Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

МЕЛЬНИКОВА Дарья Игоревна

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИМБИОНТЫ НЕМЕРТИН (NEMERTEA): БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Магарламов Тимур Юсифович

ВЛАДИВОСТОК – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4
ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14
1.1. Таксономическое разнообразие и распространение ТТХ-продуцирующих бактерий 14
1.2. Особенности выявления ТТХ в бактериях 24
1.3. Особенности продукции ТТХ в бактериях 28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 31
2.1. Объект исследования 31
2.2. Бактериальные штаммы и условия культивирования 32
2.3. Метагеномный анализ микрофлоры немертин 32
2.4. Микробиологический анализ микрофлоры немертин 36
2.5. Микроскопические исследования 38
2.6. Биотестирование экстрактов клеток штаммов *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) 41
2.7. ВЭЖХ-МС/МС экстрактов клеток штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 45
2.8. Стимуляция спорообразования у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 49
2.9. Определение полной геномной последовательности штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 53
3.1. Таксономический состав микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин 53
3.2. Анализ культивируемой микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин 62
3.3. Нейротоксический эффект экстрактов штаммов *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 на культуру клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) 66
3.4. ТТХ и его производные в штамме *Cytobacillus gottheilii* 1839 69
3.5. Жизненный цикл штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 при выращивании на твердых и жидких питательных средах 71
3.6. Стимуляция спорообразования у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 78
3.7. Анализ полного генома штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 80

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 107
ВЫВОДЫ 108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 109

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ББА – ионизация бомбардировкой быстрыми атомами

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГО – геномные островки

ГХ – газовая хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимический анализ

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЭР – ионизация электрораспылением

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная РНК

МАЛДИ-(TOF)МС – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с масс-спектрометрией на времяпролетном (с англ. Time-of-Flight (TOF)) масс-анализаторе

МС – масс-спектрометрия

ОТЕ – операционная таксономическая единица

п.н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СВЭЖХ – сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТТХ – тетродотоксин

Трис – трисаминометан

УФ-видимая спектроскопия – спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области спектра.

ФБ – фосфатный буфер

ФЛД – флуориметрическая детекция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота (с англ. ethylenediaminetetraacetic acid)

ССВА – биотесты на культуре клеток (с англ. Cell Culture Bioassay)

COG – группа ортологичных генов (с англ. Cluster of Orthologous Groups of proteins)

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, (с англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

ANI – анализ средней нуклеотидной идентичности (с англ. Average Nucleotide Identity)

dDDH - цифровая ДНК-ДНК гибридизация (с англ. digital DNA-DNA hybridization)

DMEM – среда Игла в модификации Дюльбекко (с англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium)

IgG – иммуноглобулин G

IS - инсерционные последовательности (с англ. Insertion Sequences)

FBS – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (с англ. Fetal Bovine Serum)

MBA – биотесты на мышах (с англ. Mouse Bioassay)

MRM – мониторинг множественных реакций (с англ. Multiple reaction monitoring)

NaV каналы – потенциал-зависимые натриевые каналы

PCoA – анализ главных координат (с англ. Principal Coordinates Analysis)

PERMANOVA – многомерный дисперсионный анализ (с англ. Permutational analysis of variance)

Tetra - коэффициент частотной корреляции тетрануклеотидов (с англ. tetranucleotide frequency correlation coefficient)

Y-K – Йошимицу-Кимура (с англ. Yoshimitsu Kimura)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Медицина рассматривает нейротоксины как вещества, которые повреждают, разрушают или нарушают работу нервной ткани. И хотя само понятие «нейротоксины» не согласуется с нашим восприятием безопасности, именно они обеспечили человечество жизненно необходимыми медикаментами – анальгетиками, анестетиками и миорелаксантами, без которых сложно себе представить современную медицину, в особенности хирургическое направление (Melnikova et al., 2018). На сегодняшний день большой упор в разработке лекарств на основе нейротоксинов сделан на специфические блокаторы потенциал-зависимых натриевых (NaV) каналов гуанидинового ряда, такие как токсины группы паралитического и нейротоксического отравления моллюсками (сакситоксин, бревeтоксин и их производные) (Wang, 2008) и тетродотоксин (TTX) и его производные (Lago et al., 2015). Точечное воздействие на ограниченный набор мишеней, высокая эффективность и возможность снижения системной токсичности делают эти токсины привлекательными кандидатами для создания лекарств анестетического и анальгетического действия (Newman, Cragg, 2016). Среди вышеуказанных веществ наиболее эффективным является TTX, селективно блокирующий 6 из 9 известных NaV каналов. Впервые TTX был обнаружен в 1909 г. японским ученым Йошизуми Тахара в яичниках рыбы фугу (сем. Tetraodontidae), и впоследствии был выделен из многих водных, преимущественно морских, и некоторых земноводных животных, а также водорослей и бактерий (Bane et al., 2014). Целесообразность использования TTX в качестве блокатора боли обусловлена отсутствием сродства к NaV каналам сердечной мышцы и неспособностью проникать через гематоэнцефалический барьер, сохраняя нормальную физиологию центральной нервной системы (Nieto et al., 2012). Многочисленные исследования эффективности TTX против острой, воспалительной и невропатической боли были проведены в ряде экспериментов с животными и в клинических испытаниях на людях (Lyu et al., 2000; Hagen et al.,

2008, 2011, 2017; Nieto et al., 2012; Newman, Cragg, 2014; Lago et al., 2015; Jal, Khora, 2015).

Использование ТТХ в медицинской практике затруднено из-за отсутствия оптимального способа его получения, так как основным источником токсина является печень рыбы фугу (Chau et al., 2011). Малый выход ТТХ и пагубное воздействие на водную экосистему (Zhou, Shum, 2003), направили исследователей на поиск бактериальных источников ТТХ. Бактерии относятся к легко возобновляемому биологическому сырью пригодному для культивирования в лабораторных и промышленных условиях. Использование бактериальных продуцентов ТТХ позволит значительно снизить нагрузку на экосистему и сделать токсин доступным для нужд фармакологической промышленности.

Степень разработанности темы

С момента первых исследований микрофлоры ТТХ-содержащих животных и до настоящего времени было выделено более 150 бактериальных штаммов, для которых была показана продукция ТТХ. Большое количество обнаруженных штаммов, однако, не позволило продвинуться в понимании вопросов биосинтеза токсина. Многие авторы отмечали низкую продукцию ТТХ бактериями, потерю синтеза токсина при длительном культивировании в искусственных условиях и переход штаммов в некультивируемое состояние (Carrol et al., 2003; Wang et al., 2008; Campbell et al., 2009; Jal, Khora, 2015; Lago et al., 2015; Turner et al., 2015). Потеря способности к синтезу ТТХ не позволяла проводить исследования геномов бактерий и делать выводы об участии тех или иных генов в синтезе токсина. Кроме того, методы обнаружения ТТХ, используемые в большинстве работ до 2010-х годов, не позволяли точно подтвердить синтез ТТХ бактериями (Noguchi, Mahmud, 2001).

Под вопросом остается и роль бактериальной продукции ТТХ в формировании токсичности животного-хозяина. Большинство работ по изучению микробиома ТТХ-содержащих животных было проведено на культивируемой микрофлоре и, зачастую, на специализированных питательных средах, специфичных для определенных групп бактерий. Первые попытки охарактеризовать полный состав

микрофлоры ТТХ-содержащих животных начались недавно и охватывают отдельных представителей немертин (Turner et al., 2018), рыб фугу (Li et al., 2020) и желтобрюхих тритонов (Vaelli et al., 2020).

Используемые в данной работе морские черви типа Nemertea являются одним из важных звеньев в миграции ТТХ в морских экосистемах. Немертины насчитывают около 1300 видов, большинство из которых ведет хищнический образ жизни и использует токсины в качестве орудия нападения и/или защиты от врагов (Kajihara et al., 2008). В экспериментах по кормлению рыбы *Takifugu niphobles* установлено, что ТТХ-содержащие немертины *Cephalothrix simula* активно поедаются фугу, и, тем самым, могут вносить значительный вклад в ее токсичность (Kajihara et al., 2013). ТТХ был выявлен среди представителей всех классов немертин. Столь широкое его распространение в пределах одного типа указывает на наличие «общего» механизма его накопления из окружающей среды и последующего использования в поведенческих стратегиях. Помимо самого ТТХ в немертинах были обнаружены и его производные (Asakawa et al., 2000; Vlasenko et al., 2018), указывающие на то, что эти животные не просто накапливают токсин, но и участвуют в его биосинтезе и метаболизме. Поскольку в животных не были обнаружены превращения между ТТХ и его производными, считается, что подобные реакции протекают в ТТХ-продуцирующих микроорганизмах (Kono et al., 2008; Ueyama et al., 2018). В отдельных исследованиях в культивируемой микрофлоре немертин уже были выявлены бактериальные штаммы способные продуцировать ТТХ (Carroll et al., 2003; Beleneva et al., 2014; Turner et al., 2018). В тоже время комплексные работы по изучению состава микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин, а также исследования условий продукции токсина бактериальными штаммами, выделенными из немертин, ранее не проводились.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является поиск, выделение и изучение особенностей ТТХ-продуцирующих микроорганизмов из бактериальных сообществ представителей типа Nemertea.

Для достижения цели были поставлены следующие исследовательские задачи:

1. Провести сравнительный анализ таксономического состава микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин.
2. Провести поиск ТТХ-положительных клеток в общих бактериальных высевах ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин и в отдельных бактериальных штаммах, выделенных из немертин.
3. Проверить способность экстрактов отдельных бактериальных штаммов, выделенных из немертин, оказывать нейротоксических эффект на культуру клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131).
4. Провести поиск ТТХ и его производных в бактериальном штамме с выраженным нейротоксическим эффектом с помощью хроматографических методик.
5. Провести комплексное исследование жизненного цикла бактериального штамма-продуцента ТТХ и условий продукции токсина.
6. Провести поиск генов, кодирующих ферменты, предположительно участвующие в биосинтезе ТТХ, в полном геноме бактериального штамма-продуцента токсина.

Научная новизна работы

Данная работа представляет собой первое комплексное исследование микрофлоры ТТХ-содержащих животных, проведенное с привлечением широкого арсенала методик – от морфологических до молекулярно-генетических. В ходе работы проведено метагеномное исследование микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин, что является одним из первых метагеномных исследований микрофлоры ТТХ-содержащих животных и первым исследованием, в котором использовались токсичные и не токсичные представители одного типа животных. Сравнительный анализ полученных данных позволил выявить корреляцию между токсичностью животного и накоплением ТТХ-положительных микроорганизмов. Данные, полученные в результате исследования культивируемой микрофлоры немертин, подтвердили данные метагеномного анализа о наличии ТТХ-положительных бактерий и в микрофлоре

не содержащих токсин видов. Впервые проведено комплексное исследование бактериального штамма-продуцента ТТХ и доказана его способность продуцировать токсин и его производные в течение долгого срока культивирования в лабораторных условиях. Синтез производных ТТХ бактериями ранее обнаружен не был. Впервые прослежено появление ТТХ в ходе спорообразования бактерий. Впервые получен полный геном ТТХ-продуцирующей бактерии и предположен кластер генов, вовлеченных в биосинтез ТТХ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе работы данные о микробиомах немертин представляют значительный интерес для понимания процессов токсификации отдельных групп животных и водных экосистем в целом. Данные об условиях продукции ТТХ и его производных бактериальным штаммом, выделенным из ТТХ-содержащей немертины, а также полный геном штамма и его анализ являются фундаментальным заделом для дальнейшего изучения биосинтеза ТТХ и могут быть использованы для эффективного получения токсина в условиях биотехнологического производства.

