) и ECAP (*E. coli*). Каталитический (S) и субстрат-связывающий (R) остатки VAP отмечены меткой черного цвета, Zn1-, Zn2- и Mg-металл-связывающие остатки – голубым, розовым и зеленым цветом соответственно. Последовательность со стороны N-конца холодоактивных CmAP и VAP укорочена относительно мезофильной ECAP, «большая петля» в их пространственной структуре формируется на участке 472-534. Рисунок получен с помощью сервера Toffee (<https://tcoffee.crg.eu>)

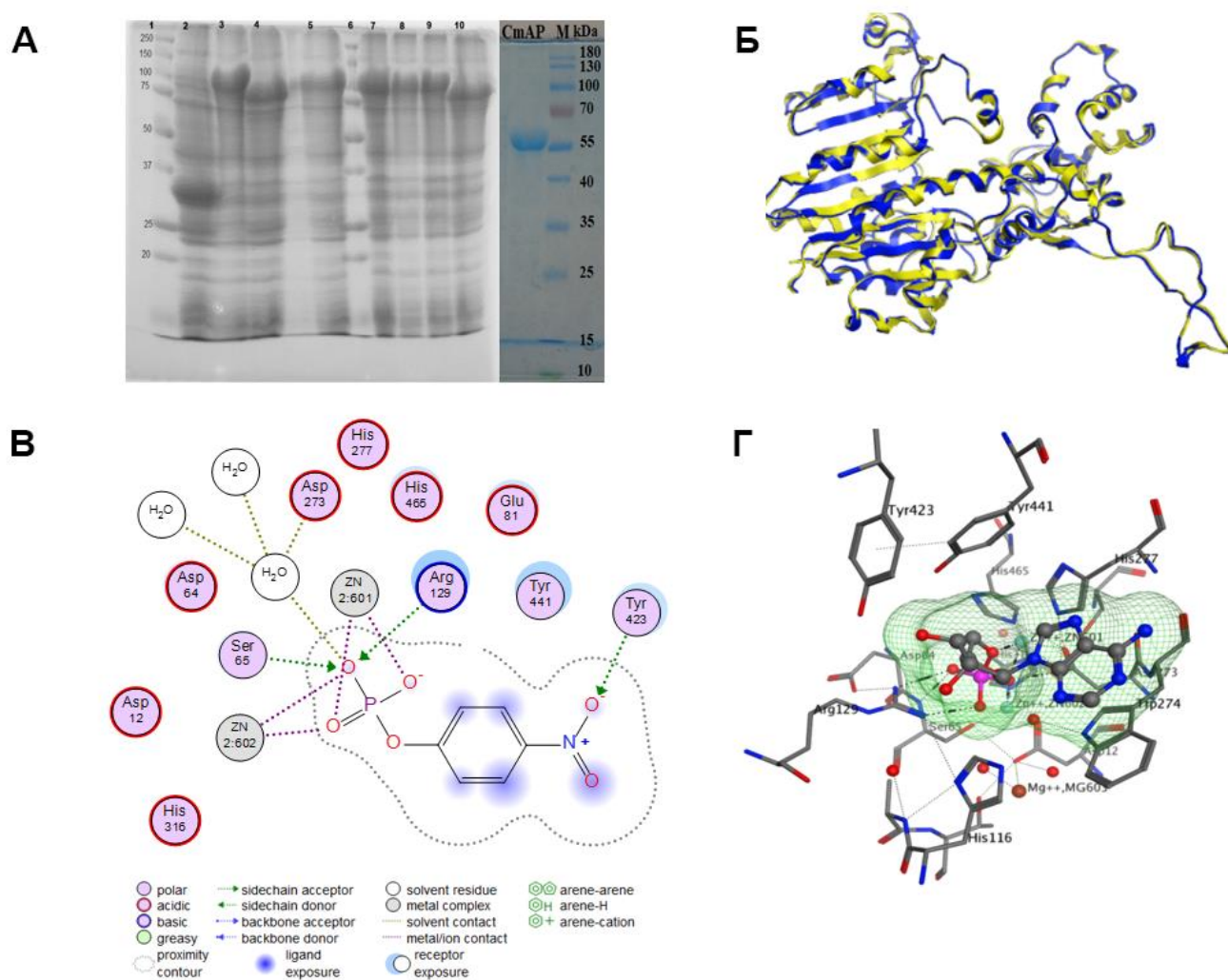


Рисунок 80 – Структурный и электрофоретический анализ рекомбинантной ЩФ PhxA (CmAP): А (слева): Электрофореграмма белковых лизатов рекомбинантных культур *E. coli* Rosetta (DE3)/PhoA (CmAP): дорожки 1 и 6 – маркеры молекулярной массы белка, кДа (BioRad, США); дорожка 2 – клеточный экстракт контрольного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET-40b(+) после ИПТГ-индуцированной экспрессии (полоса 32,5 кДа – пустая плазмида с шапероном DsbC); полосы 3–5 и 7–10 – клеточные экстракты *E. coli* Rosetta (DE3)/PhoA после экспрессии целевого белка (87,5 кДа – рекомбинантные белки DsbC/PhoA, 104,5 кДа – рекомбинантные бифункциональные лектины с ЩФ [DsbC/PhoA/CGL]); А (справа): Электрофореграмма очищенной рекомбинантной ЩФ PhxA (CmAP) после удаления шаперона DsbC, М – маркеры молекулярной массы, кДа (BioRad, США). Б. Суперпозиция теоретической 3D-модели мономера ЩФ PhxA морской бактерии *C. amphilecti* и кристаллической структуры прототипа VAP (*V. splendidus*) (ленточная диаграмма). «Большая петля» участвует в формировании димера и холодовой адаптации. В. 2D-диаграмма контактов активного центра ЩФ PhxA *C. amphilecti* и субстрата *n*-НФФ. Символы контактов на панели внизу из MOE v.2020.09 (<https://www.chemcomp.com/moe/>). Г. Выделенная область контактов активного центра ЩФ PhxA *C. amphilecti* в 3D-модели её комплекса с природным субстратом 5'-АМФ

Аминокислотные остатки, участвующие в связывании структурных ионов магния, влияющих на термостабильность CmAP и VAP, специфичны для холодоактивных ЩФ PhoA морских бактерий, чтобы обеспечивать конформационную гибкость (рис. 80). Остаток Trp274 в активном центре CmAP/VAP (соответствует Lys328 в *E. coli* и His320 в PLAP или His321/328 в зависимости от системы нумерации и типа тканей) также влияет на сродство фермента к субстрату и криоадаптацию, что было подтверждено мутагенезом (Балабанова и др., 2023; Golotin et al., 2015; Hjörleifsson et al., 2021). Упаковка молекулы ЩФ PhoA относится к (α - β - α)-типу: β -лист из 9 β -тяжей с обеих сторон окружен α -спиралями (рис. 80 Б). Сравнение содержания элементов вторичной структуры фосфатаз CmAP и VAP показало, что при 82 % идентичности аминокислотных последовательностей CmAP имеет несколько большее содержание β -структуры и α -спиралей, а также остатков пролина. В остальном ферменты PhoA морских психрофильных бактерий имеют схожие свойства. Они адаптированы к низким температурам, поэтому имеют в своей структуре гибкие локальные области, которые обеспечивают высокую эффективность каталитического действия, при этом стабильность молекулы фермента снижается (Helland et al., 2009; Golotin et al., 2015; Hjörleifsson et al., 2021). Такой гибкой структурой у морских бактериальных ферментов CmAP, VAP и ЩФ *Halomonas* sp. 593 (Hjörleifsson et al., 2021) является длинная и неструктурированная область интерфейса – «большая петля», наличие которой у ферментов обуславливает наивысшую скорость оборота (k_{cat}) среди ЩФ (Golotin et al., 2015; Hjörleifsson et al., 2021) (рис. 79, 80 Б).

Рекомбинантный активный фермент, как CmAP, так и VAP, представляет собой мономер с массой 55 ± 6 кДа (рис. 80 А), способный к образованию димера. Он имеет оптимум активности при pH 10,0–10,4, термолабилен с периодом полуинактивации 6 мин при 40 °C и 30 мин при 32 °C для VAP или 27 мин при 40 °C и 6 мин при 45 °C для CmAP (Балабанова и др., 2023; Plisova et al., 2005; Helland et al., 2009; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015). Ферменты PhoA из *C. amphilecti* и *V. splendidus* имеют не только более высокое число оборотов k_{cat} (на 1–2 порядка выше, чем у мезофила *E. coli*: 1500–3000 s^{-1} vs 40–100 s^{-1} в зависимости от температуры) и каталитическую эффективность k_{cat}/K_M (10^6 – 10^7 $M^{-1} \cdot s^{-1}$), но и более высокий коэффициент Михаэлиса-Ментен (K_M) по сравнению с ферментом PhoA из *E. coli*. Неорганический фосфат для фермента VAP является конкурентным ингибитором с относительно высоким значением K_i (1,7 мМ) (Helland et al., 2009). Для сравнения, у ЩФ *E. coli* значение K_i для фосфата значительно ниже (обычно в диапазоне 0,01–0,1 мМ в зависимости от pH), что означает гораздо более сильное ингибирование. Это объясняет почему холодоактивные ферменты менее чувствительны к ингибированию продуктом, чем мезофильные аналоги, что выгодно для катализа в суровых условиях. Таким образом, при сохранении всех консервативных доменов в белке, существенные изменения в его структуре, заключающиеся в укорачивании последовательности белка со

стороны N-конца и появлении области “большой петли” со стороны C-конца (совпадает с пробелами в ЩФ *E. coli* при выравнивании последовательностей), отражаются на физико-химических и каталитических свойствах ЩФ PhoA морских гетеротрофных бактерий, что явно свидетельствует об их холодовой адаптации (Ásgeirsson et al., 2020; Markússon et al., 2022; Hamid et al., 2022) (рис. 79, 80).

Структура димера у ЩФ морских бактерий имеет 12 межузельных Н-связей, шесть из которых находятся между атомами основной цепи. Интерфейс между «большими петлями» отдельных субъединиц фермента формируется различными межмолекулярными связями, в основном, вблизи основания петель. Основная область Н-связей, соединяющая петлю с другой субъединицей, расположена вокруг Arg336 (Hjörleifsson et al., 2021). Кроме того, высокую скорость оборота морской фермент достигает за счет специфической конформации отдельных остатков при высоком значении pH или высокой ионной силе (Ásgeirsson et al., 2020, Markússon et al., 2022). Показано, что VAP (CmAP) значительно активируются анионами и демонстрируют двухпиковый профиль pH-активности, обусловленный предполагаемым изменением конформации белка в диапазоне pH 9,0-10,5 (Markússon et al., 2022). Это конформационное изменение приводит к потере сродства к субстрату и продукту реакции (P_i), что делает лимитирующим не последний этап высвобождения нековалентно связанного P_i , а этап дефосфорилирования ковалентно связанного промежуточного продукта. Предполагается, что влияние NaCl на активность фермента носит двойственный характер. Во-первых, в присутствии соли увеличивается скорость высвобождения P_i путем прямого связывания с заряженной группой в активном центре, скорее всего, с ионом Zn^{2+} , что стабилизирует фермент и приводит к сдвигу равновесия в сторону активной конформации, фактически повышая термостабильность активного центра (защищая его от тепловой денатурации) в диапазоне pH 8,0-10,5 (Markússon et al., 2022). Данный факт объясняет температурные оптимумы холодоактивных морских ЩФ при 40 °C и 50 °C (Plisova et al., 2005; Helland et al., 2009; Golotin et al., 2015; Markússon et al., 2022). Во-вторых, NaCl влияет на константу диссоциации димера, изменение значения которой имеет сигмоидальный характер при pH 8,0, но не при pH 10,5, что свидетельствует о специфическом связывании хлорид-иона с группой(ами), участвующей(ими) в соединении мономеров, или приведении мономеров в продуктивную конформацию для образования димера. Более того, инактивация морской ЩФ не связана с диссоциацией димера или ионов Zn^{2+}/Mg^{2+} , а, скорее всего, обусловлена тонкими конформационными изменениями в активном центре, где ключевые остатки катализатора могут быть в неблагоприятном для катализа положении (Markússon et al., 2022).

3D-моделирование CmAP показало, что при $pH \geq 10,0$ локальное микроокружение активного центра способствует изменению состояния заряда субстрат-связывающего остатка

Arg129 (он становится нейтральным). Это объясняет низкое сродство фермента к P_i (HPO_4^{2-}), что способствует более быстрому освобождению активного центра и повышению скорости оборота (Golotin et al., 2015) В). Кроме того, остаток Tyr441, расположенный над входом в активный центр, приобретает отрицательный заряд и выталкивает P_i из активного центра (рис. 80 В, Г). Низкое сродство к фосфату может способствовать более высокой скорости оборота за счет более легкого высвобождения продукта реакции из активного центра ЩФ. Морской бактериальный фермент ЩФ PhoA проявляет зависимость от ионной силы в гораздо большей степени, чем его аналоги из наземных источников, что свидетельствует о коэволюции галофильной и психрофильной адаптации (Karan et al., 2020). Температурная стабильность фермента повышается вдвое при увеличении концентрации соли NaCl до 0,5 М (эквивалент морской воды). Обнаружен сайт связывания ионов Cl^- в активном центре кристалла VAP, который в связанном состоянии способствует увеличению как ферментативной активности, так и стабильности (Markússon et al., 2022). Однако при высоком значении pH активность CmAP и VAP повышается вне зависимости от ионной силы (Балабанова и др., 2023; Golotin et al., 2015; Markússon et al., 2022).

Несмотря на имеющиеся структурно-функциональные отличия ЩФ PhoA морских бактерий от наземных гомологов, у них есть общие каталитические свойства с ферментами млекопитающих, такие как высокая удельная активность препаратов очищенных белков, в отличие от термостабильной ЩФ PhoA *E. coli*, и каталитическая эффективность в отношении *n*-НФФ и пуриновых нуклеотидов, в частности АМФ (рис. 80 В, Г) (Балабанова и др., 2023; Balabanova et al., 2024a, б; Seitkalieva et al., 2024). В связи с этим предложено использовать высокоактивную ЩФ PhoA *C. amphilecti* КММ 296 CmAP в качестве модельного фермента для скрининга ингибиторов ЩФ животных и человека (Seitkalieva et al., 2024). Исследование изоферментов ЩФ человека, которая структурно кластеризуется с бактериальной ЩФ PhoA (рис. 73), представляет значительный интерес с точки зрения физиологии и терапии в связи с их высокой экспрессией при ряде тяжелых метаболических нарушений и заболеваний, включая резорбцию костной ткани (остеопороз, болезнь Пейджета), аномальную кальцификацию мягких тканей, артерий и мозга, застойную сердечную недостаточность, дисфункцию печени и почек, сепсис и злокачественную обструкцию (Nargis et al., 2009, Levitt et al., 2022). Наряду со специфическими эктоферментами, такими как нуклеозидтрифосфат дифосфогидролаза CD39 (ENTPD), нуклеотид пирофосфатаза/фосфодиэстераза (ϵ NPP1) и экто-5'-нуклеотидаза CD73 (ϵ 5'-NT), неспецифическая фосфомоноэстераза ЩФ играет важную роль в клеточной регуляции (Jablonska et al., 2021). Она отвечает за гидролиз внеклеточных сигнальных нуклеотидов до нуклеозидов, в частности АМФ до аденозина, и за контроль доступности этих сигнальных молекул к соответствующим рецепторам, которые запускают различные клеточные процессы

Это напрямую связывает ЩФ с каскадом эктонуклеотидаз (CD39/CD73) (Rader et al., 2017; Jablonska et al., 2021; Rosin et al., 2022; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Balabanova et al., 2024b). Было показано, что aberrантная экспрессия тканевого неспецифического (TNAP) и кишечного (IAP) изоферментов ЩФ человека ассоциирована с рядом различных видов рака, включая рак пищевода, молочной железы, простаты, толстой кишки, яичников и печени (Ejaz et al., 2023). Было установлено, что плацентарная ЩФ PLAP играет роль в формировании кальцификатов в клетках рака молочной железы MDA-MB-231, задействуя сигнальные пути PI3K-Akt, что является процессом, аналогичным дифференцировке остеобластов (Fushimi et al., 2020). Кроме того, изоферменты ЩФ являются ключевыми игроками в сложном механизме противовоспалительного действия благодаря их субстратной неспецифичности в отношении фосфоэфирной связи в пуринах и пиримидинах, кофактору НАДФН и его предшественнику никотинамид мононуклеотиду (NMN) (Jablonska et al., 2021; Gao et al., 2022; Santos et al., 2022; Balabanova et al., 2024b). Вышеупомянутые процессы также вовлечены в метаболизм нуклеиновых кислот и трансмембранных фосфомоноэфиров, таких как транслоказа жирных кислот/рецептор B2/CD36, фосфоинозитиды, протеинкиназы и их аллостерически фосфорилированные фосфатазы, например PTEN (Ghosh et al., 2020; Gao et al., 2022; Santos et al., 2022; Zhang et al., 2023; Steenvoorden et al., 2024; Balabanova et al., 2024b). Идентификация эффективных природных и синтетических ингибиторов ЩФ представляет собой перспективный подход к поиску средств против aberrантной активности изоферментов ЩФ TNAP, IAP и PLAP (Seitkalieva et al., 2024). Кроме того, такой подход может способствовать более глубокому пониманию роли ЩФ в клеточных процессах, открывая новые возможности для модуляции этих процессов с помощью подходящих ингибиторов (Presbitero et al., 2018; Rosin et al., 2022; Gauthier et al., 2022). Такие гетероциклические соединения, как производные пурина, теofilлин ($IC_{50}=47$ мкМ, $K_i=91$ мкМ), имидазотиазола, левамизол ($IC_{50} = 19$ мкМ), и L-фенилаланин ($IC_{50}= 80$ мкМ) являются хорошо известными ингибиторами ЩФ (al-Rashida et al., 2015; Hosseini et al., 2022; Seitkalieva et al., 2024). Однако многие ЩФ-специфические лиганды могут быть вовлечены в нежелательные жизненно важные метаболические пути, что приводит к негативным последствиям. Например, было доказано, что распространенные ингибиторы ЩФ ванадат, перванадат и ооадаиновая кислота влияют на жизнеспособность, функциональность, рост и транспорт клеток, вызывая изменения в окислительно-восстановительном состоянии митохондрий (Le-Vinh et al., 2022). В механизмах многих патофизиологических состояний, связанных с повышением активности ЩФ в плазме крови до сих пор отсутствует ясность, поэтому изучение специфического и неспецифического связывания ЩФ является ценным направлением для выяснения специфической роли ЩФ в метаболических путях (Baqi, 2015; Sato et al., 2021; Levitt et al., 2022).

В настоящем исследовании получены данные о структурных особенностях природных 5-азаиндолов, ответственных за их ингибирующую активность в отношении ЩФ СмАР (рис. 81).

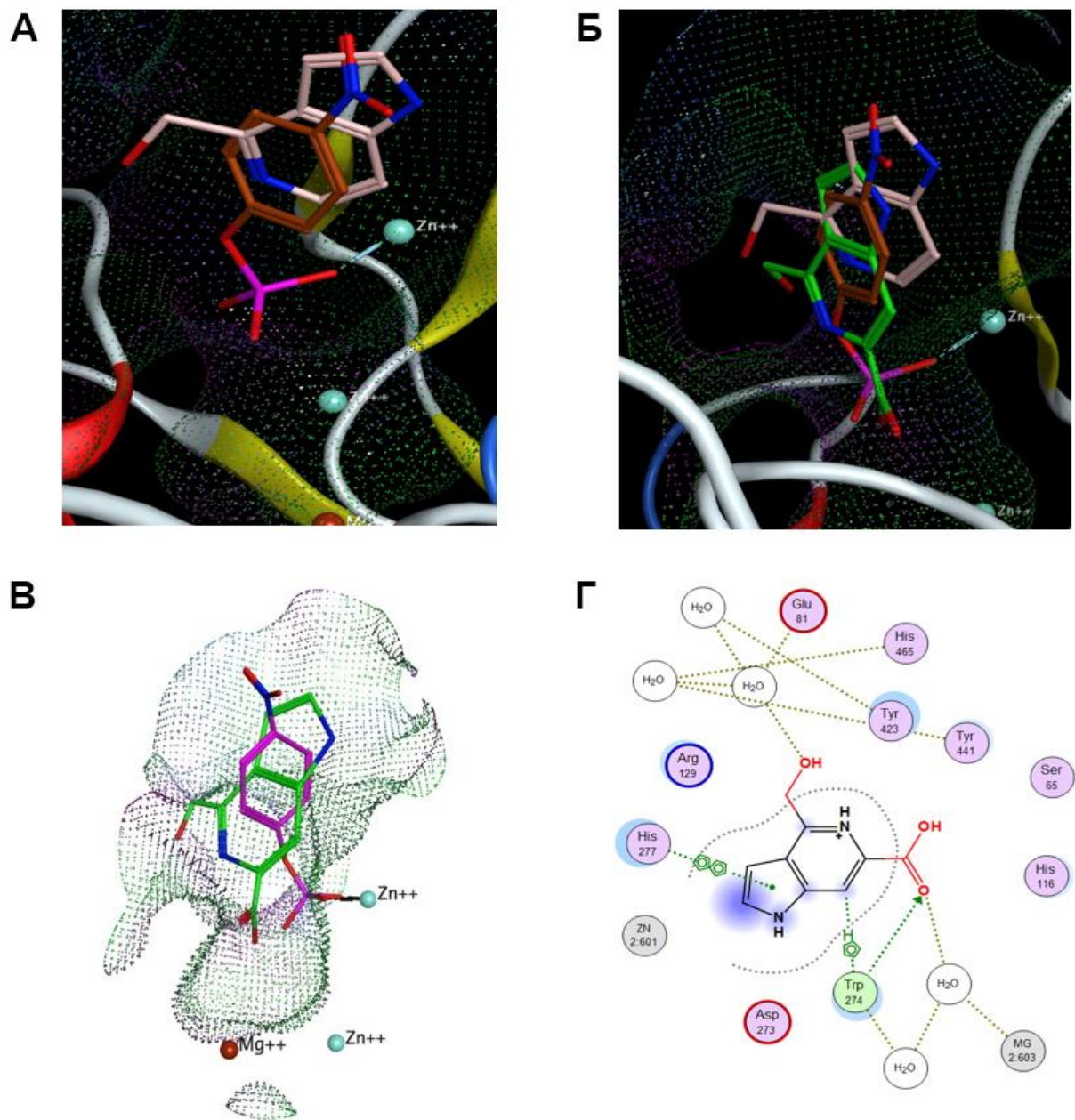


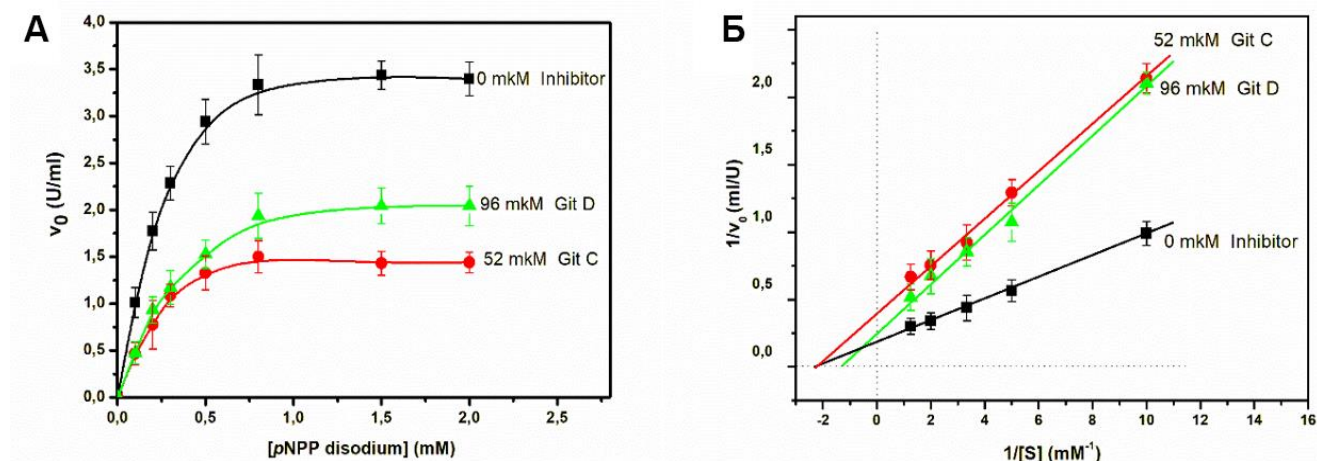
Рисунок 81 – Суперпозиция комплексов активного центра СмАР с субстратом *n*-НФФ и лигандами в водном окружении: А. Неактивный гитаррин В (светло-розовый) и *n*-НФФ (коричневый). Б. Гитаррин С (зеленый), гитаррин В (светло-розовый) и *n*-НФФ (коричневый). В. Гитаррин С (зеленый) и *n*-НФФ (розовый). Реакционноспособные группы обозначены красным цветом, фосфатная группа субстрата – розовым. Каталитические ионы Zn^{2+} представлены голубыми сферами, Mg^{2+} – коричневыми. Контур молекулярно-электростатического потенциала активного центра СмАР представлен в виде сетки. Г. 2D-диаграмма контактов гитаррина С с аминокислотными остатками активного сайта СмАР в водном окружении. Реакционные группы с низкой энергией связывания обозначены красным цветом (Seitkalieva et al., 2024)

Неорганические и органические ингибиторы ЩФ микроорганизмов являются ценными инструментами для изучения механизмов ферментативного катализа и биогеохимической роли этих процессов в окружающей среде, таких как регуляция микробиомов, биопленок, биотическая и абиотическая реминерализация, биоремедиация (Балабанова и др., 2023; Balabanova et al., 2017; Ásgeirsson et al., 2020; Doing et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Wan et al., 2022; Zorzetto et al., 2023). Так, ингибирующая активность в отношении высокоактивной ЩФ *C. amphilecti* КММ 296 СмАР была обнаружена в результате скрининга природных 5-азаиндолов из морской губки *Guitarra fimbriata* (Guzii et al., 2019; Motati et al., 2020). Ранее производные азаиндола рассматривались как потенциальные ингибиторы киназных мишеней, включая адаптер-ассоциированную киназу 1 (AAK1), киназу анапластических лимфоцитов (ALK), цикл клеточного деления 7 (Cdc7), циклин-зависимые киназы (CDKs), тирозин (Y)-фосфорилируемую регулируемую киназу 1A (DYRK1A) с двойной специфичностью и т.д. Было замечено, что гетероциклы азаиндола взаимодействуют с сайтами связывания АТФ рецептора фактора роста фибробластов 4 (FGFR4), фосфатидилинозитол 3-киназы (PI3K) и др. Это взаимодействие объясняется способностью двух атомов азота гетероциклов (для 7-азаиндола) взаимодействовать с сайтами киназ, имитируя взаимодействия аденина (Motati et al., 2020, Fang et al., 2023). У 5-изомеров положение атома азота в пиридиновом кольце также позволяет формировать специфические водородные связи, хотя геометрия может отличаться от классического 7-азаиндола (рис. 81).

Для сравнительного анализа ингибирующей активности 5-азаиндолов – гитарринов С и D, в отношении СмАР и ЩФ кишечника теленка CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), а также для установления типа ингибирования проведена экспериментальная кинетика (рис. 82). Природные 5-азаиндолы морской губки, гитаррин С и D, проявляют ингибирующую активность в отношении СмАР со значениями IC_{50} 8,5 и 110 мкМ соответственно (рис. 82). Молекулярный докинг комплексов СмАР с п-НФФ и гитарринами А–Е показал, что наличие карбоксильной группы при атоме С6 и гидроксильной группы при атоме С8 является необходимым условием для ингибирующего действия (рис. 81, 82). Гитаррин С образует сеть водородных связей с остатками активного центра, включая ключевой остаток W274 (рис. 81 Г), участвующий в аллостерической регуляции связывания ионов Mg^{2+} и координации субстрата (Балабанова и др., 2023; Golotin et al., 2015; Ásgeirsson et al., 2020; Seitkalieva et al., 2024). Отсутствие группы COOH при атоме С6 в гитаррине В меняет его ориентацию в каталитическом кармане; образования водородных связей между гитаррином В и субстрат-связывающим остатком Arg129 оказывается недостаточно для эффективного ингибирования. Более высокая активность гитаррина С объясняется его способностью конкурировать с субстратом, имитируя положение фосфатной

группы *n*-НФФ за счет пространственной ориентации карбоксильной группы (рис. 81 Б–Г) (Seitkalieva et al., 2024).

Несмотря на структурное сходство с субстратом, кинетическая модель показала, что ингибирование СмАР и СІАР гитаррином С происходит по неконкурентному типу. Это подтверждается двукратным снижением $V_{\max}$ при неизменном значении K_m (рис. 82).



Значение	ЩФ СІАР	ЩФ СмАР
IC ₅₀ (Git C)	195 ± 2,2 мкМ	8,5 ± 0,08 мкМ
IC ₅₀ (Git D)	230 ± 1,6 мкМ	110 ± 0,8 мкМ
K _i (Git C)	38 ± 0,1 мкМ	1,58 ± 0,04 мкМ
K _i (Git D)	45 ± 0,2 мкМ	20,56 ± 0,06 мкМ
V _{max}	0,35 ± 0,012 Ед/мл	5,98 ± 0,03 Ед/мл
V _{1/2}	0,175 ± 0,007 Ед/мл	2,99 ± 0,01 Ед/мл
K _m	0,49 ± 0,015 мМ	0,46 ± 0,2 мМ

Рисунок 82 – А. Зависимость начальной скорости гидролиза *n*-НФФ под действием СмАР (0,003 мг/мл) от концентрации субстрата в присутствии гитаррина С (Git C) и D (Git D). Ось ОУ: v_0 (U/ml) – начальная скорость реакции. Ось ОХ: [pNPP] (mM) – концентрация субстрата *n*-НФФ. Б. График в двойных обратных координатах (Лайнуивера–Берка) для определения типа ингибирования. Ось ОУ: $1/v_0$ (ml/U) – величина, обратная начальной скорости реакции. Ось ОХ: $1/[S]$ mM⁻¹ – величина, обратная концентрации субстрата. Графики пересекаются в одной точке на оси ОУ – конкурентный тип ингибирования; в одной точке на оси ОХ – неконкурентный. Значения констант Михаэлиса (K_m), максимальной скорости ($V_{\max}$) и констант ингибирования (K_i) для ЩФ СІАР и СмАР представлены в таблице (Seitkalieva et al., 2024)

Таким образом, гитаррин С, вероятно, связывается в аллостерическом центре или в области, критичной для конформационной подвижности фермента (включая район остатка W274), что снижает скорость каталитического акта, не препятствуя при этом первичному связыванию субстрата в активном центре (Seitkalieva et al., 2024). Неконкурентные ингибиторы часто более ценны для медицины, так как их эффективность не зависит от концентрации

субстрата в организме (их нельзя «вытеснить» избытком субстрата). Это делает гитаррин С еще более интересным кандидатом для дальнейших исследований.

Кинетические показатели, полученные в присутствии гитаррина D, имеющего дополнительную ОН-группу при атоме С7, отражали смешанный тип ингибирования (рис. 82). Это указывает на способность ингибитора связываться как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом. По-видимому, в присутствии гитарринов активный центр остается доступным для субстрата, но блокируется лимитирующий этап – дефосфорилирование или высвобождение продукта реакции (Ásgeirsson et al., 2020; Seitkalieva et al., 2024). Таким образом, вторичные метаболиты губок могут выступать в роли аллостерических регуляторов ферментов, в частности щелочных фосфатаз (Bakunina et al., 2018a; Utkina et al., 2019; Seitkalieva et al., 2024). Более высокая чувствительность бактериальной СмАР к гитарринам по сравнению с CIAP (IC_{50} в 20 раз ниже для Git C) (рис. 82) подчеркивает специфичность взаимодействия этих алкалоидов с элементами структуры, характерными для холодоактивных ферментов (например, районом W274) (рис. 81 Г). Тем не менее, полученные данные позволяют рассматривать гитаррины как основу для разработки селективных модуляторов изоферментов ЩФ млекопитающих (рис. 83).

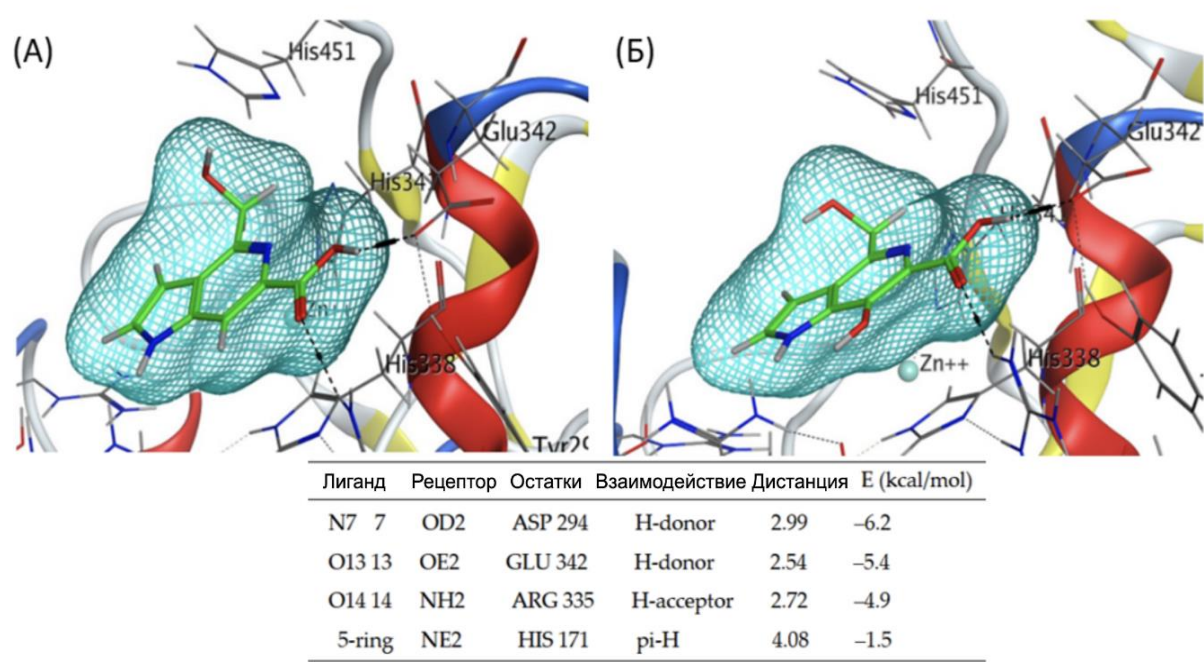


Рисунок 83 – Молекулярный докинг гитарринов С (А) и D (Б) в активный центр тканевой неспецифической щелочной фосфатазы (TNAP). Контур молекулярно-электростатического потенциала активного центра представлен в виде сетки. Типы межмолекулярных взаимодействий и расчетная энергия связывания (affinity) гитарринов с аминокислотными остатками представлены в таблице под рисунком (Seitkalieva et al., 2024)

В отсутствие кристаллической структуры CIAP, аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии, и их энергия связывания с лигандами предсказаны методом докинга гитарринов С и D в модели активных центров изоферментов ЩФ человека (рис. 83). При молекулярном докинге гитаррина D в активный центр человеческой TNAP выявлено, что контакты карбоксильной группы сохраняются с теми же ключевыми остатками (Asp294, Glu342, Arg335, His171), что и для гитаррина С. Примечательно, что остатки Asp294 и His171 идентифицированы в кристаллической структуре TNAP как координирующие ионы металлов и субстрат, а их мутации значительно снижают активность фермента (Yu et al., 2023). Это делает дальнейшее изучение гитарринов С и D в качестве регуляторов ЩФ человека перспективным направлением. Более того, как бактериальные, так и человеческие ЩФ демонстрируют высокое сродство к пуринергическим субстратам, в частности к АМФ (рис. 80 Г), что подтверждает их важную роль в модуляции внеклеточного сигналинга (Plisova et al., 2005; Balabanova et al., 2024b; Seitkalieva et al., 2024). Благодаря своему структурному сходству гитаррины С и D могут конкурировать с АМФ за места связывания в активном центре ЩФ и осуществлять конкурентное ингибирование, лимитируя стадию образования субстрат-ферментного комплекса (Балабанова и др., 2023; Chen et al., 2014; Ásgeirsson et al., 2020). Однако ингибирующую активность 5-азаиндолов, гитарринов С и D, в отношении ЩФ человека и кинетику ее ферментативного действия еще предстоит определить, чтобы убедиться в эффективности их использования (рис. 83).

Несмотря на предполагаемую аллостерическую зависимость образования субстрат-ферментного комплекса в димере любой ЩФ (негативная кооперативность) (рис. 27), подвижность «большой петли» ЩФ морских бактерий может приводить к спонтанной диссоциации димеров при сохранении каталитической активности мономеров (Балабанова и др., 2023; Helland et al., 2000; Orhanović et al., 2003; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015; Hjörleifsson et al., 2021). Высокая каталитическая эффективность рекомбинантной мономерной ЩФ CmAP позволяет использовать её в качестве высокочувствительной метки в составе бифункциональных гибридных белков. Например, для создания диагностических тест-систем на основе лектинов морских беспозвоночных (рис. 84) или выявления псевдотуберкулеза на основе порина OmpF *Y. pseudotuberculosis* (рис. 85 Б) (Балабанова и др., 2017a; Kovalchuk et al., 2015, 2018; Буйновская и др., 2018; Balabanova et al., 2018a). Для получения растворимых гибридных конструкций в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) к С-концу целевых белков (лектинов или поринов) присоединяли ЩФ CmAP через гибкий полипептидный линкер (Gly₄Ser)₃ (рис. 84, 85).

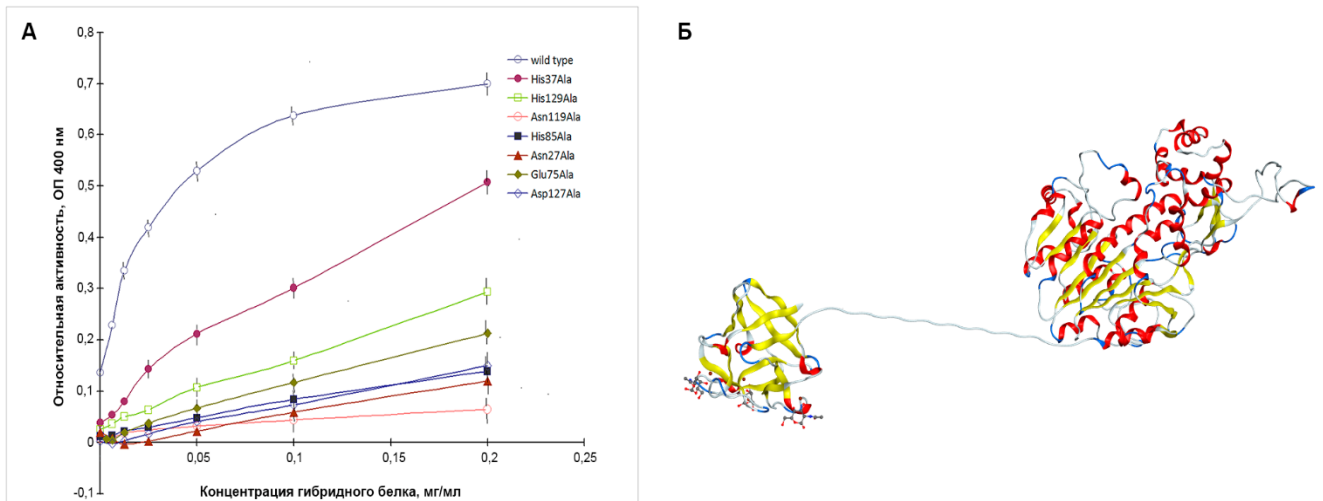


Рисунок 84 – А. Анализ углевод-связывающей активности мутантных форм рекомбинантного гибридного лектина мидии CGL/CmAP. Относительное содержание образовавшихся комплексов оценивали по количеству хромогенного продукта п-НФ (гидролиз под действием метки CmAP), измеряемому по оптической плотности при 405 нм (ось Y) (Kovalchuk et al., 2018). Б. Теоретическая модель 3D-структуры бифункционального гибридного белка: слева – гомотример GalNAc/Gal-специфичного лектина мидии CGL (ленточная модель), связанный с тремя углеводными лигандами муцина; справа – мономер CmAP (ленточная модель), присоединенный к лектину через полипептидный линкер (Gly₄Ser)₃ (Likhatskaya et al., 2018)

Использование лектинов в диагностике рака имеет ряд преимуществ перед классическим ИФА, так как позволяет выявлять специфические изменения в гликозилировании белков, что критично для ранней дифференциации опухолей и прогнозирования метастазирования. На основе маннан-связывающего лектина голотурии *A. japonicus* (MBL-AJ), избирательно связывающего углеводные детерминанты онкомаркеров (АФП, РЭА и др.), разработан неинвазивный метод диагностики рака шейки матки со специфичностью 93,6 % и чувствительностью 87,8 % (Balabanova et al., 2014). Создание рекомбинантного бифункционального белка MBL-AJ/CmAP исключает необходимость использования вторичных меченых антител. Это упрощает процедуру ТЛФА (ELLA) до одного этапа образования комплексов с онкомаркерами, которые затем визуализируются в видимом диапазоне по интенсивности окрашивания продукта реакции (ОП при 405 нм) (Balabanova et al., 2014).

Благодаря сочетанию антигенной и ферментативной активности рекомбинантный бифункциональный белок CmAP/OmpF обеспечивает прямую детекцию специфических антител в сыворотках пациентов с псевдотуберкулезом методом ИФА без применения вторичных антител. Данный подход упрощает и ускоряет проведение анализа (Буйновская и др., 2018), что открывает перспективы применения CmAP/OmpF в диагностике острых и вторично-очаговых форм псевдотуберкулеза (рис. 85).

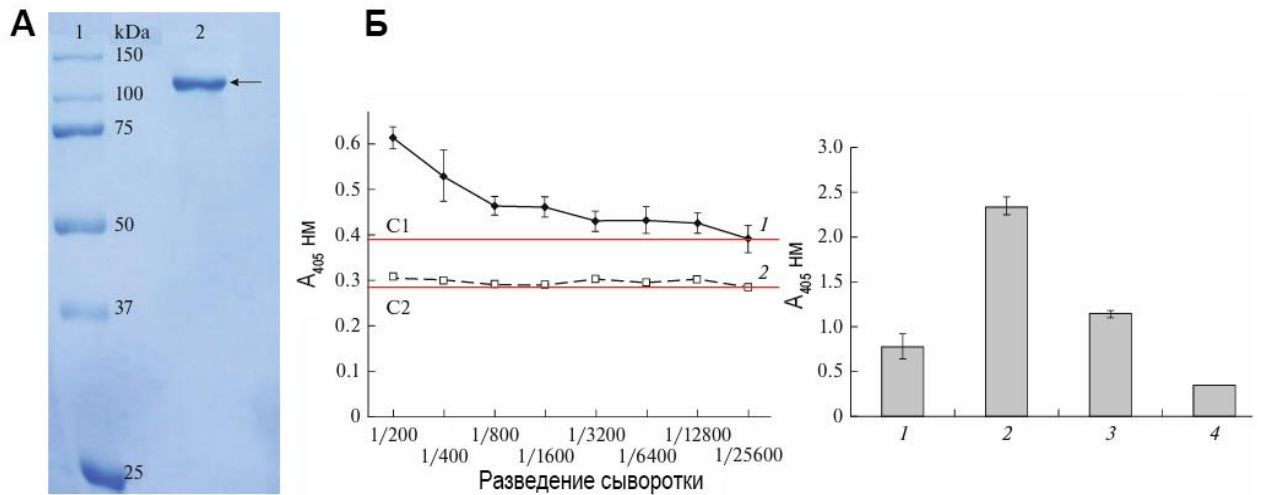


Рисунок 85 – Характеристика и функциональная активность гибридного белка CmAP/OmpF: А. Электрофореграмма в SDS-ПААГ: 1 – маркеры молекулярных масс белков (Bio-Rad, США); 2 – очищенный препарат рекомбинантного бифункционального белка (127,5 кДа), состоящего из ЩФ морской бактерии *C. marina* (CmAP) и порина *Y. pseudotuberculosis* (OmpF), в буфере 25 mM Tris-HCl, pH 8,5. Б. Результаты ИФА: (слева) Взаимодействие гибридного белка CmAP/OmpF (0,5 мкг/лунку) со специфическими антителами к порину OmpF в двукратных разведениях; детекция по собственной ферментативной активности CmAP. Горизонтальные линии – контроли активности гибрида CmAP/OmpF (C1) и индивидуальной ЩФ CmAP (C2) в отсутствие антител. Время инкубации с *n*-НФФ – 25 мин; (справа) Взаимодействие CmAP/OmpF с антителами: (1) сыворотки неиммунных мышей; (2) антитела к порину OmpF; (3) пуловая сыворотка больных псевдотуберкулезом; (4) контроль – реакция CmAP/OmpF с субстратом *n*-НФФ. Время инкубации с *n*-НФФ – 40 мин (Буйновская и др., 2018)

Использование высокоактивной ЩФ CmAP в составе рекомбинантных бифункциональных белков позволяет не только совершенствовать диагностические тест-системы и проводить мониторинг очистки целевых продуктов, но и детально исследовать их структуру и свойства (Буйновская и др., 2018; Балабанова, Исаева, 2019; Balabanova et al., 2014, 2018a; Kovalchuk et al., 2015, 2018). Так, с помощью сайт-направленного мутагенеза и ферментативного анализа была определена роль трех консервативных мотивов НРК(Y)G в белковой последовательности GalNAc/Gal-специфичного лектина мидии CGL, ответственных за его гемагглютинирующую и углеводсвязывающую активность (Kovalchuk et al., 2015). Способность лектина CGL распознавать глоботриозу (Gb3) на поверхности клеток рака молочной железы (Liao et al., 2016) и связывать гликопротеины муцинового типа (Belogortseva et al., 1998; Kovalchuk et al., 2013), ассоциированные с онкогенной трансформацией, делает данные структурные исследования крайне важными для понимания функций лектина и механизмов онкогенеза. Кроме того, благодаря активности ЩФ CmAP в составе гибридов, удалось экспериментально оценить вклад отдельных аминокислотных остатков, предсказанных *in silico*, в формирование углеводсвязывающих сайтов тримера CGL (рис. 84, 86–87).