Методология и методы диссертационного исследования

Для проведения комплексных исследований микрофлоры немертин в рамках данной диссертационной работы применены традиционные и современные методы цитологии, микробиологии, биохимии и молекулярной генетики. Выделение, культивирование и характеристику бактериальных изолятов проводили на основе стандартных микробиологических методик (Beleneva et al., 2007, 2014). Для определения таксономического состава микрофлоры немертин и видовой принадлежности отдельных бактериальных штаммов использовали методы метагеномного анализа и определения нуклеотидных последовательностей по Сенгеру (Echt et al., 1992; Kiselev et al., 2013, 2015). Нейротоксический эффект бактериальных экстрактов проверяли на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) по методу Когуре с соавторами (Kogure et al., 1988) с модификациями согласно Мэнгер с соавторами (Manger et al., 1993). Анализ на наличие ТТХ и его производных в бактериальных экстрактах проводили методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) согласно Бане с соавторами (Bane et al. 2016). Исследования морфологии, ультраструктуры и локализации ТТХ на разных стадиях жизненного цикла бактерий исследовали с помощью световой и электронной микроскопии и иммуноцитохимических методов. Полный геном ТТХ-продуцирующего бактериального штамма был получен методами высокопроизводительного определения нуклеотидных последовательностей, а его сборка и анализ с помощью биоинформационных методик.

Личный вклад автора

Автор проводила сбор и первичную обработку образцов немертин для всех видов исследования, фиксацию материала для электронной микроскопии и иммуноцитохимии, выделение и очистку токсинов из бактериальных экстрактов для хроматографических исследований и биотестирования на культуре клеток. Автор самостоятельно проводила выделение чистых культур бактерий, работы, связанные с характеристикой бактериальных изолятов, стимуляцией спорообразования бактерий, световой микроскопией, выделением ДНК для проведения молекулярно-генетических исследований и секвенированием полного генома ТТХ-продуцирующего бактериального штамма на платформе MinIon (Oxford Nanopore Technologies). Автор также принимала непосредственное участие в планировании экспериментальных работ, биоинформационной обработке и анализе экспериментальных данных, обсуждении и интерпретации полученных результатов, и написании научных публикаций и лично участвовала в представлении результатов исследований на конференциях.

Положения, выносимые на защиту

1. ТТХ-продуцирующие бактерии присутствуют в микрофлоре как ТТХ-содержащих, так и не содержащих токсин видов немертин, однако накапливаются в больших количествах в токсичных видах.

2. Бактериальные штаммы, выделенные из микрофлоры немертин, способны продуцировать ТТХ и его производные *in vitro*, что делает их перспективным объектом для биотехнологического получения токсина.

3. Синтез ТТХ бактериальным штаммом симбионтом немертин *Cytobacillus gottheilii* 1839 происходит в ходе метаболически активной стадии спорообразования и индуцируется под воздействием гипертонического стресса.

4. В геноме бактериального штамма симбионта немертин *Cytobacillus gottheilii* 1839 найден кластер генов биосинтеза поликетидсинтазы типа III, кодирующий ферменты, предположительно участвующие в синтезе ТТХ.

Степень достоверности результатов.

Достоверность результатов обеспечивается использованием разных методов исследования, взаимодополняющих друг друга, использованием апробированных методик и статистических методов при обработке получаемых данных и воспроизводимостью экспериментов. Фактические материалы, представленные в работе, полностью соответствуют протоколам исследований и записям в лабораторных журналах. Результаты, научные положения и выводы подкрепляются экспериментальными данными, приведенными в виде рисунков и таблиц.

Апробация работы и публикации.

Результаты работы представлены на Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, 2015); на Международной конференции «Future of Biomedicine» (Владивосток, 2015); в материалах Международной научно-практической конференции «Внедрение результатов инновационных разработок: проблемы и перспективы» (Екатеринбург, 2016); в материалах Международной научно-практической конференции «Концепции фундаментальных и прикладных научных исследований» (Омск, 2016); на Международной конференции «Scientific and technological developments of research and monitoring of matine biological resources» (Владивосток, 2017).

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 7 статей в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК, и 5 тезисов научных конференций.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», заключения, выводов и списка литературы. Список литературы насчитывает 163 наименования. Материалы диссертации изложены на 127 страницах, содержат 20 таблиц и 26 рисунков.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Магарламову Тимуру Юсифовичу за опытное руководство, всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах настоящей работы. Отдельную благодарность автор выражает Беленевой Ирине Алексеевне и Чернышеву Алексею Викторовичу за сотрудничество в написании совместных статей, за ценные наставления, советы и помощь при проведении исследований и Фомину Денису Владимировичу за помощь при работе с микроскопическим оборудованием.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Таксономическое разнообразие и распространение ТТХ-продуцирующих бактерий

Широкое распространение ТТХ в филогенетически разных группах эукариотических организмов привело к созданию гипотезы о бактериальном происхождении токсина (Mosher, Fuhrman, 1984). Поскольку горизонтальный перенос генов между высшими животными не был задокументирован, а конвергентная эволюция генов биосинтеза ТТХ в столь большом количестве организмов маловероятна, исследователи пришли к выводу о ключевой роли симбиотической или комменсальной микрофлоры в формировании токсичности животного (Chau et al., 2011). Открытие ТТХ-продуцирующих микроорганизмов напрямую связано с изучением ТТХ-содержащих животных, которые, зачастую, становятся причиной пищевых отравлений. Наличие ТТХ-продуцирующих бактерий в микрофлоре ТТХ-содержащего животного было впервые показано в 1986 г. (Noguchi et al., 1986). Авторы выделили бактерий рода *Vibrio* из кишечника краба *Atergatis floridus* и показали присутствие ТТХ и ангидро-ТТХ в клеточном экстракте бактерий и культуральной среде. В том же году из красной водоросли *Jania* sp. были выделены ТТХ-продуцирующие бактерии рода *Pseudomonas* (Yasumoto et al., 1986). В последующее годы наблюдался высокий интерес к изучению бактерий-симбионтов морских ТТХ-содержащих животных и их способности продуцировать токсин. С 1987 по 1995 гг. ТТХ-продуцирующие бактерии были выделены из ряда животных, собранных в Тихом океане: морской звезды *Astropecten polycanthus* (Narita et al., 1987), нескольких видов рыбы фугу (*Takifugu vermicularis* (Noguchi et al., 1987), *Takifugu poecilonotus* (Yotsu et al., 1987), *Takifugu niphobles* (Matsui et al., 1989)), осьминога *Octopus maculosus* (Hwang et al., 1989), мечехвоста *Carcinoscorpius rotundicauda* (Kungsuwan et al., 1988), планктонных щетинкочелюстных *Flaccisagitta lyra, Parasagitta elegans, Zonosagitta nagae* и *Eukrohnia hamata* (Thuesen, Kogure, 1989), и морских брюхоногих моллюсков *Natica lineata* (Hwang et al., 1994) и *Niotha clathrata* (Cheng et al., 1995).

Позднее ТТХ-продуцирующие бактерии были обнаружены в морском еже *Meoma ventricosa* из прибрежных вод Карибских островов (Ritchie et al., 2000).

Большинство работ последних 15 лет посвящено ассоциативной микрофлоре рыбы фугу, однако ТТХ-продуценты были обнаружены и в нескольких видах немертин (Carroll et al., 2003; Magarlamov et al., 2014; Turner et al., 2018), паразитирующей на рыбе фугу копеподе *Pseudocaligus fugu* (Maran et al., 2007), морском брюхоногом моллюске *Nassarius semiplicatus* (Wang et al., 2008), бычке *Yongeichthys criniger* (Wei et al., 2015) и желтобрюхом тритоне *Taricha granulosa* (Vaelli et al., 2020). Среди всех ТТХ-продуцирующих штаммов, обнаруженных в рыбе фугу, большинство было выделено из кишечника и яичников (63%), остальные были выделены из печени (13%), кожи и слизи на поверхности кожи (17%) и общем экстракте внутренних органов (7%). Интересным оказалось исследование Родригес с соавторами, в котором авторы связали продукцию ТТХ токсичными микроводорослями *Prorocentrum minimum* с симбиотическими бактериями родов *Roseobacter* и *Vibrio* (Rodríguez et al., 2017).

В 1988 г. Когурэ с соавторами показали наличие высоких концентраций ТТХ в морских донных осадках: в 10 г некоторых образцов содержалась доза токсина, смертельная для одной мыши (Kogure et al., 1988). ТТХ содержался как в глубоководных донных осадках (глубина 4033 м), так и в осадках, собранных в прибрежной зоне (глубины 21 и 81 м), при этом концентрация токсина в разных образцах значительно не отличалась. Исследования донных образцов с глубины 4033 м выявили 22 штамма ТТХ-продуцирующих бактерий из 8 родов (Do et al., 1990). Обнаружение в морских донных осадках нетипичных морских бактерий, таких как актиномицеты, бациллы и микрококки, послужило поводом для поиска ТТХ-продуцентов в пресноводных осадках. Из пресноводных донных осадков было выделено 17 ТТХ-продуцирующих штаммов бактерий из 5 родов (Do et al., 1993). Концентрация ТТХ, как и таксономическое разнообразие ТТХ-продуцентов, в пресноводных осадках оказалась на порядок ниже, чем в морских (Do et al., 1993). Продукция ТТХ была также показана для ряда типичных морских коллекционных штаммов бактерий (Simidu et al., 1990). Обнаружение свободноживущих

микроорганизмов, способных синтезировать ТТХ, позволило предположить, что симбиоз не является обязательным фактором для продукции токсина.

Подавляющее большинство микроорганизмов, продуцирующих ТТХ, было обнаружено в тропических и субтропических районах тихоокеанского побережья Азии (главным образом в Японии и Китае), что связано с активным исследованием ТТХ-содержащих животных именно в этом регионе (Таблица 1). Высокая конкуренция среди животных, обитающих в тропических и субтропических зонах, ориентирует часть из них на симбиоз с токсин-продуцирующими бактериями. Однако ТТХ продуцирующие штаммы обнаружены и в нескольких видах немертин из бореальных широт (Carroll et al., 2003; Magarlamov et al., 2014; Turner et al., 2018). В последние годы ТТХ-содержащие рыбы фугу (Rodriguez et al., 2012; Katikou et al., 2009) брюхоногие моллюски (Cassiday, 2008; Rodriguez et al., 2008) и немертины (Turner et al., 2018) были обнаружены в Средиземном море и Атлантическом океане. Некоторые исследователи связывают появление ТТХ-содержащих животных в европейских водах с повышением температуры вод мирового океана, а также с миграцией видов, обитающих в Красном море, через Суэцкий канал (Bane et al., 2014). В ряде работ было показано, что повышение или понижение температуры может приводить к изменению скорости роста и метаболизма ТТХ-продуцирующих симбиотических микроорганизмов. Исследования микробного состава различных органов рыбы фугу *T. niphobles* показали, что понижение температуры уменьшает разнообразие и выживаемость ассоциированных бактерий (Sugita et al., 1989). Повышенные концентрации ТТХ в рыбе фугу *Lagocephalus lunaris* в период с января по март при температуре воды 25–26°C совпадают с повышенной продукцией токсина симбиотической бактерией *Shewanella putrefaciens* в этот период (Auawithoothij, Noomhorm, 2012). В другие месяцы при температуре воды 29-30°C наблюдался более активный рост данного штамма, но продукция токсина бактерией и содержание токсина в рыбе фугу значительно снижались.

Таблица 1. Морские тетродотоксин (ТТХ)-продуцирующие бактерии

ТТХ-продуцирующие бактерии*	Число штаммов	Источник выделения*	Место вылова	Метод детекции токсина	Обнаруженные токсины	Ссылка
Vibrio sp.	1	Краб *Atergatis floridus*	Япония	ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Noguchi et al., 1986
Pseudomonas sp.	1	Красная водоросль *Jania* sp.	Япония	ВЭЖХ-ФЛД ВЭЖХ-ББА-МС МВА	ТТХ ангидро-ТТХ	Yasumoto et al., 1986
Vibrio alginolyticus	2	Морская звезда *Astropecten polycanthus*	Япония	ВЭЖХ-МС УФ-видимая спектроскопия ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ 4-эпиТТХ	Narita et al., 1987
Vibrio alginolyticus	2	Рыба фугу *Fugu vermicularis vermicularis*	Япония	ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Noguchi et al., 1987
Vibrio alginolyticus ATCC 17749 *Vibrio alginolyticus* NCMB 1903	-	Американская коллекция типовых культур (Роквилл, штат Мэриленд) и Национальная коллекция морских бактерий (Абердин, Шотландия)	-	ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ангидро-ТТХ	Simidu et al., 1987
Vibrio parahaemolyticus NCMB 1902 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802	-					
Vibrio anguillarum NCMB 1291	-					
Photobacterium phosphoreum NCMB 844	-					
Aeromonas salmonicida ATCC 14174	-					
Plesiomonas shigelloides ATCC 14029	-					
Pseudomonas sp.	1	Рыба фугу *Fugu poecilonotus*	Япония	ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ 4-эпиТТХ	Yotsu et al., 1987
Vibrio alginolyticus	1	Мечехвост *Carcinoscorpius rotundicauda*	Тайланд	ВЭЖХ-МС УФ-видимая спектроскопия ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Kungsuwan et al., 1988
Alteromonas sp.	2	Осьминог *Octopus maculosus*	Филиппины	МВА ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Hwang et al., 1989
Bacillus sp.	2					
Pseudomonas sp.	1					
Vibrio sp.	1					
Shewanella putrefaciens	1	Рыба фугу *Takifugu niphobles*	Япония	МВА ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Matsui et al., 1989
Vibrio alginolyticus	1	Планктонные щетинкочелюстные: *Flussisagitta lyra*, *Parasagitta elegans*, *Zonosagitta nagae* и *Eukrohnia hamata*	Япония	ССВА ВЭЖХ-ФЛД	ТТХ	Thuesen, Kogure, 1989
Vibrio sp.	1	Морские донные отложения	Япония	ССВА ВЭЖХ-ФЛД	ТТХ ангидро-ТТХ	Do et al., 1990
Bacillus sp.	5					
Alteromonas sp.	5					

ТТХ-продуцирующие бактерии*	Число штаммов	Источник выделения*	Место вылова	Метод детекции токсина	Обнаруженные токсины	Ссылка
Aeromonas sp.	1					
Micrococcus sp.	4					
Acinetobacter sp.	3					
Moraxella sp.	2					
Streptomyces sp.	7	Морские донные отложения	Япония	ССВА ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ	Do et al., 1991
Bacillus sp.	7	Пресноводные донные отложения	Япония	ССВА ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ 4-эпиТТХ	Do et al., 1993
Micrococcus sp.	7					
Alcaligens sp.	1					
Caulobacter sp.	1					
Flavobacterium sp.	1					
Vibrio alginolyticus	5	Брюхоногий моллюск *Natica lineata*	Тайвань	ВЭЖХ-МС УФ-видимая спектроскопия ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ 4-эпиТТХ	Hwang et al., 1994
Vibrio parahaemolyticus	1					
Aeromonas sp.	2					
Pseudomonas sp.	2					
Vibrio alginolyticus	3	Брюхоногий моллюск *Niotha clathrata*	Тайвань	ВЭЖХ-МС УФ-видимая спектроскопия ГХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Cheng et al., 1995
Vibrio parahaemolyticus	1					
Pseudomonas sp.	4					
Aeromonas sp.	1					
Plesiomonas sp.	1					
Vibrio sp.	1	Рыба фугу *Fugu vermicularis radiates*	Южная Корея	МВА ВЭЖХ-ФЛД ГХ-МС ТСХ электрофорез	ТТХ ангидро-ТТХ TDA	Lee et al., 2000
Pseudoalteromonas sp.	1	Морской еж *Meoma ventricosa*	Карибские острова	ИГХ	ТТХ	Ritchie et al., 2000
Vibrio sp.	-	Немертины: *Cephalothrix rufifrons,* *Lineus longissimus,* *Lineus ruber,* *Lineus viridis,* *Ramphogordius sanguineus,* *Riseriellus occultus* и *Amphiporus lactifloreus*	Англия	УФ-видимая спектроскопия ВЭЖХ-ФЛД	ТТХ 4-эпиТТХ TDA	Carroll et al., 2003
Microbacterium arabinogalactanolyticum	1	Рыба фугу *Chelonodon patoca,* *Takifugu alboplumbeus,* *Takifugu niphobles*	Гонконг	МВА ТСХ ВЭЖХ-ИЭР-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Yu et al., 2004
Serratia marcescens	1					
Vibrio alginolyticus	1					
Bacillus sp.	3	Рыба фугу *Fugu rubripes*	Китай	МВА ССВА ТСХ	ТТХ	Wu et al., 2005a

ТТХ-продуцирующие бактерии*	Число штаммов	Источник выделения*	Место вылова	Метод детекции токсина	Обнаруженные токсины	Ссылка
Actinomyces sp.	1			ВЭЖХ-ФЛД ВЭЖХ-ИЭР-МС		
Nocardiopsis dassonvillei	1	Рыба фугу *Fugu rubripes*	Китай	МВА ССВА ВЭЖХ-ФЛД ТСХ ВЭЖХ-ИЭР-МС УФ-видимая спектроскопия	ТТХ ангидро-ТТХ	Wu et al., 2005b
Roseobacter sp	6	Копепода *Pseudocaligus fugu*	Япония	МВА ГХ-МС ВЭЖХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Maran et al., 2007
Vibrio sp.	13	Брюхоногий моллюск *Nassarius semiplicatus*	Китай	ИФА	ТТХ	Wang et al., 2008
Shewanella sp.	3					
Marinomonas sp.	1					
Tenacibaculum sp.	1					
Aeromonas sp.	1					
Bacillus horikoshii	1	Рыба фугу	Тайвань	МВА ВЭЖХ-МС ВЭЖХ-ФЛД ВЭЖХ-МС/МС	ТТХ	Lu, Yi, 2009
Vibrio harveyi	1	Рыба фугу *Arothron hispidus*	Гавайи	ССВА ВЭЖХ-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Campbell et al., 2009
Kytococcus sedentarius	1	Рыба фугу *Arothron hispidus*	Индия	МВА	ТТХ	Bragadeeswaran et al., 2010
Cellulomonas fimi	1					
Bacillus lentimorbus	1					
Bacillus sp.	1	Рыба фугу *Fugu obscurus*	Китай	МВА ВЭЖХ-ФЛД ВЭЖХ-ИЭР-МС	ТТХ ангидро-ТТХ 4-эпиТТХ	Wang and Fan, 2010
Lysinibacillus fusiformis	1	Рыба фугу *Fugu obscurus*	Китай	МВА ВЭЖХ-ИЭР-МС	ТТХ ангидро-ТТХ	Wang et al., 2010
Aeromonas sp.	1	Рыба фугу *Takifugu obscurus*	Китай	МВА ИФА ВЭЖХ-МС	ТТХ	Yang et al., 2010
Raoultella terrigena	1	Рыба фугу *Takifugu niphobles*	Гонконг	МВА ИФА ВЭЖХ-МАЛДИ-(TOF)МС	ТТХ	Yu et al., 2011
Shewanella putrefaciens	1	Рыба фугу *Lagocephalus lunaris*	Тайланд	ВЭЖХ-МС/МС	ТТХ	Auawithoothij, Noomhorm., 2012
Bacillus sp.	1	Немертина *Cephalothrix simula*	Россия	ИГХ	ТТХ	Beleneva et al., 2014
Providencia rettgeri	1	Рыба фугу *Lagocephalus* sp.	Вьетнам	МВА ВЭЖХ-ФЛД ТСХ	ТТХ	Tu et al., 2014
Enterococcus faecium	1	Рыба фугу	Вьетнам	МВА	ТТХ	Nguyen et al., 2015

ТТХ-продуцирующие бактерии*	Число штаммов	Источник выделения*	Место вылова	Метод детекции токсина	Обнаруженные токсины	Ссылка
				ВЭЖХ-ФЛД ТСХ		
Enterobacter cloaca	1	Рыба фугу *Yongeichthys criniger*	Китай	МВА ИФА ВЭЖХ-МС/МС	ТТХ	Wei et al., 2015
Rahnella aquatilis	1					
Vibrio cholerae	1	Мидия *Mytilus edulis* Устрица *Crassostrea gigas*	Англия	СВЭЖХ-ИЭР-МС/МС	ТТХ	Turner et al., 2015
Vibrio parahaemolyticus	9					
Pseudomonas lutiola.	1	Немертины *Cephalothrix simula* и *Cephalothrix rubifrons*	Англия	ВЭЖХ-МС/МС	ТТХ	Turner et al., 2018
Vibrio algionolyticus	1					
Aeromonas	1	Желтобрюхий тритон *Taricha granulosa*	Северная Америка	ВЭЖХ-МС/МС	ТТХ	Vaelli et al., 2020
Pseudomonas	7					
Shewanella	2					
Sphingopyxis	1					

Примечание. Родовые и видовые названия указаны в соответствии с тем, как они приведены в статьях.

Список сокращений: **МВА –** биотесты на мышах (с англ. Mouse Bioassay); **ССВА -** биотесты на культуре клеток (с англ. Cell Culture Bioassay); **ИФА** – иммуноферментный анализ; **ИГХ** – иммуногистохимический анализ; **ТСХ** – тонкослойная хроматография; **ВЭЖХ-ФЛД** – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрической детекцией; **ВЭЖХ-МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией; **ВЭЖХ-МС/МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией; **ВЭЖХ-ББА-МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография при ионизации бомбардировкой быстрыми атомами с масс-спектрометрией; **ВЭЖХ-ИЭР-МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография при ионизации электрораспылением с масс-спектрометрией; **СВЭЖХ–ИЭР–МС/МС** – сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография при ионизации электрораспылением с тандемной масс-спектрометрией; **ВЭЖХ-МАЛДИ-(TOF)МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография при матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с масс-спектрометрией на времяпролетном (с англ. Time-of-Flight (TOF)) масс-анализаторе; **ГХ-МС** – газовая хроматография с масс-спектрометрией; **УФ-видимая спектроскопия** – спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области спектра.

В результате исследований ТТХ-содержащих организмов, пресноводных и морских донных осадков были выделены ТТХ-продуцирующие бактерии из 32 родов. Большинство изолятов принадлежит типу Proteobacteria и классу Gammaproteobacteria (роды *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alteromonas* и др.). Представители классов Alphaproteobacteria (роды *Caulobacter*, *Roseobacter* и *Sphingopyxis*) и Betaproteobacteria (род *Alcaligenes*) были менее многочислены (Рисунок 1). Также среди ТТХ-продуцирующих бактерий были обнаружены представители типов Firmicutes (роды *Bacillus*, *Lysinibacillus* и *Enterococcus*), Bacteroides (роды *Flavobacterium* и *Tenacibaculum*) и Actinobacteria (роды *Actinomycetes*, *Microbacterium*, *Micrococcus* и *Nocardiopsis*).