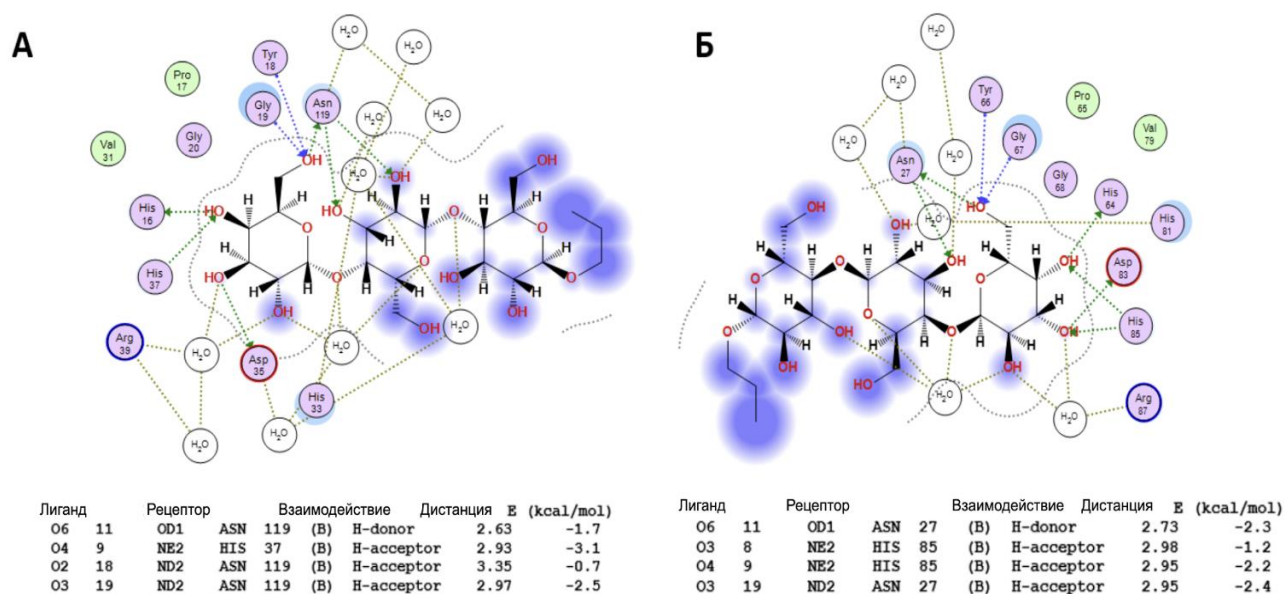


Рисунок 86 – 2D-диаграммы контактов глоботриозы (Gb3) в углеводсвязывающих сайтах 1 (А) и 2 (Б) лектина мидии CGL. Обозначения типов контактов и расчетная энергия связывания приведены в экспликации под рисунком. Моделирование выполнено в программе MOE v.2020.09 (Chemical Computing Group Inc., Канада; <https://www.chemcomp.com/moe/>) (Kovalchuk et al., 2018)

Результаты измерения активности комплексов CGL с муцином подтвердили образование предсказанных *in silico* контактов между остатками Asn27, His37, Glu75, His85, Asn119, Asp127, His129 и двумя галактозными остатками глоботриозы в двух углеводсвязывающих сайтах лектина (рис. 84 А, 86). Однако активность мутантных форм CGL по третьему углеводсвязывающему сайту в реакциях с муцином не соответствовала расчетной энергии связывания с глоботриозой (рис. 87 А) (Kovalchuk et al., 2018).

Молекулярный докинг показал, что GalNAc/Gal-специфичный лектин CGL способен связывать не только два концевых галактозных остатка в олигосахариде муцина, но и проявляет сродство к его третьему остатку – фукозе (рис. 87 Б, В). В структуре Gb3 на этом месте расположен остаток глюкозы, к которому у лектина нет выраженного сродства. Вследствие этого расчетная энергия связывания (ΔG) CGL с муцином значительно ниже (что указывает на более прочное связывание), чем с Gb3 или моносахаридом Gal (рис. 87) (Kovalchuk et al., 2018).

Кроме того, для трех углеводсвязывающих сайтов CGL с заменами Н37А, Н85А и Н129А предсказано изменение специфичности в отношении сиаловых кислот (рис. 84). Утрата водородных связей между данными остатками и галактозой, выявленная *in silico*, была подтверждена экспериментально: связывание мутантных форм с муцином оказалось существенно слабее в сравнении с нативным лектином (рис. 84 А). Способность таких мутантов

селективно взаимодействовать с сиалированными гликанами позволит повысить точность профилирования онкомаркеров при использовании диагностических тест-систем на основе бифункциональных зондов CGL/CmAP (Балабанова и др., 2015а) (рис. 84).

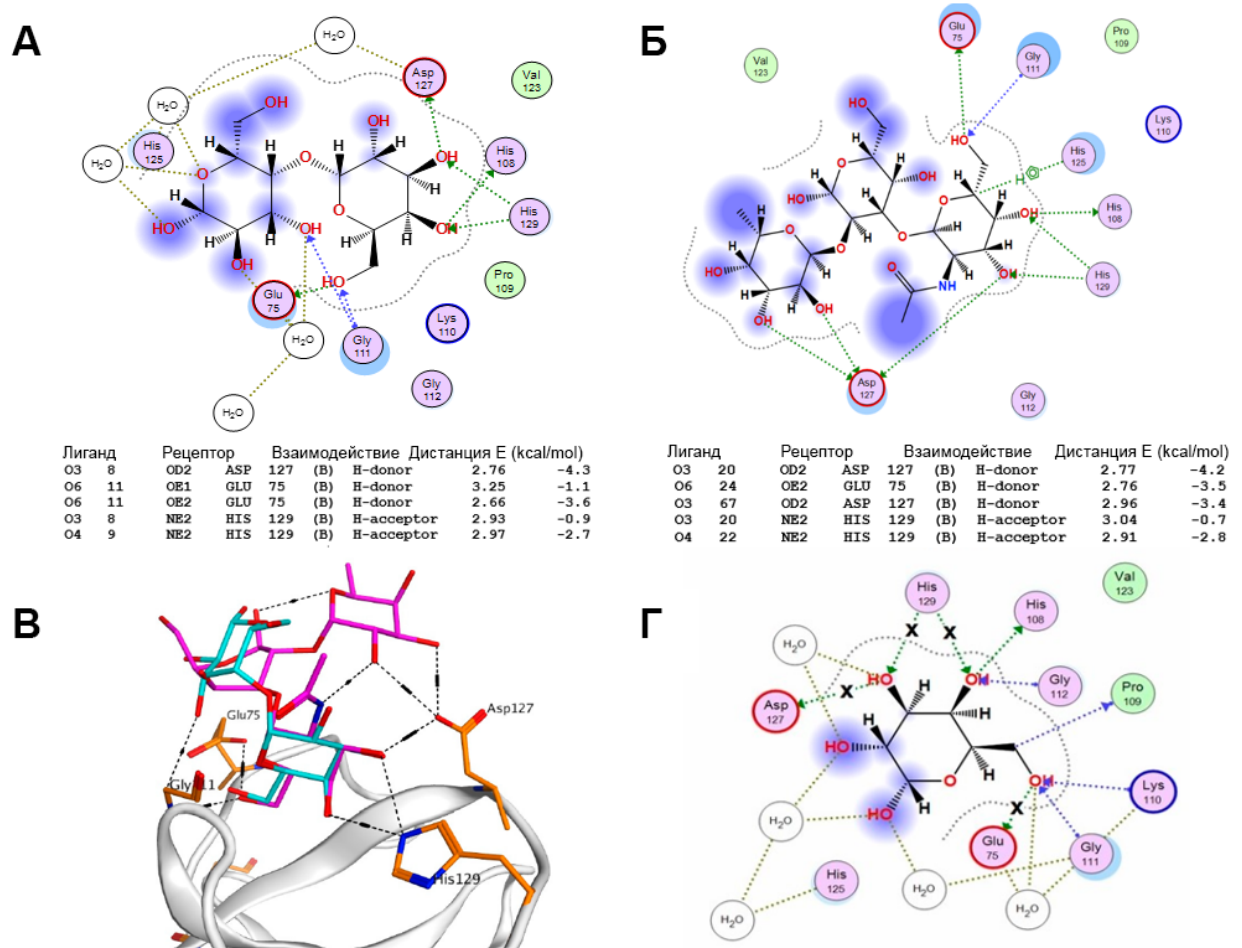


Рисунок 87 – 2D-диаграммы контактов глоботриозы Gb3 (А), муцина (Б) и галактозы (В) в третьем углеводсвязывающем сайте лектина CGL. Суперпозиция Gb3 и трисахарида муцина свиньи в сайте 3 лектина CGL (Г). В комплексе с муцином остаток Asp127 образует две дополнительные связи с остатком фукозы (Б, В). Перечеркнутые Н-связи остатков Asp127, His129 и Glu75 указывают на их отсутствие при замене на аланин (Г). У данных мутантных форм в составе гибридов CGL/CmAP экспериментально определенная ферментативная активность в присутствии муцина не коррелировала с расчетной энергией связывания для галактозы и Gb3, что обусловлено дополнительным взаимодействием с остатком фукозы в структуре муцина. Типы контактов приведены согласно классификации MOE v.2020.09 (www.chemcomp.com) (Kovalchuk et al., 2018)

4.6.2 ЛПС-дефосфорилирующая активность и противовоспалительная эффективность ЩФ семейства PhoA бактерии *S. amphilecti* в модели хронического ДСН-индуцированного колита

Целью данного исследования было определение потенциального защитного эффекта высокоактивной щелочной фосфатазы (ЩФ) семейства PhoA морской бактерии *S. amphilecti* КММ 296 (SmAP) на мышинной модели ДСН-индуцированного колита. Влияние перорального введения SmAP на течение хронического воспаления кишечника у мышей сравнивали с эффектом рекомбинантной кишечной ЩФ человека (hrecAP), полученной в системе экспрессии клеток моркови (Шмыкова и др., 2019). Это позволило оценить перспективность применения изучаемого фермента при патологиях, сопряженных с кишечной гиперпроницаемостью (Goyal et al., 2014; Ghosh et al., 2020).

Нарушение барьерной функции кишечника возникает на фоне воспалительных процессов, дисбиоза, интоксикации и различных стрессорных факторов (Ghosh et al., 2020; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Balabanova et al., 2024b). Данное состояние способствует транслокации антигенов химуса (в частности, ЛПС – эндотоксина грамотрицательных бактерий) в системный кровоток. Бактериальные антигены усиливают локальное воспаление и усугубляют деструктивные изменения тканей кишечника. Попадая в кровоток, они инициируют системный воспалительный ответ и повреждение жизненно важных органов, что в тяжелых случаях может привести к развитию сепсиса (Park et al., 2018; Ghosh, 2020; Balabanova et al., 2024b).

ЛПС является одним из основных типов патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), распознаваемых рецепторным комплексом Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) – ключевым компонентом врожденной иммунной системы (Komazin et al., 2019; Gauthier et al., 2022). Воздействуя на TLR4 нейтрофилов и макрофагов, ЛПС активирует их трансмембранную НАДФН-оксидазу-2 (NOX2). Активация происходит через каскад сигнальных путей, опосредованных транскрипционным фактором NF-κB – главным медиатором воспалительного ответа. NOX2 инициирует усиленную выработку активных форм кислорода (АФК) и азота: супероксид-анион радикала ($O_2^{\cdot-}$), оксида азота (NO), пероксинитрита ($ONOO^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2) и хлорноватистой кислоты (HOCl). Наряду с аутоиндукцией NOX2 это приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и TNF-α (Griffiths et al., 2017; Taylor et al., 2021; Gauthier et al., 2022; Banskota et al., 2023). Изоформа NOX1, являющаяся основным источником АФК в нефагоцитарных (в частности, эпителиальных) клетках, играет центральную роль в ЛПС-индуцированной гиперпроницаемости кишечника. Она активирует матриксную металлопротеиназу-9 (MMP9), что способствует дальнейшему развитию воспаления (Liu et al., 2020; Balabanova et al., 2024b) (рис. 88).

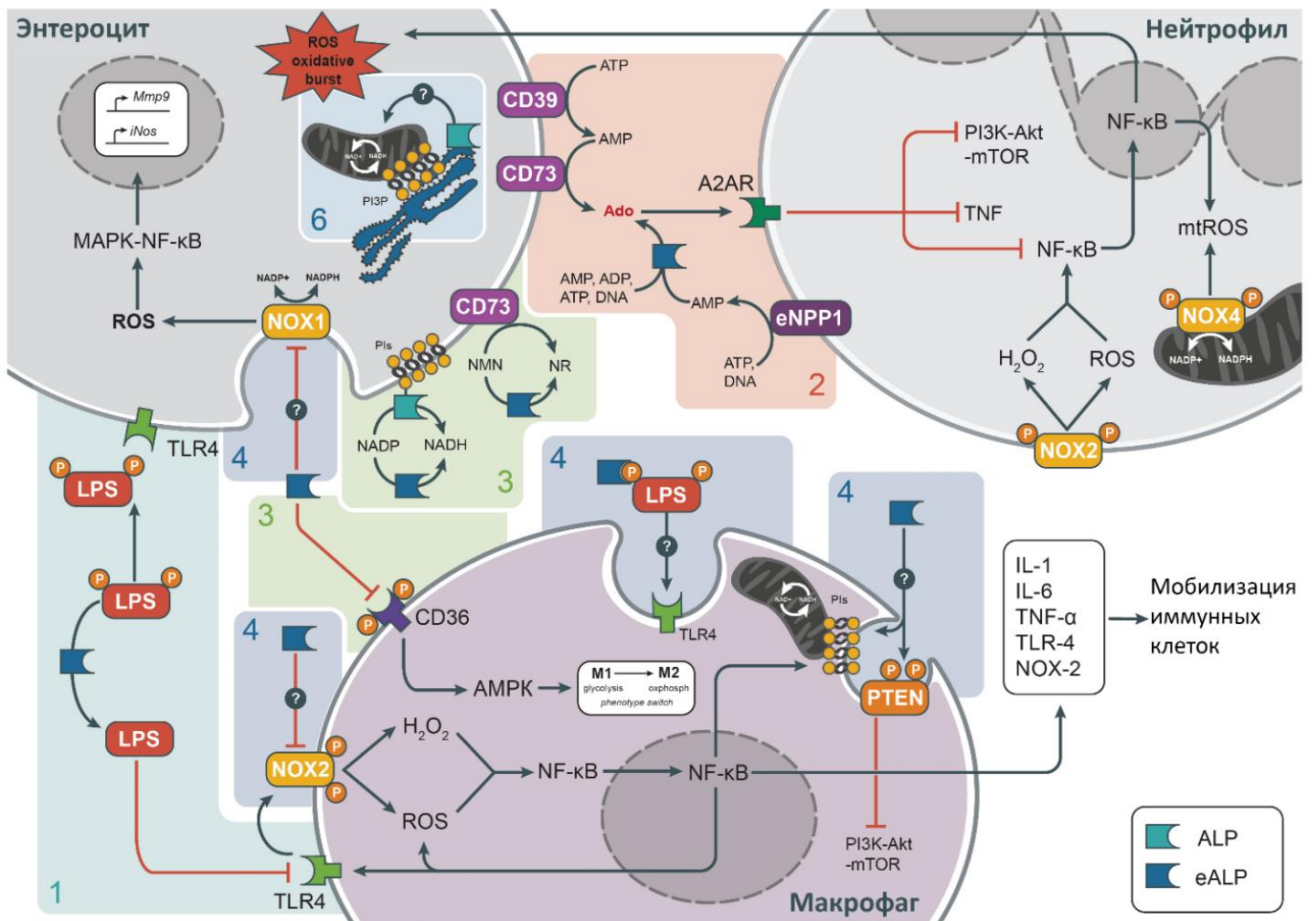


Рисунок 88 – Предполагаемые механизмы противовоспалительного действия неспецифической фосфомоноэстеразы, клеточной ЩФ (ALP: GPI-связанная) и внеклеточной ЩФ (eALP: экзогенная или свободная эндогенная) на клетки врожденного иммунитета и эпителия: **1.** Ингибирование взаимодействия LPS-TLR4 и блокирование TLR-4-NF-κB-индуцированных сигнальных путей (IL-1, IL-6, TNF-α, TLR4, NOX2 и др.), подавление продукции активных форм кислорода (АФК) (внеклеточных ROS и митохондриальных mtROS) и рекрутирования иммунных клеток (голубой блок). **2.** Дефосфорилирование межклеточных сигнальных пуринов (AMP, ADP и ATP) и пиримидинов (совместно с эктоферментами CD39, CD73 и eNPP1) до аденозина (Ado) и PO_4^{2-} (P). Ado связывается с рецепторами (A2AR), ингибируя провоспалительные пути NF-κB, PI3K-Akt-mTOR и TNF-α (розовый блок). **3.** Дефосфорилирование никотинамидмононуклеотида (NMN) до никотинамидрибозида (NR) и НАДФН (NAD(P)H) до НАДН (NADH) для синтеза НАД⁺ *de novo* и в путях реутилизации (зеленые блоки). **4.** Предполагаемая (?) индукция интернализации мембраны комплексами, связанными с ЩФ (ALP-LPS-TLR4, eALP-PTEN и др.) в специфических фосфоинозитидных (PIs) сайтах, формирующихся в ответ на провоспалительные сигналы для осуществления кавеоларного эндоцитоза (серые блоки). **5.** Дефосфорилирование рецептора CD36, способствующее переключению метаболизма макрофагов с гликолиза на окислительное фосфорилирование (поляризация M1 → M2). **6.** Вероятное участие (?) в формировании митофагосомы. Дополнительные обозначения на схеме: оксидоредуктазы NOX1 (энтероцит), NOX2 (макрофаг, нейтрофил) и NOX4 (митохондрия); дуальная фосфатаза PTEN – регулятор пути PI3K/Akt/mTOR; ЩФ (ALP и eALP) – на панели внизу (Balabanova et al., 20246)

Несмотря на то, что основные механизмы воспаления установлены, пути врожденного иммунного ответа и их взаимосвязи остаются недостаточно изученными для точной идентификации терапевтических мишеней. Однако доказано, что эндогенная кишечная ЩФ человека (IAP) является важным компонентом врожденной иммунной системы и оказывает выраженное противовоспалительное действие (Yang, 2012; Rader et al., 2017; Ghosh et al., 2020; Santos et al., 2022; Balabanova et al., 2024a). ЩФ IAP дефосфорилирует ЛПС, существенно снижая его эндотоксическую активность. Установлено, что отщепление даже одной из двух фосфатных групп липида А снижает эндотоксичность ЛПС более чем в 100 раз (Ghosh et al., 2020). Дефосфорилированный ЛПС сохраняет сродство к рецепторному комплексу TLR4, однако действует преимущественно как его антагонист. Это ингибирует внутриклеточную передачу сигнала, что приводит к подавлению транскрипционной активности NF-κB и сопряженных реакций иммунного ответа, включая секрецию провоспалительных цитокинов (Kany et al., 2019; Ghosh, 2020; Balabanova et al., 2024b). Кроме того, ЩФ IAP способна нейтрализовать как патоген-ассоциированные (PAMP), так и ассоциированные с повреждением (DAMP) молекулярные паттерны, образующиеся в ответ на ЛПС-опосредованное воспаление (Gauthier et al., 2021; Rosin et al., 2022; Balabanova et al., 2024a, б). Данные эффекты способствуют купированию локального воспаления, восстановлению барьерной функции кишечника и нивелированию системных иммуотропных нарушений. Благодаря этому фермент рассматривается как перспективное средство для лечения острых и хронических патологий, связанных с aberrантной активацией рецептора TLR4 (Presbitero et al., 2018; Santos et al., 2022; Duan, 2022; Balabanova et al., 2024b; Steenvoorden et al., 2024).

Наряду с детоксикацией ЛПС, IAP ингибирует секрецию IL-6 и TNF-α свежевыделенными лейкоцитами даже в отсутствие эндотоксина, ослабляет окислительный стресс и модулирует экспрессию белков плотных контактов кишечного барьера. Также показано, что фермент способен изменять состав микробиоты кишечника, смягчать инсулинорезистентность и уменьшать выраженность симптомов у мышей с экспериментальным ожирением и колитом. Это свидетельствует о многогранном противовоспалительном действии ЩФ (Singh et al., 2020; Gao et al., 2022; Rosin et al., 2022; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Balabanova et al., 2024b). Известно, что ЩФ участвует в поддержании оптимального уровня pH поверхности двенадцатиперстной кишки, абсорбции длинноцепочечных жирных кислот и нейтрализации PAMP и DAMP в просвете кишечника, а именно: флагеллинов, ДНК, РНК, нуклеотидов и кофакторов (например, НАДФН) (Gao et al., 2022; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Steenvoorden et al., 2024). Сигнальный аденозин (Ado) является конечным продуктом неспецифической ферментативной деградации внеклеточных пуринов (АТФ, АДФ и АМФ), опосредованной ЩФ. Эти пурины также являются специфическими субстратами для эктоферментов CD39, CD73 и

eNPP1 (Jablonska et al., 2021; Gao et al., 2022) (рис. 88). Было показано, что аденозин снижает уровень АТФ-связывающих пуриnergических P2X- и P2Y-рецепторов на иммунных клетках и оказывает выраженное противовоспалительное действие. Это происходит за счет связывания с аденозиновыми A2A-рецепторами (A2AR), которые ингибируют ключевые сигнальные пути активации NF- κ B, TNF и PI3K-Akt (Vuerich et al., 2020; Gao et al., 2022; Balabanova et al., 2024b) (рис. 88).

Противовоспалительный эффект ЩФ, по-видимому, не ограничивается детоксикацией ЛПС и генерацией аденозина из пуринов, высвобождающихся в ходе воспаления. Даже в отсутствие эндотоксина поврежденные компоненты клеток и митохондрий, а также их метаболиты, выступая в роли DAMP, продолжают поддерживать воспалительный процесс (Marchi et al., 2023). Недавно на моделях энтероцитов и ЛПС-активированных макрофагов была подтверждена способность ЩФ IAP индуцировать TLR4-зависимую экспрессию лизосомальных генов, ассоциированных с аутофагией (Singh et al., 2020; Liu et al., 2021b). Противовоспалительный эффект IAP проявлялся в ингибировании ЛПС-опосредованной активации NF- κ B и подавлении экспрессии мРНК IL-1 β (Singh et al., 2020). Тем не менее, остается открытым вопрос о том, реализуется ли регуляторное действие IAP на комплекс TLR4 прямым или опосредованным путем, а также на каком этапе – до или после индукции сигнального пути NF- κ B – осуществляется этот контроль. Примечательно, что совместная локализация тканевой неспецифической ЩФ (TNAP) и митохондрий в перинуклеарном пространстве коррелирует с прогрессией клеточного цикла, интенсивностью митохондриального дыхания и синтезом АТФ в костных и мышечных клетках-предшественниках (Zhang et al., 2021b). У TNAP-дефицитных клеток наблюдалась митохондриальная гиперфункция и избыточная выработка АТФ, что приводило к нарушению их пролиферации и дифференцировки (Zhang et al., 2021b). Таким образом, ЩФ эукариот может быть функционально связана с митохондриальными или прилегающими к ним лизосомальными мембранами (рис. 88). Взаимодействуя с эктонуклеотидазой ENPP1, ЩФ способна модулировать функцию митохондрий путем генерации высоких концентраций неорганического фосфата (P_i). Это предотвращает деполяризацию митохондриальных мембран и ограничивает участие органелл в провоспалительных сигнальных путях (Shibayama et al., 2013; Zhang et al., 2021b; Balabanova et al., 2024b). Механизм транслокации активного эктофермента внутрь клетки, вероятно, связан с процессами кавеоларного эндоцитоза и везикулярного транспорта.

В настоящей работе впервые предложен универсальный механизм, объясняющий разносторонние эффекты, наблюдаемые в организме при воздействии эндогенной и экзогенной рекомбинантной ЩФ PhoA (рис. 88). Как предполагается в нашей модели (рис. 88),

интернализация комплексов ЩФ в составе липидных рафтов обеспечивает их доставку к внутриклеточным компартментам, что позволяет ферменту модулировать функции лизосом и митохондрий (Balabanova et al., 2024b).

По сходному принципу ЩФ семейства PhoA морских бактерий предотвращают деполяризацию мембран и регулируют осмоляльность клеток, обеспечивая приток P_i в периплазму и поддерживая окислительно-восстановительный баланс и клеточный цикл (Kamennaya et al., 2020; Zhang et al., 2021a). Данный механизм подтверждается локализацией гена изучаемой ЩФ в составе кластера генов белков электрон-транспортной цепи (рис. 75, 78) (Balabanova et al., 2024a). Помимо способности расщеплять пирогосфаты (PP_i), нуклеотиды, фосфотаноламин и фосфохалин, ЩФ может дефосфорилировать ключевые интернализированные регуляторы провоспалительных путей, такие как фосфоинозитиды (PIs), а также модулировать активность киназ и протеинфосфатаз (фосфостатус сигнальных белков) (Harroun et al., 2023; Zhang et al., 2023) (рис. 88). Тем самым предотвращается их избыточная активация, ограничиваются клеточные анаболические эффекты и снижается риск повреждения митохондриальной ДНК. Это способствует восстановлению биоэнергетической функции и снижению зависимости клеток от гликолиза (эффект Варбурга) (Griffiths et al., 2017; Du et al., 2018; Zhang et al., 2021b; 2023; Harroun et al., 2023). В совокупности многогранные эффекты неспецифической ЩФ (рис. 88) могут быть востребованы при разработке препаратов, нацеленных на модуляцию митохондриальной функции, для терапии ожирения, диабета, метаболического синдрома, онкологических заболеваний и ряда системных воспалительных состояний (Rosin et al., 2022; Wojcik-Grzybek et al., 2022; Steenvoorden et al., 2024).

Тем не менее, получение рекомбинантной ЩФ человека или животных затруднено из-за критической зависимости биологической активности фермента от посттрансляционных модификаций (Bozkurt et al., 2023; Yin et al., 2023). Напротив, производство высокоактивной ЩФ семейства PhoA (CmAP) из морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 успешно реализуется в системе экспрессии *E. coli* (Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2024a; Seitkalieva et al., 2024). Микробные ЩФ семейства PhoA обладают сходной архитектурой активного центра и проявляют фосфомоноэстеразную активность в отношении широкого спектра субстратов: внеклеточных ДНК и РНК, нуклеотидфосфатов, фосфолипидов, ЛПС и НАДФН. Благодаря технологичности производства такие ферменты являются перспективными объектами для биомедицины (Plisova et al., 2005; Balabanova et al., 2024a; Seitkalieva et al., 2024). Так, рекомбинантная мутантная ЩФ *E. coli* проявила противовоспалительное действие в ЛПС-индуцированной модели воспаления эпителиальных клеток, снижая относительную экспрессию генов IL-6, IL-8 и TNF- α (Dong et al., 2022). Однако удельная активность большинства

бактериальных ферментов значительно ниже, чем у аналогов из тканей млекопитающих. Исключение составляют высокоактивные ЩФ PhoA морских бактерий, характеристики которых позволяют достигать терапевтического эффекта при использовании низких, физиологически допустимых концентраций белка (Балабанова, Рассказов, 2010; Голотин, 2014; Буйновская и др. 2018, Буйновская, 2023; Plisova et al., 2005; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2017).

Кроме того, рекомбинантная ЩФ CmAP морской бактерии *S. amphilecti* KMM 296 проявляла ферментативную активность в отношении ЛПС *E. coli* O55:B5. Активность фермента зависела от степени агрегации субстрата (рис. 89 А), которая, как известно, снижается при повышении температуры или в присутствии детергентов (Richter et al., 2011; Gauthier et al., 2022; Balabanova et al., 2024a).

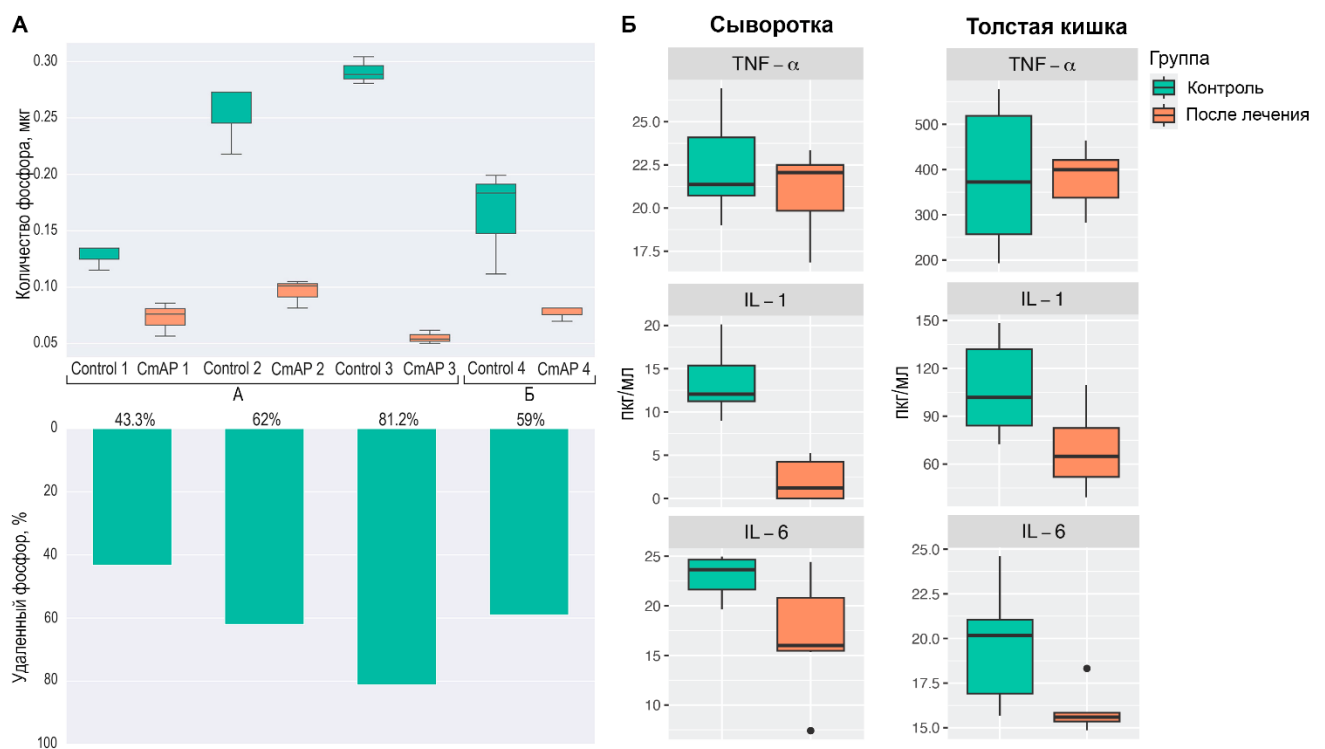


Рисунок 89 – **А.** Содержание фосфора (мкг) в образцах ЛПС *E. coli* O55:B5 (70 мкл, 0,2 мг/мл) до (контроль, зеленый боксплот) и после (CmAP, оранжевый боксплот) обработки рекомбинантной ЩФ CmAP (0,012 мг/мл, 2300 U/мг) в течение 1 ч при 37 °С. Образцы ЛПС подготовлены в буфере А (0,1 М Tris-HCl, 0,1 М KCl, pH 7,7): **1** – при 24 °С в течение 12 ч; **2** – при 37 °С в течение 12 ч; **3** – при 24 °С в течение 12 ч с добавлением ТЭА (1 мкл/мл); и в буфере В (0,1 М Tris-HCl, 0,1 М KCl, pH 10,0): **4** – при 24 °С в течение 12 ч. Значения гидролизованного P_i в каждом образце указаны в % от количества отщепленного фосфора (после диализа) относительно контроля (Balabanova et al., 2024a). **Б.** Влияние рекомбинантных ЩФ CmAP и hresAP на уровни провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β и IL-6) в сыворотке крови (слева) и тканях толстой кишки (справа) мышей в модели ДСН-индуцированного воспаления. Различия статистически значимы ($M \pm SE$; $p < 0,05$)

Согласно результатам анализа содержания остаточного фосфора, эффективность гидролиза ЛПС достигала 80 % после предварительной солюбилизации субстрата в течение 12 ч в буфере Tris-HCl с добавлением диспергирующего агента – триэтиламина (ТЭА) (рис. 89 А, образец 3). Повышение температуры инкубации до 37 °С также способствовало увеличению растворимости ЛПС, вследствие чего гидролитическая активность СмАР в образце 2 была достоверно выше, чем в образце 1 (рис. 89 А). Таким образом, физиологические условия в просвете кишечника млекопитающих (температура и pH) могут способствовать деагрегации ЛПС, обеспечивая доступность фосфатных групп его липидной части (липида А) для ферментативного воздействия СмАР. Это, в свою очередь, позволяет эффективно ингибировать ЛПС-индуцированный TLR4-зависимый сигнальный путь воспаления (рис. 88).

В связи с этим был проведен сравнительный анализ эффективности рекомбинантных ферментов СмАР и hresAP на мышинной модели хронического ДСН-индуцированного колита (рис. 89 Б, 90).

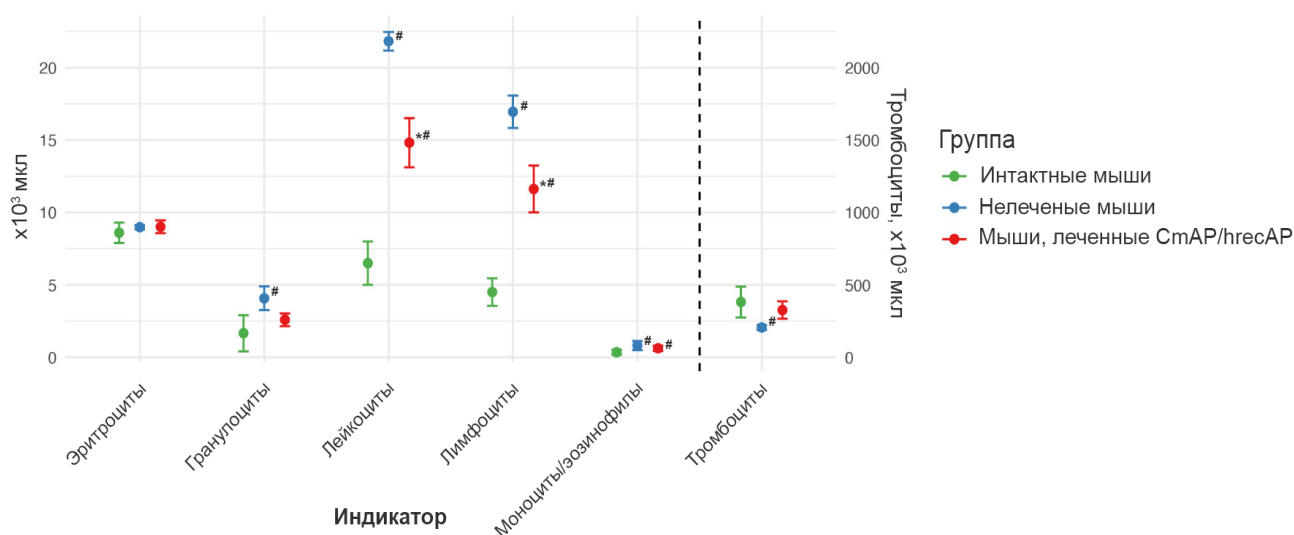


Рисунок 90 – Влияние перорального введения СмАР и hresAP (100 Ед) на показатели общего анализа крови мышей при хроническом колите. Эксперимент проведен на самцах мышей линии CD-1 (n=10) в каждой группе). Группы исследования: 1) интактные мыши (зеленый цвет); 2) контроль (нелеченый колит) (синий цвет); 3) мыши с колитом, получавшие СмАР или hresAP (красный цвет). Модель хронического колита индуцировали по схеме: 5 дней ДСН (3% w/v), 5 дней вода, затем повторный цикл – 5 дней ДСН. Рекомбинантные ферменты вводили перорально ежедневно с 16-го по 22-й день эксперимента. Данные представлены как среднее $\pm$ SE. * – статистически значимые отличия от контрольной группы (колит без лечения), $p < 0,05$; # – статистически значимые отличия от интактной группы, $p < 0,05$

В разработанной модели ДСН-индуцированного колита у мышей как в контрольной, так и в опытных группах (табл. 6, 7) наблюдалась сопоставимая частота проявления клинических признаков заболевания. Среди них отмечены пилоэрекция (1/10), диарейный синдром (3/10),

наличие геморрагических включений в фекалиях (2/10) и увеличение массы болюсов (1/10). Таким образом, пероральное введение СмАР или hresАР в течение 7 дней при выбранном режиме дозирования не привело к значимому снижению выраженности внешних симптомов ДСН-индуцированного колита. Однако в контрольной группе (без лечения) наблюдалось снижение массы тела животных в среднем с $37,8 \pm 1,0$ до $36,9 \pm 0,9$ г. В то же время у животных, получавших СмАР или hresАР, отмечалась противоположная динамика: масса тела увеличилась с $38,7 \pm 0,6$ до $39,3 \pm 0,6$ г. Таким образом, в группах, получавших рекомбинантную ЩФ, выявлена тенденция к приросту массы тела ($p = 0,058$), что контрастирует с дефицитом веса в нелеченом контроле. Важным показателем эффективности терапии стало отсутствие летальных исходов в группах, получавших СмАР или hresАР, тогда как в группе контроля без лечения летальность составила 20 % (2 из 10 животных). Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение СмАР по выбранной терапевтической схеме предотвращает прогрессирующее истощение и гибель животных при экспериментальном колите.

Кроме того, индукция колита сопровождалась выраженным системным лейкоцитозом: наблюдалось четырехкратное увеличение количества лимфоцитов и гранулоцитов, двукратное повышение числа эозинофилов и моноцитов, а также развитие тромбоцитопении на фоне увеличения среднего объема тромбоцитов (MPV) (рис. 90). Увеличение количества гранулоцитов и лимфоцитов свидетельствует об активации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, что характерно для воспалительных заболеваний кишечника и ДСН-индуцированной модели колита (Okba et al., 2019). При этом значимых изменений уровней эритроцитов и концентрации гемоглобина отмечено не было. Введение ЩФ СмАР приводило к существенному снижению общего количества лейкоцитов (в частности, лимфоцитов и гранулоцитов), демонстрируя эффект, сопоставимый с действием hresАР (рис. 90). Кроме того, у животных, получавших СмАР или hresАР, наблюдалась нормализация количества тромбоцитов, при отсутствии влияния ферментов на другие показатели общего анализа крови. Таким образом, применение СмАР способствует купированию системного воспаления и снижению интенсивности кишечных кровотечений.

Средняя масса ткани толстой кишки животных в группах без лечения и группах, получавших СмАР/hresАР, составила 93 ± 7 и 89 ± 4 мг соответственно (различия статистически не значимы, тест Манна-Уитни). Масса кишки интактных животных составила 107 ± 3 мг, что согласуется с литературными данными (Chen et al., 2017). Несмотря на отсутствие значимого влияния СмАР и hresАР на массу органа, гистологический анализ выявил их положительное воздействие на микроморфологию тканей. В группах терапии наблюдалось снижение выраженности патологических изменений, таких как деструкция эпителия, расширение крипт,

потеря бокаловидных клеток, лейкоцитарная инфильтрация, формирование крипт-абсцессов и отек стромы (рис. 91 А, 92).

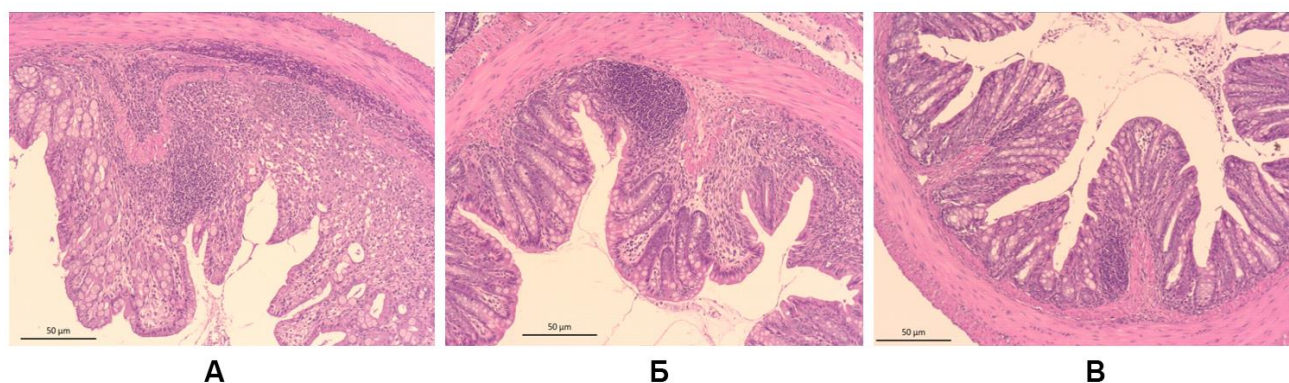


Рисунок 91 – Микрофотографии гистологических срезов толстой кишки мышей в модели ДСН-индуцированного колита. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштаб 50 мкм. А. Контроль (колит без лечения): выраженный отек стромы, обширная воспалительная клеточная инфильтрация с изъязвлением слизистой оболочки и вовлечением мышечной пластинки. Б, В. Группы, получавшие СмАР (Б) и hresAP (В): частичное восстановление целостности эпителиального пласта, признаки заживления язвенных дефектов при сохранении умеренной резидуальной инфильтрации

Развитие ДСН-индуцированного колита привело к значительному повреждению стенки толстой кишки: индекс гистологической активности составил 14,9 из 24,0 возможных баллов. Такая морфологическая картина характерна для острого язвенного колита (AlSharari et al., 2013). В полученной модели изменения слизистой оболочки как в контрольной, так и в опытных группах сохранялись в виде резидуальной инфильтрации, криптита и формирования крипт-абсцессов (рис. 91 Б, В). Таким образом, ферменты СмАР и hresAP оказывали сходное модулирующее влияние на степень повреждения тканей при используемой терапевтической схеме.

В данной экспериментальной модели воспаление, сопряженное с активацией TLR4-зависимых путей, привело к существенному росту концентрации цитокинов в тканях кишечника и сыворотке крови, что подтверждает системный характер процесса (рис. 89 Б). Поступление интерлейкинов в системный кровоток инициирует рекрутирование, адгезию и инфильтрацию иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения, а также провоцирует лейкоцитоз, преимущественно за счет увеличения пула гранулоцитов (Okba et al., 2019). Данный тип лейкоцитоза обусловлен специфическим цитокиновым профилем: гиперпродукция IL-1 β , IL-6 и TNF- α опосредует острую фазу воспаления и хемотаксис, стимулируя в дальнейшем созревание и активацию лейкоцитов (Okba et al., 2019).

Щелочная фосфатаза СмАР, аналогично hresAP, статистически значимо снижала уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 как в ткани толстой кишки, так и в сыворотке крови

(рис. 89 Б). Однако в рамках данной модели ферменты не оказывали существенного влияния на концентрацию TNF- α (рис. 89 Б). В ряде исследований, посвященных динамике цитокинового профиля при лечении бактериальных инфекций, было показано, что уровень IL-6 статистически значимо снижается уже через 3–7 дней терапии. В то же время концентрация TNF- α может не претерпевать существенных изменений в этот период из-за более медленной кинетики снижения данного показателя (Dao et al., 2023). Вероятно, отсутствие значимого влияния CmAP и hrecAP на уровень TNF- α в тканях толстой кишки и, как следствие, на выраженность отека слизистой оболочки (рис. 91) обусловлено недостаточной продолжительностью курса (7 дней) или применением субоптимальных доз ферментов (табл. 7). Несмотря на это, зафиксированное снижение уровней других провоспалительных цитокинов привело к нормализации клеточного состава крови, прежде всего за счет уменьшения количества лимфоцитов (рис. 90), пролиферация и дифференцировка которых регулируются IL-6. Данный факт свидетельствует о купировании системного воспалительного ответа, что, по-видимому, стало ключевым фактором снижения летальности животных в эксперименте (Goyal et al., 2014; Pettengill et al., 2017; Okba et al., 2019; Balabanova et al., 2024b).