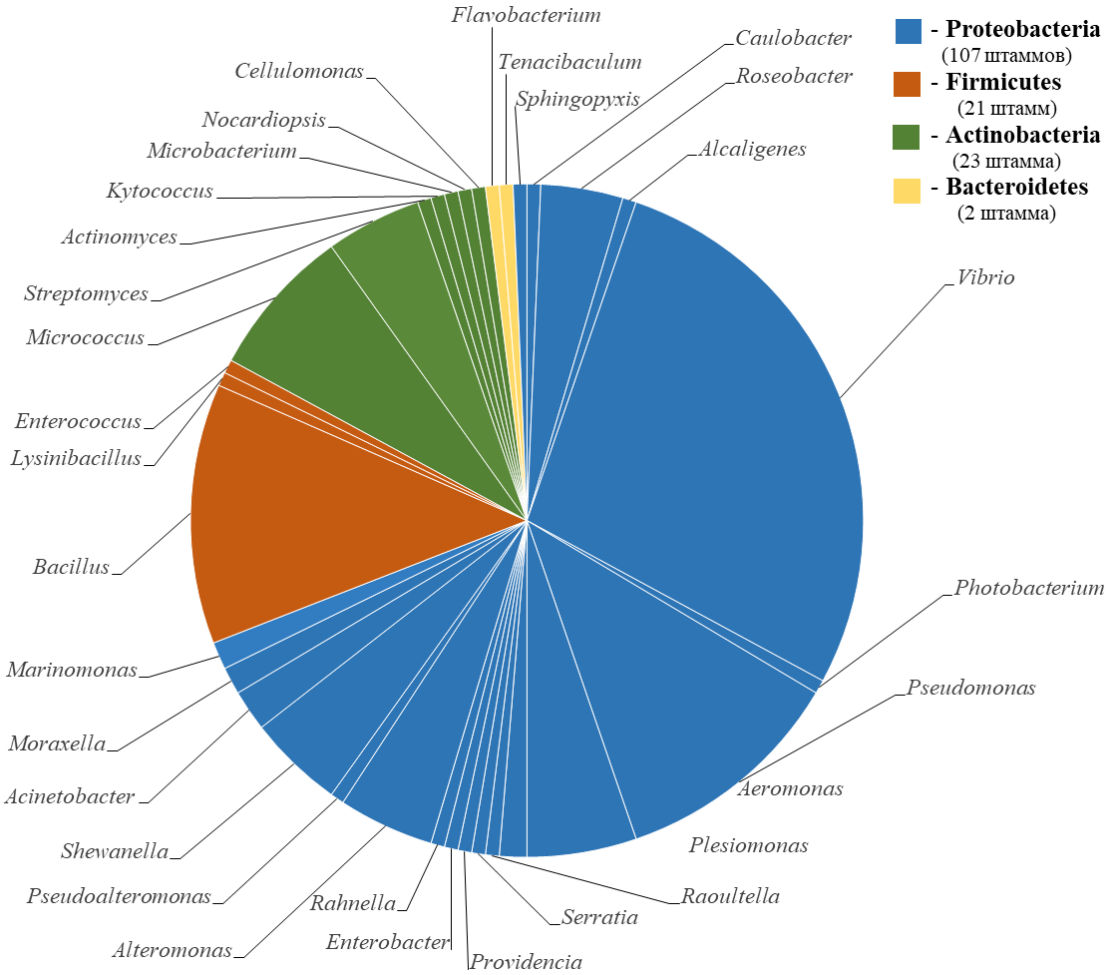


Рисунок 1 – Таксономический состав тетродотоксин (ТТХ)-продуцирующих бактерий. Диаграмма основана на анализе работ, в которых были обнаружены ТТХ-продуцирующие микроорганизмы.

В литературе имеются сведения о более 150 штаммах ТТХ-продуцирующих бактерий (Таблица 1). Представители рода *Vibrio*, обнаруженные во многих ТТХ-содержащих животных, составляют более 30% от всех выделенных ТТХ-продуцирующих штаммов. Большинство работ указывают на связь между продукцией токсина и присутствием в микрофлоре гидробионтов *Vibrio alginolyticus*. Около 15% от выделенных ТТХ-продуцирующих штаммов составляют представители рода *Bacillus*. Представители родов *Pseudomonas, Aeromonas, Alteromonas, Streptomyces* и *Roseobacter* составляют по 7% от всех ТТХ продуцирующих штаммов. Среди других родов ТТХ-продуценты были представленны единичными штаммами. Стоит отметить, что для большинства обнаруженных штаммов определена родовая принадлежность, и только 25% штаммов идентифицированы до вида. Вопрос видовой специфичности бактериального синтеза ТТХ в настоящее время остается открытым. Как показали исследования Матсумура (Matsumura, 1995) и Стрэнд с соавторами (Strand et al., 2016) на *V. alginolyticus*, не все штаммы этого вида способны продуцировать ТТХ. Подобные исследования для других видов бактерий, отдельные представители которых способны к синтезу ТТХ, не проводились.

Несмотря на большое число исследований, посвященных ТТХ-содержащим организмам и их микрофлоре, роль самого токсина в жизни животного остается загадкой. Согласно распространённому предположению ТТХ, накапливаемый в организме хозяина за счет симбиотической микрофлоры, служит для защиты от хищников. Шимидзу с соавторами показали, что выживаемость мальков рыбы фугу *Takifugu rubripes*, выращенных в искусственных условиях, значительно ниже выживаемости мальков из естественной среды (Shimizu et al., 2007). Авторы объясняют низкую выживаемость искусственно выращенных мальков неадаптивным поведением и низкой концентрацией ТТХ по сравнению с особями из естественных мест обитаний. В экспериментах по кормлению ТТХ-содержащей пищей *T. rubripes*, выращенной в искусственных условиях, Хонда с соавторами показали, что ТТХ может выступать в качестве иммуностимулятора (Honda et al., 2005). Некоторые брюхоногие моллюски секретируют ТТХ в окружающую среду

в ответ на внешнее воздействие, в частности, стимуляцию электрическим током (Hwang et al., 1990; 1992). Некоторые виды морских червей, осьминогов и других хищных животных используют ТТХ для охоты (Williams, 2010). ТТХ также может выполнять коммуникативную функцию. Так, минимум один вид рыбы фугу, *T. niphobles*, использует ТТХ в качестве феромона (Matsumura, 1995).

Неизвестен и вопрос о вкладе ТТХ-продуцирующих бактерий в общую токсичность ТТХ-содержащих организмов. Комплексные исследования по профилированию общей микрофлоры ТТХ-содержащих животных начались совсем недавно. Так, метагеномный подход к исследованию микрофлоры был использован только в трех работах по отношению к токсичной немертине *C. simula* (Turner et al., 2018), рыбам фугу *Takifugu bimaculatus*, *Takifugu obscurus*, *Takifugu ocellatus* и *Takifugu xanthopterus* (Li et al., 2020), и желтобрюхому тритону *T. granulosa* (Vaelli et al., 2020). В микрофлоре *C. simula* были выявлены бактериальные рода, связанные с продукцией ТТХ, включая *Alteromonas*, *Vibrio* и *Pseudomonas* (Turner et al., 2018). Ли с соавторами (2020) выявили значительные различия в таксономическом составе кишечной микрофлоры между ТТХ-содержащими и не содержащими токсин рыбами фугу, при этом большее микробное разнообразие наблюдалось в нетоксичных видах. Статистические анализы, проведенные авторами, показали, что бактерии рода *Vibrio* и *Cyanobacteria* являются ключевыми симбионтами в кишечной среде токсичных рыб фугу и могут быть вовлечены в биосинтез ТТХ в исследуемых животных. В исследовании на тритонах было показано, что бактерии рода *Pseudomonas* превалируют в микрофлоре кожных покровов ТТХ-содержащих особей (Vaelli et al., 2020). Обнаружение бактерий в данной работе позволило авторам опровергнуть предыдущие данные об отсутствии бактериальной ДНК в кожных покровах тритона, предполагающие эндогенное происхождение ТТХ (Lehman et al., 2004). Авторы также подчеркнули важность симбиотической микрофлоры в формировании токсичности животного.

1.2. Особенности выявления ТТХ в бактериях

Методы, используемые для выявления ТТХ в биологических образцах, в том числе бактериях, подразделяются на три основные группы, основанные на физико-химических свойствах токсина, его антигенной специфичности и нейротоксическом эффекте (Таблица 2).

В ранних работах по выявлению ТТХ широко использовались биотесты на мышах, которые, впоследствии, показали низкую точность ввиду отсутствия специфичности и высокой индивидуальной изменчивости среди экспериментальных животных (Noguchi, Mahmud, 2001). В качестве альтернативного метода для тестирования ТТХ были разработаны биотесты на культуре клеток (Kogure et al., 1988). При любых модификациях биотесты позволяют оценить только общую токсичность образца, но не содержание в нем отдельных токсинов.

Иммунологические методы, основанные на использовании антител против ТТХ, используются реже, но позволяют определить наличие токсина и визуализировать его в клетках (Watabe et al., 1989). Сложность в применении данных методик заключается в возможной перекрестной реактивности как поли-, так и моноклональных антител против ТТХ с сакситоксином (Kaufman et al., 1991; Stokes et al., 2012). Перекрестная реактивность антител может быть обусловлена стереоспецифическим сходством активных центров данных токсинов (Kao, 1986). Однако современные исследования по оптимизации иммунологических методик привели к разработке более чувствительных конфигураций стандартных методов, снизивших неспецифичное связывание антител, в том числе и с сакситоксином (Huot et al., 1989; Turner et al., 2015).

Для количественного и качественного анализа ТТХ часто используют физико-химические методы, основанные на комбинации хроматографии и спектрофотомерии. Для разделения веществ чаще всего применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и тонкослойную хроматографию (ТСХ). Наиболее распространенными методиками являются жидкостная хроматография с флуориметрической детекцией (ВЭЖХ-ФЛД),

жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) и жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). ВЭЖХ- ФЛД позволяет разделять и детектировать как ТТХ, так и его производные, но существенные различия в интенсивности флюоресценции производных токсина и фоновый сигнал от матрикса делают этот метод малоэффективным при анализе нативных экстрактов (Yasumoto, Michishita, 1995). ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС, сочетающие в себе разделительную силу жидкостной хроматографии и возможность масс-спектрометрии выборочно определять и подтверждать молекулярную идентичность вещества, являются более чувствительными в отношении ТТХ (Noguchi, Mahmud, 2001). Для определения токсина в экстракте, который трудно очистить и использовать для других видов анализа, применяют также газовую хроматографию с масс-спектрометрией (ГХ-МС) (Noguchi, Mahmud, 2001). При этом сложный состав матрикса, нерастворимость ТТХ в органических растворителях и используемый в анализе компонент C_9, являющийся общим для нескольких производных токсина, делают данный вид анализа менее специфичным. Методы молекулярной спектроскопии, такие как ультрафиолетовая спектроскопия (Asakawa et al., 2012), могут быть использованы для идентификации ТТХ, но менее распространены ввиду низкой специфичности. Для оценки степени чистоты ТТХ иногда применяют электрофорез (Shiomi et al., 1985).

Другой многообещающей методикой оценки способности бактерий продуцировать ТТХ может стать поиск генов, участвующих в биосинтезе токсина, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Pratheepa et al., 2016). ПЦР-анализ позволяет обрабатывать большое число образцов, требует минимальное количество бактериальной биомассы и может определять нужные гены среди некультивируемой микрофлоры. Однако отсутствие данных о путях биосинтеза ТТХ в настоящее время делают этот метод недоступным для поиска ТТХ-продуцентов.