Экзогенные ферменты CmAP и hrecAP оказывали локальное действие в просвете кишечника, не поступая в системный кровоток, что, по-видимому, обусловлено большой молекулярной массой их ферментативно активных димеров (Millan et al., 2006; Nasu et al., 2012; Yu et al., 2023). Предположительно, CmAP и hrecAP способствовали повышению концентрации противовоспалительного аденозина и снижали антигенную нагрузку непосредственно в просвете толстой кишки, блокируя TLR4-опосредованную активацию NF- κ B-зависимых сигнальных путей (рис. 88) (Griffiths et al., 2007; Singh et al., 2020; Gao et al., 2020; Banskota et al., 2023; Balabanova et al., 2024b). Данный вывод согласуется с установленной ЛПС-дефосфорилирующей активностью ЩФ морской бактерии CmAP (рис. 89 А).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности курсового (от 7 суток) перорального применения рекомбинантной ЩФ семейства PhoA морской бактерии *C. amphilecti* для купирования системного воспаления и коррекции патологических состояний, вызванных повышенной кишечной проницаемостью и другими воспалительными заболеваниями кишечника.

4.6.3 Регуляторное действие ЩФ семейства PhoA морской бактерии *C. amphilecti* на процессы биопленкообразования и рост планктонных клеток

Изучение механизмов формирования биопленок является актуальной задачей современной микробиологии, поскольку микроорганизмы способны колонизировать как биотические, так и абиотические поверхности. В медицине эта проблема остро стоит в контексте контаминации протезов, катетеров, шунтов и контактных линз (Романова, Гинцбург, 2011;

Корниенко и др., 2018). Особое внимание уделяется патогенным биопленкообразующим бактериям, являющимися причиной развития рецидивирующих хронических инфекций (Ильина, Романова, 2021). Устойчивость бактерий в составе биопленки к антибиотикам может быть в 1000 раз выше по сравнению с их планктонными формами. Для ингибирования формирования и деструкции зрелых биопленок могут быть использованы низкомолекулярные соединения и ферменты (Ильина, Романова, 2021). В связи с этим целью настоящего раздела являлось изучение влияния высокоактивной ЩФ морской бактерии *C. amphilecti* на формирование и разрушение биопленок, образованных различными видами микроорганизмов (Терентьева и др., 2020; Balabanova et al., 2017). Преимущество ферментов морского происхождения заключается в их высокой каталитической эффективности при пониженных температурах, что представляет особый интерес для биотехнологии, пищевой промышленности и медицины (Подволоцкая и др., 2015, 2016; Слепченко и др., 2017).

Известно, что основную часть внеклеточного матрикса биопленок составляют штаммоспецифичные экзополисахариды (Ильина, Романова, 2021; Flemming, Wingender, 2010). Они обеспечивают выживание микроорганизмов в морской среде и могут способствовать их патогенности для человека, особенно в периоды сезонных эпидемий. В связи с этим актуально изучение влияния гидролитических ферментов, участвующих в трансформации углеводсодержащих биополимеров, на процессы биопленкообразования. Так, ранее нами было показано, что α -галактозидаза морской бактерии *P. distincta* КММ 701 эффективно гидролизует α -галактозидные связи в олиго- и полисахаридах, а также в гликоконъюгатах (Balabanova et al., 2010; Bakunina et al., 2018a; 2019).

При исследовании штаммов *Bacillus* spp. (коллекция КММ ТИБОХ ДВО РАН) и клинического изолята *Y. pseudotuberculosis* 512pYV+ было установлено, что добавление α -галактозидазы (0,5 Ед/мл) в течение трех суток приводило к увеличению биомассы биопленок морских бактерий на 30 %, в то время как формирование биопленки референсного штамма *B. subtilis* ингибировалось на 20 % (табл. 15). Стимулирующее действие фермента на биопленкообразование может быть обусловлено его участием в синтезе галактозосодержащих компонентов матрикса, в том числе за счет способности к трансгликозилированию (Слепченко и др., 2017; Bakunina et al., 2018a). Несмотря на вариативность влияния на начальных этапах, фермент вызывал деструкцию 70–95 % зрелой биопленки независимо от вида микроорганизма (табл. 15). В случае клинического штамма *Y. pseudotuberculosis* 512pYV+ под действием бактериальной морской α -галактозидазы наблюдалось ингибирование формирования биопленки до 30 % относительно контроля (Терентьева и др., 2020) (табл. 15).

Таблица 15 – Влияние ферментов морских бактерий на формирование (I) и разрушение (II) бактериальной биопленки¹

Вид бактерий	Фермент					
	ЩФ PhoD ² (0,1 Ед/мл)		ЩФ PhoA ² (1,75 Ед/мл)		α -Галактозидаза ³ (0,5 Ед/мл)	
	I	II	I	II	I	II
<i>B. subtilis</i>	100 ± 6	0	100 ± 5	0	78 ± 4	28 ± 1
<i>B. licheniformis</i>	74 ± 4	15 ± 2	57 ± 3	35 ± 2	125 ± 7	35 ± 2
<i>B. aegricola</i>	68 ± 4	14 ± 2	49 ± 3	7 ± 1	128 ± 6	10 ± 1
<i>B. berkelelogi</i>	82 ± 5	8 ± 1	66 ± 4	3 ± 1	130 ± 7	5 ± 1
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	85 ± 5	23 ± 3	80 ± 4	27 ± 2	69 ± 4	27 ± 2
Контроль	100 ± 5	0	100 ± 5	0	100 ± 6	0

Примечание: 1. Приведена средняя величина ± SD; 0 – разрушение биопленки отсутствует. 2. *C. amphilecti* КММ 296. 3. *P. distincta* КММ 701.

Ранее было показано, что обработка культуры *Y. pseudotuberculosis* ферментом морского происхождения – ДНКазой I гепатопанкреаса краба, приводит к двукратному уменьшению роста и разрушению биопленки зрелой формы (Терентьева и др., 2015). Расщепление внеклеточной ДНК существенно разрежает структуру матрикса биопленки, что может улучшить доступ антибиотиков к бактериальным клеткам (Терентьева и др., 2015; Ильина, Романова, 2021).

Действие щелочных фосфатаз на биопленки может быть обусловлено не только деградацией внеклеточной ДНК матрикса, но и регуляцией концентрации внеклеточных нуклеотидов (рис. 88). Рекомбинантная бифункциональная ЩФ семейства PhoD из морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (0,1 Ед/мл), обладающая фосфодиэстеразной активностью (Noskova et al., 2019), оказывала ингибирующее действие на формирование биопленок морских бацилл *B. licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkelelogi* (на 18–32 %) в течение трех суток, однако не влияла на рост биопленки *B. subtilis* (табл. 15). Добавление фермента приводило к умеренной деструкции (8–15 %) зрелых биопленок морских бацилл и патогенного штамма *Y. pseudotuberculosis* (табл. 15). Высокоактивная ЩФ семейства PhoA *C. amphilecti* КММ 296 (CmAP) в концентрации 1,75 Ед/мл ингибировала формирование биопленок исследованных штаммов на 20–50 % относительно контроля (инкубация в течение трех суток при температуре 20–22 °C). Степень деструкции зрелых биопленок под действием CmAP составила 5–35 % (табл. 15) (Терентьева и др., 2020).

В экспериментах со штаммами бактерий *P. aeruginosa* РАЕМ, *B. subtilis*, *S. enteritidis* и *S. aureus*, выделенными из замороженных пищевых полуфабрикатов, было установлено, что влияние ЩФ семейства PhoA на биопленкообразование носит мультифакторный характер, что может указывать на регуляторную функцию данного фермента (Balabanova et al., 2016, 2017, 2020). Воздействие ЩФ CmAP на формирование биопленок зависело от концентрации фермента,

видовой принадлежности микроорганизма и исходной плотности бактериальной популяции (КОЕ/мл) (рис. 93).

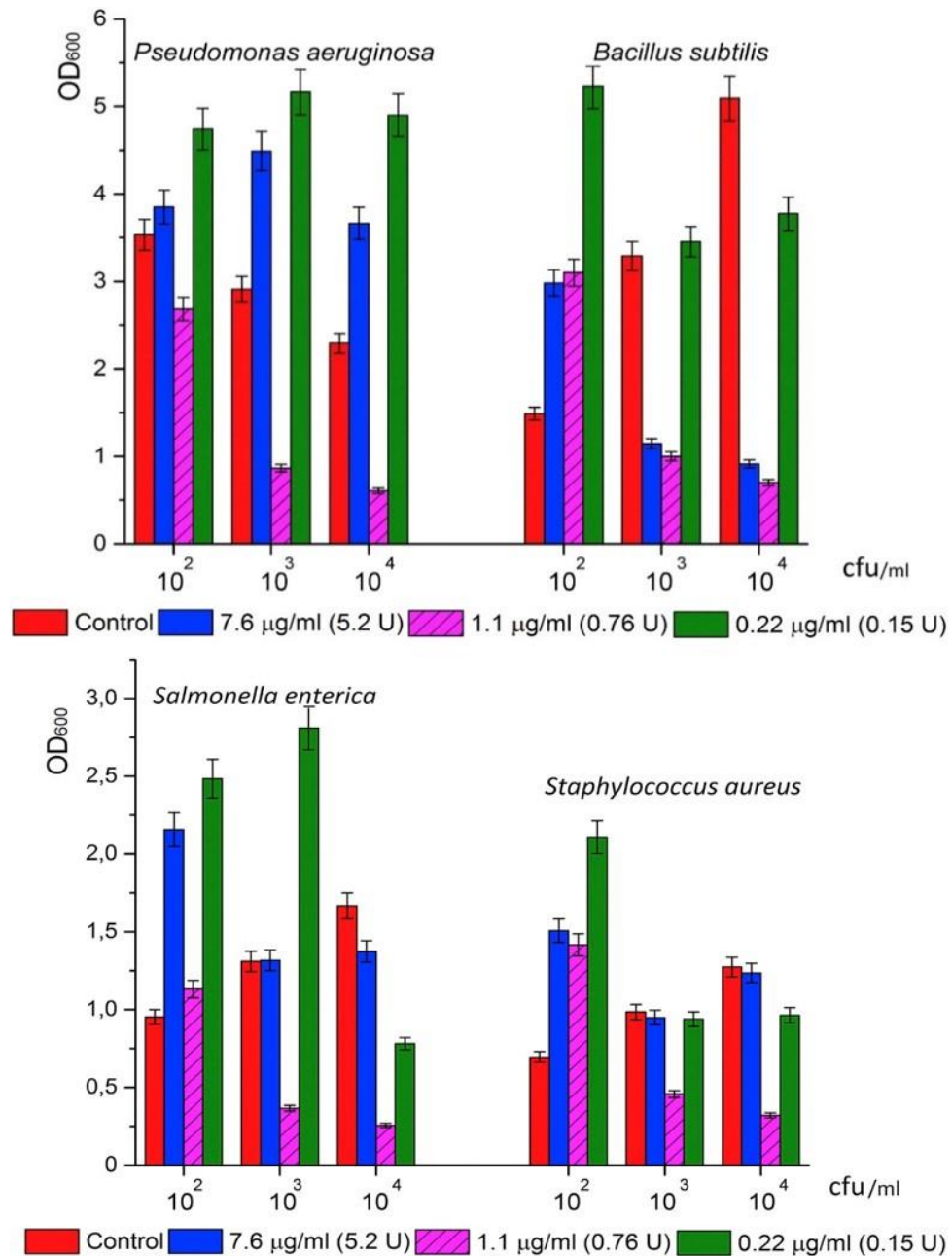


Рисунок 93 – Влияние различных концентраций ЦФ PhoA *C. amphilecti* КММ 296 (CmAP) на образование биопленок штаммами бактерий (*P. aeruginosa* РАЕМ, *B. subtilis*, *S. enteritidis* и *S. aureus*), выделенных из замороженных пищевых полуфабрикатов. Эксперимент проведен после 12-часовой ферментативной обработки при 18 °С (n=10). Ось Y: относительная биомасса биопленки (OD₆₀₀ образца/OD₆₀₀ контроля). Ось X: исходная концентрация клеток (КОЕ/мл, CFU/ml). Различные концентрации CmAP показаны цветом: 7,6 мкг/мл (5,2 Ед(У)/лунку = 17,3 Ед(У)/мл) – синий цвет; 1,1 мкг/мл (0,76 U/лунку = 2,5 U/мл) – заштрихованный розовый; 0,22 мкг/мл (0,15 Ед(У)/лунку = 0,5 U/мл) – зеленый цвет (Balabanova et al., 2017)

Наиболее эффективная доза ЩФ СмАР составила 0,76 Ед на лунку, что соответствует концентрации фермента 1,1 мкг/мл (2,5 Ед/мл) (рис. 93). Штаммы *P. aeruginosa* РАЕМ, *B. subtilis* и *S. enteritidis* при инкубации с 0,76 Ед фермента в течение 12 ч ингибировали формирование биопленки на $72,7 \pm 1,3$ %, $79,0 \pm 7,1$ % и $74,7 \pm 4,1$ % соответственно при исходной плотности клеток в жидкой культуре не менее 10^3 – 10^4 КОЕ/мл (рис. 93). Изолят *S. aureus* в аналогичных условиях снижал биомассу биопленки на 50,0 % и $76,0 \pm 1,5$ % при исходной плотности клеток 10^3 и 10^4 КОЕ/мл соответственно (рис. 93). Штамм *P. aeruginosa* РАЕМ отличался от других исследованных микроорганизмов повышенной чувствительностью к присутствию СмАР в концентрации 2,5 Ед/мл при низкой плотности клеток (10^2 КОЕ/мл). В тех же условиях эксперимента доза 0,15 Ед СмАР оказывала незначительное ингибирующее действие только на формирование биопленок *S. enteritidis* и *B. subtilis* при плотности клеток не менее 10^4 КОЕ/мл. Максимальная доза 5,2 Ед подавляла биопленкообразование только в культуре *B. subtilis* с плотностью клеток в диапазоне от 10^3 до 10^4 КОЕ/мл (рис. 93).

Как видно из рисунка 93, чем выше исходная плотность бактериальных клеток, тем более выражен ингибирующий эффект СмАР (в концентрации 2,5 Ед/мл) в отношении биопленкообразования, независимо от вида микроорганизма. Так, для клеток штамма *P. aeruginosa* РАЕМ с плотностью 10^2 , 10^3 и 10^4 КОЕ/мл эффективная доза фермента СмАР, при которой биомасса биопленки уменьшалась на 50% ($ЭД_{50}$) по сравнению с контролем, составила 9,9; 1,7 и 0,5 Ед/мл соответственно (рис. 93). Для клеток *B. subtilis* с плотностью 10^3 – 10^4 КОЕ/мл эффективная противобиопленочная доза ($ЭД_{50}$) СмАР составила 4,0 и 1,8 Ед/мл соответственно. Для ингибирования формирования биопленок *S. enteritidis* и *S. aureus* значения $ЭД_{50}$ составили 4,8 и 1,2 Ед/мл для первого штамма и 2,5 и 1,1 Ед/мл для второго при аналогичной плотности клеток. Примечательно, что концентрация СмАР ниже или выше уровня 2,5 Ед/мл могла стимулировать биопленкообразование у всех исследованных штаммов.

Таким образом, эффективная доза ЩФ СмАР, обеспечивающая отрицательную регуляцию формирования биопленок, видоспецифична и коррелирует с исходной плотностью популяции, которая для большинства видов должна составлять не менее 10^3 КОЕ/мл (рис. 93). При меньшей плотности клеток или некорректно подобранной концентрации фермента ЩФ СмАР может вызывать обратный эффект – усиление роста биопленки (рис. 93). Это подчеркивает регуляторную, а не просто разрушающую роль ЩФ в бактериальных сообществах.

После инкубации зрелой биопленки в жидкой культуре *P. aeruginosa* РАЕМ с ферментом СмАР при температуре 2–4 °С в течение 1 ч эффект деструкции составил $32,8 \pm 1,5$ % (Balabanova et al., 2017, 2020). Биомасса биопленок изолятов *B. subtilis* и *S. enteritidis* при обработке СмАР снижалась на $33,3 \pm 1,2$ % через 1 ч и на $52,8 \pm 1,5$ % через 3 ч инкубации при 18–22 °С. Аналогичный эффект наблюдался через 3 ч обработки при 2–4 °С. После 12-часовой инкубации

с СмАР при 2–4 °С биопленки *B. subtilis* и *S. enteritidis* разрушались почти на 80%. Биопленки *S. aureus* проявили бóльшую устойчивость к действию СмАР: видимых изменений после 1-часовой обработки ферментом зафиксировано не было. Биомасса биопленок *S. aureus* уменьшилась на $2,9 \pm 3,5$ % через 3 ч инкубации при 18–22 °С и на $47,0 \pm 0,6$ % через 4 ч при 2–4 °С (Balabanova et al., 2017).

Зрелые биопленки штамма *P. aeruginosa* РАЕМ (Balabanova et al., 2017, 2020), сформированные на поверхности чашек Петри, в присутствии 0,1–0,6 Ед фермента СмАР разрушались более чем на 70 % в течение 1–12 ч при температуре 18–22 °С (рис. 94). При этом наблюдалось значительное уменьшение количества внеклеточного матрикса и межклеточных контактов (пилей) (рис. 94 В).

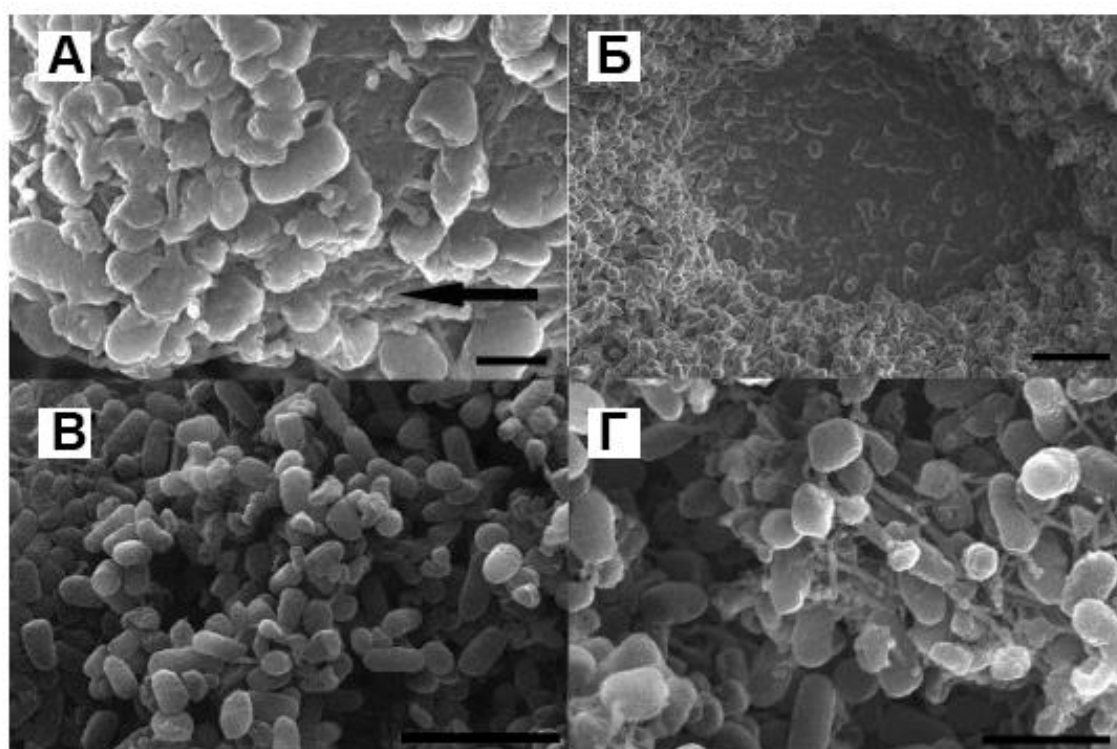


Рисунок 94 – Микрофотографии десятидневной биопленки *P. aeruginosa* РАЕМ, сформированной на чашке Петри: А. Интактная биопленка (масштаб 0,5 мкм). Стрелкой (курсором) указан плотный экзополисахаридный матрикс. Б, В. Зона биопленки после обработки ШЦФ СмАР в течение 12 ч (масштаб 4 мкм и 2 мкм соответственно). Наблюдается деструкция внеклеточного матрикса и разрушение межклеточных контактов (пилей). Г. Зона биопленки после обработки ДНКазой СмЕЕР (масштаб 2 мкм): зафиксировано разрыхление внеклеточного матрикса при сохранении целостности межклеточных контактов (пилей) (Balabanova et al., 2017)

Более того, после нанесения ШЦФ СмАР (10 мкл, 2,5 Ед/мл) на зрелую (10-суточную) биопленку *P. aeruginosa* РАЕМ наблюдалась направленная колонизация деградированных участков клетками *C. amphilecti* КММ 296 (рис. 94, рис. А11). Несмотря на то, что жидкая

культура *C. amphilecti* была инокулирована в отдельные лунки на удалении от зон воздействия фермента, через 7 суток инкубации (22–25 °C) было зафиксировано перемещение бактерий из первичного очага и их преимущественное заселение участков биопленки, предварительно обработанных СмАР (рис. А11). Это свидетельствует о способности *C. amphilecti* к миграции по поверхности сформированного матрикса *P. aeruginosa* в зоны ферментативного гидролиза, что позволяет рассматривать ЩФ СмАР как фактор, способствующий колонизации (рис. А11).

В отличие от ЩФ, рекомбинантные нуклеазы СмЕЕР и СмNUC (табл. 5) из морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 вызывали деструкцию биопленок в широком диапазоне температур (от 2 до 22 °C) независимо от видовой принадлежности бактерий (Balabanova et al., 2017). При значении pH 4,6 межклеточный матрикс биопленок исследуемых пищевых изолятов разрушался под действием СмЕЕР и СмNUC на 60 % в течение 12 ч. Однако, в отличие от эффекта ЩФ СмАР, воздействие данных ДНКаз не приводило к разрушению межклеточных пилей (рис. 94 Г).

Таким образом, ЩФ семейства PhoA выступает в роли универсального регулятора плотности бактериальных популяций, что тесно связано с процессами размножения и биопленкообразования (рис. 93, 94, рис. А11). Транскриптомные исследования показывают, что бактериальные клетки в составе биопленок характеризуются низкой метаболической активностью на фоне ап-регуляции генов, необходимых для анаэробного роста (Ильина, Романова, 2021). Этот процесс находится под строгим контролем чувства кворума (*quorum sensing*) – механизма межклеточной коммуникации, позволяющего бактериям координировать экспрессию генов в зависимости от плотности популяции (Balabanova et al., 2017; Ильина, Романова, 2021). Этим объясняется повышенная устойчивость бактерий в сессильной фазе («оседлых», неподвижных клеток внутри матрикса) к антибиотикам, дезинфицирующим средствам и факторам иммунной системы (Подволоцкая и др., 2016; Ильина, Романова, 2021).

Под воздействием факторов окружающей среды происходит переключение метаболизма сессильных анаэробных клеток на метаболизм подвижных планктонных аэробных форм, предназначенных для колонизации новых экологических ниш. Вероятно, внеклеточная ЩФ PhoA морской бактерии-космополита *C. amphilecti* является фактором, модулирующим сигналы системы *quorum sensing* конкурентов (рис. 93, 94, рис. А11). Это позволяет успешно колонизировать новые экониши со сложными мультивидовыми сообществами (рис. А11), используя дополнительные преимущества в виде синтеза антимикробных вторичных метаболитов и наличия ферментных систем для утилизации разнообразных источников углерода, включая двухуглеродные субстраты и углеводороды (рис. 77) (Balabanova et al., 2016).

Тем не менее, молекулярный механизм сложной дозозависимой регуляции со стороны высокоактивной бактериальной ЩФ PhoA в отношении отдельных представителей микробного

сообщества может варьировать и требует дальнейшего изучения. Это справедливо и для установленного нами дозозависимого ингибирующего действия CmAP на клетки карциномы T-47D и аденокарциномы MDA-MB-231 (Буйновская, 2023). Выявленная активность подтверждает гипотезу об универсальном механизме регуляторного влияния ЩФ семейства PhoA на энергетический метаболизм как прокариотических, так и эукариотических клеток, что, вероятно, связано с модуляцией пуринергической сигнализации и редокс-статуса микроокружения.

4.6.4 Экспрессия рекомбинантной ЩФ семейства PhoA *C. amphilecti* в растениях табака и ее функциональная роль при абиотическом стрессе

Молекулярное фермерство – это быстро развивающаяся область биотехнологии, позволяющая экономически эффективно производить функциональные рекомбинантные белки терапевтического и промышленного значения в достаточных количествах с использованием растительных систем (Ku et al., 2014; Valkova et al., 2017; Animasaun et al., 2023; Adedibu et al., 2024б). Было показано, что такие виды табака, как *N. tabacum* и *N. benthamiana*, являются высокоэффективными гетерологичными системами экспрессии для рекомбинантных ферментов с широким спектром применения (Joensuu et al., 2009; Conley et al., 2010). Эти виды часто называют «белыми мышами» науки о растениях благодаря их чувствительности к генетическим модификациям и широкому использованию в качестве платформы для ранних исследований в области производства рекомбинантных белков (Yin et al., 2019). Рекомбинантные белки экспрессируются, в основном, в листьях, это снижает риск непреднамеренной утечки генов в окружающую среду через пыльцу или семена (Conley et al., 2010). Виды *Nicotiana* хорошо подходят для эффективной генетической трансформации и дают высокие выходы белка из большой биомассы листьев (Conley et al., 2010). Кроме того, растения табака не содержат человеческих эндотоксинов, в частности ЛПС, присутствие которых может ограничить терапевтическое применение рекомбинантной ЩФ, полученной в бактериальных системах экспрессии. В связи с этим, в данной работе проведена гетерологичная экспрессия ЩФ структурного семейства PhoA морской бактерии *C. amphilecti* (rCmAP) в растениях *N. tabacum*. Получены результаты сравнительного анализа выхода рекомбинантного фермента в каллусе и тканях листьев табака при использовании различных векторов, генетических конструкций и методов, охарактеризованы физико-химические свойства рекомбинантного фермента rCmAP, выделенного из трансформированного табака (Adedibu et al., 2024б). Это открывает возможности для получения высокоочищенного фермента, не содержащего ЛПС, который может быть использован в терапевтических целях в ветеринарии и медицине. Для транзиторной трансформации листьев *N. tabacum* и получения трансгенных каллусов использовали рекомбинантные векторы pHREAC-CmAP и pEff-CmAP (рис. 45). Известно, что векторы pHREAC и pEff способствуют высокой экспрессии рекомбинантных ферментов (Mardanov et al.,

2017; Peyret et al., 2019). Рекомбинантный *alp*, кодирующий CmAP(rCmAP), был успешно экспрессирован в листьях и каллусе *N. tabacum* с выходом общего белка в лизате с активной рекомбинантной ЩФ от 2,2 до 7,4 мг из 2 г трансформированных тканей листьев (рис. 95).

Результаты анализа показали, что удельная активность (у.а.) ЩФ исследуемых образцов составила 0,093–14,6 Ед/мг. В целом, активность и выход рекомбинантного фермента rCmAP были выше в трансформированных тканях листьев по сравнению с каллусами (рис. 95).

В отличие от конструкций pHREAC-CmAP использование векторов pEff-CmAP приводило к наиболее высокой ферментативной активности и выходу rCmAP в трансформированных листьях (рис. 95). Средняя у.а. ЩФ составила 11,2 Ед/мг и 0,34 Ед/мг, а общая активность ЩФ – 49,2 Ед и 0,73 Ед, в листьях и каллусах соответственно (рис. 95). Уровень экспрессии rCmAP в каллусе был в два раза ниже, чем в листьях *N. tabacum* (рис. 95, 96).

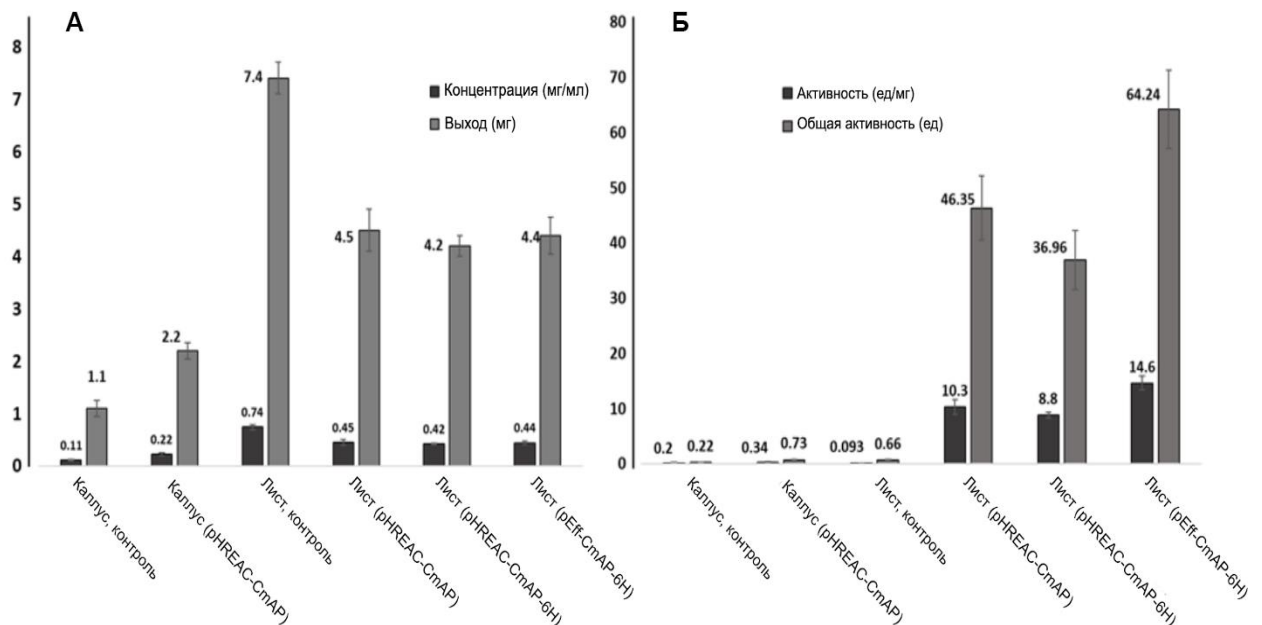


Рисунок 95 – Выход и активность рекомбинантного CmAP в лизатах трансгенных листьев и каллусов *N. tabacum*: А. Концентрация и выход белка. Б. Относительная ферментативная активность rCmAP. Соответствующие значения каждого показателя представлены на оси у. Данные представлены как среднее $\pm$ SE ($p \leq 0,05$)

В итоге, из 2 г трансформированных листьев получено 0,227 мг очищенного рекомбинантного белка rCmAP с у.а. 733,3 Ед/мг (рис. 95). На последней стадии такой же схемы очистки рекомбинантного белка CmAP, экспрессированного в клетках *E. coli*, у.а. составила 4052,6 Ед/мг (Adedibu et al., 20246; Seitkalieva et al., 2024). Однако, выход rCmAP из трансгенного растения *N. tabacum* составлял 5,2 % от общего содержания белка, что превышает 0,37 % целевого белка, полученного из *E. coli* (Adedibu et al., 20246). Кроме того, окрашивание серебром гелей

(ПААГ) выявило присутствие высокой концентрации ЛПС в образце очищенного препарата CmAP из клеток *E. coli*, что указывает на его контаминацию ЛПС продуцента (рис. 96).

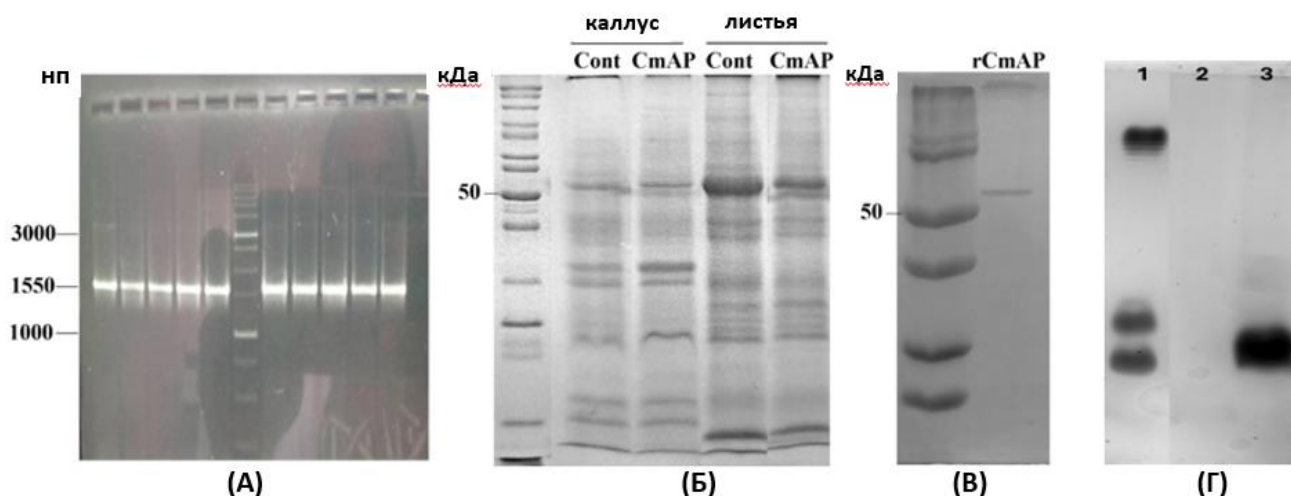


Рисунок 96 – А. Электрофореграмма в агарозном геле, показывающая амплификацию полноразмерного гена *alp* для rCmAP (1550 п.н.) в трансформированных каллусах *N. tabacum*. Полоса с маркером пар оснований ДНК слева (bp). Б. Анализ белковых экстрактов из контрольных (Cont) и трансформированных (CmAP) каллусов и листьев *N. tabacum* в полиакриламидном геле. В. Анализ в ДСН-ПААГ рекомбинантного белка rCmAP из трансгенных растений после аффинной очистки на Ni-агарозе. Полоса с маркером молекулярной массы (кДа) (New England Biolabs, USA). Г. Анализ в ДСН-ПААГ образцов рекомбинантных белков rCmAP, выделенных и очищенных из клеток *E. coli* (3) и *N. tabacum* (2) в полиакриламидном геле. Контроль (1) – образец водного раствора ЛПС штамма *E. coli* O55:B5 (Sigma, США)

Сниженные значения у.а. очищенного препарата rCmAP из трансгенных листьев относительно аналога из бактериального продуцента могут указывать на aberrantное N-гликозилирование, встречающееся в растении-хозяине (Adedibu et al., 2024б). В недавнем исследовании было отмечено, что гликозилированные в растениях белки могут иметь измененную конформацию или неправильно взаимодействовать с молекулами-мишенями (Bennett et al., 2018). Однако для определения наличия гликозилирования rCmAP после посттрансляционного созревания в тканях листьев табака требуются дальнейшие исследования (Adedibu et al., 2024б). Таким образом, транзиентная трансформация листьев табака оказалась более эффективным методом получения функционально активной морской бактериальной ЩФ rCmAP, обладающей термостабильностью, солеустойчивостью и другими свойствами, сопоставимыми с природным ферментом (Plisova et al., 2005; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015; Adedibu et al., 2024б).

Производство rCmAP в каллусных культурах остается недостаточно эффективным, с низким уровнем экспрессии и выхода, несмотря на высокие показатели общего белка в тканях (рис. 95). Такая разница в эффективности производства rCmAP в каллусе и листьях подчеркивает

метаболические различия между этими тканями, причем в каллусе приоритет отдается активной дифференциации и росту клеток, а не синтезу рекомбинантного белка. Данное исследование также подчеркивает значительное влияние экспрессионных векторов на выход и активность rCmAP (Adedibu et al., 2024б). Репликативный РНК-вирусный вектор «pEff» обеспечил в два раза более высокий уровень ферментативной активности rCmAP по сравнению с нерепликативным вектором (рис. 95). Необходимы дальнейшие исследования для оптимизации выхода и активности рекомбинантной ЩФ PhoA морской бактерии, особенно в каллусных культурах, для возможности его терапевтического применения.

Кроме того, в настоящем исследовании изучено влияние гетерологичной экспрессии гена *alp*, кодирующего полноразмерный белок rCmAP с активностью ЩФ PhoA морской бактерии, на физиологические и биохимические реакции растений табака *N. tabacum* в условиях различных абиотических стрессов (Yugay et al., 2025). В результате показано, что в контрольных условиях линии контрольного растения дикого типа (WT) и трансгенных линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (сокращение CaAP для ЩФ CmAP использовано по историческому названию продуцента – *S. marina* КММ 269, реклассифицированного в *S. amphilecti* КММ 269) достигли 100 % всхожести (рис. 97). Однако трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 демонстрировали небольшое преимущество в скорости прорастания, достигая полной всхожести примерно на день раньше, чем линия WT.

В условиях дефицита фосфатов это преимущество стало более заметным: на десятый день эксперимента всхожесть трансгенных линий составила 88 % (Nt-CaAP1) и 84 % (Nt-CaAP2), тогда как в случае WT – лишь 68 % (рис. 97). В условиях обилия фосфатов все линии продемонстрировали высокую скорость прорастания, достигая 100 % всхожести уже к девятому дню эксперимента (рис. 97).

Солевой и осмотический стрессы значительно снижали всхожесть семян WT (70–76 %), тогда как трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 демонстрировали более высокую устойчивость, достигая 93–98 % всхожести. Кроме того, на ранних стадиях прорастания трансгенные линии превосходили WT: на 7-й день эксперимента 50 % семян Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 проросли, в то время как всхожесть WT составила лишь 25 % (рис. 97). В условиях дефицита кальция, напротив, трансгенные линии показали снижение адаптивности. На 10-й день эксперимента всхожесть семян Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 составила лишь 63% по сравнению с 90% у WT (рис. 97). Кроме того, у трансгенных линий наблюдалось отставание в прорастании на ранних этапах, где их скорость была примерно в три раза ниже, чем у WT (рис. 97).

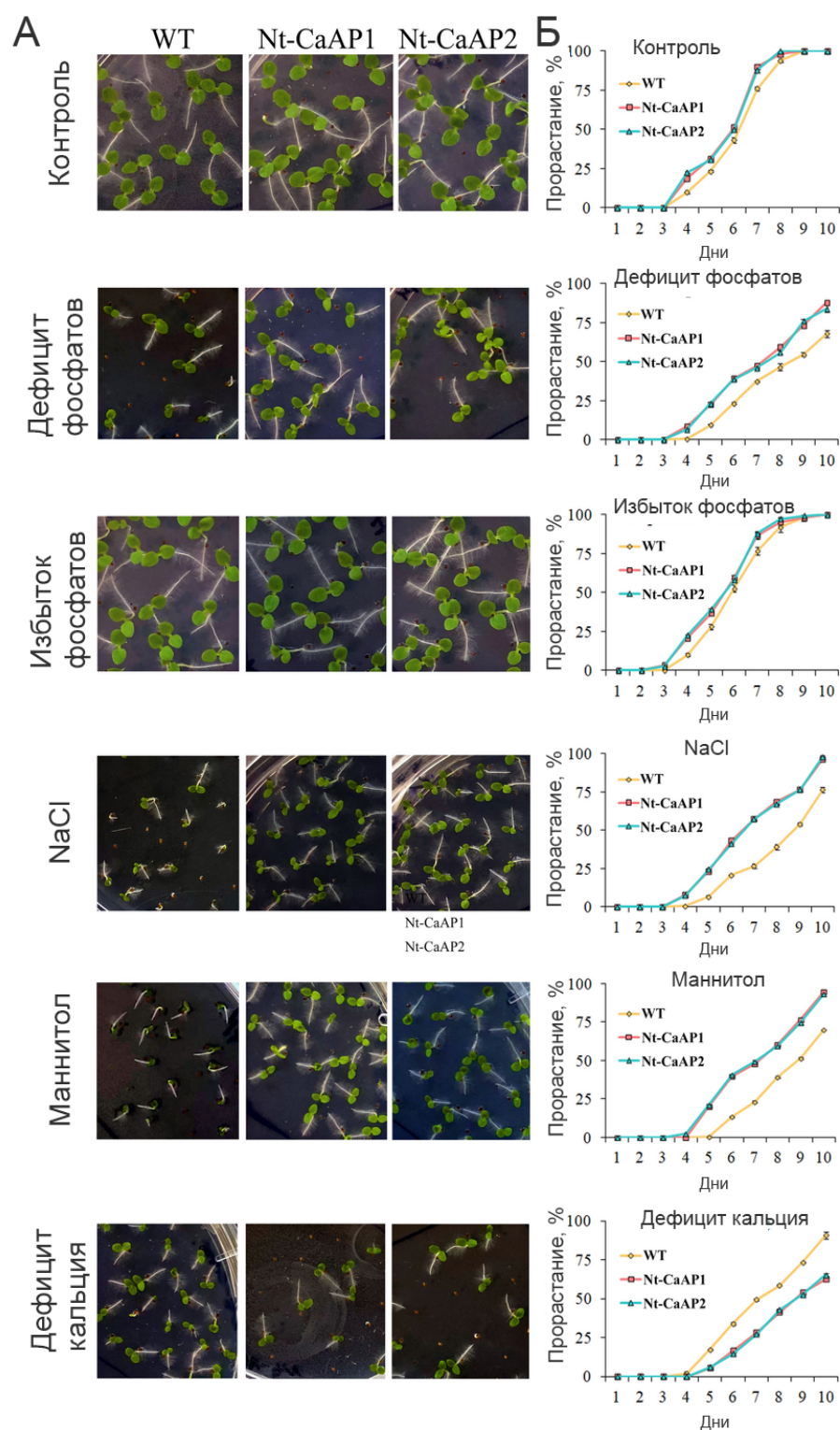


Рисунок 97 – А. Внешний вид проросших семян табака дикого типа (WT) и трансгенных линий, экспрессирующих ген ЩФ rCmAP (здесь: Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2) в условиях абиотических стрессов. Б. Статистический анализ всхожести семян. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SE из трех независимых повторов и количестве семян не менее 50 (Yugay et al., 2025)

В контрольных условиях обе трансгенные линии (Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2) показали небольшое увеличение длины корней по сравнению с WT: средняя длина корней составила 26,6 мм у Nt-CaAP1 и 26,2 мм у Nt-CaAP2 против 24,1 мм у WT (рис. 98).

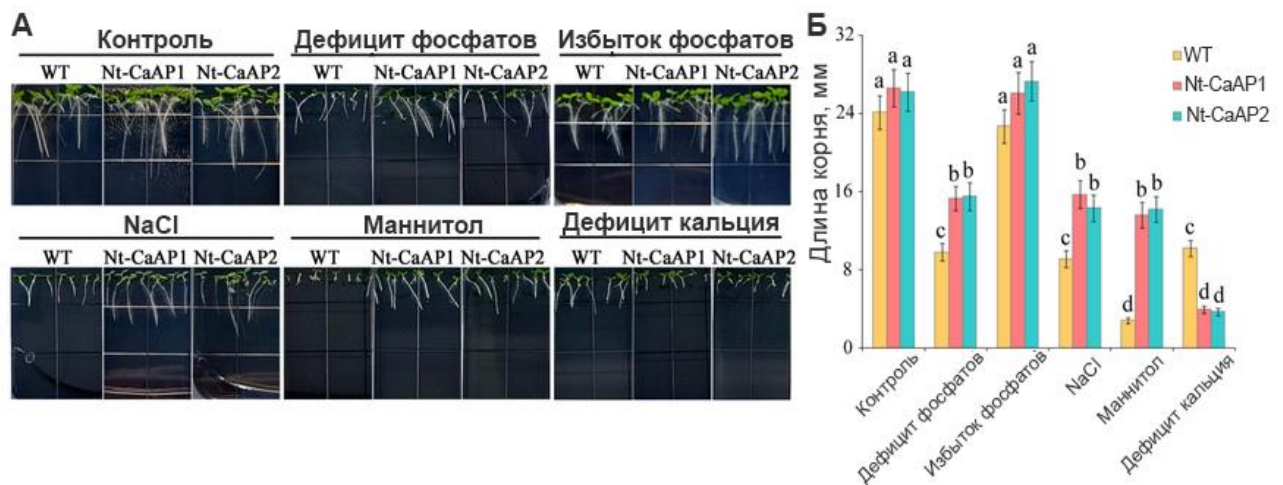


Рисунок 98 – Рост корней у растений табака дикого типа (WT) и трансгенных линий (Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2), экспрессирующих ген ЩФ гСмАР, в условиях абиотических стрессов. Семена были высажены группами по 7–10 штук на квадратных чашках. А. Фотографии типичных чашек получены через 2 недели после посева. Б. Статистический анализ роста корней. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка, рассчитанные из трех биологических повторов. Значения, обозначенные одной и той же буквой, не различались достоверно при $p < 0,05$, тест LSD (Yugay et al., 2025)

В условиях дефицита фосфатов увеличение длины корней у трансгенных линий было более выраженным: длина корней Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 превышала показатель WT в 2,7 раза (рис. 98). Дефицит фосфатов снижает энергетический потенциал клеток, замедляя их деление и рост из-за недостатка АТФ, с другой стороны, растения адаптируются к дефициту, перераспределяя ресурсы в пользу развития корневой системы, что увеличивает площадь поглощения и улучшает доступ к фосфатам в почве. Избыточное содержание фосфатов в среде не влияло на рост корней во всех исследованных линиях, и их длина не отличалась от таковой в контрольных условиях (рис. 98).

В условиях солевого и осмотического стрессов трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 демонстрировали заметное преимущество по длине корней, превышая значения линии WT в 1,6 и 5 раз соответственно (рис. 98). Таким образом, ЩФ гСмАР усилила перераспределение ресурсов в трансгенах, увеличив адаптивные реакции растений в условиях дефицита фосфора. Однако при дефиците кальция рост корней был значительно ограничен во всех исследованных линиях. В этих условиях длина корней у растений WT оказалась в 2,7 раза больше, чем у трансгенных линий (рис. 98).

Анализ влияния ЩФ rSmAP на окислительно-восстановительный статус трансгенного растения в условиях окислительного стресса показал, что в контрольных условиях активность пероксидаз была низкой и практически одинаковой во всех исследованных линиях, с минимальными различиями между WT, Nt-CaAP1, Nt-CaAP2 (рис. 99 А).

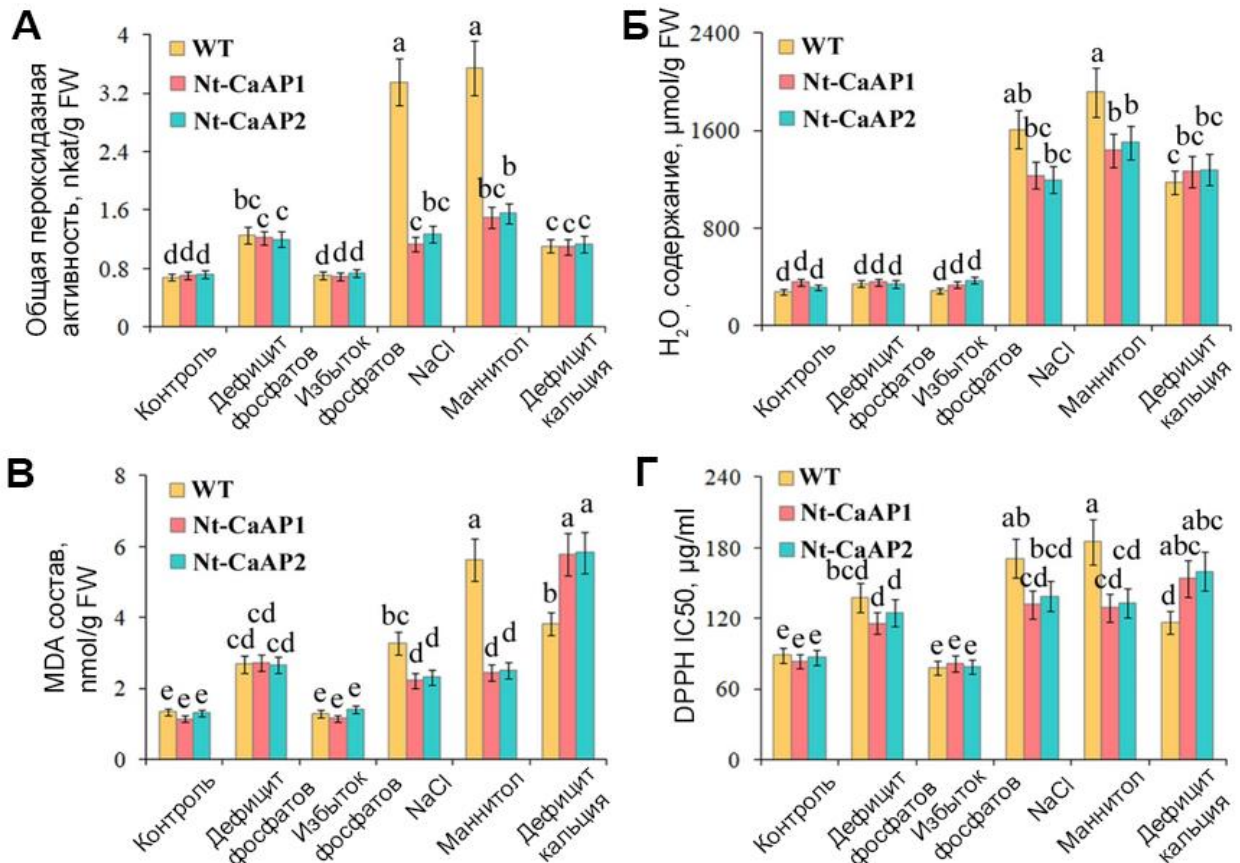


Рисунок 99 – Влияние абиотических стрессов на окислительно-восстановительный статус растений табака дикого типа (WT) и трансгенных линий, экспрессирующих ген ЩФ rSmAP (Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2): А. Общая активность пероксидаз. Б. Уровень накопления перекиси водорода (H₂O₂). В. Содержание малондиальдегида (MDA). Г. Антирадикальная активность по методу определения 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH). Данные представляют собой средние значения ± SE. Значения, обозначенные одной и той же буквой, достоверно не различались при $p < 0,05$, тест LSD (Yugay et al., 2025)

В условиях дефицита фосфатов активность пероксидаз увеличивалась почти в 2 раза по сравнению с контрольными условиями во всех линиях, при этом значимых различий между трансгенными линиями и WT не наблюдалось. Выращивание как WT, так и трансгенных линий на среде с избытком фосфатов не влияло на активность пероксидаз, которая оставалась на уровне контрольных значений (рис. 99 А). В условиях солевого и осмотического стрессов растения WT демонстрировали 2,8-кратное увеличение активности пероксидаз, достигая максимальных значений среди всех исследованных условий и линий (рис. 99 А). В условиях дефицита кальция

активность пероксидаз увеличивалась в 1,5 раза во всех линиях по сравнению с контрольными условиями. Однако значимых различий между WT и трансгенными линиями при дефиците кальция не наблюдалось (рис. 99 А).

В контрольных условиях, а также при дефиците и избытке фосфатов, содержание H_2O_2 оставалось относительно низким и одинаковым во всех линиях, находясь в пределах 270–370 мкмоль/г сырой массы (рис. 99 Б). Однако, в условиях солевого и осмотического стрессов наблюдалось 4-х кратное увеличение содержания H_2O_2 по сравнению с контрольными условиями. В растениях WT содержание H_2O_2 достигало примерно 1900 мкмоль/г сырой массы, тогда как трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 характеризовались меньшим накоплением H_2O_2 , около 1200 мкмоль/г сырой массы (рис. 99 Б). Дефицит кальция также приводил к 4-х кратному повышению содержания H_2O_2 во всех линиях по сравнению с контролем с уровнями около 900–1000 мкмоль/г сырой массы. При этом значимых различий между WT, Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 в данных условиях не выявлено (рис. 99 Б).

В контрольных условиях и при избытке фосфатов все исследованные линии демонстрировали низкий уровень содержания малондиальдегида (МДА) – около 1 нмоль/г сырой массы, без значительных различий между WT, Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (рис. 99 В). Дефицит фосфатов вызывал окислительный стресс, сопровождающийся увеличением содержания МДА примерно вдвое по сравнению с контрольными условиями, при этом различий между трансгенными линиями и WT не наблюдалось (рис. 99 В). При солевом и осмотическом стрессах как WT, так и трансгенные линии демонстрировали удвоенное накопление МДА относительно контрольных условий. Однако в этих стрессовых условиях WT накапливал МДА на 1,5 и 2,3 раза больше соответственно по сравнению с линиями Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (рис. 99 В). В условиях дефицита кальция наблюдалась противоположная картина: трансгенные линии оказались более чувствительными, демонстрируя уровень МДА в 1,5 раза выше, чем у WT (рис. 99 В). Значения активности IC_{50} по отношению к радикалу DPPH во всех линиях при выращивании в контрольных условиях и в среде с избытком фосфатов были относительно низкими, находясь в диапазоне 78–89 мкг/мл (рис. 99 В).

Отсутствие фосфатов и кальция, а также воздействие солевого и осмотического стрессов приводили к увеличению значений IC_{50} 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH) приблизительно в 1,5 раза по сравнению с контрольными условиями (рис. 99 Г). При дефиците фосфатов различий между растениями WT и трансгенных линий не наблюдалось. В условиях солевого и осмотического стрессов значения IC_{50} DPPH в растениях WT были в 1,3 раза выше, чем в трансгенных линиях. Напротив, при дефиците кальция значения IC_{50} DPPH у трансгенных линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 превышали показатели WT в 1,3 раза (рис. 99 Г).

Кроме того, отмечено эндогенное влияние гSmAP на физиологические характеристики трансгенов. Так, в контрольных условиях и при избытке фосфатов все линии демонстрировали высокие значения MSI (индекс стабильности мембраны), достигая почти 90 % (рис. 100 А).

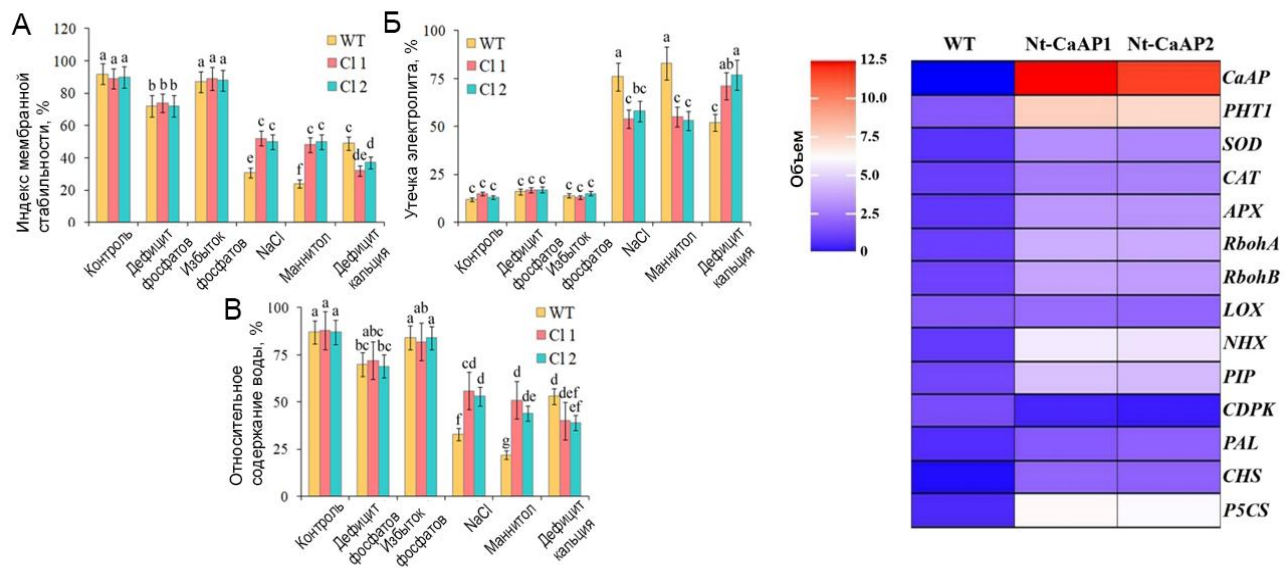


Рисунок 100 – (А, Б, В) Анализ физиологических параметров у растений табака дикого типа (WT) и трансгенных линий Nt-CaAP1 (C11) и Nt-CaAP2 (C12), экспрессирующих ген щелочной фосфатазы гSmAP (слева): А. Индекс стабильности мембран (MSI). Б. Утечка электролитов. В. Относительное содержание воды в листьях. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка. Значения, обозначенные одной и той же буквой, достоверно не различались при $p < 0,05$, тест LSD. Справа: тепловая карта экспрессии трансгена ЩФ *CaAP* и генов, участвующих в антиоксидантной защите (*SOD*, *CAT*, *APX*), прооксидантных путях (*RbohA*, *RbohB*), липидном метаболизме (*LOX*), транспорте ионов (*NHX*), транспорте воды (*PIP*), активности кальций-зависимой протеинкиназы (*CDPK*), биосинтезе фенолов и флавоноидов (*PAL*, *CHS*) и биосинтезе пролина (*P5CS*) у *N. tabacum* WT и трансгенных линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (Yugay et al., 2025)

Более высокие значения показателя целостности клеточной мембраны – индекс стабильности мембран (MSI), указывают на большую мембранную стабильность и устойчивость к стрессовым повреждениям. Однако дефицит фосфатов приводил к снижению мембранной стабильности во всех линиях, с уменьшением MSI до 70 % по сравнению с контрольными условиями. Солевой и осмотический стрессы значительно ухудшали целостность мембран. У WT значения MSI снизились в 3–4 раза относительно контрольных условий и оказались в 1,6–2,0 раза ниже, чем у трансгенных линий Nt-CaAP1 (C11) и Nt-CaAP2 (C12) в тех же условиях (рис. 100 А). При дефиците кальция наблюдался аналогичный эффект: показатель MSI существенно снижался во всех линиях. Однако в этом случае WT демонстрировал преимущество перед трансгенными линиями, сохраняя более высокие значения MSI (рис. 100 А).

На рисунке 100 Б представлен процент утечки (оттока) электролитов, который служит индикатором повреждения клеточных мембран. Более высокий процент свидетельствует о серьезных структурных нарушениях. В контрольных условиях, а также при дефиците и избытке фосфатов, утечка электролитов оставалась низкой и у трансгенных линий отличалась незначительно. Однако солевой и осмотический стрессы, как и дефицит кальция, значительно увеличивали утечку электролитов, превышая показатели контрольных условий в 4–7 раз (рис. 100 Б). Трансгенные линии Nt-CaAP1 (Cl1) и Nt-CaAP2 (Cl2) проявляли повышенную устойчивость к солевому и осмотическому стрессам, демонстрируя уровень утечки электролитов примерно в 1,5 раза ниже, чем у WT. В условиях дефицита кальция, напротив, трансгенные линии характеризовались высоким уровнем утечки электролитов, достигая 71–75 % (рис. 100 Б).

Относительное содержание воды (RWC) отражает способность тканей растений удерживать влагу, при этом высокий процент RWC указывает на хорошую гидратацию и сбалансированный водный статус растений. В контрольных условиях, а также при дефиците и избытке фосфатов уровень RWC оставался достаточно высоким, находясь в диапазоне 70–88 % во всех линиях (рис. 100 В). При солевом и осмотическом стрессе наблюдалось значительное снижение RWC у растений WT, с показателями, достигающими 22–33 %. В то же время трансгенные линии Nt-CaAP1 (Cl1) и Nt-CaAP2 (Cl2) демонстрировали более высокий уровень гидратации, удерживая более 50 % воды (рис. 100 В). В условиях дефицита кальция способность удерживать воду снизилась у всех линий и составила примерно 50 % от значений, зарегистрированных в контрольных условиях (рис. 100 В).

Таким образом, растения, экспрессирующие ЩФ гCaAP, оказались более чувствительными к дефициту кальция по сравнению с WT во всех экспериментах (Yugay et al., 2025). Кальций является важным вторичным мессенджером, регулирующим реакции растений на абиотические и биотические стрессы. Его концентрация в цитоплазме оказывает существенное влияние на активность кальций-зависимых ферментов и транскрипцию стресс-индуцируемых генов. Ранее была показана ключевая роль кальция в регуляции метаболизма фосфатов фосфатазами, которые участвуют в переработке органофосфатов в почве и обеспечивают адаптацию к дефициту фосфора (Praat et al., 2021). Дефицит кальция нарушает работу ферментов антиоксидантной системы, включая фосфатазы, что приводит к накоплению АФК и повреждению клеток.

Количественная оценка влияния экспрессии *rhoA* (*CaAP*) на растения табака (рис. 100) выявила значительное повышение уровней транскриптов генов, ответственных за ключевые адаптивные механизмы. Наблюдалась активация сигнальных путей АФК (*RbohA*, *RbohB*) и транспорта фосфата (*PHT1*) (в 3–4 раза), антиоксидантных ферментов (*SOD*, *CAT*, *APX*) (в 2,5–4

раза), систем ионного гомеостаза и транспорта (*PIP*, *NHX*) (в 3,5–5,8 раза), а также путей биосинтеза вторичных метаболитов: фенилпропаноидов (*PAL*, в 2,9 раза) и флавоноидов (*CHS*, в 15 раз). Сравнительный анализ культур амаранта и риса подтвердил, что экспрессия генов *NHX*, регулирующих Na^+/H^+ -антипорт, повышает устойчивость растений к солевому и осмотическому стрессам за счет оптимизации ионного баланса и снижения интенсивности окислительных процессов (Rasheed et al., 2022; Adedibu et al., 2024в). Напротив, уровень мРНК Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы *CDPK* в трансгенных линиях снизился в 4 раза. Кроме того, уровень транскрипции стресс-чувствительного гена *P5CS* увеличился в 10 раз по сравнению с диким типом табака (WT) (рис. 29).

Таким образом, гетерологичная экспрессия гена *phoA* морской бактерии *C. amphilecti* in planta подтвердила, что ЩФ PhoA регулирует метаболизм на уровне транскрипции, включаясь в сеть метаболических путей, ответственных за предотвращение окислительного стресса и повреждение тканей. Это указывает на универсальность механизмов регуляции ионного и окислительно-восстановительного баланса, а также адаптации к стрессорным воздействиям у прокариот и эукариот. Экспрессия ЩФ PhoA *C. amphilecti* способствовала увеличению активности пероксидаз, снижению уровня H_2O_2 и уменьшению накопления малонового диальдегида (МДА) в условиях солевого и осмотического стрессов. Это повышает уровень защиты мембран от липидного перекисного окисления, снижает структурные повреждения, уменьшает утечку электролитов и способствует удержанию воды в листьях (рис. 99, 100). Подобный эффект наблюдался у трансгенных линий хлопчатника, экспрессирующих фитазу (Ma et al., 2013). Помимо устойчивости к окислительному стрессу, трансгенный рис, экспрессирующий ген *phoA* *E. coli*, показал устойчивость к гербициду глифосату за счет способности бактериального фермента расщеплять фосфотриэфирную связь (Ram et al., 2019).

Антиоксидантная активность фермента в периоды абиотического стресса, широкая субстратная специфичность и способность к регуляции метаболизма широкого круга патогенов открывают новые перспективы для биотехнологического использования генов ЩФ семейства PhoA морских гетеротрофных бактерий (Балабанова и др., 2023; Animasaun, 2023; Balabanova et al., 2017, 2022a, 2023, 2024a, б; Adedibu et al., 2024a, б, в; Shkryl et al., 2022; Yugay et al., 2025). Это особенно актуально для решения проблем биомедицины, сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности в засушливых и неблагоприятных регионах мира, в частности, при разработке культур, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование включает полногеномную, пангеномную и таксономическую характеристику штаммов морских гетеротрофных бактерий типов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Данные микроорганизмы являются перспективными источниками холодоактивных и галотолерантных щелочных фосфатаз, нуклеаз, гликозидаз и протеаз, а также биосинтетических генных кластеров (БГК) эктоина, сидерофоров, арилполиенов, резорцина, кофакторов, биоцидов и иммуносупрессоров. Функциональная аннотация генов подтверждена получением рекомбинантных белков, проявляющих высокую активность при пониженных температурах, повышенной ионной силе и щелочных значениях pH.

Представленные результаты служат основой для разработки единого подхода к оценке биотехнологического потенциала штаммов на основе комплексного таксономического, фенотипического и молекулярно-генетического анализа с выявлением структурно-функциональных особенностей и физиологической роли целевых ферментов. Применение данного подхода позволило пополнить референсные базы данных, провести таксономическую классификацию фенотипически и генетически гетерогенных близкородственных штаммов и изолятов из различных экосистем Мирового океана, установить новые виды морских бактерий и новый род альфа-протеобактерий *Rhodalgimonas*, а также идентифицировать метаболические пути, проанализировать штаммоспецифическое разнообразие структур щелочных фосфатаз (ЩФ) и установить биосинтетические генные кластеры (БГК) биотехнологического значения.

Хромосомная локализация ЩФ в составе БГК мембранных белков энергетического обмена и отсутствие оперонной структуры указывают на возможную регуляторную функцию этих ферментов в окислительном метаболизме для поддержания редокс-баланса в клетке, предотвращения окислительного стресса и деполяризации мембран. Наличие альтернативных метаболических путей в морских бактериях подтверждает их высокую адаптагенность в условиях меняющейся среды обитания (температура, соленость, концентрация ионов железа, фосфатов, O₂ (азрация), наличие альтернативных источников углерода и энергии).

Способность переключаться с одного типа метаболизма на другой позволяет морским гетеротрофам выживать как в богатых органикой, так и в крайне скудных и экстремальных средах. Наличие БГК разных классов антимикробных соединений и иммуносупрессоров говорит о высокой конкурентоспособности морских гетеротрофов при колонизации новых экониш, в том числе тканей водорослей, растений и животных. Полученные результаты играют первостепенную роль в разработке приемов биоремедиации водоемов и прибрежных экосистем, получении пробиотиков для аквакультуры и уникальных продуцентов ценных ферментов и метаболитов, в характеристике их биологических особенностей в целях использования в биотехнологии.

Кроме того, в данном исследовании впервые на трансгенном растении показана уникальная роль штаммоспецифической высокоактивной щелочной фосфатазы PhoA в преодолении клеткой оксидативного стресса, связанного с повышением уровня активных форм кислорода (АФК), оттоком электролитов и потерей воды, в том числе путем положительной регуляции транскрипции генов антиоксидантных систем. Эти свойства PhoA морских гетеротрофов делают ее схожей со щелочной фосфатазой эпителиальных и иммунных клеток эукариот не только по структуре, но и по механизму действия в отношении ЛПС-индуцированного провоспалительного метаболизма. Механизм противовоспалительного действия ЩФ PhoA включает детоксикацию ЛПС, нейтрализацию фосфатсодержащих медиаторов иммунного ответа и активацию НАДН-зависимых катаболических процессов. Это приводит к снижению биосинтеза мембранных НАДФН-оксидаз (NOX), продукции ими АФК, провоспалительных цитокинов и ограничению мобилизации иммунных клеток. Вероятно, ЩФ семейства PhoA имеют общее происхождение и универсальную биологическую функцию – отрицательную регуляцию избыточной метаболической активности клеток (анаболизма), сопровождающейся образованием АФК, повреждающих мембраны и ДНК. Бактерии используют данный механизм для подавления врожденного иммунитета хозяина и успешной колонизации тканей эукариот. Высокая ферментативная активность и технологичность получения препаратов ЩФ PhoA морских бактерий открывают путь к их эффективному использованию в медицине и сельском хозяйстве.

6 ВЫВОДЫ

1. На основе сравнительного геномного анализа 87 видов морских бактерий проведена реклассификация и типирование новых изолятов. Описан новый род и вид *Rhodalgimonas zhirmunskyi* (сем. *Roseobacteraceae*), изменены описания видов *P. distincta*, *C. amphilecti* и *C. marina*. Все изученные штаммы являются аэробными гетеротрофами с выраженной ферментативной активностью (оксидаза, каталаза, щелочная фосфатаза) и высокой адаптивностью к факторам среды (рост при 4–42 °C и 0–20 % NaCl).
2. Анализ метаболических путей выявил преобладание аэробного обмена, дополненного анаэробным дыханием, ассимиляцией CO₂ и Na⁺-транслоцирующими комплексами (R_{sx}/R_{nf}). Идентифицированы специфические БГК: у *Cobetia* – эктоина, сидерофоров и сульфатированных ЭПС; у флавобактерий – антимикробных пептидов (аналогов севацидина) и гликозидаз. Альфа-протеобактерии характеризуются генами обмена N и S, а *Pseudoalteromonas* – потенциалом синтеза нуклеозидов, иммуносупрессоров (аналогов бразиликардина A), антибиотиков (аналогов стрепторубина B) и полисахарид-деградирующих ферментов. Каротиноидный фенотип ассоциированных штаммов обусловлен БГК арилполиенов, этерифицированных резорцином.
3. Полногеномный анализ выявил высокую изменчивость систем щелочных фосфатаз (ЩФ): от 2–5 копий у протеобактерий до 7–9 у флавобактерий. Идентифицированы гены семейств PhoA, PhoX, PhoD, PafA и YncM, при этом их состав и количество паралогов являются штаммо- и видоспецифичными. Установлено, что ЩФ семейства PhoA типичны для ассоциированных с эукариотами штаммов и филогенетически близки гомологам *E. coli* и млекопитающих. Диверсификация систем фосфатаз обусловлена адаптацией к различным экологическим нишам.
4. Разработано веб-приложение Syntenome для анализа генетического контекста и функционального прогнозирования белков. Установлено, что гены ЩФ локализованы в кластерах различных мембранных НАДН-оксидоредуктаз: *phoA* ассоциирован с Na⁺-транслоцирующим R_{sx}-комплексом, *phoD* – с системами нейтрализации H₂O₂, а *phoX/pafA* – с транспортерами альтернативных субстратов. Соответствие между числом систем ЩФ и количеством ЭТЦ указывает на ключевую роль ЩФ в поддержании редокс-гомеостаза и предотвращении деполяризации мембран при осмотическом и оксидативном стрессах. Предсказано участия внеклеточной ЩФ PhoA в путях регенерации пула кофермента НАД⁺.
5. Получены активные рекомбинантные аналоги ЩФ и сопутствующих гидролаз, что подтвердило точность их функциональной аннотации. Показано, что психротолерантные нуклеазы, протеазы и гликозидазы изученных штаммов обладают биотехнологическим потенциалом за счет высокой активности в экстремальных условиях (низкие температуры, широкий диапазон pH и соленость до 3,0 M NaCl). Разработаны эффективные продуценты ЩФ

семейства PhoA штамма *C. amphilecti* КММ 296 (CmAP), пригодные для применения в биомедицине и молекулярной диагностике.

6. Рекомбинантная ЩФ *C. amphilecti* (CmAP) характеризуется высокой удельной активностью (до 20 000 Ед/мг) и каталитической эффективностью (k_{cat}/K_m до $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), значительно превосходя гомолог из *E. coli*. Установлено, что высокая эффективность CmAP и его холодовая адаптация обусловлены пониженным сродством к продукту (P_i) и повышенной конформационной лабильностью «большой петли» (остатки 375–420). Фермент сохраняет стабильность в широком диапазоне pH (6,0–11,0) и концентраций NaCl.

7. Обосновано применение CmAP как модели для скрининга ингибиторов ЩФ млекопитающих. Среди 5-азаиндольных алкалоидов морской губки идентифицирован селективный неконкурентный ингибитор – гитаррин С (IC_{50} 8,5 мкМ). Установлена зависимость его активности от наличия карбоксильной (С6) и гидроксильной (С8) групп. Показан потенциал гитарринов как регуляторов ЩФ микробиома и ингибиторов аберрантной активности фосфатаз человека.

8. Обосновано применение ЩФ CmAP в составе химерных белков: с лектинами – для детекции опухолевых маркеров (ТЛФА), с порином OmpF – для диагностики иерсиниозов (ИФА). Установлено дозозависимое ингибирующее действие CmAP на формирование биопленок, рост планктонных клеток бактерий, а также пролиферацию клеток карциномы (Т-47D, MDA-MB-231), что указывает на универсальный механизм регуляторного влияния ЩФ PhoA на энергетический метаболизм про- и эукариот.

9. В модели хронического колита у мышей показана противовоспалительная активность CmAP, сопоставимая с кишечной ЩФ человека. Эффект обусловлен детоксикацией RAMP/DAMP-агентов и нормализацией уровней ИЛ-1 β , ИЛ-6. Обоснован механизм действия ЩФ, включающий дефосфорилирование внеклеточных пуринов и ЛПС, модуляцию фосфостатуса сигнальных белков, что инициирует метаболическое перепрограммирование клеток (переход от гликолиза к окислительному фосфорилированию). Это ведет к подавлению активности НАДФН-оксидаз, купированию оксидативного стресса и восстановлению барьерной функции кишечника.

10. Подтверждено регуляторное действие ЩФ PhoA на редокс-баланс растений. Гетерологичная экспрессия *phoA* у трансгенного табака активирует антиоксидантные пути, снижая уровень АФК и МДА, что повышает устойчивость к засолению, осмотическому стрессу и дефициту фосфатов. Установлено, что ЩФ *PhoA* отрицательно регулирует транскрипцию киназы CDPK, снижая стрессоустойчивость при дефиците кальция. Это указывает на прямую взаимозависимость между кальциевым гомеостазом, фосфатным обменом и регуляцией окислительного стресса.

7 СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрашова Т. В. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: справочник / Т. В. Абрашова, под ред. В. Г. Макаров, М. Н. Макарова, Издательство «Лемма», 2013.
2. Бакунина И. [и др.]. Активность О-гликозидгидролаз и других полисахарид-деградирующих ферментов у культивируемых бактериальных изолятов красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970 // Биология моря. 2020. № 5 (46). С. 357–360.
3. Балабанова Л. [и др.]. Геном морской бактерии *Cobetia marina* КММ 296, выделенной из мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Биология моря. 2016. № 1 (42). С. 106–109.
4. Балабанова Л. [и др.]. Плазмида 40Gal, определяющая синтез α -галактозидазы α -PsGal, штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/40Gal –продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность α -PsGal, и способ ее получения. 2012. Пат. RU№2504583.
5. Балабанова Л. [и др.]. Плазмида 40NaGal, определяющая синтез α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal, штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal, и способ ее получения. 2014. Пат. RU№2525682.
6. Балабанова Л. [и др.]. Полисахарид-деградирующая активность морских и наземных штаммов мицелиальных грибов // Биоорганическая химия. 2018. № 4 (44). С. 425–432.
7. Балабанова Л. [и др.]. Рекомбинантная α -N-ацетилгалактозаминидаза морской бактерии, модифицирующая детерминанты А-эритроцитов // Acta Naturae. 2015в, № 1 (7). С. 124–127.
8. Балабанова Л. [и др.]. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/OmpF, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и порообразующего мембранного белка OmpF, и рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF. 2017а Пат. RU№2634871.
9. Балабанова Л. [и др.]. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/CGL, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/CGL со свойствами высокоэффективной щелочной фосфатазы CmAP и галактозоспецифического лектина CGL, рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL – продуцент гибридного полифункционального полипептида CmAP/CGL и способ его получения. 2015а Пат. RU№2557306.
10. Балабанова Л. [и др.]. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/MBL-T, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/MBL-T со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CMAP и маннан-связывающего лектина С-типа MBL-T, рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40Cmap/Mbl-T – продуцент гибридного

бифункционального полипептида SmAP/MBL-T и способ его получения. 20156 Пат. RU№2538169.

11. Балабанова Л. [и др.]. Скрининг мицелиальных грибов как потенциальных продуцентов кормового белка // Современные проблемы науки и образования. 2017. (6). С. 1–10.

12. Балабанова Л. [и др.]. Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции: монография / Л. Балабанова, А. Сейткалиева, О. Сон, Л. Текутьева, Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2023. 144 с.

13. Балабанова Л., Исаева М. Морская биохимия: достижения и перспективы структурно-функционального исследования генов и геномов морских организмов // Вестник ДВО РАН. 2019. (5). С. 123–127.

14. Балабанова Л., Рассказов В. Плаزمид 40ph, определяющая синтез щелочной фосфатазы стар, штамм *E.coli* rosetta(de3)/40ph - продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной щелочной фосфатазы SmAP, и способ ее получения. 2010. Пат. RU2447151C1.

15. Буйновская Н. [и др.]. Гибридный бифункциональный белок на основе порина OmpF и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорганическая химия. 2018. № 4 (44). С. 417–424.

16. Буйновская Нина Сергеевна Гибридные бифункциональные лиганд-связывающие белки на основе высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (SmAP) 2023.

17. Бунатян Н., Васильев А. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Н. Бунатян, А. Васильев, под ред. А. Миронов, Гриф и К, 2012.

18. Глушанко В. С. Основы медицинской статистики : учеб.-метод. пособие / В. С. Глушанко, ВГМУ, 2012. 155 с.

19. Голотин В. [и др.]. Щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia marina* как инструмент в исследовании свойств рекомбинантных белков // Вестник ДВО РАН. 2015. (6). С. 125–131.

20. Голотин Василий Александрович Рекомбинантная щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia marina*: получение, свойства и перспективы применения 2014.

21. Ивашкин В Чулкина. Т. [и др.]. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита // Колопроктология. 2017. № 1 (59). С. 6–30.

22. Ильина Т. С., Романова Ю. М. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2021. № 2 (39). С. 14–24.

23. Корниенко М. А. [и др.]. Особенности коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных из центральных венозных катетеров новорожденных детей отделения реанимации и

интенсивной терапии: формирование биопленок и популяционная структура по данным мультилокусного секвенирования // Акушерство и гинекология. 2018.

24. Крылов Ю. М. Организация биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов у споровиков (Protozoa: Sporozoa) // Паразитология. 1992. № 4 (26). С. 305–309.

25. Подволоцкая А. [и др.]. Биопленки бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – современные риски в обороте пищевых продуктов // Хранение и переработка сельхозсырья. 2015. (12). С. 44–47.

26. Подволоцкая А. [и др.]. Современные аспекты санитарной обработки и дезинфекции производственной среды мясоперерабатывающих предприятий // Хранение и переработка сельхозсырья. 2016. (12). С. 28–30.

27. Портнягина О. Ю. [и др.]. Иммуногенные свойства рекомбинантного OMPF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. № 7 (148). С. 85–87.

28. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 3 (88). С. 99–109.

29. Слепченко Л. В., Балабанова Л. А., Бакунина И. Ю., Исаков В. В., Подволоцкая А. Б., Елисейкина М. Г., Носкова Ю. А., Рассказов В. А. Свойства и возможная биологическая роль альфа-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* spp. КММ 701 // Вестник ДВО РАН. 2017. (2). С. 51–58.

30. Терентьева Н. [и др.]. Гидролитические ферменты из морских организмов как ингибиторы образования биопленок // Биология моря. 2020. № 4 (46). С. 285–288.

31. Терентьева Н. [и др.]. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. (3). С. 72–78.

32. Чулкина М. М., Пичугин А. В., Атауллаханов Р. И. Терапевтическое действие иммуномодулирующего пептида ТЕККRRRETVEREKE в экспериментальной модели индуцированного язвенного колита у мышей // Иммунология. 2019. № 1 (40).

33. Шигаева Т. [и др.]. Окислительно-восстановительный потенциал как показатель состояния объектов окружающей среды // Биосфера. 2020. (12). С. 111–124.

34. Шмыкова Н. А. [и др.]. Способ получения трансформированных растительных клеток, содержащих рекомбинантную щелочную фосфатазу человека, и применение трансформированных растительных клеток, содержащих рекомбинантную щелочную фосфатазу человека // 2019. № RU 2698397 C2.

35. Abell G. C. J., Bowman J. P. Ecological and biogeographic relationships of class *Flavobacteria*

in the Southern Ocean // FEMS Microbiology Ecology. 2005. № 2 (51). C. 265–277.

36. Acinas S. G. [и др.]. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community // Nature. 2004. № 6999 (430). C. 551–554.

37. Acinas S. G., Antón J., Rodríguez-Valera F. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA // Applied and Environmental Microbiology. 1999. № 2 (65). C. 514–522.

38. Acker M. [и др.]. Phosphonate production by marine microbes: Exploring new sources and potential function // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2022. № 11 (119).

39. Adedibu P. A. [и др.]. Expression and characterization of alkaline phosphatase from *Cobetia amphilecti* KMM 296 in transiently transformed tobacco leaves and transgenic calli // Plants (Basel, Switzerland). 2024b. № 24 (13).

40. Adedibu P. A. [и др.]. Pathogenomic insights into *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*'s resistome, virulome, and diversity for improved rice blight management // Life (Basel, Switzerland). 2024a. № 12 (14).

41. Adedibu P. A. [и др.]. Variability in morphological, biochemical, and proximate yield composition among predominant *Amaranthus hybridus* cultivars in South-West Nigeria // Horticulturae. 2024b. № 5 (10).

42. Ahn S. [и др.]. Role of glyoxylate shunt in oxidative stress response // Journal of Biological Chemistry. 2016. № 22 (291). C. 11928–11938.

43. Al Khudary R. [и др.]. *Pseudoalteromonas arctica* sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № Pt 9 (58). C. 2018–2024.

44. Alexiev A. [и др.]. Draft genome sequence of *Cobetia* sp. UCD-24C, isolated from roots and leaves of the seagrass *Zostera marina* // Genome announcements. 2016. № 2 (4).

45. Al-Ghanayem A. A., Joseph B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. № 7 (104). C. 2871–2882.

46. AlSharari S. D. [и др.]. Novel insights on the effect of nicotine in a murine colitis model // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2013. № 1 (344). C. 207–217.

47. Alvarez H. M., Pucci O. H., Steinbüchel A. Lipid storage compounds in marine bacteria // Applied Microbiology and Biotechnology. 1997. № 2 (47). C. 132–139.

48. Amin S. A. [и др.]. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria // Nature. 2015. № 7554 (522). C. 98–101.

49. Anantharaman V., Iyer L. M., Aravind L. Ter-dependent stress response systems: novel pathways related to metal sensing, production of a nucleoside-like metabolite, and DNA-processing // Molecular

BioSystems. 2012. № 12 (8). C. 3142.

50. Andrews L. D., Zalatan J. G., Herschlag D. Probing the origins of catalytic discrimination between phosphate and sulfate monoester hydrolysis: comparative analysis of alkaline phosphatase and protein tyrosine phosphatases // *Biochemistry*. 2014. № 43 (53). C. 6811–6819.

51. Animasaun D. A. [и др.]. Modern plant biotechnology: an antidote against global food insecurity // *Agronomy*. 2023. № 8 (13).

52. Aoki S. [и др.]. Development of metallosupramolecular phosphatases based on the combinatorial self-assembly of metal complexes and organic building blocks for the catalytic hydrolysis of phosphate monoesters // *Results in Chemistry*. 2021. (3). C. 100133.

53. Arabacı N., Arıkan B. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable α -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8 // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2018. № 5 (48). C. 419–426.

54. Arahal D. R. [и др.]. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002a. № 1 (52). C. 241–249.

55. Arahal D. R. [и др.]. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the Family Halomonadaceae, to Include the Species *Halomonas marina* // *Systematic and Applied Microbiology*. 2002b. № 2 (25). C. 207–211.

56. Ásgeirsson B. [и др.]. X-ray crystal structure of Vibrio alkaline phosphatase with the non-competitive inhibitor cyclohexylamine // *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2020. (24). C. 100830.

57. Asnicar F. [и др.]. Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0. // *Nature communications*. 2020. № 1 (11). C. 2500.

58. Auta H. S. [и др.]. Marine Microbial Enzymes: An Overview // *Environmental and microbial biotechnology*. 2022. C. 83–104.

59. Averianova L. A. [и др.]. Production of vitamin B2 (Riboflavin) by microorganisms: An Overview. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020. (8). C. 570828.

60. Azam F., Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems // *Nature Reviews Microbiology*. 2007. № 10 (5). C. 782–791.

61. Aziz R. K. [и др.]. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // *BMC Genomics*. 2008. № 1 (9). C. 75.

62. Baidya A. S., Pasek M. A., Stüeken E. E. Moderate and high-temperature metamorphic conditions produced diverse phosphorous species for the origin of life // *Communications Earth & Environment*. 2024. № 1 (5).

63. Baier F., Copp J. N., Tokuriki N. Evolution of enzyme superfamilies: comprehensive exploration of sequence–function relationships // *Biochemistry*. 2016. № 46 (55). C. 6375–6388.

64. Bakunina I. [и др.]. Characterization of properties and transglycosylation abilities of recombinant α -galactosidase from cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* KMM 701 and its C494N and D451A mutants // *Marine drugs*. 2018a. № 10 (16).
65. Bakunina I. [и др.]. Comparative analysis of glycoside hydrolases activities from phylogenetically diverse marine bacteria of the genus *Arenibacter* // *Marine Drugs*. 2013. № 6 (11). С. 1977–1998.
66. Bakunina I. [и др.]. Effect of pentacyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra* on activity of α -glycosidases from marine bacteria. // *Marine drugs*. 2019. № 1 (17).
67. Bakunina I. [и др.]. Slow-binding irreversible inhibitors of recombinant alpha-galactosidase from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 and its C494N mutant // *Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2018b. № 202 (6S). С. 20–201.
68. Bakunina I. Y. [и др.]. Alpha-galactosidase of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 // *Biochemistry. Biokhimiia*. 1998. № 10 (63). С. 1209–1215.
69. Bakunina I. Y. [и др.]. Hooked on α -d-galactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis // *Critical reviews in biotechnology*. 2016. № 2 (36). С. 233–245.
70. Balabanova L. [и др.]. A novel bifunctional hybrid with marine bacterium alkaline phosphatase and far eastern holothurian mannan-binding lectin activities // *PLoS ONE*. 2014. № 11 (9). С. e112729.
71. Balabanova L. [и др.]. Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates // *Frontiers in microbiology*. 2018b. (9). С. 1527.
72. Balabanova L. [и др.]. Computational insight into intraspecies distinctions in *Pseudoalteromonas distincta*: carotenoid-like synthesis traits and genomic heterogeneity // *International journal of molecular sciences*. 2023. № 4 (24).
73. Balabanova L. [и др.]. Data supporting functional diversity of the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // *Data in Brief*. 2016. (8). С. 726–732.
74. Balabanova L. [и др.]. Engineered fungus *Thermothelomyces thermophilus* producing plant storage proteins // *Journal of fungi* (Basel, Switzerland). 2022a. № 2 (8).
75. Balabanova L. [и др.]. Genomic Features of a food-derived *Pseudomonas aeruginosa* strain PAEM and biofilm-associated gene expression under a marine bacterial α -galactosidase // *International journal of molecular sciences*. 2020. № 20 (21).
76. Balabanova L. [и др.]. Insights into alkaline phosphatase anti-inflammatory mechanisms // *Biomedicines*. 2024b. № 11 (12).
77. Balabanova L. [и др.]. LPS-dephosphorylating *Cobetia amphilecti* alkaline phosphatase of PhoA family divergent from the multiple homologues of *Cobetia* spp. // *Microorganisms*. 2024a. № 3 (12).
78. Balabanova L. [и др.]. Marine bacterial enzymes for molecular genetics and structure-function studies // *Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2018a. № 202 (6S). С.

77–78.

79. Balabanova L. [и др.]. Microbial and genetic resources for cobalamin (Vitamin B12) biosynthesis: from ecosystems to industrial biotechnology // International Journal of Molecular Sciences. 2021. № 9 (22). С. 4522.

80. Balabanova L. [и др.]. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products // Food Control. 2017. (78). С. 270–278.

81. Balabanova L. [и др.]. Shift of choline/betaine pathway in recombinant *Pseudomonas* for cobalamin biosynthesis and abiotic stress protection // International journal of molecular sciences. 2022. № 22 (23).

82. Balabanova L. A. [и др.]. Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi // Plasmid. 2019. (101). С. 1–9.

83. Balabanova L. A. [и др.]. Molecular characterization and therapeutic potential of a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 α -galactosidase // Marine Biotechnology. 2010. № 1 (12). С. 111–120.

84. Baltar F. [и др.]. Prokaryotic responses to ammonium and organic carbon reveal alternative CO₂ fixation pathways and importance of alkaline phosphatase in the mesopelagic North Atlantic // Frontiers in Microbiology. 2016. (7).

85. Bankevich A. [и др.]. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // Journal of Computational Biology. 2012. № 5 (19). С. 455–477.

86. Banskota S. [и др.]. Inhibition of NADPH Oxidase (NOX) 2 mitigates colitis in mice with impaired macrophage AMPK function // Biomedicines. 2023. № 5 (11). С. 1443.

87. Baqi Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2015. № 1 (15). С. 21–33.

88. Barbara G. M., Mitchell J. G. Marine bacterial organisation around point-like sources of amino acids // FEMS Microbiology Ecology. 2003. № 1 (43). С. 99–109.

89. Barno A. R. [и др.]. Bacterial inoculation elicits changes to the coral epigenome // bioRxiv. 2025. C. 2024.10.27.620496.

90. Bar-On Y. M., Phillips R., Milo R. The biomass distribution on Earth // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. № 25 (115). С. 6506–6511.

91. Barrozo A. [и др.]. Cooperative electrostatic interactions drive functional evolution in the alkaline phosphatase superfamily // Journal of the American Chemical Society. 2015. № 28 (137). С. 9061–9076.

92. Belda I. [и др.]. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking // International Journal of Food Microbiology. 2016. (223). С. 1–8.