Таблица 2. Основные методы, используемые для обнаружения тетродотоксина (ТТХ) в бактериях

Группа методов	Метод		Сокращение	Чувстви-тельность мкг/мл	Недостатки
Биотесты	Биотесты на мышах (с англ. Mouse Bioassay)		MBA	0,2	• низкая точность вследствие индивидуальной изменчивости биологических объектов; • низкая специфичность, позволяет определить только общее число токсинов в образце; • низкая избирательность;
	Биотесты на культуре клеток (с англ. Cell Culture Bioassay)		CCBA	0,5	• низкая специфичность, позволяет определить только общее число токсинов в образце; • низкая избирательность
Иммунологические методы	Иммуноферментный анализ		ИФА	< 0,001	• могут выявлять токсины со сходными с ТТХ эпитопами; • не позволяет провести количественный анализ
	Иммуногистохимический анализ		ИГХ		
Физикохимические методы	Тонкослойная хроматография		ТСХ	2	• низкая специфичность; • низкая избирательность; • не позволяет провести количественный анализ
	Высокоэффективная жидкостная хроматография	С флуориметрической детекцией	ВЭЖХ-ФЛД	0,001–0,002	• низкая чувствительность; • сложно выявить производные ТТХ, чья интенсивность флюоресценции сильно отличается от флюоресценции ТТХ
		с масс-спектрометрией	ВЭЖХ–МС		• возможность ложноположительных результатов из-за примесей в среде
		с тандемной масс-спектрометрией	ВЭЖХ–МС/МС		• Требует тщательной очистки экстрактов
	Газовая хроматография с масс-спектрометрией		ГХ-МС	0,001–0,002	• ТТХ не является летучим веществом, его деривация в летучую форму требует большого количества образцов и много времени на обработку; • Не все производные ТТХ термостабильны и могут разрушаться в ходе хроматографии; • менее специфичный по отношению к ТТХ из-за использования C_9 компонента
	Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области спектра		УФ-видимая спектроскопия	0,1	• низкая чувствительность; • низкая специфичность; • наложение спектров
	Электрофорез		-	2	• низкая чувствительность; • низкая специфичность, детектирует целый спектр веществ с близким зарядом

Во многих работах по исследованию бактериальной продукции ТТХ используется сочетание биотестов (на мышах или культуре клеток) с хроматографическими методами (ВЭЖХ-ФЛД, ТСХ, ГХ-МС) (Таблица 1). Также применяют жидкостную хроматографию с различными вариантами масс-спектрометрии, иногда совмещенные с методом иммуноферментного анализа (Таблица 1). Реже для выявления токсина в бактериальных образцах используют электрофорез, иммуногистохимию и спектроскопию (Таблица 1).

Основная сложность обнаружения ТТХ в бактериях связана с тем, что разные методы могут давать противоречивые результаты. Так, в работе Мацумура (Matsumura, 2001) для выявления токсина в клетках *V. alginolyticus*, выделенного из *T. niphobles*, были использованы ВЭЖХ-ФЛД, ГХ-МС, моноклональные антитела против ТТХ и биоиспытания на мышах. Автор показал, что токсин, выделенный из этой бактерии, имел те же хроматографические пики, что и ТТХ, и давал положительный результат в биоиспытаниях на мышах, но не связывался с антителами против ТТХ. Более того, хроматографические анализы выявили пики, соответствующие ТТХ, в полипептонных и дрожжевых экстрактах, используемых в качестве среды для культивирования бактерий, в то время как эти экстракты давали отрицательный результат в биоиспытаниях на мышах. Автор заключил, что при применении аналитических методов, основанных на щелочном гидролизе, таких как ТСХ, ВЭЖХ, ГХ-МС и электрофорез, для обнаружения ТТХ в бактериях, требуются дополнительные исследования (Matsumura, 2001). Сходные данные были получены другой группой исследователей (Strand et al., 2016). Авторам не удалось выявить продукцию ТТХ в штаммах *V. alginolyticus*, выделенных из немертины *Lineus longissimus*. При этом бактерии продуцировали нетоксичное вещество со сходной с ТТХ молекулярной массой, а в слизи червя было обнаружено активное вещество, паралитический эффект которого был сходен с действием токсина.

На сегодняшний день ВЭЖХ-МС/МС является наиболее надежным показателем присутствия ТТХ в бактериальных образцах. При использовании других хроматографических методик необходимо подтверждение с помощью

иммунологических методов или методов, основанных на блокировке потенциал зависимых натриевых каналов, и наоборот. Тем не менее применение трех различных подходов позволяет получить наиболее полные данные о наличии ТТХ в исследуемом образце, его распределении и токсическом эффекте.

1.3. Особенности продукции ТТХ в бактериях

После выделения первого ТТХ-продуцирующего штамма из кишечника краба *Altergatis floridus* (Noguchi et al., 1986), была выдвинута гипотеза о токсификации организмов через пищеварительную систему, что в последующие годы было подкреплено многочисленными исследованиями симбиотической микрофлоры ТТХ-содержащих животных. Однако низкая продукция ТТХ, обнаруживаемая в бактериях при культивировании в искусственных условиях, подвергла сомнениям данную гипотезу (Lago et al., 2015). Концентрация ТТХ в культуре бактерий, выращенных на жидкой среде, варьирует от 42 нг/л у штамма *Vibrio parahaemolyticus* (Turner et al., 2015) до 0,5-1,57 мкг/мл у штамма *Vibrio harveyi* (Campbell et al., 2009). Концентрация ТТХ в высокотоксичной немертине *C. simula* достигает 5,2 мг на 1 г тела животного (Asakawa et al., 2013), что в 3,5 тысячи раз выше концентрации токсина, продуцируемой любым из известных ТТХ-содержащих бактериальных штаммов. Кроме того, в ряде работ показано, что продукция ТТХ в бактериальной культуре через несколько пассажей теряется, а сами бактерии часто переходят в некультивируемые формы (Wang et al., 2008).

Многие авторы отмечают, что низкая продукция ТТХ, как и его потеря в процессе культивирования связана с отсутствием оптимальных условий для его синтеза (Jal, Khora, 2015). Кэррол с соавторами предположили, что потеря способности бактерий синтезировать ТТХ может быть результатом отсутствия каких-либо веществ, выделяемых организмом хозяина (Carrol et al., 2003). На продукцию метаболитов в бактериях также влияют условия роста и внешние факторы, такие как температура, pH и соленость среды. В исследованиях на *Alteromonas tetraodonis* было показано, что повышение концентрации фосфатов в среде приводит к увеличению продукцию ТТХ (Gallacher, Birkbeck, 1993). Исследования на бактериальном штамме *S. putrefaciens*, выделенном из рыбы фугу,

показали, что продукция ТТХ зависит от температуры культивирования, и при 25°C микроорганизм продуцирует больше токсина, чем при 30°C (Auawithoothij, Noomhorm, 2012). В более поздней работе большего выхода ТТХ удалось добиться при культивировании бактерий при температуре 22°C (Turner et al., 2018). Согласно исследованию Ченг с соавторами токсичность ТТХ-продуцирующих бактерий в брюхоногом моллюске *N. clathrata* варьировала в зависимости от места вылова животного, что говорит в пользу влияния внешних условий на индукцию синтеза ТТХ (Cheng et al., 1995). Другими важными факторами являются фаза роста и время культивирования бактериальной культуры. В исследовании 1990 г. на *V. alginolyticus* было показано, что в первые двое суток культура штамма не обладала заметной токсичность, но уже к 72-м ч. после начала культивирования токсичность штамма внезапно увеличилась до 213 МЕ (Hashimoto et al., 1990). В случае с *A. tetraodonis* продукция ТТХ была ассоциирована со стационарной фазой роста культуры (Gallacher, Birkbeck, 1993). В то же время Йу с соавторами (Yu et al., 2011) показали, что токсичность 24-х часовой культуры *Raoultella terrigena*, находящейся в фазе активного роста, вдвое превышала токсичность 48-часовой культуры, где клетки перешли в стационарную фазу. Интересные данные были получены на бактериальном штамме *Bacillus* sp. 1839, выделенном из немертины *C. simula* (Beleneva et al., 2014; Magarlamov et al., 2014). Авторы показали, что продукция ТТХ приурочена к споровой форме штамма, и в вегетативных клетках токсин отсутствует. При исследовании штамма *Aeromonas* sp. Ne-1 Лиу с соавторами выявили корреляцию между концентрацией ТТХ в культуральной среде и количеством копий плазмиды pNe-1 в бактериальных клетках (Liu et al., 2015). Авторы предположили, что бактерия может обладать способностью переносить гены биосинтеза ТТХ при переносе плазмиды путем конъюгации.

Дополнительным препятствием при подборе условий для бактериальной продукции ТТХ является отсутствие каких-либо данных о путях его биосинтеза. Предполагаемые пути биосинтеза ТТХ, не имеющие, однако, экспериментального подтверждения, во многом основаны на данных о биосинтезе структурного гомолога ТТХ – сакситоксина (Woodward and Gougoutas, 1964; Yasumoto et al.,

1988; Kotaki, Shimizu, 1993; Chau et al., 2011). Предполагается, что некоторые ферменты, участвующие в сборке сходных с ТТХ структурных фрагментов сакситоксина, могут функционировать аналогичным образом в ТТХ-продуцентах. К таким ферментам Чау с соавторами отнесли амидинотрансферазу, поликетидсинтазу и нерибосомальную пептидсинтетазу, вовлеченные в широкий круг биосинтетических процессов, включая синтез многих антибиотиков, токсинов и статинов (Chau et al., 2011). Мультифункциональность данных ферментативных комплексов не позволяет провести четкую корреляцию между их присутствием в клетках бактерий и синтезом ТТХ (Pratheepa et al., 2016). Поиск генов биосинтеза ТТХ затрудняется и в связи с отсутствием данных о геномах ТТХ-продуцирующих бактерий. В большинстве работ бактериальные штаммы были определены до рода с помощью стандартных микробиологических методик и секвенирования последовательности гена 16S р РНК без дальнейших генетических исследований.

Другим ключом к пониманию биосинтеза ТТХ являются его производные, обнаруживаемые вместе с токсином. Производные ТТХ условно подразделяют на молекулы химически эквивалентные ТТХ (4-эпиТТХ, ангидроТТХ и 4,9-ангидроТТХ), деокси производные (5-деоксиТТХ, 11-деоксиТТХ, 5,11-дидеоксиТТХ, 6,11-дидеоксиТТХ и 5,6,11-тридеоксиТТХ), окисленное производное (11-оксоТТХ) и производные с удаленной метиленовой группой С11 (11-норТТХ-6(S)-ол и 11-норТТХ-6(R)-ол) (Yotsu-Yamashita et al., 2013; Bane et al., 2014). Основываясь на химической структуре производных предполагается, что деокси производные являются предшественниками ТТХ на поздних стадиях его биосинтеза, а окисленное производное и производные с удаленной метиленовой группой – продуктами метаболизма токсина (Yotsu-Yamashita et al., 2013). Однако никакие вещества, кроме химически равновесных ТТХ, в бактериях обнаружены не были.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта для поиска ТТХ-положительной микрофлоры, анализа ее таксономического состава и источника выделения отдельных штаммов микроорганизмов были использованы ТТХ-содержащие и не содержащие токсин немертины из разных филогенетических групп (Таблица 3). Немертины были собраны на литорали в бухте Спокойная (42.7090N, 133.1809E) и бухте Восток (42.9021N, 132.7385E) в заливе Петра Великого (Японское море, Дальний Восток, Россия). Животных собирали в период с июня по август в 2015 и 2019 гг. Температура воды в местах сбора составляла 17–21,7°C. Большинство исследуемых в данной работе видов было собрано в ризоидах бурых водорослей *Saccharina* sp. на глубине до 1 м. Образцы *Parahubrechtia* и *Hubrechtella* были собраны в илах на глубине 5-7 м, а *Cerebratulus* в песчаных илах на глубине до 2 м, при помощи траления. *Malacobdella grossa* была собрана из мантийной полости моллюска *Mya uzenensis*. Все выловленные образцы были любезно определены д.б.н. А.В. Чернышевым (ННЦМБ ДВО РАН), экспертом в области зоологии немертин. Немертины из комплекса *Cephalothrix simula* s. l. именуются в наших публикациях *Cephalothrix simula*. Однако недавние генетические исследования показали, что особи из залива Петра Великого не являются истинными *C. simula* (Kajihara, 2019) и далее в работе обозначаются как *C.* cf. *simula*.

Таблица 3. Виды немертин, используемые в данном исследовании.

Виды исследуемых немертин	Наличие/отсутствие тетродотоксина (ТТХ)	Ссылки
Класс Palaeonemertea		
Cephalothrix cf. *simula* (Iwata, 1952)	+	Vlasenko et al., 2018
Tubulanus punctatus (Takakura, 1898)	+	Vlasenko et al., 2018
Parahubrechtia sp.	-	Melnikova et al., 2020
Класс Pilidiophora		
Hubrechtella juliae Chernyshev, 2003	+/-	Melnikova et al., 2020, Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные
Cerebratulus cf. *marginatus* Renier, 1804	-	Vlasenko et al., 2018
Micrura cf. *bella* (Stimpson, 1857)	-	Vlasenko et al., 2018
Kulikovia alborostrata (Takakura, 1898)	+	Vlasenko et al., 2018
Класс Hoplonemertea		
Quasitetrastemma stimpsoni (Chernyshev, 1992)	+	Vlasenko et al., 2018
Malacobdella grossa (Müller, 1776)	-	Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные

Примечание. (+) - наличие ТТХ и/или его производных было подтверждено физико-химическими методами; (-) - ТТХ и/или его производные не были обнаружены; (+/-) – наличие ТТХ и/или его производных было показано иммуногистохимическими методами с использованием антител против ТТХ, но не было подтверждено физико-химическими методами.

2.2. Бактериальные штаммы и условия культивирования

Бактериальный штамм *Bacillus* sp. 1839 (KF444411-KF444416), классифицированный в ходе настоящей работы, как *Cytobacillus gottheilii* 1839, был выделен из ТТХ-содержащей немертины *C.* cf. *simula* в работе Беленевой с соавторами (2014). Для проведения исследований в настоящей работе штамм был взят из коллекции культур морских гетеротрофных бактерий Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Остальные используемые в работе штаммы выделяли из немертин и также помещали в коллекцию культур. Для культивирования бактерий использовали следующие питательные среды: твердую селективную среду для культивирования вибрионов агар CASO (с англ. Casein-peptone Soymeal-peptone agar) (Merck, Германия) (pH 7.6), морской агар DifcoTM Marine Agar (BD, США) (pH 7.6), твердую и жидкую питательные среды Йошимицу-Кимура (с англ. Yoshimitsu Kimura (Y-K)) (Youschimizu, Kimura, 1976) следующего состава: 5 г пептона (Biospringer, Франция), 2,5 г дрожжевого экстракта (Biospringer, Франция), 1 г глюкозы (VWR Life Science AMRESCO, США), 0,2 г K_2HPO_4 (ЛенРеактив, Россия), 0,1 г $MgSO_4 \times 7H_2O$ (ЛенРеактив, Россия), 500 мл дистиллированная воды, 500 мл морской воды и 12 г/л агара (Oxoid, Великобритания) для получения твердой среды; pH 7.8–8.0. Бактерий культивировали при температуре 23°C. Для хранения штаммов использовали среду, содержащую морскую воду с 30% глицерина (MP Biomedicals, США), 1% пептона и 3–5 г/л $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich, США). Штаммы хранили в криопробирках при –85°C.

2.3. Метагеномный анализ микрофлоры немертин

Сбор и подготовка образцов. Для проведения таксономического анализа состава микрофлоры были выбраны ТТХ-содержащие и не содержащие токсин немертины *K. alborostrata*, *M.* cf. *bella*, *C.* cf. *marginatus*, *C.* cf. *simula*, *T. punctatus*, *Q. stimpsoni*, *Parahubrechtia* sp. и *H. juliae*. Для проведения исследований было собрано по 3 особи каждого вида. После вылова образцы немедленно транспортировали в лабораторию, промывали стерильной морской водой,

помещали в 96% этанол (ЛенРеактив, Россия) и хранили при -20°С до дальнейшей обработки.

Выделение ДНК и секвенирование последовательности гена 16S рРНК. Для выделения ДНК образцы 5 видов немертин, включая *K. alborostrata*, *M.* cf. *bella*, *C.* cf. *marginatus*, *C.* cf. *simula* и *T. punctatus*, были разрезаны на секции весом 20 мг. Образцы *Parahubrechtia*, *Hubrechtella* и *Quasitetrastemma*, в силу небольшого размера, были взяты для исследования полностью. Срез или целого червя гомогенизировали при помощи ручного гомогенизатора (EMS, США) в 350 мкл лизирующего буфера, содержащего 10 мМ трисаминометан (Трис)-HCL (pH 8,0) (Abcam, Великобритания), 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (с англ. ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) (VWR International, США), 10 мМ NaCl (Sigma-Aldrich, США), 0,5% додецилсульфата натрия (Sigma-Aldrich, США) и 200 мкг/мл протеиназы K (New England Biolabs, США) в течение 3 мин. Далее смесь инкубировали при 37°С в течение 30 мин. Для выделения тотальной ДНК использовали набор реагентов «E.Z.N.A. Mollusc DNA Kit» (Omega Bio-tek, США). Процедуру выделения проводили в соответствии с протоколом производителя, с одним исключением: этапы перемешивания образца в режиме вортекса были заменены деликатным перемешиванием вручную. Чистоту и концентрацию ДНК оценивали с использованием спектрофотометра UV5Nano (Mettler Toledo, США). Коэффициент оптической плотности при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм составлял> 1,8 и> 2,0, соответственно. Количество ДНК на образец варьировало от 39,7 до 509,8 нг/мкл. Метагеномный анализ проводили на основе вариабельных участков V3 и V4 гена 16S рРНК. Подготовка библиотеки и секвенирование образцов было проведено фирмой «Macrogen Inc.» в Южной Корее. Библиотеки конструировали с использованием набора реагентов «Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2» (Agilent Technologies, США). Секвенирование методом парных прочтений (2×301 п.н.) проводилось на платформе Miseq (Illumina, США). Демультиплексирование и первичный контроль качества полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программного обеспечения

FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) было проведено компанией «Macrogen Inc».

Биоинформационный анализ данных (Рисунок 2). На начальном этапе обработки данных с помощью программного обеспечения BBDuk (http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bb-tools/) был произведен отсев последовательностей ненадлежащего качества, удаление адаптеров и ошибок секвенирования. При работе использовались следующие параметры входа: «ktrim = r, k = 27, qtrim = rl, trimq = 20, minoverlap = 24, minlength = 150». Дальнейший анализ проводили с использованием программного обеспечения «Quantitative Insights into Microbial Ecology 2» (QIIME 2) версия 2019.7 (https://qiime2.org). Для объединения прямых и обратных прочтений использовали алгоритм VSEARCH (Rognes et al., 2016). После процедуры объединения прочтения длиной менее 400 п.н. и более 570 п.н. были удалены из дальнейшей обработки. Далее были удалены повторяющиеся прочтения, и последовательности с 97% сходства были объединены в операционные таксономические единицы (OTE) с использованием алгоритма *de novo*. На следующем этапе репрезентативную последовательность из каждой OTE выравнивали на соответствующую последовательность из базы данных «Greengenes core set» версия 13.8 (McDonald et al., 2012) с использованием алгоритма для классификации встроенного в QIIME 2 по методу «classify-sklearn» (Pedregosa et al., 2011). Для последовательностей, классифицировать которых с помощью матрицы Greengenes не удалось, был проведен ручной поиск в системе NCBI с помощью алгоритма BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn). Химерные последовательности были удалены с помощью алгоритма VSEARCH. Последовательности хлоропластов и митохондрий были также исключены из последующих исследований. Общие OTE для разных видов и всех немертин определяли по присутствию определенного OTE в более 50% образцов. Файлы, содержащие нуклеотидные последовательности и метаданные для всех образцов, располагаются в архиве «NCBI Sequence Read

Archive» под названием «BioProject PRJNA604891» (номера доступа SRR11027358-SRR11027381).

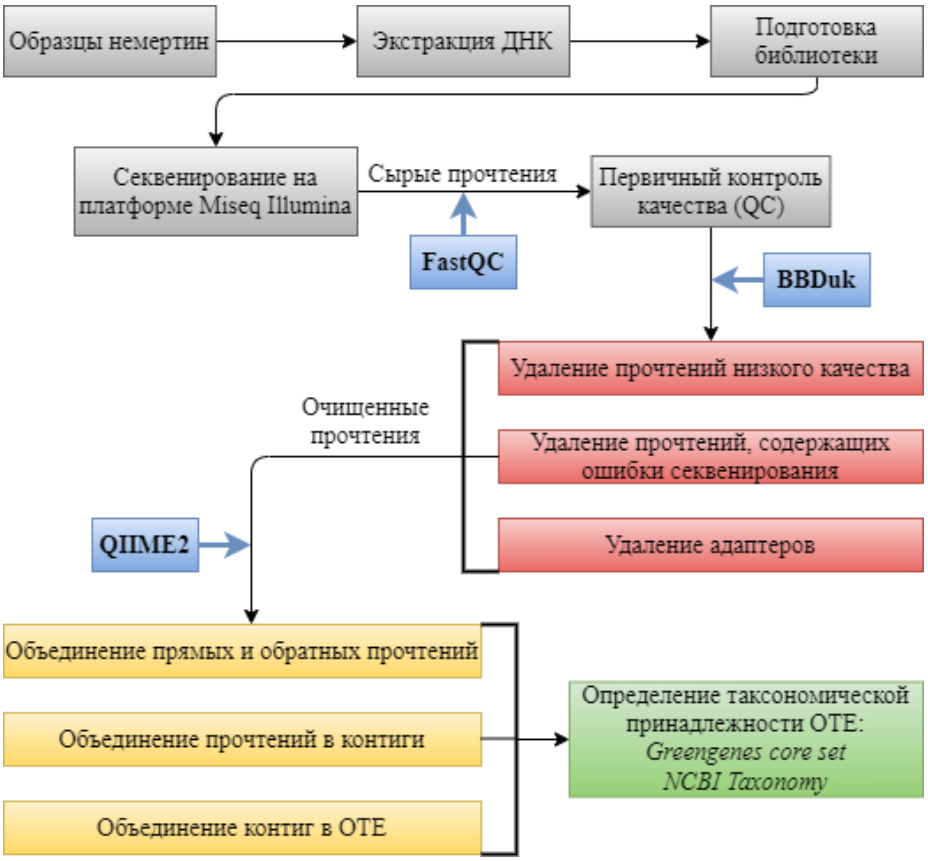


Рисунок 2 - Основные этапы биоинформационной обработки данных метагеномного анализа немертин. Синим цветом обозначено программное обеспечение, используемое на разных этапах анализа.