93. Belogortseva N. I. [и др.]. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus Grayanus* // Comparative Biochemistry and Physiology Part C Pharmacology Toxicology and Endocrinology. 1998. № 1 (119). С. 45–50.
94. Bennett L. [и др.]. Implementation of glycan remodeling to plant-made therapeutic antibodies // International Journal of Molecular Sciences. 2018. № 2 (19). С. 421.
95. Berg O. G., Kurland C. G. Evolution of microbial genomes: sequence acquisition and loss // Molecular Biology and Evolution. 2002. № 12 (19). С. 2265–2276.
96. Bertelli C. [и др.]. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets // Nucleic Acids Research. 2017. № W1 (45). С. W30–W35.
97. Bertilsson S., Jones J. G. Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources под ред. S. E. G. Findlay, R. L. Sinsabaugh, Academic Press, 2003. С. 3–24.
98. Bertrand E. M. [и др.]. Vitamin B12 and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea // Limnology and Oceanography. 2007. № 3 (52). С. 1079–1093.
99. Beurmann S. [и др.]. *Pseudoalteromonas piratica* sp. nov., a budding, prosthecate bacterium from diseased *Montipora capitata*, and emended description of the genus *Pseudoalteromonas* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2017. № 8 (67). С. 2683–2688.
100. Bienert S. [и др.]. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality // Nucleic Acids Research. 2016. № D1 (45). С. D313–D319.
101. Bill N. [и др.]. Fixation of CO₂ using the ethylmalonyl-CoA pathway in the photoheterotrophic marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* // Environmental Microbiology. 2017. № 7 (19). С. 2645–2660.
102. Birolli W. G., Lima R. N., Porto A. L. M. Applications of marine-derived microorganisms and their enzymes in biocatalysis and biotransformation, the underexplored potentials // Frontiers in Microbiology. 2019. (10).
103. Björkman K. M., Karl D. M. Bioavailability of dissolved organic phosphorus in the euphotic zone at Station ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre // Limnology and Oceanography. 2003. № 3 (48). С. 1049–1057.
104. Blackburn N., Fenchel T., Mitchell J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria // Science. 1998. № 5397 (282). С. 2254–2256.
105. Blank L. M. [и др.]. Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase // FEBS Journal. 2008. № 20 (275). С. 5173–5190.
106. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959. № 8 (37). С. 911–917.
107. Blin K. [и др.]. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities // Nucleic Acids Research. 2021. № W1 (49). С. W29–W35.

- 108.Blin K. [и др.]. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation // Nucleic acids research. 2023. № W1 (51).
- 109.Boden J. S. [и др.]. Timing the evolution of phosphorus-cycling enzymes through geological time using phylogenomics // Nature Communications. 2024. № 1 (15).
- 110.Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. № 15 (30). С. 2114–2120.
- 111.Bolinesi F. [и др.]. Spatial-related community structure and dynamics in phytoplankton of the Ross Sea, Antarctica // Frontiers in Marine Science. 2020. (7).
- 112.Borges T. A. [и др.]. Biochemical characterization of an endoxylanase from *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov. strain GHG001 isolated from the intestinal tract of *Chrysomelidae* larvae associated to sugarcane roots // Process Biochemistry. 2014. № 1 (49). С. 77–83.
- 113.Bosi E. [и др.]. The pangenome of (Antarctic) *Pseudoalteromonas* bacteria: evolutionary and functional insights // BMC Genomics. 2017. № 1 (18).
- 114.Botas A. [и др.]. Genetic engineering in combination with semi-synthesis leads to a new route for gram-scale production of the immunosuppressive natural product brasilicardin A // Angewandte Chemie International Edition. 2021. № 24 (60). С. 13536–13541.
- 115.Boucher Y., Stokes H. The roles of lateral gene transfer and vertical descent in *Vibrio* evolution под ред. F. Thompson, B. Austin, J. Swings, ASM Press, 2006.
- 116.Boullet A., Meynial-Salles I. An overview of the ferredoxin NAD⁺ reductases used for energy conservation in various anaerobic microorganisms // Preprints. 2018. С. 2018070473.
- 117.Bowman J. P. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice // International Journal of Systematic Bacteriology. 1998. № 3 (48). С. 1037–1041.
- 118.Bozkurt E. U. [и др.]. Glycosylation circuit enables improved catalytic properties for recombinant alkaline phosphatase // ACS Omega. 2023. № 39 (8). С. 36218–36227.
- 119.Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. № 1–2 (72). С. 248–254.
- 120.Brady M. P., Tostevin R., Tosca N. J. Marine phosphate availability and the chemical origins of life on Earth // Nature Communications. 2022. № 1 (13).
- 121.Braun A. [и др.]. Reviews and syntheses: Heterotrophic fixation of inorganic carbon – significant but invisible flux in environmental carbon cycling // Biogeosciences. 2021. № 12 (18). С. 3689–3700.
- 122.Britton K. L. [и др.]. Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. № 13 (103). С. 4846–4851.

123. Bryson S. [и др.]. Phylogenetically conserved resource partitioning in the coastal microbial loop // *The ISME Journal*. 2017. № 12 (11). С. 2781–2792.
124. Brzoska P., Boos W. Characteristics of a *ugp*-encoded and *phoB*-dependent glycerophosphoryl diester phosphodiesterase which is physically dependent on the *ugp* transport system of *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 1988. № 9 (170). С. 4125–4135.
125. Buchan A. [и др.]. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms // *Nature Reviews Microbiology*. 2014. № 10 (12). С. 686–698.
126. Buchan A., González J. M., Moran M. A. Overview of the marine roseobacter lineage // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. № 10 (71). С. 5665–5677.
127. Buinovskaya N., Bakholdina S., Balabanova L. Dephosphorylation of lipopolysaccharides by alkaline phosphatase from marine bacterium // *Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2018. № 202 (6S). С. 81–82.
128. Burcar B. [и др.]. Darwin's Warm Little Pond: A One-pot reaction for prebiotic phosphorylation and the mobilization of phosphate from minerals in a urea-based solvent // *Angewandte Chemie International Edition*. 2016. № 42 (55). С. 13249–13253.
129. Burga A., Lehner B. Beyond genotype to phenotype: why the phenotype of an individual cannot always be predicted from their genome sequence and the environment that they experience // *FEBS Journal*. 2012. № 20 (279). С. 3765–3775.
130. Cai L. [и др.]. Abundant and cosmopolitan lineage of cyanopodoviruses lacking a DNA polymerase gene // *The ISME Journal*. 2022. № 2 (17). С. 252–262.
131. Cai Z.-W. [и др.]. Characterization of a novel psychrophilic and halophilic β -1, 3-xylanase from deep-sea bacterium, *Flammeovirga pacifica* strain WPAGA1 // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. (118). С. 2176–2184.
132. Capella-Gutierrez S., Silla-Martinez J. M., Gabaldon T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // *Bioinformatics*. 2009. № 15 (25). С. 1972–1973.
133. Caron D. A., Hutchins D. A. The effects of changing climate on microzooplankton grazing and community structure: drivers, predictions and knowledge gaps // *Journal of Plankton Research*. 2012. № 2 (35). С. 235–252.
134. Carpenter C. E., Broadbent J. R. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods // *Journal of Food Science*. 2009. № 1 (74). С. R12–R15.
135. Carrasco M. [и др.]. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region // *BMC Microbiology*. 2012. № 1 (12).
136. Casillo A. [и др.]. Structural elucidation of a novel lipooligosaccharide from the antarctic bacterium OMVs producer // *Marine drugs*. 2018. № 1 (17).

137. Catrina I. [и др.]. Probing the origin of the compromised catalysis of *E. coli* alkaline phosphatase in its promiscuous sulfatase reaction // *Journal of the American Chemical Society*. 2007. № 17 (129). С. 5760–5765.
138. Cavicchioli R. [и др.]. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles // *Microbial Biotechnology*. 2011. № 4 (4). С. 449–460.
139. Caza M., Kronstad J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013. (3).
140. CAZypedia Consortium Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes // *Glycobiology*. 2017. № 1 (28). С. 3–8.
141. Celussi M. [и др.]. Depth profiles of bacterioplankton assemblages and their activities in the Ross Sea // *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2009. № 12 (56). С. 2193–2205.
142. Chafee M. [и др.]. Recurrent patterns of microdiversity in a temperate coastal marine environment // *The ISME Journal*. 2018. № 1 (12). С. 237–252.
143. Chakravorty S. [и др.]. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria // *Journal of Microbiological Methods*. 2007. № 2 (69). С. 330–339.
144. Chandonia J.-M. [и др.]. SCOPe: improvements to the structural classification of proteins – extended database to facilitate variant interpretation and machine learning // *Nucleic Acids Research*. 2021. № D1 (50). С. D553–D559.
145. Chattopadhyay M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature // *Journal of Biosciences*. 2006. № 1 (31). С. 157–165.
146. Chau R. [и др.]. A *Pseudoalteromonas* clade with remarkable biosynthetic potential // *Applied and Environmental Microbiology*. 2021. № 6 (87).
147. Chen M. [и др.]. Genomic characteristics and potential metabolic adaptations of hadal trench *Roseobacter* and *Alteromonas* bacteria based on single-cell genomics analyses // *Frontiers in Microbiology*. 2020. (11).
148. Chen Q. [и др.]. Computer-aided search for a cold-active cellobiose 2-epimerase // *Journal of Dairy Science*. 2020a. № 9 (103). С. 7730–7741.
149. Chen S.-L., Liao R.-Z. Phosphate monoester hydrolysis by trinuclear alkaline phosphatase; DFT study of transition states and reaction mechanism // *ChemPhysChem*. 2014. № 11 (15). С. 2321–2330.
150. Chen X. [и др.]. Prevent effects of *Lactobacillus fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice // *Nutrients*. 2017. № 6 (9). С. 545.
151. Chen Y. [и др.]. Induction of experimental acute ulcerative colitis in rats by administration of dextran sulfate sodium at low concentration followed by intracolonic administration of 30% ethanol // *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2007. № 9 (8). С. 632–637.
152. Cheng W. [и др.]. Isolation, identification, and whole genome sequence analysis of the alginate-

degrading bacterium *Cobetia* sp. cqz5-12 // Scientific Reports. 2020. № 1 (10).

153.Chidwick H. S. [и др.]. Reconstitution and optimisation of the biosynthesis of bacterial sugar pseudaminic acid (Pse5Ac7Ac) enables preparative enzymatic synthesis of CMP-Pse5Ac7Ac // Scientific Reports. 2021. № 1 (11). C. 4756.

154.Chintalapati S., Kiran M., Shivaji S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. // Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France). 2004. № 5 (50). C. 631–642.

155.Chiu C. H., Paszkowski U. Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2019. № 6 (11). C. a034603.

156.Choi J. [и др.]. Strategies to improve reference databases for soil microbiomes // The ISME Journal. 2016. № 4 (11). C. 829–834.

157.Christensen M. [и др.]. High natural PHA production from acetate in *Cobetia* sp. MC34 and *Cobetia marina* DSM 4741^T and *in silico* analyses of the genus specific PhaC2 polymerase variant // Microbial Cell Factories. 2021. № 1 (20).

158.Chun J. [и др.]. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018. № 1 (68). C. 461–466.

159.Chun J., Rainey F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. № Pt_2 (64). C. 316–324.

160.Church M. J., Hutchins D. A., Ducklow H. W. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern Ocean // Applied and Environmental Microbiology. 2000. № 2 (66). C. 455–466.

161.Cobet A. B., Wirsén C., Jones G. E. The effect of nickel on a marine bacterium, *Arthrobacter marinus* sp.nov. // Journal of General Microbiology. 1970. № 2 (62). C. 159–169.

162.Cohan F. M. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006. № 1475 (361). C. 1985–1996.

163.Cohan F. M. What are Bacterial Species? // Annual Review of Microbiology. 2002. № 1 (56). C. 457–487.

164.Collins M. D., Shah H. N. Fatty acid, menaquinone and polar lipid composition of *Rothia dentocariosa* // Archives of Microbiology. 1984. № 3 (137). C. 247–249.

165.Collins T., Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. № 7 (103). C. 2857–2871.

166.Colston S. M. [и др.]. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case // mBio. 2014. № 6 (5).

- 167.Conley A. J. [и др.]. Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis // Plant Biotechnology Journal. 2010. № 4 (9). С. 434–444.
- 168.Copley S. D. Shining a light on enzyme promiscuity // Current Opinion in Structural Biology. 2017. (47). С. 167–175.
- 169.Corbeil C. R., Williams C. I., Labute P. Variability in docking success rates due to dataset preparation // Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2012. № 6 (26). С. 775–786.
- 170.Cordone A. [и др.]. Bacterioplankton diversity and distribution in relation to phytoplankton community structure in the ross sea surface waters // Frontiers in Microbiology. 2022. (13).
- 171.Croft M. T. [и др.]. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria // Nature. 2005. № 7064 (438). С. 90–93.
- 172.Crump B. C. [и др.]. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time // Applied and Environmental Microbiology. 2004. № 3 (70). С. 1494–1505.
- 173.Cusano A. [и др.]. A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // Microbial Cell Factories. 2006. № 1 (5). С. 40.
- 174.D’Andrilli J. [и др.]. DOM composition alters ecosystem function during microbial processing of isolated sources // Biogeochemistry. 2019. № 2 (142). С. 281–298.
- 175.Dang H., Lovell C. R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments // microbiology and molecular biology reviews. 2015. № 1 (80). С. 91–138.
- 176.Dao B. N. [и др.]. Relationship between serum TNF- α , IL-6, and IL- 10 levels and disease severity, and changes in the cytokines after treatment in patients with bacterial community-acquired pneumonia // Pneumon. 2023. № 4 (36). С. 1–8.
- 177.DasSarma S. [и др.]. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from Antarctica // PLoS ONE. 2013. № 3 (8). С. e58587.
- 178.Datta M. S. [и др.]. Microbial interactions lead to rapid micro-scale successions on model marine particles // Nature Communications. 2016. № 1 (7).
- 179.De Ley J., Cattoir H., Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates // European journal of biochemistry. 1970. № 1 (12). С. 133–142.
- 180.De Prada P., Brenchley J. E. Purification and characterization of two extracellular alkaline phosphatases from a psychrophilic arthrobacter isolate // Applied and environmental microbiology. 1997. № 7 (63). С. 2928–2931.
- 181.Degtyarenko A. [и др.]. Optimization of the transient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Panax ginseng* shoots and its use to change the profile of ginsenoside production // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2021. № 2 (146). С. 357–373.
- 182.DeLong E. F., Karl D. M. Genomic perspectives in microbial oceanography // Nature. 2005. №

7057 (437). C. 336–342.

183.Deming J. W., Young J. N. The role of exopolysaccharides in microbial adaptation to cold habitats под ред. R. Margesin, Springer, 2017.C. 259–284.

184.Dhaulaniya A. S. [и др.]. Cold survival strategies for bacteria, recent advancement and potential industrial applications // Archives of Microbiology. 2018. № 1 (201). C. 1–16.

185.Di Poi E. [и др.]. Structure and interactions within the pelagic microbial food web (from viruses to microplankton) across environmental gradients in the Mediterranean Sea // Global Biogeochemical Cycles. 2013. № 4 (27). C. 1034–1045.

186.Dittmar T., Arnosti C. An inseparable liaison: marine microbes and nonliving organic matter под ред. D. L. Kirchman, John Wiley & Sons, 2018.C. 195–229.

187.Doing G. [и др.]. Conditional antagonism in co-cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*: An intersection of ethanol and phosphate signaling distilled from dual-seq transcriptomics // PLOS Genetics. 2020. № 8 (16). C. e1008783–e1008783.

188.Dong Y. [и др.]. Optimization, characteristics, and functions of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* // Frontiers in Microbiology. 2022. (12).

189.Doré H. [и др.]. Evolutionary mechanisms of long-term genome diversification associated with niche partitioning in marine picocyanobacteria // Frontiers in Microbiology. 2020. (11).

190.Du L. [и др.]. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution: implication for a substrate specificity // Journal of Biological Chemistry. 2001. № 12 (276). C. 9158–9165.

191.Du M. [и др.]. Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ -calpain activity // Food Chemistry. 2018. (252). C. 33–39.

192.Duan R. The role of intestinal alkaline phosphatase and bacterial lipopolysaccharides in patients undergoing pancreaticoduodenectomy 2022 [Электронный ресурс]. URL: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-296690> (дата обращения: 01.01.2025).

193.Duarte F., Amrein B. A., Kamerlin S. C. L. Modeling catalytic promiscuity in the alkaline phosphatase superfamily // Physical Chemistry Chemical Physics. 2013. № 27 (15). C. 11160.

194.Ducklow H., Kirchman D. Bacterial production and biomass in the Oceans / H. Ducklow, D. Kirchman, Wiley-Liss, 2000.

195.Duhamel S. [и др.]. Characterization of alkaline phosphatase activity in the North and South Pacific Subtropical Gyres: Implications for phosphorus cycling // Limnology and Oceanography. 2011. № 4 (56). C. 1244–1254.

196.Durham B. P. [и др.]. Sulfonate-based networks between eukaryotic phytoplankton and heterotrophic bacteria in the surface ocean // Nature Microbiology. 2019. № 10 (4). C. 1706–1715.

197.Dyhrman S. T., Ammerman J. W., Mooy V. Microbes and the marine phosphorus cycle //

Oceanography. 2007. № 2 (20). C. 110–116.

198.Egan S., Holmström C., Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001. № 4 (51). C. 1499–1504.

199.Ejaz S. A. [и др.]. Synthesis, biochemical characterization and molecular modeling studies of 5-(substituted benzyldene) pyrimidine-2,4,6-trione: Potential inhibitors of alkaline phosphatase // Journal of Molecular Structure. 2023. (1282). C. 135225.

200.El-Naggar N. E.-A., El-Ewasy S. M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H // Scientific Reports. 2017. № 1 (7). C. 42129.

201.Elser J. J. [и др.]. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems // Ecology Letters. 2007. № 12 (10). C. 1135–1142.

202.Eoh H., Rhee K. Y. Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013. № 16 (110). C. 6554–6559.

203.Eren A. M. [и др.]. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data // PeerJ. 2015. (3). C. e1319.

204.Ernebjerg M., Kishony R. Distinct growth strategies of soil bacteria as revealed by large-scale colony tracking // Applied and Environmental Microbiology. 2011. № 5 (78). C. 1345–1352.

205.Estrella M. [и др.]. The metabolites NADP⁺ and NADPH are the targets of the circadian protein Nocturnin (Curled) // Nature Communications. 2019. № 1 (10).

206.Ewens S. [и др.]. The diversity and evolution of microbial dissimilatory phosphite oxidation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2021. № 11 (118).

207.Falkowski P. G., Fenchel T., Delong E. F. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles // Science. 2008. № 5879 (320). C. 1034–1039.

208.Falush D. [и др.]. Mismatch induced speciation in *Salmonella*: model and data // Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences. 2006. № 1475 (361). C. 2045–2053.

209.Fang G. [и др.]. Azaindole derivatives as potential kinase inhibitors and their SARs elucidation // European Journal of Medicinal Chemistry. 2023. (258). C. 115621.

210.Fang H., Kang J., Zhang D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives // Microbial Cell Factories. 2017. № 1 (16).

211.Fang Z. [и др.]. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability // Bioresource Technology. 2012. (111). C. 36–41.

212.Fenchel T. Microbial behavior in a heterogeneous world // Science. 2002. № 5570 (296). C. 1068–1071.

- 213.Feng X., Bello D., O'Hagan D. Isolation of 5'-O-sulfamyladenosine and related 3'-O- β -glucosylated adenosines from the nucleocidin producer *Streptomyces calvus* // RSC Advances. 2021. № 10 (11). С. 5291–5294.
- 214.Fernández-Juárez V. [и др.]. Everything is everywhere: physiological responses of the Mediterranean sea and Eastern Pacific Ocean Epiphyte *Cobetia* sp. to varying nutrient concentration // Microbial Ecology. 2021. № 2 (83). С. 296–313.
- 215.Ferrer M. [и др.]. Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain // Applied and Environment Microbiology. 2004. № 8 (70). С. 4499–4504.
- 216.Ferrer-González F. X. [и др.]. Resource partitioning of phytoplankton metabolites that support bacterial heterotrophy // The ISME Journal. 2020. № 3 (15). С. 762–773.
- 217.Fiala M., Delille D. Variability and interactions of phytoplankton and bacterioplankton in the Antarctic neritic area // Marine Ecology Progress Series. 1992. (89). С. 135–146.
- 218.Field K. G. [и др.]. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria // Applied and Environmental Microbiology. 1997. № 1 (63). С. 63–70.
- 219.Flaviani F. Microbial biodiversity in the southern Indian Ocean and Southern Ocean. 2017 // Uct.ac.za [Электронный ресурс]. URL: <https://open.uct.ac.za/handle/11427/25058> (дата обращения: 01.01.2025).
- 220.Fleming D., Rumbaugh K. P. Approaches to dispersing medical biofilms // Microorganisms. 2017. № 2 (5).
- 221.Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nature reviews. Microbiology. 2010. № 9 (8). С. 623–633.
- 222.Flynn K. J., Clark D. R., Xue Y. Modeling the release of dissolved organic matter by phytoplankton // Journal of Phycology. 2008. № 5 (44). С. 1171–1187.
- 223.Fol M. [и др.]. Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator // Molecular Microbiology. 2006. № 3 (60). С. 643–657.
- 224.Forchielli E., Sher D., Segrè D. Metabolic phenotyping of marine heterotrophs on refactored media reveals diverse metabolic adaptations and lifestyle strategies // mSystems. 2022. № 4 (7).
- 225.Fourquez M. [и др.]. Effects of iron limitation on growth and carbon metabolism in oceanic and coastal heterotrophic bacteria // Limnology and Oceanography. 2014. № 2 (59). С. 349–360.
- 226.Franceus J., Pinel D., Desmet T. Glucosylglycerate phosphorylase, an enzyme with novel specificity involved in compatible solute metabolism // Applied and Environmental Microbiology. 2017. № 19 (83).
- 227.Fukiya S. [и др.]. Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains revealed by comparative genomic hybridization microarray // Journal of Bacteriology. 2004. № 12 (186). С. 3911–3921.

- 228.Furhan J. [и др.]. Partial purification and characterisation of cold-active metalloprotease by *Bacillus* sp. AP1 from Apharwat peak, Kashmir // Pakistan Journal of Biotechnology. 2019. № 1 (16). C. 47–54.
- 229.Fushimi A. [и др.]. Osteogenic cocktail induces calcifications in human breast cancer cell line via placental alkaline phosphatase expression // Scientific Reports. 2020. № 1 (10).
- 230.Gallois P., Marinho P. Leaf disk transformation using agrobacterium tumefaciens-expression of heterologous genes in tobacco // Plant Gene Transfer and Expression Protocols. 1995. C. 39–48.
- 231.Gao C. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase (IAP, IAP Enhancer) attenuates intestinal inflammation and alleviates insulin resistance // Frontiers in Immunology. 2022. (13).
- 232.Gauthier A. E. [и др.]. Deep-sea microbes as tools to refine the rules of innate immune pattern recognition // Science Immunology. 2021. № 57 (6).
- 233.Gauthier A. E., Rotjan R. D., Kagan J. C. Lipopolysaccharide detection by the innate immune system may be an uncommon defence strategy used in nature // Open Biology. 2022. № 10 (12).
- 234.Gauthier G., Gauthier M., Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations // International journal of systematic bacteriology. 1995. № 4 (45). C. 755–761.
- 235.Gavrilets S., Vose A. Dynamic patterns of adaptive radiation // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. № 50 (102). C. 18040–18045.
- 236.Geng H., Belas R. Molecular mechanisms underlying roseobacter–phytoplankton symbioses // Current Opinion in Biotechnology. 2010. № 3 (21). C. 332–338.
- 237.Georlette D. [и др.]. A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures // European Journal of Biochemistry. 2000. № 12 (267). C. 3502–3512.
- 238.Gerdes S. Y. [и др.]. From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways // Journal of Bacteriology. 2002. № 16 (184). C. 4555–4572.
- 239.Gerhardt P. [и др.]. Methods for general and molecular bacteriology / P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. 791 c.
- 240.Ghosh S. S. [и др.]. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development // Journal of the Endocrine Society. 2020. № 2 (4).
- 241.Ghyoot C. [и др.]. Modelling alkaline phosphatase activity in microalgae under orthophosphate limitation: the case of *Phaeocystis globosa* // Journal of Plankton Research. 2015. № 5 (37). C. 869–885.
- 242.Gilchrist C. L. M., Chooi Y.-H. clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster

comparison figures // Bioinformatics. 2021. № 16 (37). C. 2473–2475.

243.Giovannoni S. J. [и др.]. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium // Science. 2005. № 5738 (309). C. 1242–1245.

244.Giovannoni S. J., Stingl U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton // Nature. 2005. № 7057 (437). C. 343–348.

245.Giovannoni S., Rappé M. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes Wiley-Liss, Inc, 2000.C. 47–84.

246.Golotin V. [и др.]. Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia marina* // Marine biotechnology (New York, N.Y.). 2015. № 2 (17). C. 130–143.

247.Gómez-León J. [и др.]. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities // Applied and Environmental Microbiology. 2005. № 1 (71). C. 98–104.

248.Goyal N. [и др.]. Animal models of inflammatory bowel disease: a review // Inflammopharmacology. 2014. № 4 (22). C. 219–233.

249.Gralka M., Hallatschek O. Environmental heterogeneity can tip the population genetics of range expansions // eLife. 2019. (8). C. e44359.

250.Grammbitter G. L. [и др.]. Cold spring harbor laboratory. the chemical structure of widespread microbial aryl polyene lipids. 2020.

251.Grammbitter G. L. C. [и др.]. An Uncommon type II PKS catalyzes biosynthesis of aryl polyene pigments // Journal of the American Chemical Society. 2019. № 42 (141). C. 16615–16623.

252.Griffiths H. R., Gao D., Pararasa C. Redox regulation in metabolic programming and inflammation // Redox Biology. 2017. (12). C. 50–57.

253.Grose J. H. [и др.]. Evidence that feedback inhibition of NAD kinase controls responses to oxidative stress // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. № 20 (103). C. 7601–7606.

254.Guzii A. G. [и др.]. Guitarrins A-E and aluminumguitarrin a: 5-azaindoles from the northwestern pacific marine sponge *Guitarra fimbriata*. // Journal of natural products. 2019. № 6 (82). C. 1704–1709.

255.Ha S., Shin B., Park W. Lack of glyoxylate shunt dysregulates iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology. 2018. № 4 (164). C. 587–599.

256.Haas S., Sinclair K. P., Catling D. C. Biogeochemical explanations for the world's most phosphate-rich lake, an origin-of-life analog // Communications Earth & Environment. 2024. № 1 (5). C. 1–11.

257.Hacker J., Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity // EMBO reports. 2001. № 5 (2). C. 376–381.

258.Halder U., Banerjee A., Bandopadhyay R. Structural and functional properties, biosynthesis, and

patenting trends of bacterial succinoglycan: A Review // Indian Journal of Microbiology. 2017. № 3 (57). C. 278–284.

259.Hall J. P. J., Brockhurst M. A., Harrison E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2017. № 1735 (372). C. 20160424.

260.Hamarneh S. R. [и др.]. A Novel approach to maintain gut mucosal integrity using an oral enzyme supplement // Annals of Surgery. 2014. № 4 (260). C. 706–715.

261.Hamid B. [и др.]. Cold-active enzymes and their potential industrial applications—A Review // Molecules. 2022. № 18 (27). C. 5885.

262.Hanage W. P. [и др.]. Modelling bacterial speciation // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006. № 1475 (361). C. 2039–2044.

263.Hanage W. P., Fraser C., Spratt B. G. Fuzzy species among recombinogenic bacteria // BMC Biology. 2005. № 1 (3). C. 6.

264.Hardie D. Protein kinases at the frontier // Trends in Cell Biology. 2001. № 3 (11). C. 142.

265.Harroun S. G., Vallée-Bélisle A. Methods to characterise enzyme kinetics with biological and medicinal substrates: the case of alkaline phosphatase // Chemistry methods. 2023. № 8 (3).

266.He L. [и др.]. Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization // BMC Biotechnology. 2017. № 1 (17).

267.He Y.-W., Cao X.-Q., Poplawsky A. R. Chemical structure, biological roles, biosynthesis and regulation of the yellow xanthomonadin pigments in the phytopathogenic genus *Xanthomonas* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2020. № 5 (33). C. 705–714.

268.Heidelberg J. F. [и др.]. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae* // Nature. 2000. № 6795 (406). C. 477–483.

269.Helland R., Larsen R. L., Ásgeirsson B. The 1.4 Å crystal structure of the large and cold-active *Vibrio* sp. alkaline phosphatase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2009. № 2 (1794). C. 297–308.

270.Hellebust J. A. Extracellular products под ред. W. D. P. Stewart, Blackwell Scientific, 1974.C. 838–863.

271.Herschy B. [и др.]. Archean phosphorus liberation induced by iron redox geochemistry // Nature Communications. 2018. № 1 (9). C. 1346.

272.Hertkorn N. [и др.]. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter // Geochimica et Cosmochimica Acta. 2006. № 12 (70). C. 2990–3010.

273.Hettle A. G. [и др.]. Insights into the κ /ι-carrageenan metabolism pathway of some marine *Pseudoalteromonas* species. // Communications biology. 2019. (2). C. 474.

274.Hjörleifsson J. G. [и др.]. The high catalytic rate of the cold-active *Vibrio* alkaline phosphatase

requires a hydrogen bonding network involving a large interface loop // FEBS Open Bio. 2020. № 1 (11). C. 173–184.

275.Hjorleifsson J. G., Ásgeirsson B. Chloride promotes refolding of active *Vibrio* alkaline phosphatase through an inactive dimeric intermediate with an altered interface // FEBS Open Bio. 2019. № 1 (9). C. 169–184.

276.Hjörleifsson J. G., Ásgeirsson B. pH-Dependent binding of chloride to a marine alkaline phosphatase affects the catalysis, active site stability, and dimer equilibrium // Biochemistry. 2017. № 38 (56). C. 5075–5089.

277.Hollibaugh J., Wong P., Murrell M. Similarity of particle-associated and free-living bacterial communities in northern San Francisco Bay, California // Aquatic Microbial Ecology. 2000. (21). C. 103–114.

278.Hood E. E. [и др.]. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants // Transgenic Research. 1993. № 4 (2). C. 208–218.

279.Horsch R. B. [и др.]. Leaf disc transformation // Plant Molecular Biology Manual. 1989. C. 63–71.

280.Hosseini Nasab N. [и др.]. Potent alkaline phosphatase inhibitors, pyrazolo-oxothiazolidines: synthesis, biological evaluation, molecular docking, and kinetic studies // International Journal of Molecular Sciences. 2022. № 21 (23). C. 13262.

281.Hsieh Y.-J., Wanner B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system // Current Opinion in Microbiology. 2010. № 2 (13). C. 198–203.

282.Hwang C. Y. [и др.]. *Pseudoalteromonas neustonica* sp. nov., isolated from the sea surface microlayer of the Ross Sea (Antarctica), and emended description of the genus *Pseudoalteromonas* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016. № 9 (66). C. 3377–3382.

283.Ibacache-Quiroga C. [и др.]. Genome sequence of *Cobetia* sp. strain MM1IDA2H-1, a hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing marine bacterium // Genome Announcements. 2017. № 15 (5).

284.Iffland-Stettner A. [и др.]. A Genome-scale metabolic model of marine heterotroph *Vibrio splendidus* strain 1A01 // mSystems. 2023. № 2 (8).

285.Israel E. [и др.]. Quorum sensing: unravelling the intricacies of microbial communication for biofilm formation, biogeochemical cycling, and biotechnological applications // Journal of Marine Science and Engineering. 2023. № 8 (11). C. 1586–1586.

286.Ivanova E. P. [и др.]. *Arenibacter* gen. nov., new genus of the family flavobacteriaceae and description of a new species, *Arenibacter latericius* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001. № 6 (51). C. 1987–1995.

287.Ivanova E. P. [и др.]. Characterization of the marine bacterium *Deleya marina* producing highly

active alkaline phosphatase and associated with the mussel *Crenomytilus grayanus* // Biol Morya (in Russian J Mar Biol). 1994. (20). С. 340–545.

288.Ivanova E. P. [и др.]. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens* // Current Microbiology. 2002a. № 1 (46). С. 6–10.

289.Ivanova E. P. [и др.]. Presence of ecophysiologicaly diverse populations within *Cobetia marina* strains isolated from marine invertebrate, algae and the environments // Microbes and Environments. 2005. № 4 (20). С. 200–207.

290.Ivanova E. P. [и др.]. *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002b. № 1 (52). С. 263–271.

291.Ivanova E. P. [и др.]. *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine invertebrates // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2002b. № 1 (52). С. 235–240.

292.Ivanova E. P., Flavier S., Christen R. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. № 5 (54). С. 1773–1788.

293.Ivars-Martínez E. [и др.]. Biogeography of the ubiquitous marine bacterium *Alteromonas macleodii* determined by multilocus sequence analysis // Molecular Ecology. 2008. № 18 (17). С. 4092–4106.

294.Jaafar N. R. [и др.]. Crystal structure of fuculose aldolase from the Antarctic psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12 // Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications. 2016. № 11 (72). С. 831–839.

295.Jablonska P. [и др.]. The new insight into extracellular NAD⁺ degradation-the contribution of CD38 and CD73 in calcific aortic valve disease // Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2021. № 13 (25). С. 5884–5898.

296.Jackson R. J. [и др.]. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels // FEMS Microbiology Letters. 2008. № 2 (289). С. 219–224.

297.Jacox E. [и др.]. ecceTERA: comprehensive gene tree-species tree reconciliation using parsimony: Table 1. // Bioinformatics. 2016. № 13 (32). С. 2056–2058.

298.Jiang F. [и др.]. Cryo-EM structure and assembly of an extracellular contractile injection system // Cell. 2019. № 2 (177). С. 370–383.e15.

- 299.Jin M. [и др.]. Properties and applications of extremozymes from deep-sea extremophilic microorganisms: a mini review // *Marine Drugs*. 2019. № 12 (17). С. 656.
- 300.Joensuu J. J. [и др.]. Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Physiology*. 2009. № 2 (152). С. 622–633.
- 301.Johnson Z. I. Niche partitioning among *prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients // *Science*. 2006. № 5768 (311). С. 1737–1740.
- 302.Johnston I. [и др.]. Identification of essential genes for *Escherichia coli* aryl polyene biosynthesis and function in biofilm formation // *NPJ Biofilms and Microbiomes*. 2021. № 1 (7).
- 303.Jolley K. A., Bray J. E., Maiden M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications // *Wellcome Open Research*. 2018. (3). С. 124.
- 304.Jones C. [и др.]. Iron oxides, divalent cations, silica, and the early earth phosphorus crisis // *Geology*. 2015. № 2 (43). С. 135–138.
- 305.Kageyama H. [и др.]. An alkaline phosphatase/phosphodiesterase, PhoD, induced by salt stress and secreted out of the cells of *Aphanothece halophytica*, a halotolerant cyanobacterium // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. № 15 (77). С. 5178–5183.
- 306.Kalyaanamoorthy S. [и др.]. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. // *Nature methods*. 2017. № 6 (14). С. 587–589.
- 307.Kamennaya N. A. [и др.]. Accumulation of ambient phosphate into the periplasm of marine bacteria is proton motive force dependent // *Nature Communications*. 2020. № 1 (11).
- 308.Kanehisa M. [и др.]. KEGG: biological systems database as a model of the real world // *Nucleic Acids Research*. 2025. № D1 (53).
- 309.Kany S., Vollrath J. T., Relja B. Cytokines in inflammatory disease // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. № 23 (20).
- 310.Karan R. [и др.]. Understanding high-salt and cold adaptation of a polyextremophilic enzyme // *Microorganisms*. 2020. № 10 (8). С. 1594.
- 311.Karp P. D. [и др.]. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways // *Briefings in Bioinformatics*. 2017. № 4 (20). С. 1085–1093.
- 312.Kathuria S., Martiny A. C. Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* and other ocean bacteria // *Environmental Microbiology*. 2011. № 1 (13). С. 74–83.
- 313.Kato J., Katayama T. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli* // *The EMBO Journal*. 2001. № 15 (20). С. 4253–4262.
- 314.Kautharapu K. B., Jarboe L. R. Genome sequence of the psychrophilic deep-sea bacterium *Moritella marina* MP-1 (ATCC 15381) // *Journal of Bacteriology*. 2012. № 22 (194). С. 6296–6297.

- 315.Kaval K. G., Garsin D. A. Ethanolamine utilization in bacteria // mBio. 2018. № 1 (9).
- 316.Kavitha M., Shanthi C. NISCAIR-CSIR, India. Alkaline thermostable cold active lipase from halotolerant *Pseudomonas* sp. VITCLP4 as detergent additive. 2017.
- 317.Kawai S., Murata K. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H) // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2008. № 4 (72). C. 919–930.
- 318.Ke H.-M. [и др.]. Tracing genomic divergence of *Vibrio* bacteria in the Harveyi clade // Journal of Bacteriology. 2018. № 15 (200).
- 319.Kearse M. [и др.]. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // Bioinformatics. 2012. № 12 (28). C. 1647–1649.
- 320.Kerk D. [и др.]. Origin of the Phosphoprotein Phosphatase (PPP) sequence family in Bacteria: Critical ancestral sequence changes, radiation patterns and substrate binding features // BBA Advances. 2021. (1). C. 100005.
- 321.Khorshidian N. [и др.]. An overview of antimicrobial activity of lysozyme and its functionality in cheese // Frontiers in Nutrition. 2022. (9).
- 322.Kim H.-W. [и др.]. Cold adaptation of a psychrophilic chaperonin from *Psychrobacter* sp. and its application for heterologous protein expression // Biotechnology Letters. 2015. № 9 (37). C. 1887–1893.
- 323.Kim M. [и др.]. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014. № Pt 2 (64). C. 346–51.
- 324.Kim M.-S., Roh S. W., Bae J.-W. *Cobetia crustatorum* sp. nov., a novel slightly halophilic bacterium isolated from traditional fermented seafood in Korea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010. № 3 (60). C. 620–626.
- 325.Kim S. [и др.]. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces // Nucleic Acids Research. 2021. № D1 (49). C. D1388–D1395.
- 326.Kim S. H., Lee P. C. Functional expression and extension of staphylococcal staphyloxanthin biosynthetic pathway in *Escherichia coli* // Journal of Biological Chemistry. 2012. № 26 (287). C. 21575–21583.
- 327.Kiorboe T. [и др.]. Mechanisms and rates of bacterial colonization of sinking aggregates // Applied and Environmental Microbiology. 2002. № 8 (68). C. 3996–4006.
- 328.Kirchman D. L. [и др.]. Glucose fluxes and concentrations of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in the Ross Sea and Polar Front Zone, Antarctica // Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2001. № 19–20 (48). C. 4179–4197.
- 329.Klepac-Ceraj V. [и др.]. High overall diversity and dominance of microdiverse relationships in

salt marsh sulphate-reducing bacteria // *Environmental Microbiology*. 2004. № 7 (6). С. 686–698.

330.Knoll S., Zwisler W., Simon M. Bacterial colonization of early stages of limnetic diatom microaggregates // *Aquatic Microbial Ecology*. 2001. (25). С. 141–150.

331.Kobus S. [и др.]. Overproduction, crystallization and X-ray diffraction data analysis of ectoine synthase from the cold-adapted marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* // *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*. 2015. № 8 (71). С. 1027–1032.

332.Koch H. [и др.]. Genomic, metabolic and phenotypic variability shapes ecological differentiation and intraspecies interactions of *Alteromonas macleodii* // *Scientific Reports*. 2020. № 1 (10).

333. Koedooder C. [и др.]. The Role of the glyoxylate shunt in the acclimation to iron limitation in marine heterotrophic bacteria // *Frontiers in Marine Science*. 2018. (Volume 5-2018).

334.Kokoulin M. S. [и др.]. Structure and anticancer activity of sulfated O-polysaccharide from marine bacterium *Cobetia litoralis* KMM 3880 T // *Carbohydrate Polymers*. 2016. (154). С. 55–61.

335.Kokoulin M. S. [и др.]. Structure and antiproliferative activity of the polysaccharide from *Halomonas aquamarina* related to *Cobetia pacifica* // *Carbohydrate Polymers*. 2022. (298). С. 120125–120125.

336.Kolowith L. C., Ingall E. D., Benner R. Composition and cycling of marine organic phosphorus // *Limnology and Oceanography*. 2001. № 2 (46). С. 309–320.

337.Komazin G. [и др.]. Substrate structure-activity relationship reveals a limited lipopolysaccharide chemotype range for intestinal alkaline phosphatase // *Journal of Biological Chemistry*. 2019. № 50 (294). С. 19405–19423.

338.Kovalchuk S. N. [и др.]. Carbohydrate-binding motifs in a novel type lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* : Homology modeling study and site-specific mutagenesis // *Fish & Shellfish Immunology*. 2015. № 1 (47). С. 565–571.

339.Kovalchuk S. N. [и др.]. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // *Fish & Shellfish Immunology*. 2013. № 4 (35). С. 1320–1324.

340.Kovalchuk S. N. [и др.]. Mutagenesis studies and structure-function relationships for GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // *Marine drugs*. 2018. № 12 (16).

341.Ku P. [и др.]. Molecular Farming: A biotechnological approach in agriculture for production of useful metabolites // *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry*. 2014. (4). С. 23–30.

342.Kühn F. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging // *JCI Insight*. 2020. № 6 (5).

343.Kuhns M. [и др.]. The Rnf complex is a Na(+) coupled respiratory enzyme in a fermenting

bacterium, *Thermotoga maritima* // Communications biology. 2020. № 1 (3). C. 431.

344.Labute P. The generalized Born/volume integral implicit solvent model: Estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area // Journal of Computational Chemistry. 2008. № 10 (29). C. 1693–1698.

345.Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 5259 (227). C. 680–685.

346.Lassila J. K., Herschlag D. Promiscuous sulfatase activity and thio-effects in a phosphodiesterase of the alkaline phosphatase superfamily // Biochemistry. 2008. № 48 (47). C. 12853–12859.

347.Latoscha A. [и др.]. c-di-AMP hydrolysis by the phosphodiesterase AtaC promotes differentiation of multicellular bacteria // Proceedings of the national academy of sciences. 2020. № 13 (117). C. 7392–7400.

348.Lawrence J. G. Gene transfer in bacteria: speciation without species? // Theoretical Population Biology. 2002. № 4 (61). C. 449–460.

349.Laye V. J. [и др.]. Key amino acid residues conferring enhanced enzyme activity at cold temperatures in an Antarctic polyextremophilic β -galactosidase // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017. № 47 (114). C. 12530–12535.

350.Leaden L. [и др.]. Iron deficiency generates oxidative stress and activation of the sos response in *Caulobacter crescentus* // Frontiers in Microbiology. 2018. (9).

351.Ledbetter R. N. [и др.]. The Electron bifurcating FixABCX protein complex from *Azotobacter vinelandii*: generation of low-potential reducing equivalents for nitrogenase catalysis. // Biochemistry. 2017. № 32 (56). C. 4177–4190.

352.Lee I. [и др.]. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016. № 2 (66). C. 1100–1103.

353.Lemos M. L., Toranzo A. E., Barja J. L. Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria // Applied and environmental microbiology. 1985. № 6 (49). C. 1541–1543.

354.Letscher R. T., Moore J. K. Preferential remineralization of dissolved organic phosphorus and non-Redfield DOM dynamics in the global ocean: Impacts on marine productivity, nitrogen fixation, and carbon export // Global Biogeochemical Cycles. 2015. № 3 (29). C. 325–340.

355.Le-Vinh B. [и др.]. Alkaline Phosphatase: a reliable endogenous partner for drug delivery and diagnostics // Advanced Therapeutics. 2022. № 2 (5). C. 2100219.

356.Levitt M. D., Hapak S. M., Levitt D. G. Alkaline phosphatase pathophysiology with emphasis on the seldom-discussed role of defective elimination in unexplained elevations of serum alp – a case report and literature review // Clinical and Experimental Gastroenterology. 2022. № 15 (15). C. 41–49.

- 357.Li Q. [и др.]. Co-production of xylooligosaccharides and xylose from poplar sawdust by recombinant endo-1,4- β -xylanase and β -xylosidase mixture hydrolysis // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. (8).
- 358.Li Z. [и др.]. *Lentibacter algarum* gen. nov., sp. nov., isolated from coastal water during a massive green algae bloom // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2012. № Pt_5 (62). С. 1042–1047.
- 359.Liang Y. [и др.]. Alkaline phosphomonoesterase-harboring microorganisms mediate soil phosphorus transformation with stand age in chinese *Pinus massoniana* plantations // *Frontiers in Microbiology*. 2020. (11).
- 360.Liao J.-H. [и др.]. A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3 // *Journal of the American Chemical Society*. 2016. № 14 (138). С. 4787–4795.
- 361.Lidbury I. D. [и др.]. A widely distributed phosphate-insensitive phosphatase presents a route for rapid organophosphorus remineralization in the biosphere // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. № 5 (119). С. e2118122119.
- 362.Lidbury I. D. E. A. [и др.]. Niche-adaptation in plant-associated *Bacteroidetes* favours specialisation in organic phosphorus mineralisation // *The ISME Journal*. 2021. № 4 (15). С. 1040–1055.
- 363.Likhatskaya G. [и др.]. Structural bioinformatics in the study of cold-active enzymes from marine organisms // *Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2018. № 202 (6S). С. 50–51.
- 364.Lim J., Thomas T., Cavicchioli R. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii* // *Journal of Molecular Biology*. 2000. № 3 (297). С. 553–567.
- 365.Lin W., Zhao D., Luo J. Distribution of alkaline phosphatase genes in cyanobacteria and the role of alkaline phosphatase on the acquisition of phosphorus from dissolved organic phosphorus for cyanobacterial growth // *Journal of Applied Phycology*. 2017. № 2 (30). С. 839–850.
- 366.Lindell D. [и др.]. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection // *Nature*. 2005. № 7064 (438). С. 86–89.
- 367.Liu J. [и др.]. NOX1/NADPH oxidase in bone marrow-derived cells modulates intestinal barrier function // *Free Radical Biology and Medicine*. 2020. (147). С. 90–101.
- 368.Liu J.-Y. [и др.]. Comprehensive bioinformatics analysis of lipopolysaccharide-induced altered autophagy in acute lung injury and construction of underlying competing endogenous RNA regulatory mechanism // *BioMed Research International*. 2021. С. 1–21.
- 369.Liu M. [и др.]. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals // *Microbial Cell Factories*. 2021a. № 1 (20).