Статистическая обработка данных. Для оценки биоразнообразия и проведения сравнительного анализа сообществ были рассчитаны параметры бета-разнообразия с использованием инструментов предлагаемых QIIME 2. Анализ проводили на разреженном наборе данных для предотвращения ошибок из-за разной глубины секвенирования. Только OTE, обнаруженные как минимум в 4 образцах, были включены в анализ. Глубина выборки составила 7400 последовательностей. Оценку бета-разнообразия проводили с использованием индекса Брея-Кёртиса, коэффициента Жаккара и методов «weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac». Статистическую значимость кластеризации образцов по данным метрикам оценивали с помощью теста многомерного дисперсионного анализа (с англ. Permutational analysis of variance (PERMANOVA)). Тест считали действительным при параметре $p < 0{,}05$. Результаты были представлены с

использованием методов многомерной статистики на основе анализа главных координат (с англ. Principal Coordinates Analysis (PCoA)). Визуализация данных осуществлялась в программе «Emperor».

2.4. Микробиологический анализ микрофлоры немертин

Сбор и подготовка образцов. Для проведения анализа были выбраны ТТХ-содержащие и не содержащие токсин немертины *H. juliae*, *K. alborostrata*, *Q. stimpsoni* и *M. grossa*. Выловленные образцы содержались в аэрируемом аквариуме с морской водой в течение 7 дней. Каждый образец тщательно троекратно отмывали стерильной морской водой для удаления микроорганизмов с поверхности животных. Немертин тщательно растирали до гомогенного состояния в ручном гомогенизаторе с соблюдением правил асептики; затем гомогенат разбавляли 0,154 М раствором NaCl до конечного объема 1 мл.

Получение чистых культур бактерий. Для получения отдельных бактериальных колоний гомогенат червя в 10-кратных серийных разведениях высевали на чашки Петри с твердой питательной средой Y–K. Посевы культивировали при 23°C в течение 7 дней. Отдельные бактериальные изоляты трижды пересевали на соответствующую среду для получения чистой культуры. В дальнейшем вибрионы культивировали на твердых питательных средах агар CASO и DifcoTM Marine Agar. Остальные штаммы выращивали на среде Y–K и морском агаре.

Фенотипическая характеристика бактериальных изолятов. Морфологию колоний бактериальных изолятов изучали на среде Y-K с использованием стереомикроскопа MBS-10 (LOMO, Россия). Подвижность бактерий в культурах тестировалась в живом состоянии с использованием конденсатора темного поля. Морфологию клеток и тип клеточной стенки изучали с помощью окраски по Граму с последующим микроскопированием (см. п. 2.5). Тесты на цитохромоксидазу, нитратредукцию, окислительно-ферментативный тест Хью-Лейфсона, а также тесты на рост при различных температурах, значениях pH и солености проводили согласно Беленевой с соавторами (Beleneva et al., 2007). Потребность бактерий в ионах Na^+ исследовали на среде без NaCl и с 3, 6, 8 и 10% NaCl. Гидролиз желатина

(Sigma-Aldrich, США) и крахмала (Science Lab ltd, Кения) исследовали на агаре, содержащем соответствующие субстраты, согласно Смиберт и Криг (Smibert, Krieg, 1994). Дополнительное биохимическое тестирование штаммов рода *Vibrio* проводили с использованием тест-систем СИБ (Микроген, Россия), остальных изолятов – тест-систем API 20NE (bioMérieus, Франция).

Таксономическое определение бактериальных изолятов. Для выделения геномной ДНК исследуемые бактериальные изоляты культивировали на твердой питательной среде Y-K при 23°C в течение 24 ч. Выделение тотальной ДНК проводили методом Эхта (Echt et al., 1992) с модификациями согласно Киселеву с соавторами (Kiselev et al., 2015). Бактериальные клетки гомогенизировали в 800 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,2% меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 100 мМ Трис (pH 8,0), 0,7 М NaCl, 40 мМ ЭДТА (pH 7,5–8,0) и 1% бромида цетилтриметиламмония (AppliChem, США). Смесь инкубировали при 60°C в течение 60 мин. После гомогенизации образцы перемешивали с 300 мкл хлороформа (ЛенРеактив, Россия) в течение 5 мин и осаждали на центрифуге Jouan BR4i (Thermo Fisher Scientific, США) при 10000 g в течение 5 мин. Далее отбирали 300-400 мкл водной фазы, добавляли 2,5 объема 96% этанола и инкубировали при -20°C в течение 20 мин. Смесь осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин. Образцы ДНК подсушивали при 37°C и растворяли в 100-150 мкл дистиллированной воды. Чистоту и концентрацию ДНК оценивали с использованием спектрофотометра RF-1501 (Shimadzu, Япония). Для дальнейшей работы использовали образцы с коэффициентом оптической плотности при длинах волн 260/280 нм> 1,8. Таксономическую принадлежность изолятов на основе последовательности гена 16S рРНК определяли по методике Киселева с соавторами (Kiselev et al., 2013). Для амплификации использовали праймеры p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) и p1524r (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA) (Lane, 1991). Реакцию амплификации проводили в объеме 20 мкл, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 8,5), 50 мМ KCl (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, США), 0,01% желатина, 0,1 мМ Тритон X-100 (AppliChem, США), 0,2 мМ каждого из дНТФ (New England Biolabs, США), 0,2 мкМ праймеров и 1 ед. Taq-

ДНК-полимеразы (Silex M, Россия). В качестве матрицы в реакции ПЦР использовали 20-60 нг ДНК. Термический цикл проводили в UNO Thermoblock (Biometra, Германия), запрограммированном на начальной стадии денатурации: 2 мин при 95°C, а затем 35 циклов: 20 сек при 95°C, 20 сек при 55°C, 2 мин при 72°C, и окончательный цикл - 72°C в течение 5 мин. ПЦР-продукты, соответствующие последовательности гена 16S рРНК, очищали этанолом и секвенировали генным анализатором ABI 3130 (Applied Biosystems, США) по методике Киселева с соавторами (Kiselev et al., 2013). Полученные фрагменты последовательностей генов 16S рРНК депонированы в GenBank в системе «National Center for Biotechnology Information» (NCBI) под номерами KX233643-KX233683. Филогенетическое дерево бактериальных изолятов было построено методом объединения ближайших соседей (с англ. Neighbor-joining method) (Saitou, Nei, 1987) с использованием программы ClustalX вер. 1.8 (Thompson et al. 1997). Для оценки топологии филогенетического дерева и стабильности кластеров использовали бутстреп анализ с 1000 итераций в программе Mega 6 (Tamura et al., 2013).

2.5. Микроскопические исследования

Световая микроскопия. Исследования в режиме световой микроскопии проводили с использованием микроскопа IX83 (Olympus, Япония). Морфологию бактериальных клеток изучали на окрашенных по Граму препаратах согласно инструкции производителя (БиоВитрум, Россия). Для выявления эндоспор и свободных спор использовали окраску по методу Пешкова. На препарат наносили щелочной раствор метиленового синего (Sigma-Aldrich, США), держали в пламени горелки в течение 10 - 15 сек. Затем препараты отмывали дистиллированной водой, после наносили 0,5% водный раствор нейтрального красного (Sigma-Aldrich, США) и окрашивали в течение 30 – 40 сек. Препараты отмывали дистиллированной водой и хорошо просушивали.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Ультраструктуру бактериальных клеток исследовали с помощью электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Образцы готовили следующим образом: клетки бактерий,

выращенные на твердой питательной среде, смывали с поверхности агара стерильной морской водой и мягко осаждали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 3000 g в течение 10 мин. Культуру, выращенную в жидкой питательной среде и солевых растворах, сразу осаждали без дополнительной обработки. Далее надосадочную жидкость сливали, а к получившемуся осадку добавляли 2,5% глутаровый альдегид (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М фосфатном буфере (ФБ), содержащем NaCl (0,9 г), KCl (0,01 г), Na_2HPO_4 (0,165 г) (Sigma-Aldrich, США), KH_2PO_4 (0,0083 г) (Sigma-Aldrich, США) и дистиллированную воду (50 мл) (pH 7,8), и фиксировали в течение 60 мин при 20°C. Материал промывали ФБ 3 раза по 15 мин и фиксировали 1% водным раствором OsO_4 (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин. Для дальнейшей обработки материал заключали в легкоплавкую агарозу (Sigma-Aldrich, США). Для этого бактериальные клетки осаждали центрифугированием, надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 30 мкл расплавленной агарозы, перемешивали и охлаждали при 0°C в течение 30 сек. Затем материал обезвоживали в возрастающей концентрации этанола и ацетона (Реахимприбор, Россия) и заключали в смесь эпона и аралдита (EMS, США). Ультратонкие срезы толщиной 60-70 нм получали с помощью ультрамикротома Ultracat E (Reichert, Германия) и контрастировали растворами уранилацетата (Sigma-Aldrich, США) и цитрата свинца (Sigma-Aldrich, США).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Для выявления ТТХ-положительных бактериальных клеток использовали метод КЛСМ с поликлональными антителами против ТТХ. Исследования проводили на микроскопе LSM510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Фотографии обрабатывали с помощью программного обеспечения CLSM510 Meta. Для подготовки образцов использовали клетки бактерий, смытые с поверхности твердой питательной среды и мягко осажденные по методике, указанной выше. Осадок бактерий фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) на ФБ в течение 60 мин при 20°C, после чего отмывали ФБ три раза по 15 мин. Далее фиксированный материал обезвоживали в возрастающей концентрации этанола и ацетона и заключали в водорастворимую смолу LR White (EMS, США). Полутонкие срезы

толщиной 0,9 мкм получали на ультрамикротоме Ultracat E и переносили на предметные стекла. Полутонкие среды пермобилизировали 1% раствором тритона X100 на ФБ в течение 60 мин, отмывали ФБ три раза по 15 мин и инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich, США) и 10% нормальную сыворотку козы (Invitrogen, США) на ФБ, в течение 60 мин. Далее срезы инкубировали в растворе первичных антител против ТТХ (поликлональные антитела кролика, разведение 1:25) (Abnova, США) на ФБ, содержащем 1% БСА, при 4°С в течение 48 ч, отмывали ФБ и инкубировали в растворе вторичных антивидовых антител Alexa 546 (антитела вторичные козьи к кроличьему иммуноглобулину G (IgG) (Invitrogen, США), разведенных в ФБ в пропорции 1:800, в течение 2 ч при 20°С. Срезы отмывали ФБ и заключали в Moviol (Sigma-Aldrich, США). В качестве отрицательного контроля использовались не иммунная сыворотка кролика и ФБ с добавлением 10% БСА. Каких-либо положительных свечений в контроле не наблюдалось. Для исключения аберрантной автофлюоресценции образцы анализировались в 546 фильтре.

Иммуноэлектронная микроскопия. Внутриклеточную локализацию ТТХ исследовали методом иммуноэлектронной микроскопии с поликлональными антителами против ТТХ. Исследования проводили на микроскопе Libra 120. Культуру бактерий, выращенную в солевых растворах, мягко осаждали на центрифуге MiniSpin при 3000g в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 4% формальдегид на ФБ и фиксировали в течение 60 мин при 20°С. После фиксации материал промывали ФБ в течение 120 мин. Далее материал обезвоживали в возрастающей концентрации этанола и ацетона и заливали в смолу LR White. Ультратонкие срезы толщиной 0,9 мкм получали на ультрамикротоме Ultracat E и переносили на золотые бленды (EMS, США), покрытые 0,25% формваром (EMS, США). Далее срезы инкубировали в течение 30 мин в блокирующем растворе, содержащем 10% БСА и 10% нормальной сыворотки козы (ImmunoStar Inc, США) на ФБ. Для выявления ТТХ срезы инкубировали в растворе первичных антител против ТТХ (поликлональные антитела кролика, разведение 1:25) на ФБ с 10% БСА при 4°С в течение 24 ч, промывали ФБ при 4°С в течение

24 ч и инкубировали в растворе коньюгированных с золотом вторичных антивидовых антител (антитела вторичные козьи к кроличьему IgG) (Sigma-Aldrich, США), разведенных в ФБ с 1% БСА в пропорции 1:50, при 4°С в течение 24 ч. Срезы отмвали ФБ в течение 6 ч и окрашивали 1% раствором уранил ацетата (Sigma-Aldrich, США).