- 370.Liu W. [и др.]. Complete genome sequencing and comparison of two nitrogen-metabolizing bacteria isolated from Antarctic deep-sea sediment // BMC Genomics. 2022. № 1 (23).
- 371.Lockwood S. [и др.]. Global and seasonal variation of marine phosphonate metabolism // The ISME Journal. 2022. № 9 (16). С. 2198–2212.
- 372.Loo B. van [и др.]. An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. № 7 (107). С. 2740–2745.
- 373.Lozaupone C. A., Knight R. Global patterns in bacterial diversity // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. № 27 (104). С. 11436–11440.
- 374.Lu S. [и др.]. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 // Nucleic Acids Research. 2019. № D1 (48).
- 375.Luo C., Rodriguez-R L. M., Konstantinidis K. T. MyTaxa: an advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences // Nucleic Acids Research. 2014. № 8 (42). С. e73–e73.
- 376.Luo H. [и др.]. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. № 50 (106). С. 21219–21223.
- 377.Lv N. [и др.]. A novel micro-organism for removing excess ammonia-N in seawater ponds and the effect of *Cobetia amphilecti* on the growth and immune parameters of *Litopenaeus vannamei* // Journal of the World Aquaculture Society. 2018. № 2 (50). С. 448–459.
- 378.Ma Z., Liu J., Wang X. Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) shoot apex with a fungal phytase gene improves phosphorus acquisition // Methods in Molecular Biology. 2013. (958). С. 211–222.
- 379.Maeda Y., Abe T. Experimental induction of heterotrophic to autotrophic conversion, realized by the enforced primary endosymbiosis of photosynthetic bacteria onto eukaryotic amoebae // Natural Science. 2022. № 09 (14). С. 364–385.
- 380.Majewski J. [и др.]. Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation // Journal of Bacteriology. 2000. № 4 (182). С. 1016–1023.
- 381.Majumdar A., Ghatak A., Ghosh R. K. Identification of the gene for the monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* serogroup O1 strain // Gene. 2005. (344). С. 251–258.
- 382.Malard F. [и др.]. Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease // Mucosal Immunology. 2021. № 3 (14).
- 383.Mallick H. [и др.]. Predictive metabolomic profiling of microbial communities using amplicon or metagenomic sequences // Nature Communications. 2019. № 1 (10).
- 384.Malmstrom R. R. [и др.]. Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the Northwest Atlantic Ocean // Applied and Environmental Microbiology. 2005. № 6 (71). С. 2979–2986.
- 385.Mangiagalli M. [и др.]. The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active

enzymes and ice-binding proteins // *New Biotechnology*. 2020. (55). С. 5–11.

386.Мao Y. [и др.]. Development of a novel *Aspergillus* uracil deficient expression system and its application in expressing a cold-adapted α -amylase gene from Antarctic fungi *Geomyces pannorum* // *Process Biochemistry*. 2015. № 10 (50). С. 1581–1590.

387.Marchi S. [и др.]. Mitochondrial control of inflammation // *Nature Reviews Immunology*. 2023. № 3 (23).

388.Margesin R. [и др.]. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis*—production and properties // *Research in microbiology*. 2005. № 4 (156). С. 499–505.

389.Markússon S. [и др.]. Structural characterization of functionally important chloride binding sites in the marine *Vibrio* alkaline phosphatase // *Biochemistry*. 2022. № 20 (61). С. 2248–2260.

390.Martinez A. [и др.]. Phosphite utilization by the marine picocyanobacterium *Prochlorococcus* MIT9301 // *Environmental Microbiology*. 2012. № 6 (14). С. 1363–1377.

391.Martinez J. [и др.]. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea // *Aquatic Microbial Ecology*. 1996. (10). С. 223–230.

392.Matallana-Surget S. [и др.]. Shotgun redox proteomics: identification and quantitation of carbonylated proteins in the UVB-resistant marine bacterium, *Photobacterium angustum* S14 // *PLoS ONE*. 2013. № 7 (8). С. e68112.

393.Mather R. L. [и др.]. Phosphorus cycling in the North and South Atlantic Ocean subtropical gyres // *Nature Geoscience*. 2008. № 7 (1). С. 439–443.

394.Matsuyama H. [и др.]. *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* sp. nov., a marine polysaccharide-producing bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014. № Pt_1 (64). С. 101–106.

395.McCleary W. R. Molecular mechanisms of phosphate homeostasis in *Escherichia coli* / W. R. McCleary, под ред. A. Samie, IntechOpen, 2017. 333 с.

396.McComb R. B., Bowers G. N., Posen S. Alkaline phosphatase / R. B. McComb, G. N. Bowers, S. Posen, Springer US, 1979.

397.McDonough E., Kamp H., Camilli A. *Vibrio cholerae* phosphatases required for the utilization of nucleotides and extracellular DNA as phosphate sources // *Molecular Microbiology*. 2016. № 3 (99). С. 453–469.

398.Meier-Kolthoff J. P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // *Nature Communications*. 2019. № 1 (10).

399.Metcalf W. W. [и др.]. Synthesis of methylphosphonic acid by marine microbes: a source for methane in the aerobic ocean // *Science*. 2012. № 6098 (337). С. 1104–1107.

400.Meylan S. [и др.]. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control // *Cell Chemical Biology*. 2017. № 2 (24). С. 195–206.

- 401.Mikkola S. Nucleotide sugars in chemistry and biology // *Molecules*. 2020. № 23 (25). C. 5755.
- 402.Millán J. L. Alkaline phosphatases : structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes // *Purinergic signalling*. 2006. № 2 (2). C. 335–41.
- 403.Miri S. [и др.]. Recent biotechnological advances in petroleum hydrocarbons degradation under cold climate conditions: A review // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2018. № 7 (49). C. 553–586.
- 404.Mitchell J. G. The energetics and scaling of search strategies in bacteria // *The American Naturalist*. 2002. № 6 (160). C. 727–740.
- 405.Moeseneder M. M., Herndl G. J. Influence of turbulence on bacterial production in the sea // *Limnology and Oceanography*. 1995. № 8 (40). C. 1466–1473.
- 406.Moran M. A. [и др.]. Deciphering ocean carbon in a changing world // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. № 12 (113). C. 3143–3151.
- 407.Moran M. A. [и др.]. Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment // *Nature*. 2004. № 7019 (432). C. 910–913.
- 408.Moran M. A., Miller W. L. Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean // *Nature Reviews Microbiology*. 2007. № 10 (5). C. 792–800.
- 409.Morán X. A. G. [и др.]. Dissolved primary production and the strength of phytoplankton? Bacterioplankton coupling in contrasting marine regions // *Microbial Ecology*. 2002. № 3 (44). C. 217–223.
- 410.Moriya H. [и др.]. *Cobetia* sp. bacteria, which are capable of utilizing alginate or waste *Laminaria* sp. for Poly(3-Hydroxybutyrate) synthesis, isolated from a marine environment // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. (8).
- 411.Morris R. [и др.]. Bacterioplankton responses to deep seasonal mixing in the Sargasso Sea // *Limnol. Oceanogr*. 2005. (50). C. 382–391.
- 412.Morris R. M. [и др.]. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities // *Nature*. 2002. № 6917 (420). C. 806–810.
- 413.Motati D. R., Amaradhi R., Ganesh T. Azaindole therapeutic agents // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2020. № 24 (28). C. 115830.
- 414.Motomura K. [и др.]. Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in *Escherichia coli*: a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation // *FEMS Microbiology Letters*. 2011. № 1 (320). C. 25–32.
- 415.Munoz-Munoz J. [и др.]. An evolutionarily distinct family of polysaccharide lyases removes rhamnose capping of complex arabinogalactan proteins // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. № 32 (292). C. 13271–13283.
- 416.Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue

cultures. // *Physiologia plantarum*. 1962. № 3 (15).

417.Murphy A. R. J. [и др.]. Transporter characterisation reveals aminoethylphosphonate mineralisation as a key step in the marine phosphorus redox cycle // *Nature Communications*. 2021. № 1 (12).

418.Muthusamy S. Functional Profiling of Metabolic Regulation in Marine Bacteria 2016.

419.Mykytczuk N. C. S. [и др.]. Bacterial growth at -15°C ; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1 // *The ISME Journal*. 2013. № 6 (7). C. 1211–1226.

420.Nagata T. Organic matter–bacteria interactions in seawater // *Microbial ecology of the oceans*. 2008. (2). C. 207–241.

421.Nasu E., Ichiyanagi A., Gomi K. Cloning and expression of a highly active recombinant alkaline phosphatase from psychrotrophic *Cobetia marina* // *Biotechnology Letters*. 2012. № 2 (34). C. 321–328.

422.Navarro-Torre S. [и др.]. *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel plant growth-promoting bacterium with potential use in phytoremediation // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. № 5 (70). C. 3287–3294.

423.Nedashkovskaya O. I. [и др.]. Genome-based classification of strain 16-SW-7, a marine bacterium capable of converting B red blood cells, as *Pseudoalteromonas distincta* and proposal to reclassify *Pseudoalteromonas paragorgicola* as a later heterotypic synonym of *Pseudoalteromonas distincta*. // *Frontiers in microbiology*. 2021. (12). C. 809431.

424.Nedashkovskaya O. [и др.]. In-Depth genome characterization and pan-genome analysis of strain KMM 296, a producer of highly active alkaline phosphatase; proposal for the reclassification of *Cobetia litoralis* and *Cobetia pacifica* as the later heterotypic synonyms of *Cobetia amphilecti* and *Cobetia marina*, and emended description of the species *Cobetia amphilecti* and *Cobetia marina* // *Biomolecules*. 2024. № 2 (14).

425.Nedashkovskaya O. [и др.]. *Rhodoaligimonas zhirmunskyi* gen. nov., sp. nov., a marine *Alphaproteobacterium* isolated from the Pacific red alga *Ahnfeltia tobuchiensis*: phenotypic characterization and pan-genome analysis // *Microorganisms*. 2023. № 10 (11).

426.Nedashkovskaya O. I. [и др.]. *Polaribacter staleyi* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2018. № 2 (68). C. 623–629.

427.Needham D. M., Fuhrman J. A. Pronounced daily succession of phytoplankton, archaea and bacteria following a spring bloom // *Nature Microbiology*. 2016. № 4 (1).

428.Neto S. [и др.]. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus* // *Nucleic acids research*. 2009. № 14 (37). C. 4812–4825.

429.Newton R. R. [и др.]. Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage // *The*

ISME Journal. 2010. № 6 (4). C. 784–798.

430.Nguyen L.-T. [и др.]. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Molecular biology and evolution. 2015. № 1 (32). C. 268–274.

431.Nijland R., Hall M. J., Burgess J. G. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase // PloS one. 2010. № 12 (5). C. e15668.

432.Noskova Y. [и др.]. A Novel alkaline phosphatase/phosphodiesterase, CamPhoD, from marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // Marine drugs. 2019. № 12 (17).

433.Noskova Y. [и др.]. Are the closely related *Cobetia* strains of different species? // Molecules (Basel, Switzerland). 2021. № 3 (26).

434.Noskova Y. [и др.]. Purification and characterization of a DegP-type protease from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // Microorganisms. 2023. № 7 (11).

435.Noskova Y., Balabanova L., Terentieva N. Alkaline phosphatase/phosphodiesterase from marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences. 2018. № 202 (6S). C. 94–95.

436.Noskova Y., Nedashkovskaya O., Balabanova L. Production, purification, and biochemical characterization of a novel ATP-dependent caseinolytic protease from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // Microorganisms. 2025. № 2 (13). C. 307.

437.O'Brien P. J., Herschlag D. Alkaline phosphatase revisited: hydrolysis of alkyl phosphates // Biochemistry. 2002. № 9 (41). C. 3207–3225.

438.O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay // Journal of Visualized Experiments: JoVE. 2011. (47). C. e2437.

439.Obayashi Y., Suzuki S. Proteolytic enzymes in coastal surface seawater: Significant activity of endopeptidases and exopeptidases // Limnology and Oceanography. 2005. № 2 (50). C. 722–726.

440.Oda K., Murao S. Purification and some enzymatic properties of acid protease A and B of *Scytalidium lignicolum* ATCC 24568 // Agricultural and Biological Chemistry. 1974. № 12 (38). C. 2435–2444.

441.Okba A. M. [и др.]. Neutrophil/lymphocyte ratio and lymphocyte/monocyte ratio in ulcerative colitis as non-invasive biomarkers of disease activity and severity // Autoimmunity Highlights. 2019. № 1 (10).

442.Okie J. G. [и др.]. Genomic adaptations in information processing underpin trophic strategy in a whole-ecosystem nutrient enrichment experiment // eLife. 2020. (9).

443.Oliverio A. M. [и др.]. The role of phosphorus limitation in shaping soil bacterial communities and their metabolic capabilities // mBio. 2020. № 5 (11).

- 444.Orhanović S., Pavela-Vrancic M. Dimer asymmetry and the catalytic cycle of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* // European journal of biochemistry. 2003. № 21 (270). С. 4356–4364.
- 445.Osterholz H. [и др.]. Deciphering associations between dissolved organic molecules and bacterial communities in a pelagic marine system // The ISME Journal. 2016. № 7 (10). С. 1717–1730.
- 446.Ostrowski M. [и др.]. PtrA is required for coordinate regulation of gene expression during phosphate stress in a marine *Synechococcus* // The ISME Journal. 2010. № 7 (4). С. 908–921.
- 447.Ostrowski M. [и др.]. Specific growth rate plays a critical role in hydrogen peroxide resistance of the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas alaskensis* strain RB2256 // Applied and Environmental Microbiology. 2001. № 3 (67). С. 1292–1299.
- 448.Overmann J., Lepleux C. Marine bacteria and archaea: diversity, adaptations, and culturability Springer Nature, 2016.С. 21–55.
- 449.Pal C., Papp B., Lercher M. J. Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer // Nature Genetics. 2005. № 12 (37). С. 1372–1375.
- 450.Palovaara J. [и др.]. Stimulation of growth by proteorhodopsin phototrophy involves regulation of central metabolic pathways in marine planktonic bacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. № 35 (111). С. E3650–E3658.
- 451.Pan X. [и др.]. A novel low-temperature-active pectin methylesterase from *Penicillium chrysogenum* F46 with high efficiency in fruit firming // Food Chemistry. 2014. (162). С. 229–234.
- 452.Pandey N. [и др.]. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp. (GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem // Mycology. 2018. № 2 (9). С. 81–92.
- 453.Pandey R. [и др.]. Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water // Science Advances. 2016. № 4 (2). С. e1501630.
- 454.Parales R. E. [и др.]. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3) // Applied and Environmental Microbiology. 2002. № 10 (68). С. 4699–4709.
- 455.Paredes D. I. [и др.]. Comparative void-volume analysis of psychrophilic and mesophilic enzymes: Structural bioinformatics of psychrophilic enzymes reveals sources of core flexibility // BMC Structural Biology. 2011. № 1 (11). С. 42.
- 456.Park S. [и др.]. *Pseudoalteromonas aestuariivivens* sp. nov., isolated from a tidal flat // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016. № 5 (66). С. 2078–2083.
- 457.Park S.-Y. [и др.]. Lower expression of endogenous intestinal alkaline phosphatase may predict worse prognosis in patients with Crohn's disease // BMC Gastroenterology. 2018. № 1 (18).
- 458.Park Y.-D. [и др.]. *Pseudoalteromonas byunsanensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment in Korea // International journal of systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. № 6 (55). С. 2519–

2523.

459.Parks D. H. [и др.]. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome Research*. 2015. № 7 (25). С. 1043–1055.

460.Parrilli E. [и др.]. The art of adapting to extreme environments: The model system *Pseudoalteromonas* // *Physics of life reviews*. 2021. (36). С. 137–161.

461.Parte A. C. [и др.]. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. № 11 (70). С. 5607–5612.

462.Parvizpour S. [и др.]. Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. № 3 (105). С. 899–907.

463.Pasek M. A. [и др.]. Serpentinization as a route to liberating phosphorus on habitable worlds // *Geochimica et cosmochimica acta*. 2022. (336). С. 332–340.

464.Pasek M. A., Gull M., Herschy B. Phosphorylation on the early earth // *Chemical Geology*. 2017. (475). С. 149–170.

465.Pavoncello V., Barras F., Bouveret E. Degradation of exogenous fatty acids in *Escherichia coli* // *Biomolecules*. 2022. № 8 (12). С. 1019–1019.

466.Payne W. J., Wiebe W. J. Growth yield and efficiency in chemosynthetic microorganisms // *Annual Review of Microbiology*. 1978. № 1 (32). С. 155–183.

467.Paysan-Lafosse T. [и др.]. InterPro in 2022 // *Nucleic Acids Research*. 2022. № D1 (51).

468.Peng Q. [и др.]. PurN is involved in antibiotic tolerance and virulence in *Staphylococcus aureus* // *Antibiotics*. 2022. № 12 (11). С. 1702–1702.

469.Pentekhina I. [и др.]. Chitinolytic and fungicidal potential of the marine bacterial strains habituating Pacific ocean regions // *Microorganisms*. 2023. № 9 (11).

470.Perfumo A., Banat I. M., Marchant R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications // *Trends in Biotechnology*. 2018. № 3 (36). С. 277–289.

471.Pernthaler J., Amann R. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2005. № 3 (69). С. 440–461.

472.Perret A. [и др.]. A Novel acyl-CoA beta-transaminase characterized from a metagenome // *PLoS ONE*. 2011. № 8 (6). С. e22918–e22918.

473.Pettengill M. A. [и др.]. Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis // *PLOS ONE*. 2017. № 4 (12). С. e0175936–e0175936.

474.Peyraud R. [и др.]. Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using 13 C metabolomics // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

2009. № 12 (106). С. 4846–4851.

475.Pinhal S. [и др.]. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate // Journal of bacteriology. 2019. № 13 (201). С. 10–1128.

476.Pinhasi J. [и др.]. Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea // Aquatic Microbial Ecology. 2006. № 3 (44). С. 241–252.

477.Piquet A. M.-T. [и др.]. Shifts in coastal Antarctic marine microbial communities during and after melt water-related surface stratification // FEMS Microbiology Ecology. 2011. № 3 (76). С. 413–427.

478.Plisova E. Y. [и др.]. A Highly active alkaline phosphatase from the marine bacterium *Cobetia* // Marine Biotechnology. 2005. № 3 (7). С. 173–178.

479.Polz M. F. [и др.]. Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006. № 1475 (361). С. 2009–2021.

480.Pommier T., Douzery E. J. P., Mouillot D. Environment drives high phylogenetic turnover among oceanic bacterial communities // Biology Letters. 2012. № 4 (8). С. 562–566.

481.Praat M., Smet D., Zanten van Protein kinase and phosphatase control of plant temperature responses // Journal of Experimental Botany. 2021. № 21 (72). С. 7459–7473.

482.Presbitero A. [и др.]. Supplemented alkaline phosphatase supports the immune response in patients undergoing cardiac surgery: clinical and computational evidence // Frontiers in Immunology. 2018. (9).

483.Pupo G. M., Lan R., Reeves P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. № 19 (97). С. 10567–10572.

484.Qing G. [и др.]. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli* // Nature Biotechnology. 2004. № 7 (22). С. 877–882.

485.Quirke A. M. [и др.]. Genomic island identification in *Vibrio vulnificus* reveals significant genome plasticity in this human pathogen // Bioinformatics. 2006. № 8 (22). С. 905–910.

486.Rader B. A. [и др.]. Modulation of symbiont lipid a signaling by host alkaline phosphatases in the squid-vibrio symbiosis // mBio. 2012. № 3 (3).

487.Rader B. A. Alkaline phosphatase, an unconventional immune protein // Frontiers in Immunology. 2017. (8).

488.Raes E. J. [и др.]. Oceanographic boundaries constrain microbial diversity gradients in the South Pacific Ocean // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. № 35 (115).

489.Ragot S. A. [и др.]. Soil *phoD* and *phoX* alkaline phosphatase gene diversity responds to multiple

environmental factors // FEMS Microbiology Ecology. 2016. № 1 (93). C. fiw212.

490.Ragot S. A., Kertesz M. A., Bünemann E. K. phoD alkaline phosphatase gene diversity in soil // Applied and Environmental Microbiology. 2015. № 20 (81). C. 7281–7289.

491.Raina J.-B. [и др.]. Chemotaxis increases metabolic exchanges between marine picophytoplankton and heterotrophic bacteria // Nature Microbiology. 2023. (8).

492. Ram B. [и др.]. Characterization of phoA, a bacterial alkaline phosphatase for phi use efficiency in rice plant // Frontiers in Plant Science. 2019. (Volume 10-2019).

493.Ramli A. N. [и др.]. Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12 // Microbial Cell Factories. 2011. № 1 (10).

494.Randa M. A., Polz M. F., Lim E. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR // Applied and Environmental Microbiology. 2004. № 9 (70). C. 5469–5476.

495.Randhawa P. K. [и др.]. A Review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents // The Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 2014. № 4 (18). C. 279.

496.Ranjan K., Sahay S. Identification of phytase producing yeast and optimization and characterization of extracellular phytase from *Candida parapsilosis* // Int J Sci Nat. 2013. № 4 (4). C. 583–590.

497.Rappé M. S., Giovannoni S. J. The uncultured microbial majority // Annual Review of Microbiology. 2003. № 1 (57). C. 369–394.

498.Rasheed A. [и др.]. Molecular tools, potential frontiers for enhancing salinity tolerance in rice: A critical review and future prospective // Frontiers in Plant Science. 2022. (Volume 13-2022).

499.Rashida M., Iqbal J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2015. № 1 (15). C. 41–51.

500.Rawlings N. D. [и др.]. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database // Nucleic Acids Research. 2018. № D1 (46). C. D624–D632.

501.Reed D. C. [и др.]. Gene-centric approach to integrating environmental genomics and biogeochemical models // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. № 5 (111). C. 1879–1884.

502.Reinhard C. T. [и др.]. Evolution of the global phosphorus cycle // Nature. 2017. № 7637 (541). C. 386–389.

503.Repeta D. J. [и др.]. Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter // Nature Geoscience. 2016. № 12 (9). C. 884–887.

504.Richert I. [и др.]. Summer comes to the Southern Ocean: how phytoplankton shape

bacterioplankton communities far into the deep dark sea // *Ecosphere*. 2019. № 3 (10). C. e02641.

505. Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. № 45 (106). C. 19126–19131.

506. Richter W. [и др.]. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin // *Innate Immunity*. 2011. № 5 (17). C. 427–438.

507. Rocap G. [и др.]. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation // *Nature*. 2003. № 6952 (424). C. 1042–1047.

508. Rodrigues D. F. [и др.]. Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: A genome and transcriptome approach // *BMC Genomics*. 2008. № 1 (9). C. 547–547.

509. Rodriguez F. [и др.]. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. № 45 (289). C. 30889–30899.

510. Rodriguez-R L. M., Konstantinidis K. T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // *PeerJ Prepr*. 2016. (4).

511. Romanenko L. A. [и др.]. A new species of melanin-producing bacteria of the genus *Alteromonas* // *Mikrobiologiya*. 1995. (64). C. 74–77.

512. Romanenko L. A. [и др.]. Assignment of '*Alteromonas marinoglutinosa*' NCIMB 1770 to *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* sp. nov., nom. rev., comb. nov. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003. № 4 (53). C. 1105–1109.

513. Romanenko L. A. [и др.]. Description of *Cobetia amphilecti* sp. nov., *Cobetia litoralis* sp. nov. and *Cobetia pacifica* sp. nov., classification of *Halomonas halodurans* as a later heterotypic synonym of *Cobetia marina* and emended descriptions of the genus *Cobetia* and *Cobetia marina* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013. № 1 (63). C. 288–297.

514. Romanenko L. A. [и др.]. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003. № 1 (53). C. 125–131.

515. Rontani J.-F., Bonin P. C., Volkman J. K. Production of wax esters during aerobic growth of marine bacteria on isoprenoid compounds // *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. № 1 (65). C. 221–230.

516. Rosado P. M. [и др.]. Exploring the potential molecular mechanisms of interactions between a probiotic consortium and its coral host // *mSystems*. 2023. № 1 (8).

517. Rosenbaum F. P., Müller V. Energy conservation under extreme energy limitation: the role of cytochromes and quinones in acetogenic bacteria. // *Extremophiles : life under extreme conditions*. 2021.

№ 5–6 (25). С. 413–424.

518.Rosin D. L. [и др.]. Human recombinant alkaline phosphatase (ilofotase alfa) protects against kidney ischemia-reperfusion injury in mice and rats through adenosine receptors // *Frontiers in Medicine*. 2022. (9).

519.Rosselló-Mora R., Amann R. The species concept for prokaryotes // *FEMS Microbiology Reviews*. 2001. № 1 (25). С. 39–67.

520.Roy N. K., Ghosh R. K., Das J. Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* // *Journal of Bacteriology*. 1982. № 3 (150). С. 1033–1039.

521.Russell N. J. Membrane components and cold sensing под ред. R. Margesin [и др.], Springer, 2008.С. 177–190.

522.Saba I. [и др.]. Purification and characterization of a cold active alkaline protease from *Stenotrophomonas* sp., isolated from Kashmir, India // *World journal of microbiology & biotechnology*. 2012. № 3 (28). С. 1071–9.

523.Sahay S. [и др.]. Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts // *Letters in Applied Microbiology*. 2013. № 2 (57). С. 115–121.

524.Sahay S., Chouhan D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018. № 2 (16). С. 319–325.

525.Salazar G., Sunagawa S. Marine microbial diversity // *Current Biology*. 2017. № 11 (27). С. R489–R494.

526.Salwan R., Gulati A., Kasana R. C. Phylogenetic diversity of alkaline protease-producing psychrotrophic bacteria from glacier and cold environments of Lahaul and Spiti, India // *Journal of Basic Microbiology*. 2010. № 2 (50). С. 150–159.

527.Santos G. M. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase: a review of this enzyme role in the intestinal barrier function // *Microorganisms*. 2022. № 4 (10). С. 746.

528.Santos-Beneit F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria // *Frontiers in Microbiology*. 2015. (6).

529.Sasnow S. S., Wei H., Aristilde L. Bypasses in intracellular glucose metabolism in iron-limited *Pseudomonas putida* // *Microbiologyopen*. 2016. № 1 (5). С. 3–20.

530.Sasser M. MIDI technical note 101. Newark, DE: MIDI inc. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. 1990.

531.Sato M. [и др.]. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase, a possible mediator of cell maturation: Towards a new paradigm // *Cells*. 2021. № 12 (10).

532.Sauer U. [и др.]. The Soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli** // *Journal of Biological Chemistry*.

2004. № 8 (279). С. 6613–6619.

533.Sawabe T. [и др.]. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000. № 1 (50). С. 265–271.

534.Schales O., Schales S. S. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids // J. biol. Chem. 1941. № 5 (140). С. 879–882.

535.Schöner T. A. [и др.]. Aryl polyenes, a highly abundant class of bacterial natural products, are functionally related to antioxidative carotenoids // ChemBioChem. 2016. № 3 (17). С. 247–253.

536.Sebastián M. [и др.]. Lipid remodelling is a widespread strategy in marine heterotrophic bacteria upon phosphorus deficiency // The ISME Journal. 2015. № 4 (10). С. 968–978.

537.Sebastian M., Ammerman J. W. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA // The ISME Journal. 2009. № 5 (3). С. 563–572.

538.Seitkalieva A. [и др.]. In silico prediction of alkaline phosphatase interaction with the natural inhibitory 5-azaindoles guitarrin C and D. // Molecules (Basel, Switzerland). 2024. № 23 (29).

539.Sela I., Wolf Y. I., Koonin E. V. Theory of prokaryotic genome evolution // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. № 41 (113). С. 11399–11407.

540.Seymour J. R. [и др.]. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships // Nature Microbiology. 2017. № 7 (2).

541.Shapiro B. J. [и др.]. population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria // Science. 2012. № 6077 (336). С. 48–51.

542.Sharma U., Pal D., Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview // Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2014. № 3 (29). С. 269–278.

543.Shi Y.-M. [и др.]. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals conserved and unique natural products in entomopathogenic nematode-symbiotic bacteria // Nature Chemistry. 2022. № 6 (14). С. 701–712.

544.Shibayama J. [и др.]. Metabolic determinants of electrical failure in ex-vivo canine model of cardiac arrest: evidence for the protective role of inorganic pyrophosphate // PLOS ONE. 2013. № 3 (8). С. e57821–e57821.

545.Shimizu T., Teramoto H., Inui M. Introduction of glyoxylate bypass increases hydrogen gas yield from acetate and l -glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* // Applied and Environmental Microbiology. 2019. № 2 (85).

546.Shirokova L. S. [и др.]. Moss and peat leachate degradability by heterotrophic bacteria: the fate of organic carbon and trace metals // Geomicrobiology Journal. 2015. № 8 (34). С. 641–655.

547.Shkryl Y. [и др.]. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *hos1* reveals its role in the regulation of

secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana* // Plants. 2021. № 1 (10). C. 104.

548.Shkryl Y. [и др.]. Plant exosomal vesicles: perspective information nanocarriers in biomedicine // Applied Sciences. 2022. № 16 (12).

549.Shoemaker K. M., McCliment E. A., Moisander P. H. Copepod-associated gammaproteobacterial alkaline phosphatases in the North Atlantic Subtropical Gyre // Frontiers in Microbiology. 2020. (11).

550.Shuo-shuo C., Xue-zheng L., Ji-hong S. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948 // Protein Expression and Purification. 2011. № 2 (77). C. 166–172.

551.Siddiqui K. S. [и др.]. Psychrophiles // Annual Review of Earth and Planetary Sciences. 2013. № 1 (41). C. 87–115.

552.Siddiqui K. S. Some like it hot, some like it cold: Temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes // Biotechnology advances. 2015. № 8 (33). C. 1912–22.

553.Singh M. [и др.]. Establishing virulence associated polyphosphate kinase 2 as a drug target for mycobacterium tuberculosis // Scientific Reports. 2016. № 1 (6).

554.Singh S. B. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide by inducing autophagy // Scientific Reports. 2020. № 1 (10).

555.Skouri-Panet F. [и др.]. *In vitro* and *in silico* evidence of phosphatase diversity in the biomineralizing bacterium *Ramlibacter tataouinensis* // Frontiers in Microbiology. 2018. (8).

556.Smibert R. M., Kreg N. R. Phenotypic characterization. methods for general and molecular bacteriology / R. M. Smibert, N. R. Kreg, Washington DC: American Society of Microbiology, 1994. 611–654 с.

557.Song H.-S. [и др.]. Regulation-structured dynamic metabolic model provides a potential mechanism for delayed enzyme response in denitrification process // Frontiers in Microbiology. 2017. (8).

558.Sosa O. A. [и др.]. Phosphate-limited ocean regions select for bacterial populations enriched in the carbon–phosphorus lyase pathway for phosphonate degradation // Environmental Microbiology. 2019. № 7 (21). C. 2402–2414.

559.Spaans S. K. [и др.]. NADPH-generating systems in bacteria and archaea // Frontiers in Microbiology. 2015. (6).

560.Sriaporn C. [и др.]. Bacterial and archaeal community distributions and cosmopolitanism across physicochemically diverse hot springs // ISME Communications. 2023. № 1 (3).

561.Srivastava A. [и др.]. Enzyme promiscuity in natural environments: alkaline phosphatase in the ocean // The ISME Journal. 2021. № 11 (15). C. 3375–3383.

562. Stackebrandt E., Goebel B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1994. № 4 (44). С. 846–849.
563. Steen A. D. [и др.]. Substrate specificity of aquatic extracellular peptidases assessed by competitive inhibition assays using synthetic substrates // *Aquatic Microbial Ecology*. 2015. № 3 (75). С. 271–281.
564. Steenvoorden T. S. [и др.]. Alkaline phosphatase treatment of acute kidney injury – an update // *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2024. № 8 (39).
565. Stocker R., Seymour J. R. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012. № 4 (76). С. 792–812.
566. Stoecker D. K. [и др.]. Mixotrophy in the marine plankton // *Annual Review of Marine Science*. 2017. № 1 (9). С. 311–335.
567. Sullivan M. J., Petty N. K., Beatson S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer // *Bioinformatics*. 2011. № 7 (27). С. 1009–1010.
568. Sun J. [и др.]. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes // *Nucleic acids research*. 2023. № W1 (T1). С. W397–W403.
569. Sun Y., Luo H. homologous recombination in core genomes facilitates marine bacterial adaptation // *Applied and Environmental Microbiology*. 2018. № 11 (84).
570. Sunagawa S. Ocean plankton. Structure and function of the global ocean microbiome // *Science*. 2015. № 1261359 (348). С. 403.
571. Sunden F. [и др.]. Mechanistic and evolutionary insights from comparative enzymology of phosphomonoesterases and phosphodiesterases across the alkaline phosphatase superfamily // *Journal of the American Chemical Society*. 2016. № 43 (138). С. 14273–14287.
572. Tada Y. [и др.]. Differing growth responses of major phylogenetic groups of marine bacteria to natural phytoplankton blooms in the Western North Pacific Ocean // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. № 12 (77). С. 4055–4065.
573. Tagliabue A. [и др.]. The integral role of iron in ocean biogeochemistry // *Nature*. 2017. № 7643 (543). С. 51–59.
574. Takemura M. [и др.]. Heterologous production of novel and rare C30-carotenoids using *Planococcus* carotenoid biosynthesis genes // *Microbial Cell Factories*. 2021. № 1 (20).
575. Tamaki H. *Flavobacterium limicola* sp. nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003. № 2 (53). С. 519–526.
576. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // *Molecular Biology and Evolution*. 2021. № 7 (38). С. 3022–3027.

- 577.Tang X. [и др.]. Complete genome of *Cobetia marina* JCM 21022^T and phylogenomic analysis of the family *Halomonadaceae* // Journal of Oceanology and Limnology. 2017. № 2 (36). С. 528–536.
- 578.Tatusova T. [и др.]. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Research. 2016. № 14 (44). С. 6614–6624.
- 579.Taylor J. P., Tse H. M. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases // Redox Biology. 2021. (48). С. 102159.
- 580.Taylor J. W. [и др.]. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi // Fungal Genetics and Biology. 2000. № 1 (31). С. 21–32.
- 581.Teeling H. [и др.]. Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms // eLife. 2016. (5). С. e11888.
- 582.Tenconi E. [и др.]. Production of prodiginines is part of a programmed cell death process in *Streptomyces coelicolor* // Frontiers in Microbiology. 2018. (9).
- 583.Tendulkar S. [и др.]. Psychrophiles: A journey of hope // Journal of Biosciences. 2021. № 3 (46).
- 584.Terada D. [и др.]. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types // Scientific Reports. 2016. № 1 (6). С. 28344.
- 585.Teske A. [и др.]. Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an arctic fjord of svalbard // Applied and Environmental Microbiology. 2011. № 6 (77). С. 2008–2018.
- 586.Tettelin H. [и др.]. Comparative genomics: the bacterial pan-genome // Current Opinion in Microbiology. 2008. № 5 (11). С. 472–477.
- 587.Thakur M. [и др.]. A novel cold-active type I pullulanase from a hot-spring metagenome for effective debranching and production of resistant starch // Bioresource Technology. 2021. (320). С. 124288.
- 588.Thingstad T. F. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems // Limnology and Oceanography. 2000. № 6 (45). С. 1320–1328.
- 589.Thompson J. R. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population // Science. 2005. № 5713 (307). С. 1311–1313.
- 590.Tian P., Engelbrektson A., Mandrell R. Two-log increase in sensitivity for detection of norovirus in complex samples by concentration with porcine gastric mucin conjugated to magnetic beads // Applied and Environmental Microbiology. 2008. № 14 (74). С. 4271–4276.
- 591.Tiwari B. S., Belenghi B., Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death // Plant Physiology. 2002. № 4 (128). С. 1271–1281.

- 592.Toner J. D., Catling D. C. A carbonate-rich lake solution to the phosphate problem of the origin of life // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. № 2 (117). C. 883–888.
- 593.Torcello-Requena A. [и др.]. A distinct, high-affinity, alkaline phosphatase facilitates occupation of P-depleted environments by marine picocyanobacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2024. № 20 (121).
- 594.Tramontano M. [и др.]. Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies // *Nature Microbiology*. 2018. № 4 (3). C. 514–522.
- 595.Tribelli P. M., López N. I. Reporting key features in cold-adapted bacteria // *Life*. 2018. № 1 (8).
- 596.Tsai Y.-C. C. [и др.]. Identification and characterization of multiple rubisco activases in chemoautotrophic bacteria // *Nature Communications*. 2015. № 1 (6).
- 597.Tuin A. [и др.]. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats // *Gut*. 2009. № 3 (58). C. 379–387.
- 598.Ugbenyen A. M. [и др.]. Characterization of a bioflocculant produced from the consortium of three marine bacteria of the genera *Cobetia* and *Bacillus* and its application for wastewater treatment // *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development*. 2014. № 1 (5). C. 81–88.
- 599.Uma S. [и др.]. A RNA polymerase with transcriptional activity at 0°C from the Antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* // *FEBS Letters*. 1999. № 3 (453). C. 313–317.
- 600.Urban-Rich J. Release of dissolved organic carbon from copepod fecal pellets in the Greenland Sea // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1999. № 1 (232). C. 107–124.
- 601.Ustick L. J. [и др.]. Metagenomic analysis reveals global-scale patterns of ocean nutrient limitation // *Science*. 2021. № 6539 (372). C. 287–291.
- 602.Utkina N. [и др.]. Effects of sponge-derived alkaloids on activities of the bacterial α -D-galactosidase and human cancer cell α -N-acetylgalactosaminidase. // *Biomedicines*. 2021. № 5 (9).
- 603.Utkina N. K. [и др.]. Sponge-derived polybrominated diphenyl ethers and dibenzo-p-dioxins, irreversible inhibitors of the bacterial α -d-galactosidase // *Environ. Sci.: Processes Impacts*. 2019. № 10 (21). C. 1754–1763.
- 604.Van der Beek S. L. [и др.]. Streptococcal dTDP-L-rhamnose biosynthesis enzymes: functional characterization and lead compound identification // *Molecular microbiology*. 2019. № 4 (111). C. 951–964.
- 605.Van Mooy B. A. S. [и др.]. Major role of planktonic phosphate reduction in the marine phosphorus redox cycle // *Science*. 2015. № 6236 (348). C. 783–785.
- 606.Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Ya., Vasendin I. M. A universal reagent for phospholipid analysis // *Journal of Chromatography A*. 1975. № 1 (114). C. 129–141.
- 607.Vázquez-Rosas-Landa M. [и др.]. Population genomics of *Vibrionaceae* isolated from an endangered oasis reveals local adaptation after an environmental perturbation // *BMC Genomics*. 2020.

№ 1 (21).

608.Veaudor T., Cassier-Chauvat C., Chauvat F. Genomics of urea transport and catabolism in cyanobacteria: biotechnological implications // *Frontiers in Microbiology*. 2019. (10).

609.Vetsigian K., Goldenfeld N. Global divergence of microbial genome sequences mediated by propagating fronts // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. № 20 (102). C. 7332–7337.

610.Vieites J. M. [и др.]. Metagenomics approaches in systems microbiology // *FEMS Microbiology Reviews*. 2009. № 1 (33). C. 236–255.

611.Voets I. K. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials // *Soft Matter*. 2017. № 28 (13). C. 4808–4823.

612.Vuerich M. [и др.]. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling // *Frontiers in Immunology*. 2020. (11).

613.Vulic M. [и др.]. Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. № 18 (94). C. 9763–9767.

614.Walworth N. G. [и др.]. Microbial evolutionary strategies in a dynamic ocean // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. № 117 (11). C. 201919332.

615.Wan B. [и др.]. Rethinking the biotic and abiotic remineralization of complex phosphate molecules in soils and sediments // *Science of The Total Environment*. 2022. C. 155187.

616.Wang J. [и др.]. Facile and stereo-selective synthesis of UDP- α -D-xylose and UDP- β -L-arabinose using UDP-sugar pyrophosphorylase // *Frontiers in Chemistry*. 2018. (6).

617.Wang J. [и др.]. The conserved domain database in 2023 // *Nucleic Acids Res*. 2023. № D1 (51). C. D384–D388.

618.Wang L. [и др.]. Distribution patterns of polyphosphate metabolism pathway and its relationships with bacterial durability and virulence // *Frontiers in Microbiology*. 2018. (9).

619.Wang Q. [и др.]. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology // *Bioresource Technology*. 2008. № 6 (99). C. 1926–1931.

620.Wang X. [и др.]. A Novel bacterial speciation process observed in a symbiotic marine population // *bioRxiv*. 2022.

621.Ward L. M., Rasmussen B., Fischer W. W. Primary productivity was limited by electron donors prior to the advent of oxygenic photosynthesis // *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*. 2019. № 2 (124). C. 211–226.

622.Waterhouse A. [и др.]. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. 2018. № W1 (46). C. W296–W303.

623. Wayne L. G. [и др.]. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1987. № 4 (37). С. 463–464.
624. Weisburg W. G. [и др.]. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // Journal of bacteriology. 1991. № 2 (173). С. 697–703.
625. Weitz J. S. [и др.]. A multitrophic model to quantify the effects of marine viruses on microbial food webs and ecosystem processes // The ISME Journal. 2015. № 6 (9). С. 1352–1364.
626. Welch R. A. [и др.]. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. № 26 (99). С. 17020–17024.
627. Westermann L. M. [и др.]. Bacterial catabolism of membrane phospholipids links marine biogeochemical cycles // Science Advances. 2023. № 17 (9).
628. White A. K., Metcalf W. W. Isolation and biochemical characterization of hypophosphite/ 2-oxoglutarate dioxygenase // Journal of Biological Chemistry. 2002. № 41 (277). С. 38262–38271.
629. Whitman W. B., Coleman D. C., Wiebe W. J. Prokaryotes: The unseen majority // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998. № 12 (95). С. 6578–6583.
630. Widderich N. [и др.]. Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: a metal-containing member of the cupin superfamily // PLOS ONE. 2016. № 3 (11). С. e0151285.
631. Wiegand S. [и др.]. Cultivation and functional characterization of 79 planctomycetes uncovers their unique biology // Nature microbiology. 2020. № 1 (5). С. 126–140.
632. Wiens J. R. [и др.]. Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* // mBio. 2014. № 1 (5).
633. Wierzbicka-Woś A. [и др.]. A novel cold-active β -D-galactosidase from the *Paracoccus* sp. 32d - gene cloning, purification and characterization // Microbial Cell Factories. 2011. № 1 (10). С. 108.
634. Wilkins D. [и др.]. Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments // FEMS Microbiology Reviews. 2013. № 3 (37). С. 303–335.
635. Wojcik-Grzybek D. [и др.]. The combination of intestinal alkaline phosphatase treatment with moderate physical activity alleviates the severity of experimental colitis in obese mice via modulation of gut microbiota, attenuation of proinflammatory cytokines, oxidative stress biomarkers and DNA oxidative damage in colonic mucosa // International Journal of Molecular Sciences. 2022. № 6 (23).
636. Wolfe A. J. The Acetate Switch // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2005. № 1 (69). С. 12–50.
637. Wood J. M. [и др.]. Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H_2O_2 // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004. № 4 (325). С. 1412–1417.
638. Wood W. N. [и др.]. Methionyl-tRNA synthetase synthetic and proofreading activities are

determinants of antibiotic persistence // *Frontiers in Microbiology*. 2024. (15).

639. Worden A. Z. [и др.]. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters // *Environmental Microbiology*. 2006. № 1 (8). С. 21–29.

640. Worm J. [и др.]. Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms // *Aquatic Microbial Ecology*. 2001. (25). С. 103–111.

641. Wu J.-R. [и др.]. Cloning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (PhoX) from *Pasteurella multocida* strain X-73 // *FEMS Microbiology Letters*. 2007. № 1 (267). С. 113–120.

642. Wu S. [и др.]. Gene cloning, functional expression and characterisation of a novel glycogen branching enzyme from *Rhizomucor miehei* and its application in wheat breadmaking // *Food Chemistry*. 2014. (159). С. 85–94.

643. Wu Y.-H. [и др.]. Physiological and genomic features of a novel violacein-producing bacterium isolated from surface seawater // *PLoS ONE*. 2017. № 6 (12). С. e0179997–e0179997.

644. Xia X. [и др.]. Distinct metabolic strategies of the dominant heterotrophic bacterial groups associated with marine *Synechococcus* // *Science of The Total Environment*. 2021. (798). С. 149208.

645. Xu H., Xu D., Liu Y. Molecular biology applications of psychrophilic enzymes: adaptations, advantages, expression, and prospective // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024. (196). С. 5765–5789.

646. Xu L. [и др.]. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species // *Nucleic Acids Research*. 2019. № W1 (47). С. W52–W58.

647. Yang J.-X. [и др.]. Gene horizontal transfers and functional diversity negatively correlated with bacterial taxonomic diversity along a nitrogen gradient // *npj Biofilms and Microbiomes*. 2024. № 1 (10).

648. Yang K., Metcalf W. W. A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 21 (101). С. 7919–7924.

649. Yang Y. [и др.]. Dynamic evolution of the LPS-detoxifying enzyme intestinal alkaline phosphatase in zebrafish and other vertebrates // *Frontiers in Immunology*. 2012. (3).

650. Yang Y. [и др.]. Molecular and biochemical characterization of salt-tolerant trehalose-6-phosphate hydrolases identified by screening and sequencing salt-tolerant clones from the metagenomic library of the gastrointestinal tract // *Frontiers in Microbiology*. 2020. (11).

651. Yilmaz P. [и др.]. Expanding the world of marine bacterial and archaeal clades // *Frontiers in Microbiology*. 2016. (6).

652. Yin J.-L., Wong W.-S. Production of santalenes and bergamotene in *Nicotiana tabacum* plants //

PLOS ONE. 2019. № 1 (14). C. e0203249.

653. Yin X. [и др.]. Deglycosylation differentially regulates weaned porcine gut alkaline phosphatase isoform functionality along the longitudinal axis // *Pathogens*. 2023. № 3 (12). C. 407–407.

654. Yong S. C. [и др.]. A complex iron-calcium cofactor catalyzing phosphotransfer chemistry // *Science*. 2014. № 6201 (345). C. 1170–1173.

655. Yoon S.-H. [и др.]. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017. № 5 (67). C. 1613–1617.

656. Yoshida K. [и др.]. Bacterial long-chain polyunsaturated fatty acids: their biosynthetic genes, functions, and practical use // *Marine Drugs*. 2016. № 5 (14). C. 94.

657. Yu P., Wang X., Liu J. Purification and characterization of a novel cold-adapted phytase from strain JMUY14 isolated from the Antarctic: characterization of a novel cold-adapted phytase // *J. Basic Microbiol.* 2015. (55). C. 1029–1039.

658. Yu Y. [и др.]. The structural pathology for hypophosphatasia caused by malfunctional tissue non-specific alkaline phosphatase // *Nature Communications*. 2023. № 1 (14). C. 4048.

659. Yuan Z. [и др.]. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria // *Nucleic Acids Research*. 2006. № 9 (34). C. 2686–2697.

660. Yugay Y. [и др.]. Heterologous expression of marine bacterial alkaline phosphatase enhances abiotic stress tolerance and metabolic adaptation in tobacco // *Journal of Plant Growth Regulation*. 2025. № 10 (44). C. 6217–6232.

661. Yung-Chi C., Prusoff W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction // *Biochemical Pharmacology*. 1973. № 23 (22). C. 3099–3108.

662. Zaheer R. [и др.]. Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria // *Environmental Microbiology*. 2009. № 6 (11). C. 1572–1587.

663. Zalatan J. G. [и др.]. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution // *Biochemistry*. 2006. № 32 (45). C. 9788–9803.

664. Zalatan J. G., Fenn T. D., Herschlag D. Comparative enzymology in the alkaline phosphatase superfamily to determine the catalytic role of an active-site metal ion // *Journal of Molecular Biology*. 2008. № 5 (384). C. 1174–1189.

665. Zanthorlin L. M. [и др.]. Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7 // *Scientific Reports*. 2016. № 1 (6).

666. Zeng J. [и др.]. PCycDB: a comprehensive and accurate database for fast analysis of phosphorus

cycling genes // Microbiome. 2022. № 1 (10).

667.Zhang C., Kim S.-K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects // Marine Drugs. 2010. № 6 (8). C. 1920–1934.

668.Zhang K. [и др.]. Roles of alkaline phosphatase PhoA in algal metabolic regulation under phosphorus-replete conditions // Journal of phycology. 2021. № 3 (57). C. 703–707.

669.Zhang K. K. [и др.]. PTEN is both an activator and a substrate of chaperone-mediated autophagy // The Journal of Cell Biology. 2023. № 9 (222).

670.Zhang Y., Morar M., Ealick S. E. Structural biology of the purine biosynthetic pathway // Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2008. № 23 (65). C. 3699–3724.

671.Zhang Z. [и др.]. Tissue nonspecific alkaline phosphatase function in bone and muscle progenitor cells: control of mitochondrial respiration and atp production // International Journal of Molecular Sciences. 20216. № 3 (22). C. 1140.

672.Zhao D.-L. [и др.]. Characterization of a cryptic plasmid pSM429 and its application for heterologous expression in psychrophilic *Pseudoalteromonas* // Microbial Cell Factories. 2011. № 1 (10).

673.Zimmermann J., Kaleta C., Waschina S. gapseq: informed prediction of bacterial metabolic pathways and reconstruction of accurate metabolic models // Genome Biology. 2021. № 1 (22). C. 81.

674.Zoccarato L. [и др.]. A comparative whole-genome approach identifies bacterial traits for marine microbial interactions // Communications Biology. 2022. № 1 (5). C. 1–13.

675.Zorzetto L. [и др.]. Induced mineralization of hydroxyapatite in *Escherichia coli* biofilms and the potential role of bacterial alkaline phosphatase // Chemistry of Materials. 2023. № 7 (35). C. 2762–2772.

676.Zwart I. I. de, Meade S. J., Pratt A. J. Biomimetic phosphoryl transfer catalysed by iron(II)-mineral precipitates // Geochimica et Cosmochimica Acta. 2004. № 20 (68). C. 4093–4098.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Идентификация изолятов *Cobetia* spp. из разных регионов Тихого океана методами анализа последовательностей генов 16S рРНК и ПЦР-анализа генов ферментов

Название изолята	Источник выделения	Номер коллекции KMM	Результаты идентификации		Номер доступа NCBI
			16S рРНК1, %	ПЦР ²	
<i>Cobetia</i> sp. 1AS1	coastal seawater, Vostok Bay, Sea of Japan	KMM 7516	<i>C. amphilecti</i> , 100%	<i>C. amphilecti</i>	MW332480
<i>C. amphilecti</i> KMM 296	coelomic fluid, <i>C.</i> <i>grayanus</i>	KMM 296	<i>C. amphilecti</i> , 100%	<i>C. amphilecti</i>	NZ_JQJA010000 78
<i>Cobetia</i> sp. 29-18-1	sponge <i>Esperiopsis</i> <i>digitata</i> , Sea of Okhotsk, Is. Sakhalin, Piltun bay, 107 м	KMM 7000	<i>C. amphilecti</i> , 100%/ <i>C.</i> <i>litoralis</i> , 100%	<i>C. litoralis</i>	MW332487
<i>Cobetia</i> sp. 2AS	sediments, Vostok Bay, Sea of Japan	KMM 7514	<i>C. amphilecti</i> , 99.93%/ <i>C.</i> <i>litoralis</i> 99.86%	<i>C. litoralis</i>	MW332483
<i>Cobetia</i> sp. 2AS1	sediments, Vostok Bay, Sea of Japan	KMM 7005	<i>C. amphilecti</i> , 100%	<i>C. litoralis</i>	MW332484
<i>Cobetia</i> sp. 41-10Alg46	red algae <i>A.</i> <i>tobuchiensis</i> , Is. Paramushir, Kuril Isles, Sea of Okhotsk	KMM 6284	<i>C. marina</i> / <i>C.</i> <i>pacifica</i> , 100%	<i>C. marina</i>	MK587632
<i>Cobetia</i> sp. 2S	coastal seawater, Vostok Bay, Sea of Japan	KMM 7508	<i>C. marina</i> / <i>C.</i> <i>pacifica</i> , 99.86%	<i>C. pacifica</i>	MW332481
<i>Cobetia</i> sp. 3AS	coastal seawater, Vostok Bay, Sea of Japan	KMM 7515	<i>C. marina</i> / <i>C.</i> <i>pacifica</i> , 99.86%	<i>C. pacifica</i>	MW332482
<i>Cobetia</i> sp. 3AK	coastal seawater, Vostok Bay, Sea of Japan	KMM 7505	<i>C. marina</i> / <i>C.</i> <i>pacifica</i> , 100%	<i>C. pacifica</i>	MW332488

Название изолята	Источник выделения	Номер коллекции КММ	Результаты идентификации		Номер доступа NCBI
			16S рРНК ¹ , %	ПЦР ²	
<i>Cobetia</i> sp. 11Alg1	red algae <i>A. tobuchiensis</i> (long-time cultivated), Is. Paramushir, Kuril Isles, Sea of Okhotsk	KMM 6816	<i>C. marina/C. pacifica</i> , 100%	<i>C. pacifica</i>	MW332485
<i>Cobetia</i> sp. 11Alg14	red algae <i>A. tobuchiensis</i> (long-time cultivated), Is. Paramushir, Kuril Isles, the Sea of Okhotsk	KMM 6818	<i>C. marina/C. pacifica</i> , 100%	<i>C. pacifica</i>	MW332486
<i>Cobetia</i> sp. 41-10Alg146	red alga <i>A. tobuchiensis</i> , Is. Paramushir, Kuril Isles, Sea of Okhotsk	KMM 6731	<i>C. marina/C. pacifica</i> , 100%	<i>C. pacifica</i>	KC247358
<i>Cobetia</i> sp. 11Alg4	red algae <i>Ahnfeltia tobuchiensis</i> (long-time cultivated), Is. Paramushir, Kuril Isles, Sea of Okhotsk	KMM 6817	<i>C. crustatorum</i> , 100%	<i>C. crustatorum</i>	MW332489

Примечания: 1. Кодированные последовательности рРНК 16S секвенировали и анализировали в EzBioCloud (16S database). 2. ПЦР проводили с использованием геномной ДНК каждого изолята и нескольких пар видоспецифичных праймеров для генов *C. amphilecti*: эндонуклеазы CmNuc (WP_043334786), экзонуклеазы семейства CmEER (WP_084589364), щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы CmPho семейства PhoD (WP_043333989), фосфолипаза A (WP_084589432), сериновая пептидаза DeqQ (KGA03014), АТФ-зависимая казеинолитическая протеаза Clp (KGA03297), щелочная фосфатаза CmAP семейства PhoA (DQ435608).

Таблица А2 – Олигонуклеотиды для генов ферментов близкородственных видов *Cobetia*

Название	Последовательность (5' - 3')	Молекулярный маркер ¹	Код доступа NCBI ²
1CmNucF	TATACCATGGACGATATTCGCTCGGCCG GCCGCAA	ДНК/РНК неспецифическая эндонуклеаза прекурсор	WP_043334786
CmNucR	TATAGAGCTCTCAGTAACGTGATGGCGT ACGACTG		
2CmNucF	TATACCATGGTATGGCAGGAGCGCGACT ACCAGCA		
CmNucR	TATAGAGCTCTCAGTAACGTGATGGCGT ACGACTG		
CmEePf	TATACCATGGGACTCGACGAGACGGCAC CTCCCCT	экзонуклеаза/эндонуклеаза/фосфатаза (суперсемейство EEP)	WP_084589364
CmEePr	TATAGAGCTCTTATGCTAGCCCGATCGC CTTGCGGCA		
CmPhoDf	TATACCATGGAAGGACGGCGCCCGCGCA TGCCCTC	ЩФ семейства PhoD	WP_043333989
CmPhoDr	TATAGAGCTCTTAGACACTGGCGGCGGC GGGGGTC		
CmPLA_f	TATACCATGGTACTCGATGAAAGCCTGG CCCAGCA	фосфолипаза А	WP_084589432
CmPLA_r	TATAGAGCTCTTAGGTCTCTGGCGAGCC GGCGAAG		
Tryp_F	TATACCATGGTACGTGAATTGCCCGACT TCACCCA	Периплазматическая сериновая пептидаза Do/DeqQ	KGA03014
Tryp_R	TATACTCGAGTCACTTGTCGCTGTGCGC ACGCATG		
CmClp_F	TATCCATGGTAAACGACTTCGACATCAA GAATGCT	АТФ-зависимая казеинолитическая протеаза Clp	KGA03297
CmClp_R	TATAGAGCTCTCACTCCACGTCGGGACG GCGTTCC		
X-PhoN_F	TTAACCATGGCAGAGATCAAGAATGTCA TTCTGAT	ЩФ семейства PhoA	DQ435608
CmAP_R	TTAAGAATTCCTTCGCTACCACTGTCTTC AGATACTGTCC		

Примечания: 1. Молекулярными маркерами являются аннотированные последовательности согласно структурной классификации базы данных консервативных доменов NCBI (Conserved Domain Database) (Lu et al., 2019; Wang et al., 2023). 2. Идентификаторы референсных генов *C. amphilecti* KMM 296 (GenBank ID: JQJA000000.1).

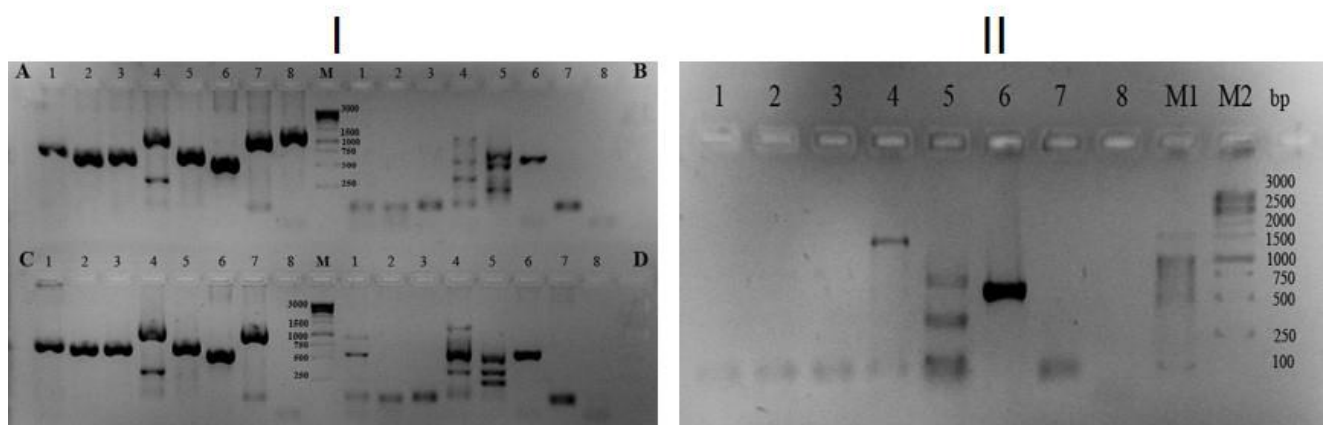


Рисунок А1 – (I) Электрофореграмма ПЦР-продуктов: (А) *C. amphilecti* КММ 1561^T, *C. amphilecti* КММ 296 и КММ 7516. (Б (=В)) *C. marina* LMG 2217^T и КММ 6284. (С (=В)) *C. litoralis* КММ 3880^T, КММ 7000, КММ 7005 и КММ 7514 – отсутствует ген ЩФ PhoA на дорожке 8. (D (=Г)) *C. pacifica* КММ 3879^T, КММ 6731, 7505, 7508, 7515, 6816 и 6818. Расположение ПЦР-продуктов в агарозном геле (дорожки 1-8) относительно маркера длин ДНК (М) соответствуют размеру кодирующих генов: 1 – предшественник ДНК/РНК неспецифической эндонуклеазы, 2 – ДНК/РНК неспецифическая эндонуклеаза, 3 – ЕЕР-подобная (DnaseI-подобная) нуклеаза, 4 – щелочная фосфатаза/фосфодиэстераза PhoD, 5 – фосфолипаза А, 6 – АТФ-зависимая протеаза Clp, 7 – периплазматическая сериновая пептидаза Do/DeqQ, 8 – СмАР-подобная щелочная фосфатаза PhoA, М – маркер 1 kb DNA ladder (Evrogen), (II) Электрофореграмма ПЦР-продуктов штаммов *C. crustatorum* JCM 15644^T и *C. crustatorum* КММ 6817. Номера карманов в агарозном геле: 1 – предшественник ДНК/РНК неспецифической эндонуклеазы, 2 – ДНК/РНК неспецифическая эндонуклеаза, 3 – ЕЕР-подобная (DnaseI-подобная) нуклеаза, 4 – щелочная фосфатаза/фосфодиэстераза PhoD, 5 – фосфолипаза А, 6 – АТФ-зависимая протеаза Clp, 7 – периплазматическая сериновая пептидаза Do/DeqQ, 8 – СмАР-подобная щелочная фосфатаза PhoA, М1 и М2 – маркеры длин ДНК соответственно 1 kb и 100 bp DNA ladder (Евроген, Москва) (Noskova et al., 2021)

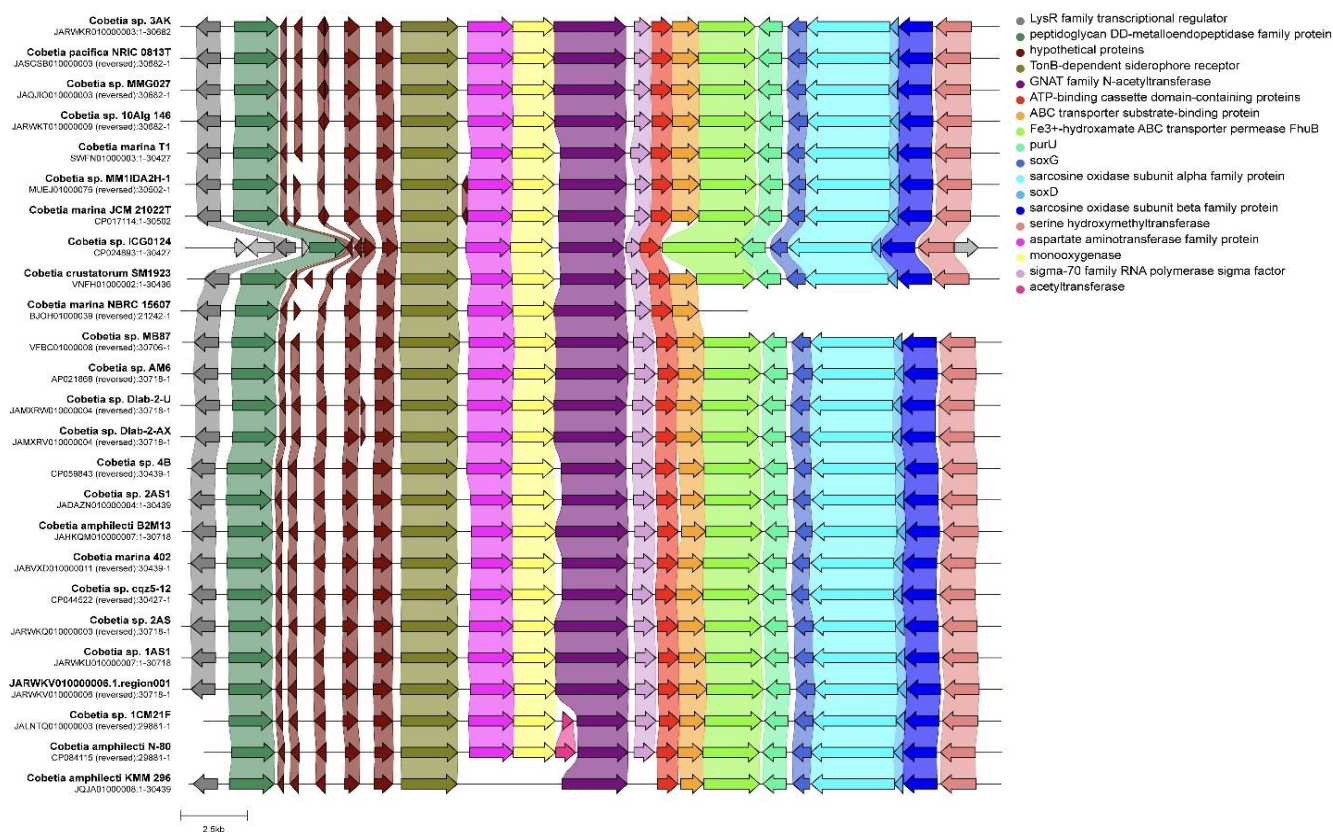
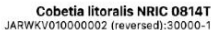


Рисунок А2 – Синтения кодирующих последовательностей родоспецифичных БГК Ni-сидерофора, выделенных из доступных геномов *Cobetia* spp (NCBI). Штаммоспецифичный БГК *C. amphilecti* KMM 296 находится в нижней строке



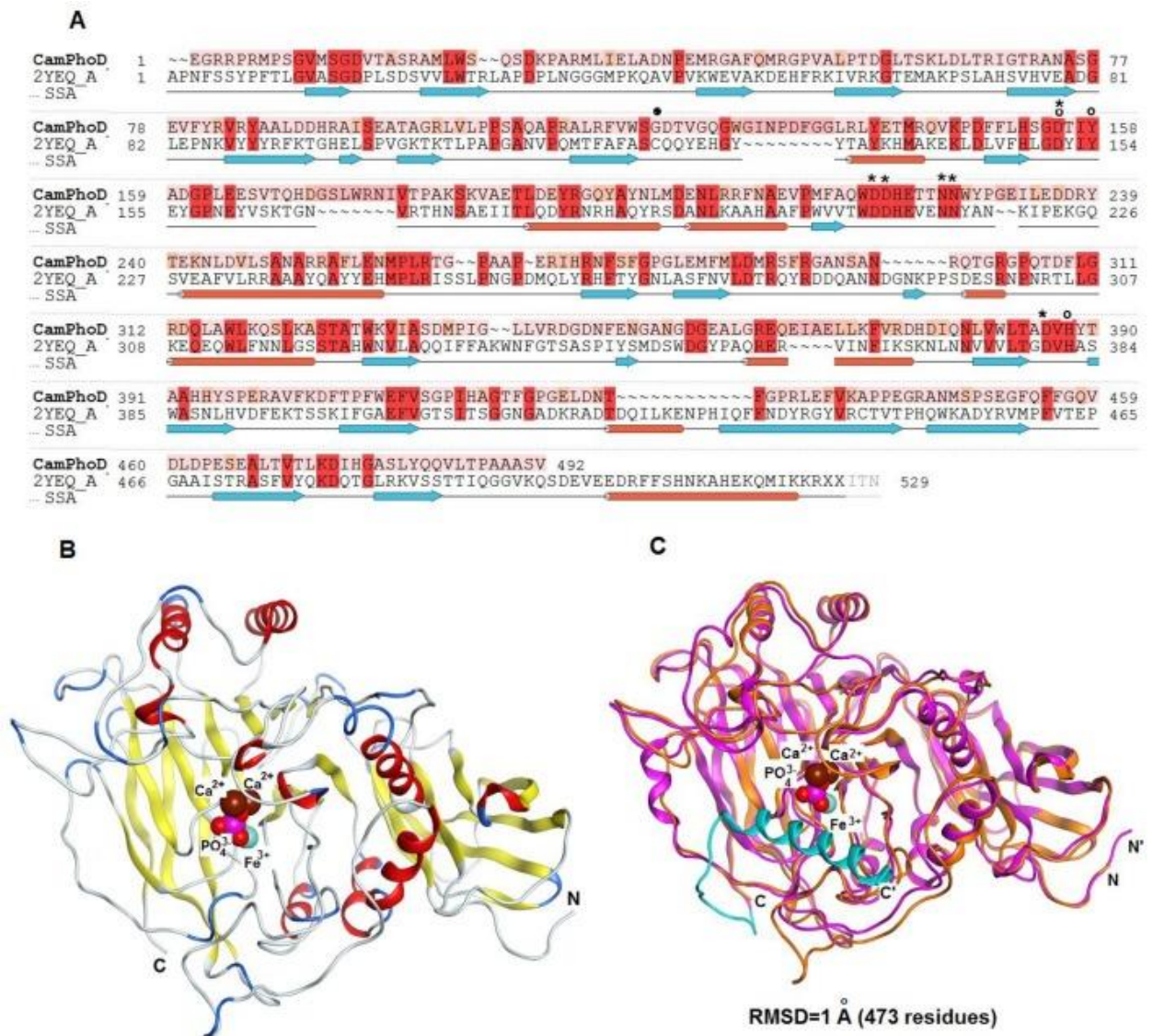


Рисунок А4 – Моделирование 3D-структуры $\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -зависимой ЩФ CamPhoD морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (GenBank: WP_043333989) на основе выравнивания с белковой последовательностью $\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -зависимой щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы семейства PhoD из ближайшего структурного прототипа морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (GenBank: WP_043333989) из ближайшего структурного прототипа из *B. subtilis* (PDB ID: 2YEQ). (А) – Выравнивание белковых последовательностей ЩФ CamPhoD и прототипа 2YEQ. Идентичные аминокислотные остатки выделены красным цветом, вторичная структура прототипа показана под изображением выравнивания: α -спирали – красные палочки, β -структура – синие стрелки, консервативные аминокислотные остатки (а.о.) активного центра – *, консервативные Fe^{3+} -связывающие а.о. – o, остаток Cys 124 прототипа отмечен черным кружком. (В) – Модель 3D-структуры ЩФ CamPhoD морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (GenBank: WP_043333989) с продуктом реакции P_i и ионами металлов в активном центре (структура белка - ленточная диаграмма, P_i - в виде палочек, Ca^{2+} - в виде сфер). (С) – 3D-суперпозиция модели ЩФ CamPhoD (оранжевый) и прототипа (PDB: 2YEQ) (показан розовым, с голубой С-концевой частью молекулы) (Noskova et al., 2019)

Таблица А3 – Некоторые результаты поиска гомологов и ортологов референсной ЩФ (UniProt: KGA01942) из *C. amphilecti* KMM 296 СтАР (выделена жирным шрифтом) в GTF-файлах геномов *Cobetia* spp.

Номер контига/генома	старт	стоп	ген_id	транскрипт_id	продукт	белок_id
NZ_VNFH01000004.1	230456	232234	FQP86_RS07180	unassigned_transcript_2216	alkaline phosphatase family protein	WP_144727163.1
NZ_LJTD01000005.1	206524	208140	AOG28_RS09595	unassigned_transcript_2640	alkaline phosphatase	WP_235507008.1
NZ_JASCSA010000006.1	103893	105509	QLT01_RS09270	unassigned_transcript_2895	alkaline phosphatase	WP_284726808.1
NZ_AP021868.1	2831012	2832628	CLAM6_RS11880	unassigned_transcript_2375	alkaline phosphatase	WP_242007665.1
NZ_JQJA01000018.1	30041	31657	KP05_RS09405	unassigned_transcript_1917	alkaline phosphatase	WP_245163010.1
NZ_JAHKQM010000010.1	212005	213621	KO496_RS07905	unassigned_transcript_534	alkaline phosphatase	WP_234368129.1
NZ_NBVS01000002.1	66985	671504	CFN46_RS06210	unassigned_transcript_1729	alkaline phosphatase	WP_246116512.1
NZ_VNFH01000005.1	269948	271567	FQP86_RS08855	unassigned_transcript_2561	alkaline phosphatase	WP_246116512.1
NZ_JEMF01000030.1	9723	11087	BF12_RS19235	unassigned_transcript_1586	alkaline phosphatase	WP_248623642.1
NZ_JARWKU010000002.1	379738	381354	QD280_RS05435	unassigned_transcript_1739	alkaline phosphatase	WP_279838543.1
NZ_JALNTQ010000001.1	537001	538617	MSG32_RS02250	unassigned_transcript_472	alkaline phosphatase	WP_248377282.1
NZ_LJTD01000003.1	510309	512471	AOG28_RS06335	unassigned_transcript_1933	alkaline phosphatase D family protein	WP_054555671.1
NZ_JASCSA010000011.1	57682	59808	QLT01_RS13510	unassigned_transcript_172	alkaline phosphatase D family protein	WP_284727213.1
NZ_CP059843.1	3534505	3536667	H2077_RS14565	unassigned_transcript_2909	alkaline phosphatase D family protein	WP_215823407.1
NZ_AP021868.1	3450804	3452966	CLAM6_RS14500	unassigned_transcript_2898	alkaline phosphatase D family protein	WP_153636482.1
NZ_CP084115.1	3368238	3370397	LCW13_RS14145	unassigned_transcript_2830	alkaline phosphatase family protein	WP_225347230.1
NZ_JQJA01000022.1	4093	6267	KP05_RS10430	unassigned_transcript_2123	alkaline phosphatase D family protein	WP_052384691.1
NZ_JAMXRW010000013.1	32510	34648	NH343_RS16155	unassigned_transcript_381	alkaline phosphatase family protein	WP_253064933.1
NZ_JAMXRV010000013.1	57865	60003	NH396_RS16230	unassigned_transcript_342	alkaline phosphatase family protein	WP_253064933.1

Таблица А4 – Содержание и распределение семейств щелочных фосфатаз в изолятах и штаммах *Cobetia* spp.

Оригинальное название штамма	Видовое название ¹	ID генома	ID белка	ЩФ	Источник выделения
<i>C. amphilecti</i> KMM 296	<i>C. amphilecti</i>	GCF_000754225.1	WP_043332298.1 WP_043333989.1 WP_245163010.1 WP_043336117.1 WP_052384691.1	PafA PhoD PhoA ² PhoX PhoD	Целомическая жидкость мидии <i>C. grayanus</i> (Россия, Японское море)
<i>Cobetia</i> sp. UCD-24C	<i>C. amphilecti</i>	GCF_001306765.1	WP_082388216.1 WP_054555671.1 WP_054555885.1 WP_235507008.1 WP_054557251.1	PhoD PhoD PafA PhoA ² PhoX	Седименты морской травы <i>Zostera</i> sp.
<i>C. amphilecti</i> B2M13	<i>C. amphilecti</i>	GCF_018860945.1	WP_244994940.1 WP_234368129.1 WP_216060785.1 WP_216060931.1 WP_216061230.1	PhoD PhoA ² PhoX PafA PhoD	Искусственные частицы альгината с глубины 40-100 м (США: пляж Кэннон-Бич)
<i>Cobetia</i> sp. 1AS1	<i>C. amphilecti</i>	GCF_029846435.1	WP_279838219.1 WP_279838543.1 WP_279838774.1 WP_279839461.1 WP_279839645.1	PafA PhoA ² PhoX PhoD PhoD	Прибрежная морская вода (Россия: Японское море, залив Восток)
<i>Cobetia</i> sp. 1CM21F*	<i>C. amphilecti</i>	GCF_023161745.1	WP_248377282.1 WP_248377879.1 WP_248378997.1 WP_248380112.1 WP_248380900.1	PhoA ² PhoX PafA PhoD PhoD	Морская пещера (Португалия: Алгарве)
<i>Cobetia</i> sp. AM6	<i>C. amphilecti</i>	GCF_009617955.1	WP_172978613.1 WP_153635520.1 WP_153635957.1 WP_242007665.1 WP_153636482.1	PhoD PafA PhoX PhoA ² PhoD	Внешняя поверхность раковины галиотиса (морского ушка), приобретенного на рыбном рынке (Токио, Япония)
<i>Cobetia</i> sp. 2AS1	<i>C. amphilecti</i>	GCF_014876835.1	WP_192837404.1 WP_192838056.1 WP_225996507.1 WP_192839216.1	PhoD PafA PhoD PhoX	Прибрежный осадок (донный осадок) (Россия: Японское море, Находка)
<i>Cobetia</i> sp. 2AS	<i>C. amphilecti</i>	GCF_029846355.1	WP_192838056.1 WP_192839216.1 WP_225996507.1 WP_192837404.1	PafA PhoX PhoD PhoD	Седименты (Россия: Японское море, залив Восток)
<i>Cobetia</i> sp. MC34	<i>C. amphilecti</i>	GCF_018340035.1	WP_249330383.1 WP_213114436.1 WP_213114659.1	PhoD PhoX PhoD	Рыбоприемный пункт (Норвегия: Тромс, Тромвик)

Оригинальное название штамма	Видовое название ¹	ID генома	ID белка	ЩФ	Источник выделения
<i>Cobetia</i> sp. 29-18-1	<i>C. amphilecti</i>	GCF_029846405.1	WP_279835410.1 WP_279835708.1 WP_279836670.1 WP_279836807.1	PhoD PhoX PafA PhoD	Пальчиковая губка <i>A. digitatus</i> (Охотское море, остров Сахалин, залив Пильтун)
<i>Cobetia</i> sp. 4B	<i>C. amphilecti</i>	GCF_018831605.1	WP_215824272.1 WP_240548688.1 WP_215822940.1 WP_215823407.1	PafA PhoD PhoX PhoD	Система течения Гумбольдта, диатомея <i>Heterostera chilensis</i> (Чили: Пуэрто-Альдеа)
<i>C. amphilecti</i> N-80	<i>C. amphilecti</i>	GCF_020217465.1	WP_225347537.1 WP_225347908.1 WP_225346724.1 WP_225347230.1	PhoD PafA PhoX PhoD	Морской (донный) осадок (Атлантический океан: море Скоша)
<i>Cobetia</i> sp. Dlab-2-U	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_024124585.1	WP_253061861.1 WP_253063154.1 WP_253064500.1 WP_253064933.1	PafA PhoD PhoX PhoD	Поверхностный слизистый слой и ткань коралла <i>D. labyrinthiformis</i> (США: Флорида, Драй-Тортугас)
<i>Cobetia</i> sp. Dlab-2-AX	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_024124625.1	WP_253061861.1 WP_253063154.1 WP_253064500.1 WP_253064933.1	PafA PhoD PhoX PhoD	Поверхностный слизистый слой и ткань коралла <i>D. labyrinthiformis</i> (США: Флорида, Драй-Тортугас)
<i>C. marina</i> 402	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_013350055.1	WP_175089240.1 WP_175090103.1 WP_254627190.1 WP_175090544.1	PhoD PhoX PhoD PafA	Аквариумная вода (Бразилия: Рио-де-Жанейро)
<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_016495405.1	WP_233593417.1 WP_200019524.1 WP_200016943.1 WP_200017549.1	PhoD PafA PhoX PhoD	Гниющая бурая водоросль, <i>Sargassum fusiforme</i> (Китай: Чжэцзян)
<i>Cobetia</i> sp. MB87	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_011319755.1	WP_240916767.1 WP_166020003.1	PhoD PhoD	Кишечник морского огурца (Вьетнам: Хон Че, залив Нячанг)
<i>C. pacifica</i> GPM2	<i>C. marina</i>	GCF_009931455.1	WP_084208519.1 WP_254696557.1 WP_254696414.1	PhoX PhoD PhoD	Красная водоросль <i>P. tenera</i> (Южная Корея)
<i>Cobetia</i> sp. 10Alg 146	<i>C. marina</i>	GCF_029846385.1	WP_279854649.1 WP_279856192.1 WP_279856235.1	PhoX PhoD PhoD	Красная водоросль <i>A. tobuchiensis</i> (Россия: Охотское море, Курильские острова)
<i>Cobetia</i> sp. 3AK	<i>C. marina</i>	GCF_029846335.1	WP_240499655.1 WP_279874635.1 WP_084208519.1	PhoD PhoD PhoX	Прибрежная морская вода (Россия: Японское море, залив Восток)
<i>Cobetia</i> sp. MMG027	<i>C. marina</i>	GCF_027947415.1	WP_271302424.1 WP_084208519.1 WP_240499655.1	PhoD PhoX PhoD	Источник не указан (США: Мишен-Бич, Сан-Диего)

Оригинальное название штамма	Видовое название ¹	ID генома	ID белка	ЩФ	Источник выделения
<i>C. marina</i> MM1IDA2H-1AD	<i>C. marina</i>	GCF_900119965.1	WP_077375791.1 WP_255303155.1 WP_258038356.1	PhoX PhoD PhoD	Эвриторальный приливный пруд на уровне моря (Чили: Вальпараисо)
<i>Cobetia</i> sp. 5-11-6-3	<i>C. marina</i>	GCF_013374055.1	WP_255303113.1 WP_255303155.1 WP_084208519.1	PhoD PhoD PhoX	Морские водоросли (Япония: Иватэ, залив Офунато)
<i>C. marina</i> T1	<i>C. marina</i>	GCF_005144735.1	WP_240704252.1 WP_240704267.1 WP_136939347.1	PhoD PhoD PhoX	Соленая вода (США: Нью-Гэмпшир, Хэмптон-Бич)
<i>C. marina</i> NBRC 15607	<i>C. marina</i>	GCF_006540105.1	WP_136939347.1 WP_240704267.1	PhoX PhoX	Источник не указан
<i>Cobetia</i> sp. 5-25-4-2	<i>C. marina</i>	GCF_013374075.1	WP_255304446.1 WP_255304452.1 WP_176494061.1	PhoD PhoD PhoX	Морские водоросли (Япония: Иватэ, залив Офунато)
<i>Cobetia</i> sp. ICG0124	<i>C. marina</i>	GCF_004006355.1	WP_127734507.1 WP_084208519.1 WP_240665388.1	PhoD PhoX PhoD	Зеленая водоросль <i>Ulva</i> sp. (Великобритания: Аберистут)
<i>Cobetia</i> sp. L2A1	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_009796845.1	WP_233266401.1 WP_024952594.1 WP_158773983.1 WP_158774142.1 WP_158774696.1	PhoD PhoX PafA PhoX PhoD	Пляж, бурые водоросли (Северный Ледовитый океан)
<i>Cobetia</i> sp. QF-1	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_002213105.1	WP_246116512.1 WP_088743230.1 WP_088743763.1 WP_088743908.1	PhoA ² PhoD PhoX PhoX	Морская вода (Китай: Циндао)
<i>C. crustatorum</i> SM1923	<i>Cobetia</i> sp.	GCF_007786215.1	WP_144726746.1 WP_088743763.1 WP_144727163.1 WP_246116512.1 WP_144728015.1	PhoD PhoD PhoX PhoA ² PhoD	Поверхностная морская вода (Конгс-фьорд, Арктика)

Примечание: 1. Видовое название указано согласно новой классификации (Nedashkovskaya et al., 2024). 2. Жирным шрифтом отмечены штаммоспецифические ЩФ PhoA.

Таблица А5 – Содержание и распределение семейств ЩФ в штаммах морских гетеротрофных гамма-протеобактерий *Vibrio* spp. и *Moritella* spp.

Вид	Штамм	ID сборки генома RefSeq	ID белка	¹ ЩФ (+/-) ²
<i>Vibrio cholerae</i> (северное озеро США)	RFB16	GCF_008369605.1	WP_001131708.1	2PhoX1(+)
<i>V. jasicida</i> (морская вода)	090810c	GCF_002887615.1	WP_038872290.1 WP_038871278.1 WP_038873495.1	1PhoD(-) 1PhoA(-) 2PhoA(-)
<i>V. splendidus</i> (устрица <i>C. gigas</i>)	2_C04b	GCF_022812045.1	WP_243579183.1 WP_017092490.1 WP_017084959.1 WP_243579973.1 WP_171307863.1	1PhoD(+) 1PhoA(-) 2PhoX(+) 2PhoX1(+) 2PhoD(+)
<i>Moritella marina</i> (глубоководная)	ATCC 15381 MP-1	GCF_008931805.1	WP_019439941.1 WP_019440633.1 WP_019441375.1	PhoD(+) PhoX(-) PhoX(-)
<i>M. yayanosii</i> (донные отложения 10000 м, 80-100 Па)	DB21MT 5	GCA_900465055.1	WP_174216900.1 WP_112713845.1	³ PhoA(+) PhoX(-)
<i>M. dasanensis</i> (арктический океан)	ArB 0140	GCF_000276805.1	WP_017219885.1 WP_017220426.1 WP_017220454.1	PhoA(-) PhoD(-) PhoD(+)
<i>M. viscosa</i> (атлантический лосось)	LFI 5006	GCF_900120065.1	WP_075471433.1 WP_045110161.1 WP_045111916.1	PhoD(+) PhoA(-) PhoX(+)

Примечание: 1. Номер хромосомы (1 или 2) в геномах *Vibrio* spp. 2. Направление цепи кодирующей ДНК (+/-). 3. Идентифицирован регулятор транскрипции PhoP(-) (GenBank: SQD76818): “Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein PhoP [*Moritella yayanosii*]”, который относится к регулятору ответа MtrA двухкомпонентной системы трансдукции MtrAB (репликация, осмопротекция и патогенез) (Fol et al., 2006).

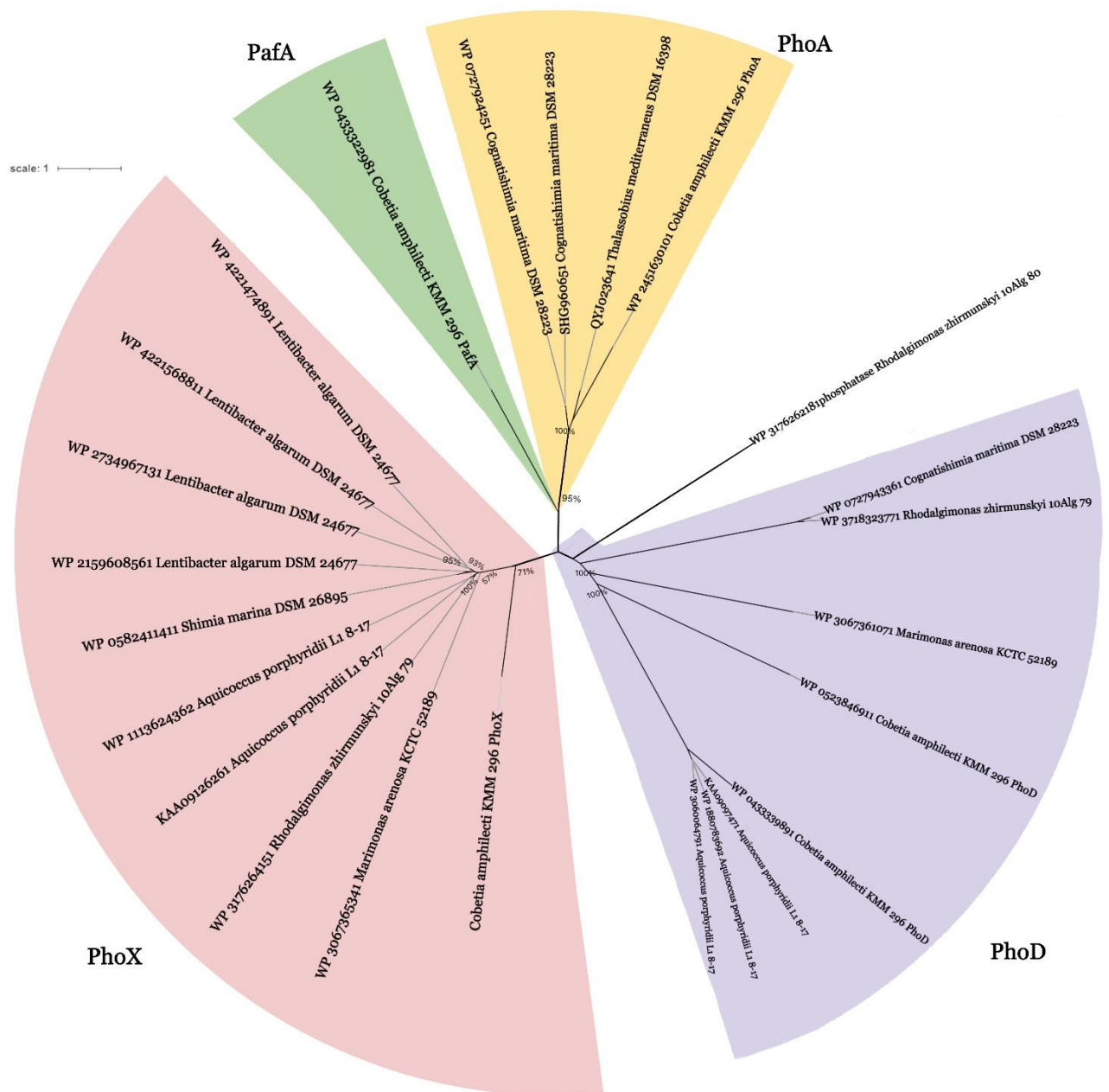


Рисунок А5 – Филогенетическое дерево (ML), построенное на основе аминокислотных последовательностей ЦФ альфа-протеобактерии *R. zhirmunskiy* и типовых видов семейства *Roseobacteraceae*. Визуализация выполнена в веб-сервисе iTOL. В качестве референсных последовательностей использованы ЦФ *C. amphilecti*. В качестве внешней группы (outgroup) выбран белок семейства эндонуклеаз/экзонуклеаз/фосфатаз (WP_317626218.1) из *R. zhirmunskiy*. Дерево реконструировано в программе RAxML с использованием модели замещения Dayhoff и аппроксимации скоростей эволюции по сайтам (CAT). Множественное выравнивание выполнено с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA11 и конвертировано в формат relaxed PHYLIP. Статистическая поддержка узлов оценена методом бутстреп-анализа (1000 реплик). Приведены значения бутстреп не менее 50 %. Последовательности ЦФ сгруппированы по семействам: PhoD, PhoA, PafA и PhoX. Номера доступа NCBI указаны перед названиями штаммов

2.Cobetia_ amphiecti B2M1	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
20.Cobetia_ pacifica GPM2	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
21.Cobetia_ sp_ 10Alg_ 146	purN	phos purN	NA	purN	phos	NA	autotri	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
22.Cobetia_ sp_ 3AK_ GCF	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	idCTP				
23.Cobetia_ pacifica NRIC	NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron	NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
24.Cobetia_ sp_ MMG027	G	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect				
25.Cobetia_ sp_ MM1DA2H	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
26.Cobetia_ marina MM1ID	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
27.Cobetia_ sp_ 5-11-6-3	G	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	idCTP			
28.Cobetia_ marinaT1	GCF	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect				
29.Cobetia_ marina NBRC	NA	electrc	NA	DUF4	NA	DUF4	NA	NAD	f	NA	IRHS	r	NA	HNH	e	NA	Imm5	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect
3.Cobetia_ sp_ 2AS1	GCF	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	idCTP			
30.Cobetia_ sp_ 5-25-4-2	G	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect				
31.Cobetia_ sp_ ICG0124	G	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP	NA	autotri	
32.Cobetia_ marina JCM_ 21	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP		
33.Cobetia_ sp_ L2A1	GCF	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
34.Cobetia_ sp_ QF-1	GCF	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP	
35.Cobetia_ crustatorum SV	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP		
36.Cobetia_ crustatorum JO	NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron	NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect					
4.Cobetia_ sp_ 2AS	GCF	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP	
5.Cobetia_ sp_ 1AS1	GCF	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP	
6.Cobetia_ litoralis NRIC_ 08	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP		
7.Cobetia_ sp_ MC34	GCF	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect				
8.Cobetia_ sp_ 1CM21F	GCF	rsxD	NA	rsxD	elect	rsxC	NA	rsxC	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxA	NA	rsxA	elect	NA	DUF3	metG	NA	TerB	NA	cell	NA	RNA	NA	apbC	NA	apbC	iron	ddc	NA	ddc	idCTP	
9.Cobetia_ sp_ 29-18-1	GCF	purN	phos NA	autotri	ddc	NA	ddc	idCTP	apbC	NA	apbC	iron-NA	RNA	NA	cell	NA	TerB	metG	NA	DUF3	rsxA	NA	rsxA	elect	rsxB	NA	rsxB	elect	rsxC	NA	rsxC	elect				

Рисунок А6 – Результаты анализа геномов 36-ти штаммов *Cobetia* spp. в приложении Syntenome. В десяти штаммах *Cobetia* spp. идентифицирован безымянный ген (N/A) с аннотированным продуктом «alkaline phosphatase» (выделены красным цветом)

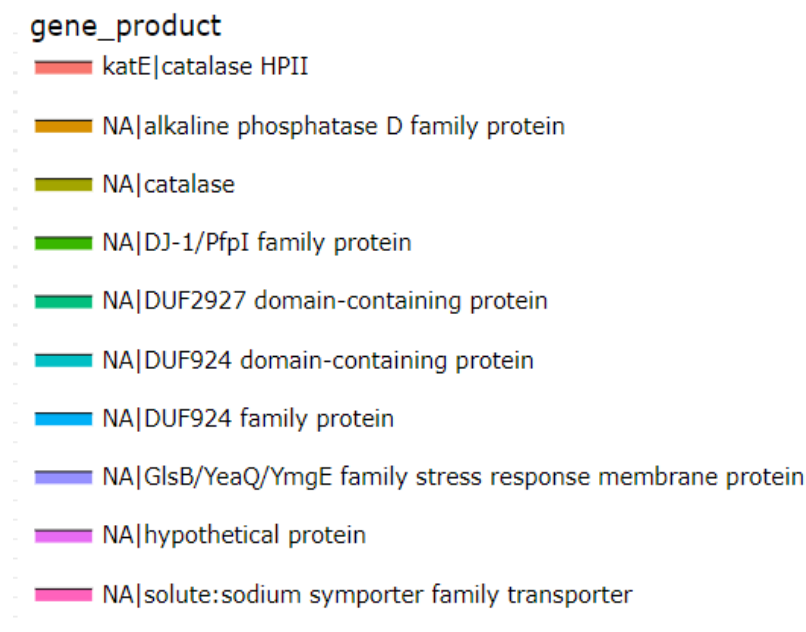
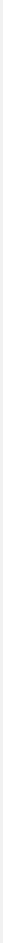


Рисунок А7 - Генное окружение кодирующих последовательностей ЩФ PhoD (NA/alkaline phosphatase D family protein) у 36-ти штаммов *Cobetia* spp. (часть генных кластеров инвертирована). Идентификация генных кластеров выполнена в веб-приложении Syntenome по аннотации продуктов генов (gene_product)

gene_product


cra catabolite repressor/activator
fruB fused PTS fructose transporter subunit IIA/HPr protein
modA molybdate ABC transporter substrate-binding protein
modB molybdate ABC transporter permease subunit
modC molybdenum ABC transporter ATP-binding protein
NA 1-phosphofructokinase family hexose kinase
NA ACP phosphodiesterase
NA alkaline phosphatase family protein
NA ATP-binding protein
NA bifunctional GNAT family N-acetyltransferase/carbon-nitrogen hydrolase family protein
NA carbon-nitrogen hydrolase family protein
NA DUF3581 family protein
NA glutathione S-transferase N-terminal domain-containing protein
NA Gp49 family protein
NA histone deacetylase
NA HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit
NA hypothetical protein
NA LysR family transcriptional regulator
NA M90 family metalloproteinase
NA molybdopterin-dependent oxidoreductase
NA MOSC domain-containing protein
NA N4-gp56 family major capsid protein
NA oxidoreductase
NA PTS fructose-like transporter subunit IIB
NA response regulator
NA sensor histidine kinase
NA TolC family protein
NA type I secretion system permease/ATPase
ptsP phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase
sclD selenide, water dikinase SclD

Рисунок А8 – Первый тип генного кластера *phoX/pafA* (NA/alkaline phosphatase family protein) у *Cobetia* spp. Идентификация генных кластеров выполнена в веб-приложении Syntenome по аннотации продуктов генов (gene_product)

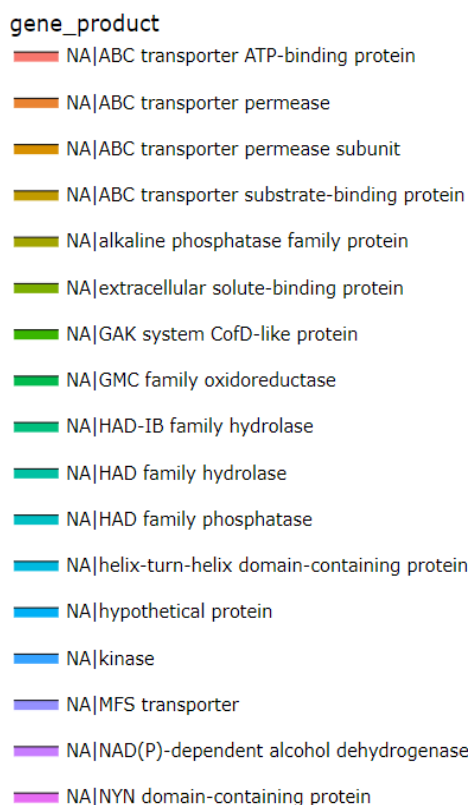


Рисунок А9 – Второй тип генных кластеров биосинтеза ЩФ PhoX/PafA (NA/alkaline phosphatase family protein) у *Cobetia* spp. Идентификация генных кластеров выполнена в веб-приложении Syntenome по аннотации продуктов генов (gene_product)

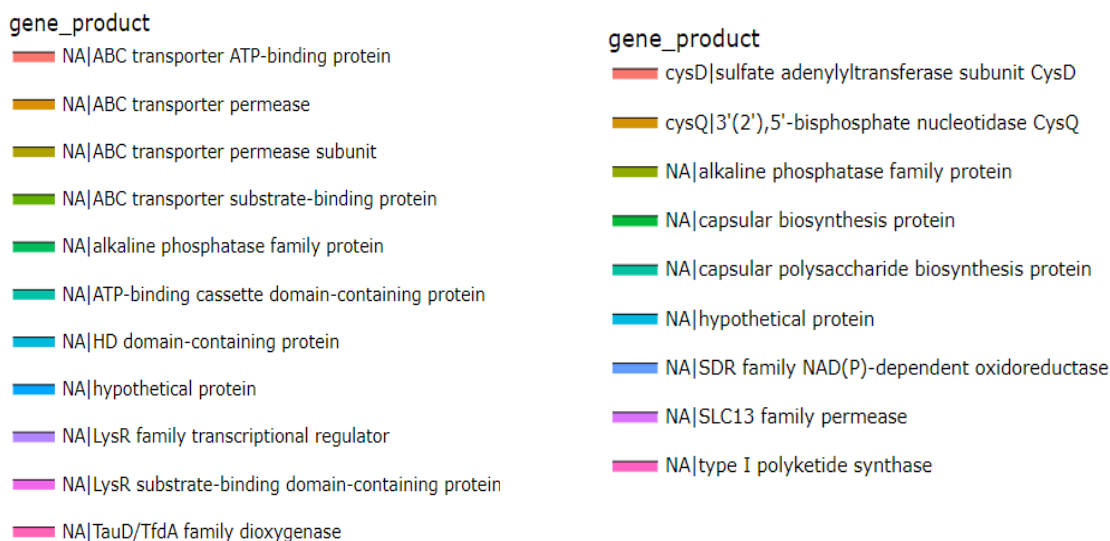
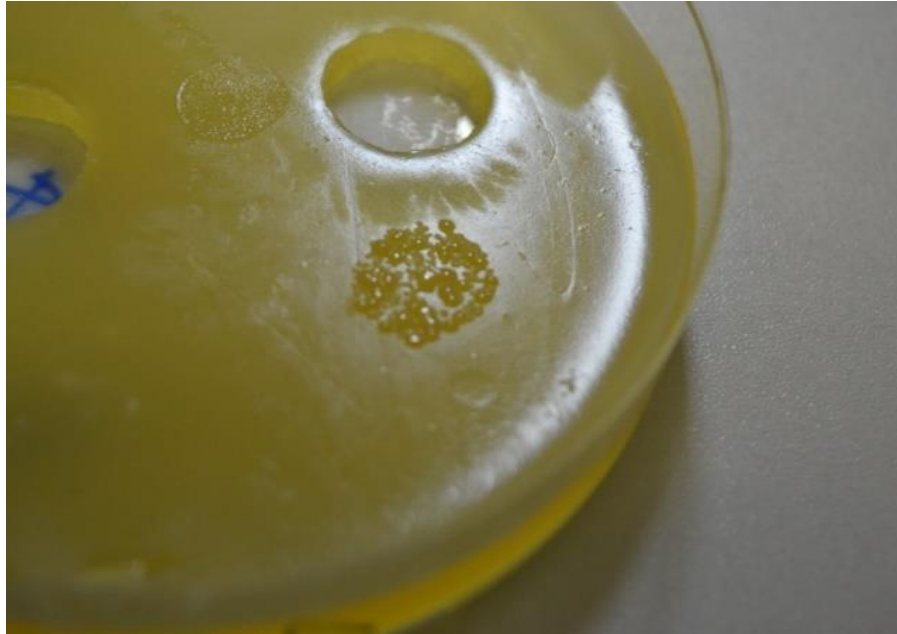


Рисунок А10 – Третий (слева) и четвертый (справа) типы генных кластеров биосинтеза ЩФ PhoX/PafA (NA/alkaline phosphatase family protein) у *Cobetia* spp. Идентификация генных кластеров выполнена в веб-приложении Syntenome по аннотации продуктов генов (gene_product)

А



Б

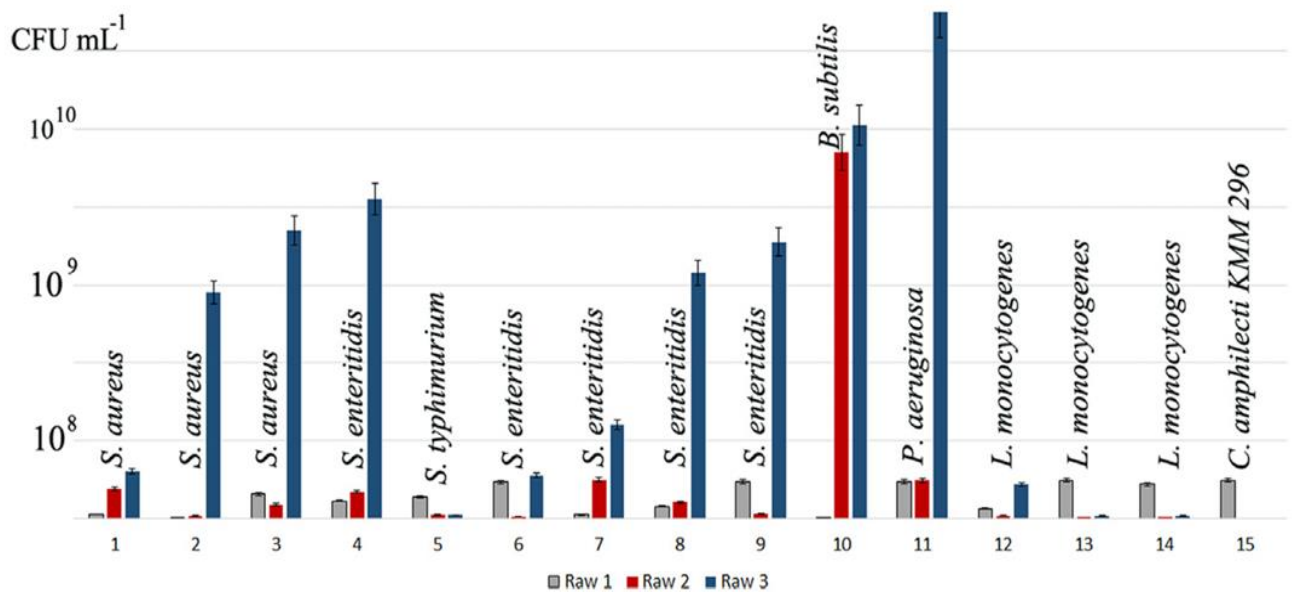


Рисунок А11 – А. Колонизация клетками *C. amphilecti* КММ 296 зон деградации 10-суточной биопленки *P. aeruginosa* РАЕМ, предварительно обработанных ЩФ СтАР (10 мкл, 2,5 Ед/мл).

Снимок сделан после 7 суток инкубации при комнатной температуре. Б. Изменение численности жизнеспособных клеток при совместном культивировании *C. amphilecti* КММ 296 с бактериальными изолятами из замороженных пищевых полуфабрикатов. Ось у – титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл (CFU/mL); Ось х – исследуемые культуры: ряд 1 (Row 1, серые столбцы) – монокультура *C. amphilecti* КММ 296; ряд 2 (Row 2, красные столбцы) – совместная культура; ряд 3 (Row 3, синие столбцы) – монокультура пищевого изолята

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б1 – Кодированные последовательности 16S рНК в геномах *P. distincta* 16-SW-7, ATCC 700518^T, KMM 3548^T и *P. arctica* A 37-1-2^T

Название генома	Номер локус_тега 16S рНК	Идентичность, %	Номер доступа хромосомы/ генома	Название хромосомы (контига)/ длина	Координаты
<i>P. distincta</i> 16-SW-7	FFU37_04590*	100.00	CP040558	L1/3735685	1023946..1025481
	FFU37_00210	100.00	CP040558	L1/ 3735685	48439..49974
	FFU37_18380	99.94	CP040559	S1/795760	375599..377134
	FFU37_15325	99.94	CP040558	L1/3735685	3416198..3417733
	FFU37_14755	99.94	CP040558	L1/3735685	3277653..3279188
	FFU37_15610	99.87	CP040558	L1/3735685	3477632..3479167
	FFU37_14215	99.87	CP040558	L1/3735685	3172769..3174304
	FFU37_00060	99.87	CP040558	L1/3735685	16934..18469
<i>P. arctica</i> A 37-1-2 ^T	PARC_br026	100.00	CP011026	Chr II/ 783876	192599..194122
	PARC_ar001	99.61	CP011025	Chr I/ 3840834	36983..38506
	PARC_ar004	99.67	CP011025	Chr I/ 3840834	313581..315104
	PARC_ar007	99.28	CP011025	Chr I/ 3840834	345719..347242
	PARC_ar012	99.34	CP011025	Chr I/ 3840834	2483422..2484945
	PARC_ar016	99.67	CP011025	Chr I/ 3840834	3068857..3070380
	PARC_ar019	99.28	CP011025	Chr I/ 3840834	3589860..3591383
	PARC_ar022	99.67	CP011025	Chr I/ 3840834	3690377..3691900
	PARC_ar025	99.67	CP011025	Chr I/ 3840834	3815090..3816613
<i>P. paragorgicola</i> KMM 3548 (= <i>P. Distincta</i> KMM 3548)	PPAR_ar004	99.87	AQHE01000014	14/ 767276	187495..189018
	PPAR_ar007	100.00	AQHE01000021	21/ 300025	298305..299828
<i>P. distincta</i> 2-2A-13	NQU47_RS19790	100.00	JANIHL010000061	Контиг 61/1771	192..1727
<i>P. distincta</i> ATCC 700518 ^T	QT16_19995	99.94	JWIG01000030	C30/ 180150	175393..176935

Примечание – * Последовательности генов 16S рНК идентифицированы в геномах *Pseudoalteromonas* spp. с помощью программы BLAST (NCBI) по поисковому запросу последовательности FFU37_04590, кодирующей 16S рНК, выделенной из основной хромосомы L1 штамма *P. distincta* 16-SW-7 (GenBank ID: CP040558).

Таблица Б2 – Список геномов *Pseudoalteromonas* spp. для филогеномного анализа

Штамм	Номер сборки генома NCBI
<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126 ^T	GCF_000172635.2
<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> DSM 14585 ^T	GCF_002310855.1
<i>Pseudoalteromonas aliena</i> SW19 ^T	GCF_014905615.1
<i>Pseudoalteromonas amylolytica</i> JW1 ^T	GCF_001854605.1
<i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> JCM 17292 ^T	GCF_001550155.1
<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2 ^T	GCF_000238395.3
<i>Pseudoalteromonas aurantia</i> 208 ^T	GCF_014858725.1
<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> JCM 12483 ^T	GCF_001854475.1
<i>Pseudoalteromonas caenipelagi</i> JBTF-M23 ^T	GCF_013140855.1
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> ATCC 43555 ^T	GCF_900239935.1
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> IAM 12662 ^T	GCF_014925295.1
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> NBRC 12985 ^T	GCF_006539245.1
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> DSM 8771 ^T	GCF_000238375.3
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> DSM 6059 ^T	GCF_900112265.1
<i>Pseudoalteromonas distincta</i> 16-SW-7	GCF_005877035.1
<i>Pseudoalteromonas distincta</i> 2-2A-13	JANIHL010000000
<i>Pseudoalteromonas distincta</i> ANT/505	GCF_000212655.2
<i>Pseudoalteromonas distincta</i> ATCC 700518 ^T	GCF_000814675.1
<i>Pseudoalteromonas distincta</i> U2A	GCF_008370225.1
<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i> HJ51 ^T	GCF_003515105.1
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> SM1926	GCF_007786285.1
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> VKPM B-3905^T	JANJFO000000000
<i>Pseudoalteromonas espejiana</i> DSM 9414 ^T	GCF_002221525.1
<i>Pseudoalteromonas espejiana</i> NBRC 102222 ^T	GCF_007989585.1
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> DSM 14401 ^T	GCF_014858715.1
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> LMG 20361 ^T	GCF_014596995.1
<i>Pseudoalteromonas fuliginea</i> KMM 216 ^T	GCF_000690055.1
<i>Pseudoalteromonas galathea</i> S4498 ^T	GCF_005886105.2
<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i> NH153 ^T	GCF_001641615.1
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> ATCC 14393 ^T	GCF_000238355.1
<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> KCTC 12958	GCF_001455325.1
<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> KMM 3549 ^T	GCF_002310795.1
<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> CGMCC 1.8499 ^T	GCF_900116435.1
<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> LMEB 39 ^T	GCF_014925285.1
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> CH130 ^T	GCF_014925325.1
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> DSM 6061 ^T	GCF_001625655.1
<i>Pseudoalteromonas maricaloris</i> LMG 19692 ^T	GCF_012641725.1
<i>Pseudoalteromonas marina</i> DSM 17587 ^T	GCF_000238335.3
<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i> NCIMB 1770 ^T	GCF_021613355.1
<i>Pseudoalteromonas neustonica</i> PAMC 28425 ^T	GCF_001653135.1
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> KMM 661 ^T	GCF_002221505.1
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> NBRC 103036 ^T	GCF_007991255.1
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> NCTC 10691 ^T	GCF_900455185.1
<i>Pseudoalteromonas ostreae</i> hOe-66 ^T	GCF_018069805.1

<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i> KMM 3548 ^T	GCF_014918315.1
<i>Pseudoalteromonas peptidolytica</i> DSM 14001 ^T	GCF_012641745.1
<i>Pseudoalteromonas peptidolytica</i> F12-50-A1 ^T	GCF_014858745.1
<i>Pseudoalteromonas peptidolytica</i> NBRC 101021 ^T	GCF_007989895.1
<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> JCM 21460 ^T	GCF_014925335.1
<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> KCTC 12086 ^T	GCF_001444405.1
<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> O-BC30 ^T	GCF_004103265.1
<i>Pseudoalteromonas piratica</i> OCN003 ^T	GCF_000788395.1
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057 ^T	GCF_000382005.1
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779 ^T	GCF_000238315.3
<i>Pseudoalteromonas profundus</i> CGMCC 1.15394 ^T	GCF_014642695.1
<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i> ACAM 620 ^T	GCF_014925355.1
<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i> DSM 14232 ^T	GCF_001661495.1
<i>Pseudoalteromonas rhizosphaerae</i> RA15 ^T	GCF_902498845.1
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> DSM 6842 ^T	GCF_000238295.3
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> LMG 19699 ^T	GCF_008808095.1
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> JCM 18891 ^T	GCF_001550135.1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AC163	GCF_000497935.1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TAE79	GCF_000498015.1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TAE80	GCF_000498035.1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TB25	GCF_000497995.1
« <i>Pseudoalteromonas spiralis</i> » DSM 16099	GCF_001596815.1
<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> UST010723-006 ^T	GCF_000238255.3
« <i>Pseudoalteromonas telluritireducens</i> » DSM 16098	GCF_001596795.1
<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> GFC ^T	GCF_002310835.1
<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> NBRC 103034 ^T	GCF_007991235.1
<i>Pseudoalteromonas translucida</i> KMM 520 ^T	GCF_001465295.1
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2 ^T	GCF_000153245.1
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2 ^T	GCF_003568825.1
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> DSM 14096 ^T	GCF_002310815.1
<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> UL12 ^T	GCF_014925405.1
<i>Pseudoalteromonas undina</i> DSM 6065 ^T	GCF_000238275.3

Примечание – Последовательности геномов, полученные методом секвенирования в данном исследовании, выделены жирным шрифтом.

Таблица БЗ – Идентификаторы генов активных гибридных БГК арилполиена и резорцина в геномах пигментированных штаммов *P. arctica*, *P. distincta* и *P. paragorgicola*

Название штамма	Геномный регион		Номер локус_тега	Функциональная аннотация сервера antiSMASH
<i>P. arctica</i> A 37-1-2 ^T	NZ_CP011026		PARC_RS19935	Транспорт
			PARC_RS19940 PARC_RS19945 PARC_RS19950 PARC_RS19955 PARC_RS19960	Другое
			PARC_RS19965	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS19970 PARC_RS19980	Другое
			PARC_RS19985	Регуляция
			PARC_RS19990	Транспорт
			PARC_RS20000	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20005 PARC_RS20010 PARC_RS20015 PARC_RS20020 PARC_RS21660 PARC_RS20025 PARC_RS20030 PARC_RS20035 PARC_RS20040 PARC_RS20045 PARC_RS20050	Другое
			PARC_RS20055	Основной биосинтез
			PARC_RS20060 PARC_RS20065 PARC_RS20070	Другое
			PARC_RS20075	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20080 PARC_RS20085	Транспорт
			PARC_RS20090	Другое
			PARC_RS20095	Основной биосинтез
			PARC_RS20100 PARC_RS20105	Другое
			PARC_RS20110 PARC_RS20115 PARC_RS20120	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20125	Другое
			PARC_RS20130	Дополнительные биосинтетические функции

Продолжение таблицы Б3

<i>P. arctica</i> A 37-1-2 ^T	NZ_CP011026		PARC_RS20135	Другое
			PARC_RS20140	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20145 PARC_RS20150 PARC_RS20155 PARC_RS20160	Другое
			PARC_RS20165 PARC_RS20170	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20175	Другое
			PARC_RS20180	Основной биосинтез
			PARC_RS20185	Другое
			PARC_RS20190	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20195	Основной биосинтез
			PARC_RS20200 PARC_RS20205 PARC_RS20210	Другое
			PARC_RS20215	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20220 PARC_RS20225 PARC_RS20230 PARC_RS20235	Другое
			PARC_RS20240	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20245 PARC_RS20250 PARC_RS20255	Другое
			PARC_RS20260	Дополнительные биосинтетические функции
			PARC_RS20265	Регуляция
			PARC_RS20270 PARC_RS20275 PARC_RS20280	Другое
<i>P. distincta</i> 2-2A-13	NODE_2		NQU47_03185	Транспорт
			NQU47_03180 NQU47_03175 NQU47_03170 NQU47_03165 NQU47_03160	Другое
			NQU47_03155	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_03150	Другое

Продолжение таблицы Б3

<i>P. distincta</i> 2-2A-13	NODE_2		NQU47_03145	Регуляция
			NQU47_03140	Транспорт
			NQU47_03135	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_03130 NQU47_03125 NQU47_03120 NQU47_03115 NQU47_03110 NQU47_03105 NQU47_03100 NQU47_03095 NQU47_03090 NQU47_03085 NQU47_03080 NQU47_03075 NQU47_03070	Другое
			NQU47_03065	Основной биосинтез
			NQU47_03060 NQU47_03055 NQU47_03050 NQU47_03045	Другое
			NQU47_03040	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_03035 NQU47_03030	Транспорт
			NQU47_03025	Другое
			NQU47_03020	Основной биосинтез
			NQU47_03015 NQU47_03010	Другое
			NQU47_03005 NQU47_03000 NQU47_02995	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02990	Другое
			NQU47_02985	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02980	Другое
			NQU47_02975	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02970 NQU47_02965 NQU47_02960 NQU47_02955	Другое
			NQU47_02950 NQU47_02945	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02940	Другое

Продолжение таблицы Б3

<i>P. distincta</i> 2-2A-13	NODE_2		NQU47_02935	Основной биосинтез
			NQU47_02930	Другое
			NQU47_02925	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02920	Основной биосинтез
			NQU47_02915 NQU47_02910 NQU47_02905	Другое
			NQU47_02900	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02895 NQU47_02890 NQU47_02885	Другое
			NQU47_02880	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02875 NQU47_02870 NQU47_02865	Другое
			NQU47_02860	Дополнительные биосинтетические функции
			NQU47_02855	Регуляция
			NQU47_02850 NQU47_02845 NQU47_02840	Другое
<i>P. paragorgicola</i> KMM 3548 ^T (= <i>P. Distincta</i> KMM 3548)	NZ_AQHE01000022		PPAR_RS18555	Транспорт
			PPAR_RS18560 PPAR_RS18565 PPAR_RS18570 PPAR_RS18575 PPAR_RS18580	Другое
			PPAR_RS18585	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18590	Другое
			PPAR_RS18595	Регуляция
			PPAR_RS18600	Транспорт
			PPAR_RS18605	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18610 PPAR_RS18615 PPAR_RS18620 PPAR_RS18625 PPAR_RS18630 PPAR_RS18635 PPAR_RS18640 PPAR_RS18645 PPAR_RS18650	Другое

Продолжение таблицы Б3

* <i>P. paragorgicola</i> KMM 3548 ^T (= <i>P. distincta</i> KMM 3548)	NZ_AQHE01000022		PPAR_RS18665	Основной биосинтез
			PPAR_RS18670 PPAR_RS18675 PPAR_RS18680 PPAR_RS18685	Другое
			PPAR_RS18690	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18695	Транспорт
			PPAR_RS18700 PPAR_RS18705	Другое
			PPAR_RS18710	Основной биосинтез
			PPAR_RS18715 PPAR_RS18720	Другое
			PPAR_RS18725 PPAR_RS18730 PPAR_RS18735	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18740	Другое
			PPAR_RS18745	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18750	Другое
			PPAR_RS18755	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18760 PPAR_RS18765 PPAR_RS18770 PPAR_RS18775	Другое
			PPAR_RS18780 PPAR_RS18785	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18790	Другое
			PPAR_RS18795	Основной биосинтез
			PPAR_RS18800	Другое
			PPAR_RS18805	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18810	Основной биосинтез
			PPAR_RS18815 PPAR_RS18820 PPAR_RS18825	Другое
			PPAR_RS18830	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18835 PPAR_RS18840 PPAR_RS18845	Другое
			PPAR_RS18850	Дополнительные биосинтетические функции
			PPAR_RS18855	Другое

Таблица Б4 – Номера доступа геномов штаммов *P. distincta* по данным сервера EzBiocloud (дата обращения: 09.02.2023)

Номера геномов NCBI	Оригинальное название	Штамм	Источник выделения	Место выделения	Страна	Год
GCA_000814675.1	<i>Pseudoalteromonas distincta</i>	ATCC 700518 (Type)	морская губка	Берингово море, 175 км от Камчатки	Россия	1989
GCA_000497935.1	<i>P. haloplanktis</i>	AC163	антарктическая губка	-	-	-
GCA_000497995.1	<i>P. haloplanktis</i>	TB25	антарктическая губка	-	-	-
-GCA_000498015.1	<i>P. haloplanktis</i>	TAE79	водная толща	-	-	-
*GCA_000498035.1	<i>P. haloplanktis</i>	TAE80	водная толща	-	-	-
GCA_000212655.3	<i>P. haloplanktis</i>	ANT/505	-	-	-	-
GCA_005877035.1	<i>P. distincta</i>	16-SW-7	Морская вода	Побережье, Охотское море, Курильские о-ва	Россия	2017
GCA_007786285.1	<i>P. elyakovii</i>	SM1926	-	-	-	2017
GCA_008370225.1	<i>P. distincta</i>	U2A	Поверхность фукуса	Пляж Уиллоус, Колумбия (BC)	Канада	2012
GCA_000803085.1	<i>P. flavipulchra</i> NCIMB 2033 = ATCC BAA-314	ATCC BAA-314	Морская вода	Ница	Франция	1978

*

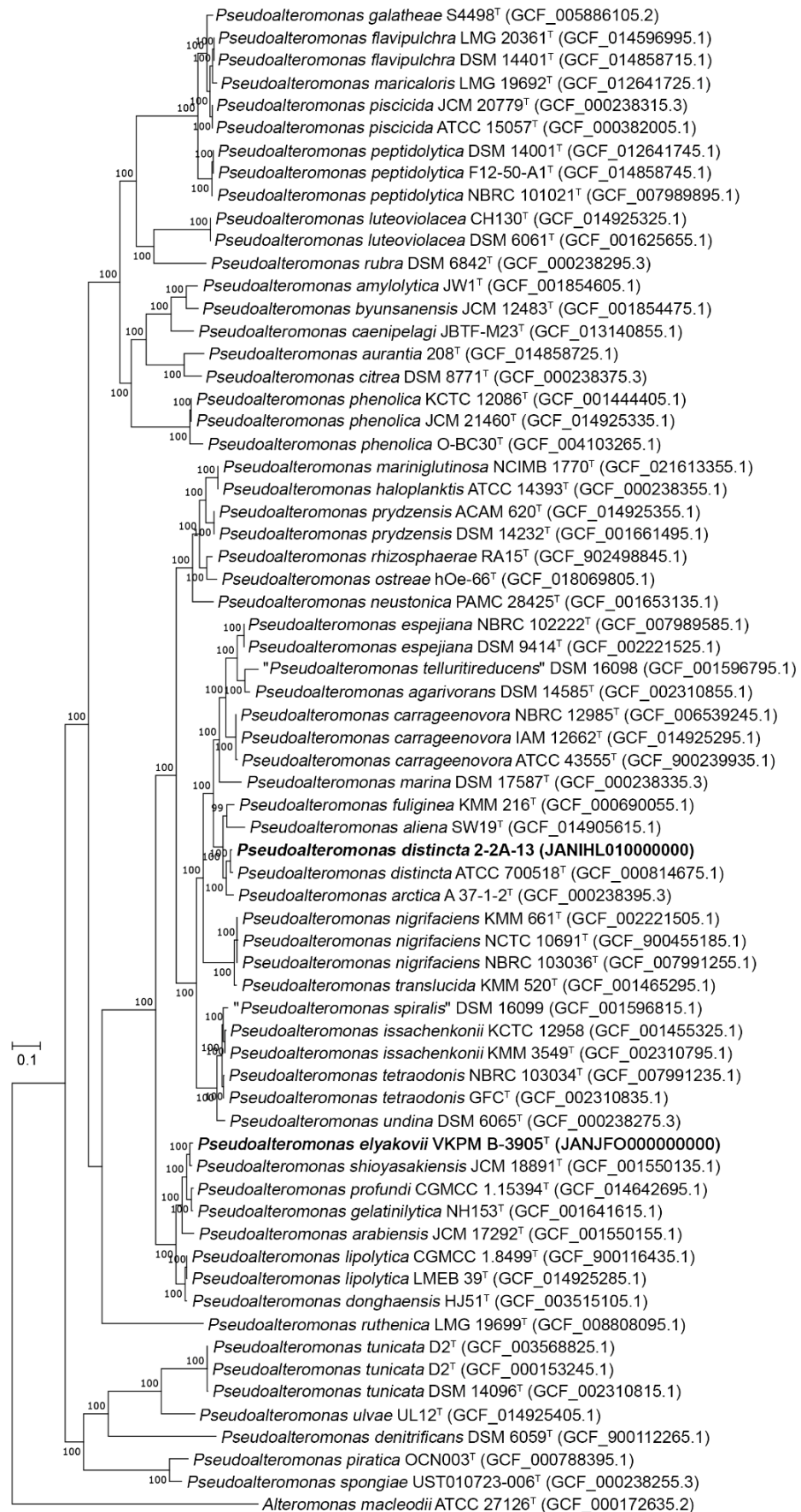


Рисунок Б1 – Полное филогеномное дерево рода *Pseudoalteromonas*. Геномы с одинаковым видовым названием получены от типовых штаммов, депонированных в разных международных коллекциях микроорганизмов, и секвенированы разными авторами

ПРИЛОЖЕНИЕ В



Рисунок В1 – Филогенетическое дерево ML 16S рДНК, показывающее расположение нового штамма 10Alg 79T (KMM 6723^T) между представителями семейства *Rosebacteraceae* (ранее *Rhodobacteriaceae*). Значения бутстрепа (%) основаны на 500 репликах. Масштаб – 0,5 замен на нуклеотид. Штамм *Caulobacter vibrioides* CB51^T/DSM 9893^T использован в качестве внешней группы. В скобках указаны номера доступа генов в репозитории GenBank/EMBL/DDB

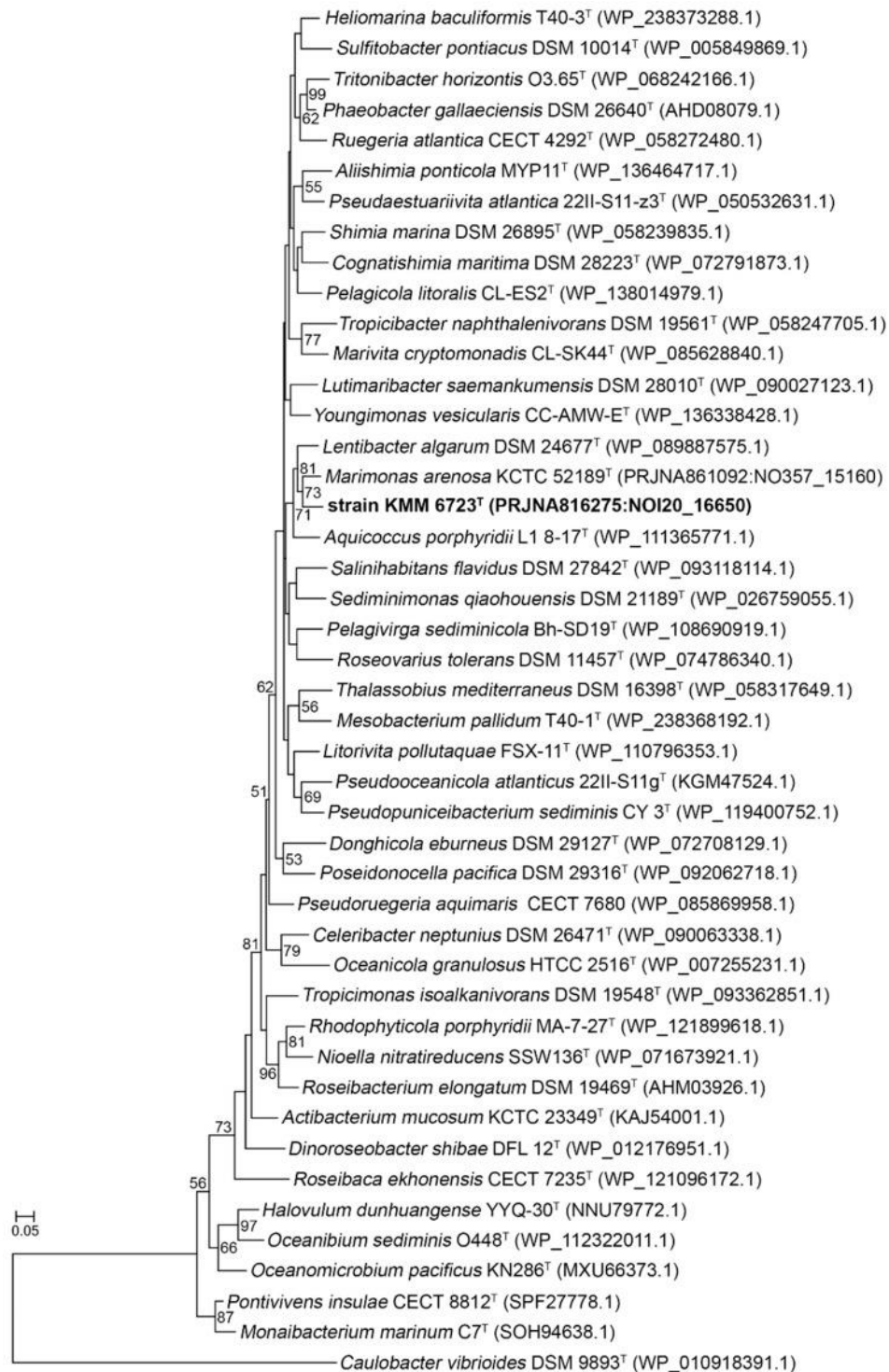


Рисунок В2 – Анализ ML белковых последовательностей RpoC, показывающий филогенетические отношения между новым штаммом 10Alg 79^T (KMM 6723^T) и 43-мя представителями семейства *Rosebacteraceae* (ранее *Rhodobacteriaceae*). Значения бутстрепа основаны на 500 репликах и представлены в процентах ($\geq 50\%$). Масштаб – 0,5 замен на одну аминокислотную позицию. Штамм *Caulobacter vibrioides* DSM 9893^T использован в качестве внешней группы. В скобках указаны номера доступа GeBank/EMBL/DDB

Таблица В1 – Фенотипические характеристики штамма 10Alg 79^T (1) и родственных родов *A. porphyridii* L1 8-17^T (2), *M. arenosa* KCTC 52189^T (3), *L. algarum* DSM 24677^T (4)

Характеристика	(1)	(2)	(3)	(4)
Источник выделения	Москря красная водоросль	Морская красная водоросль	Морской песок	Морская вода
Цвет колоний	Бежевый	Белесый	Бежевый	Белесый
Морфология	Круглый	Круглый	Круглый	Круглый
Температура роста (°C) *:	4–40	20–40	20–37	22–28
Соленость (% NaCl) *:	0–5	0–7	0–6	3–9
Редукция нитрата	-	-	-	+
Продукция ацетона (3-гидроксибутанон или ацетил метил карбинол)	-	-	-	+
Выделение H ₂ S	-	+	-	-
Деградация:				
Эскулин	W	-	-	+
Желатин	-	-	+	-
Крахмал	W	-	-	-
Твин 40 и 80	+	-	-	+
Тирозин	-	+	-	ND
Производство кислоты из:				
Д-фруктоза, Д-глюкоза, мальтоза, сахароза, Д-ксилоза	-	-	-	+
Ассимиляция:				
Л-арабиноза, мальтоза	+	+	-	+
Д-целлобиоза, Д-фруктоза,	+	-	-	+
Д-лактоза, Д-мелибиоза	+	-	-	ND
Д-глюкоза, Д-манноза	+	-	-	+
Д-маннитол	+	-	+	+
Н-ацетилглюкозамин	+	-	-	-
Адипат	+	-	+	-

Продолжение таблицы В1

Характеристика	(1)	(2)	(3)	(4)
Цитрат	-	-	-	+
Глюконат	+	-	+	+
Малат	+	+	+	-
Фенилацетат	+	+	-	-
Устойчивость к:				
Ампициллин, карбенициллин	+	-	+	+
Гентамицин	+	-	+	-
Бензилпенициллин	+	-	-	+
Канамицин	+	+	+	-
Оксациллин	+	-	-	-
Тетрациклин	+	+	-	-
Ванкомицин	+	+	-	+
Основные полярные липиды	PC, PG, PE, AL, PL, L	PC, PG, PE, AL, PL, L	PC, PG, PE, AL, GL	PC, PG, PE, AL, L

Примечание – + – положительный результат, - – отрицательный результат; W – слабая реакция; ND – нет данных, PC – фосфатидилхолин, PG – фосфатидилглицерин; PE – фосфатидилэтанолламин, AL – неидентифицированный аминолипид; PL – неидентифицированный фосфолипид, L – неидентифицированный липид, GL – неидентифицированный гликолипид. Все штаммы показали положительные результаты в следующих тестах: дыхательный тип метаболизма; активность щелочной фосфатазы, эстеразы (C4), эстеразы-липазы (C8), лейцин-ариламидазы, кислой фосфатазы, нафтол-AS-BI-фосфогидролазы, каталазы и оксидазы; чувствительность к эритромицину и устойчивость к полимиксину. Все штаммы показали отрицательные результаты в следующих тестах: подвижность; образование индола; гидролиз агара, казеина; образование кислоты из D-лактозы, D-мелибиозы, L-рамнозы и рибозы; активность липазы (C14), цистин-ариламидазы, трипсина, α -химотрипсина, α -галактозидазы, β -галактозидазы, β -глюкуронидазы, α -глюкозидазы, β -глюкозидазы, N-ацетил- β -глюкозаминидазы, α -маннозидазы и α -фукозидазы.

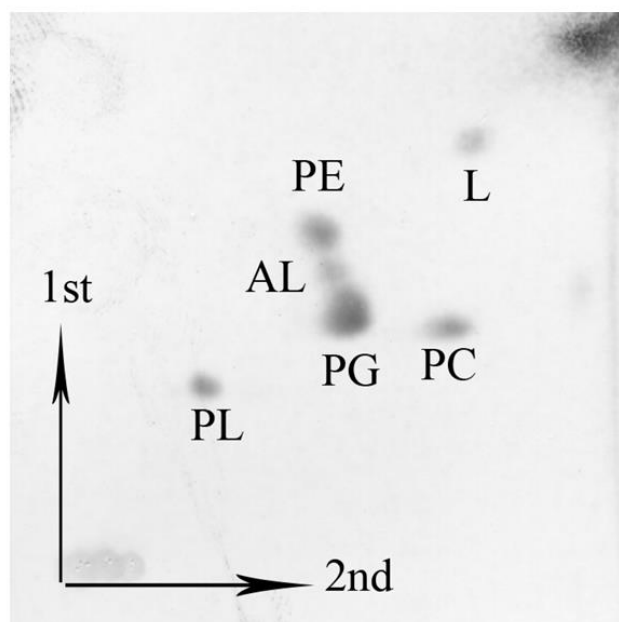


Рисунок В3 – Результат двумерной ТСХ суммарных полярных липидов штамма 10Alg 79^T. Первое направление (1st) – хлороформ/метанол/вода (65: 25: 4, v/v/v), второе направление (2st) – хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода (80: 12: 15: 4, v/v/v/v). PE – фосфатидилэтаноламин, PG – фосфатидилглицерин, PC – фосфатидилхолин, AL – неидентифицированный аминокислотный липид, PL – неидентифицированный фосфолипид, L – неидентифицированный липид