2.6. Биотестирование экстрактов клеток штаммов *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131)

Условия роста штаммов. Для проведения анализа бактерий выращивали в жидкой питательной среде Y-K при 23°С: штамм *C. gottheilii* 1839 - в течение 30 суток до достижения значительного количества спор (≥50%), штамм *Pseudoalteromonas* sp. 1942 – в течение 14 суток. По истечении срока культивирования бактерий мягко осаждали на центрифуге Jouan BR4i при 4000g и 4°С в течение 7 мин и отбирали надосадочную жидкость. Получившийся бактериальный осадок использовали для дальнейшей пробоподготовки.

Подготовка бактериальных экстрактов. Экстракты клеток штаммов *C. gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 получали следующим образом: бактериальный осадок разбавляли 0,1% водным раствором уксусной кислоты (PanReac AppliChem, Испания) в соотношении 1 объем осадка к 9 объемам раствора уксусной кислоты. Далее клетки разрушали на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия) с частотой 20 kHz, амплитудой 212 мкм и рабочим циклом 0,8 с в течение 30 мин. Полученную суспензию осаждали на центрифуге Jouan BR4i при 13000g в течение 30 мин, надосадочную жидкость отбирали и упаривали в вакуумном испарителе Centrivap Concentrator 2310905 (Labconco, Германия) при 50°С. Полученный после упаривания осадок растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты в соотношении 1 мл раствора кислоты на 1 мл начального бактериального осадка. Далее раствор пропускали через 3 кДа фильтр Microcon Ultarcel YM-3 (Millipore, США). Для удаления белков фильтрат нагревали до 95°С в течении 20 мин, коагулированные белки осаждали по

методике, описанной выше, и использовали полученный экстракт для дальнейшего анализа.

Подготовка культуры клеток. Клетки мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) были любезно предоставлены коллекцией культур университета Лозанны, Швейцария. Культивирование клеток проводили в среде Игла в модификации Дюльбекко (с англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) (Thermo Fisher Scientific, США) с высоким содержанием D-глюкозы (4,5 г/л), L-глютамином (AppliChem, США), пируватом натрия (Thermo Fisher Scientific, США), антибиотиками (1000 Ед/мл пенициллина (Sigma-Aldrich, США) и 10 мг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, США)) и 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (с англ. Fetal Bovine Serum (FBS)) (Sigma-Aldrich, США). Культуру клеток поддерживали в CO_2-инкубаторе C-150 (Binder, Германия) при 37°C, 5% CO_2 и 80% влажности. Пассирование клеток осуществляли при достижении монослоем 80% конфлюэнтности каждые 2 дня.

Биотестирование на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131). Эксперимент проводили согласно Когуре с соавторами (Kogure et al., 1988) с модификациями, предложенными Мэнгер с соавторами (Manger et al., 1993). Метод основан на способности ТТХ блокировать NaV каналы, экспрессируемые на поверхности нервных клеток (Рисунок 3). При добавлении к культуре клеток нейробластомы смеси вератридина, вызывающего приток ионов натрия и деполяризацию мембраны, и уабаина, ингирубщего работу Na^+/K^+ АТФазы, происходит набухание и гибель клеток. Добавлении ТТХ совместно с вератридином и уабаином значительно повышает выживаемость культуры. Оценка жизнеспособности клеток по морфологическим признакам, предложенная Когуре с соавторами, была впоследствии заменена на более автоматизированный метод, предполагающий использование тетразолиевого красителя МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue), который в процессе жизнедеятельности клеток перерабатывается в нерастворимые кристаллы формазана синего цвета (Manger et al., 1993). Поскольку краситель

перерабатывается только живыми клетками, измерение светопоглощения после растворения кристаллов формазана позволяет судить о жизнеспособности клеток.

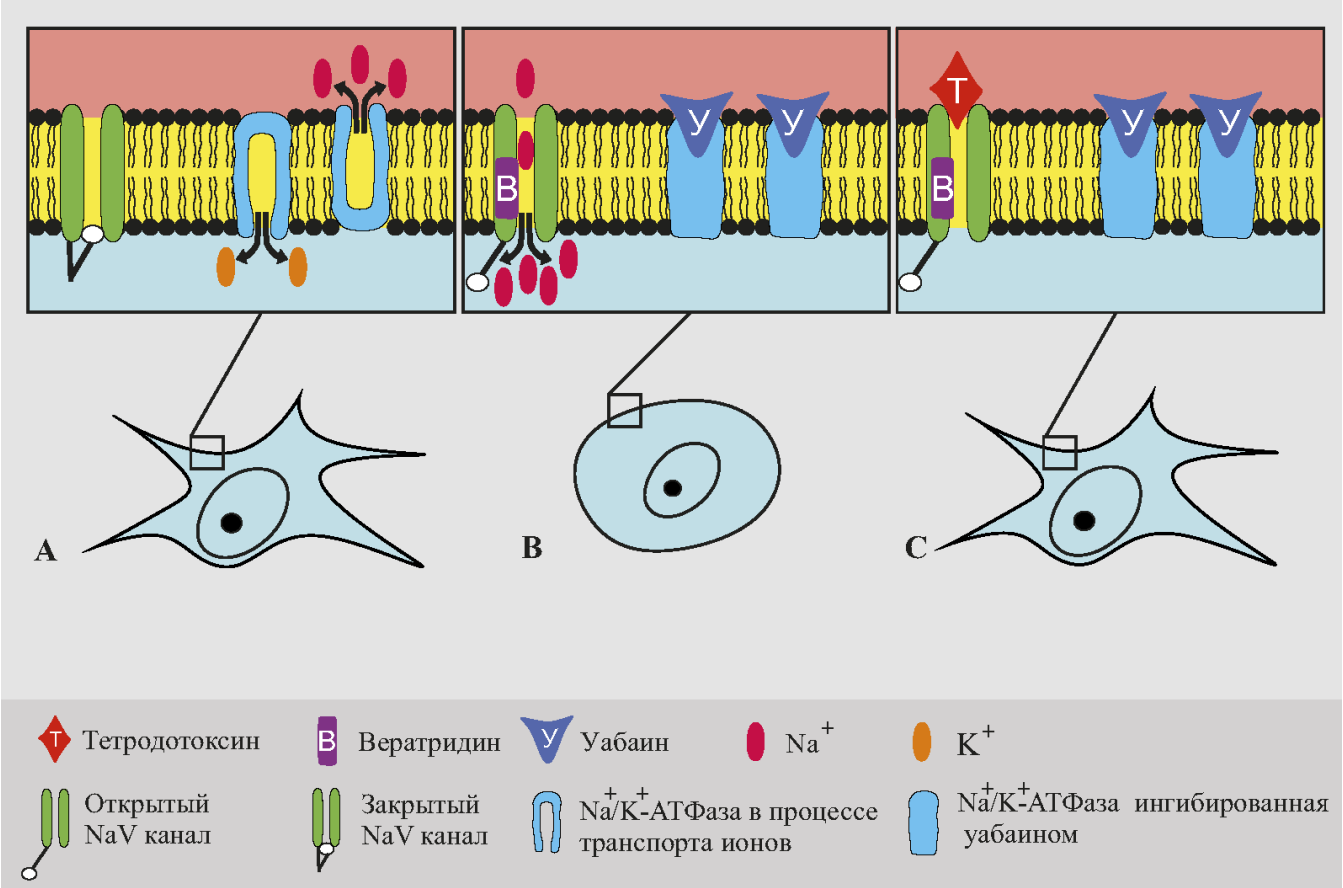


Рисунок 3 – Основа метода биотестирования на наличие нейротоксинов, блокирующих потенциал-зависимые натриевые (NaV) каналы, на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131). **A** – нормальное состояние клеток: NaV каналы закрыты; Na+/K+ АТФаза активна; клетки распластаны по поверхности субстрата. **B** – состояние клеток под воздействием смеси вератридина и уабаина: вератридин связывается с NaV каналами сдвигая порог активации каналов в сторону более отрицательного потенциала, что приводит к их постоянной работе; уабаин ингибирует работу Na+/K+ АТФазы, что препятствует восстановлению баланса ионов в клетке; клетки набухают и округляются. **C** - состояние клеток под воздействием смеси вератридина, уабаина и тетродотоксина (TTX): TTX блокирует активированные вератридином NaV каналы, что препятствует неконтролируемому притоку ионов Na+ в клетки; Na+/K+ АТФаза неактивна под воздействием уабаина; клетки сохраняют нормальную физиологию.

Для проведения эксперимента клетки двухдневной культуры собирали из культурального флакона с помощью 0,25% раствора трипсина (Sigma-Aldrich, США) на ФБ (pH 7,4) и ресуспендировали в культуральной среде (DMEM с 5% FBS) до плотности 4×10^5 клеток/мл. Клетки пересевали в 96-луночный планшет

(Greiner Bio-One, Германия), по 50 мкл суспензии в каждую лунку. Итоговое содержание клеток в каждой лунке составляло 2×10^4 клеток/мл. Далее клетки преинкубировали в CO2-инкубаторе C-150 при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. По истечении преинкубации в каждую лунку добавляли по 100 мкл тестовых и контрольных растворов и инкубировали в CO_2-инкубаторе C-150 при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Тестовые растворы представляли собой среду DMEM с 5% FBS, содержащую различные разведения экстрактов *Pseudoalteromonas* sp. 1942 и *C. gottheilii* 1839, а также 133 μM вератридина в диметилсульфоксиде (Sigma-Aldrich, США) и 0,4 мМ водного раствора уабаина (Sigma-Aldrich, США). В качестве контрольных растворов использовали чистую среду, среду с добавлением вератридина и уабаина, среду с добавлением вератридина и уабаина и коммерческого ТТХ (Alomone Labs Ltd., Израиль) в различных разведениях и среду с добавлением экстрактов бактерий. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью красителя МТТ (Sigma-Aldrich, США). Раствор красителя в концентрация 5 мг/мл в ФБ (pH 7,4) пропускали через 0,22 мкм фильтр Millipak® Gold (Millipore, США) и добавляли по 15 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета. Клетки инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 4 ч. Образовавшиеся после инкубации кристаллы формазана растворяли добавлением 50 мкл изопропанола (PanReac AppliChem, Испания) с 0,04 М HCl (PanReac AppliChem, Испания) и ставили планшет инкубироваться на шейкер PST-60HL4 (Biosan, Латвия) при 37°C и 450 rpm в течение 10 мин. Измерение светопоглощения растворенного красителя для каждой лунки проводили на спектрофотометре ELx800uv (Bio-Tek Instruments Inc., США) при длине волны 595 нм с референсной длинной волны 630 нм. Содержание ТТХ в лунках рассчитывали с использованием калибровочной кривой (Рисунок 4). Для визуального анализа эффекта бактериальных экстрактов на культуру клеток в присутствии вератридина и уабаина использовали инвертированный микроскоп Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия).

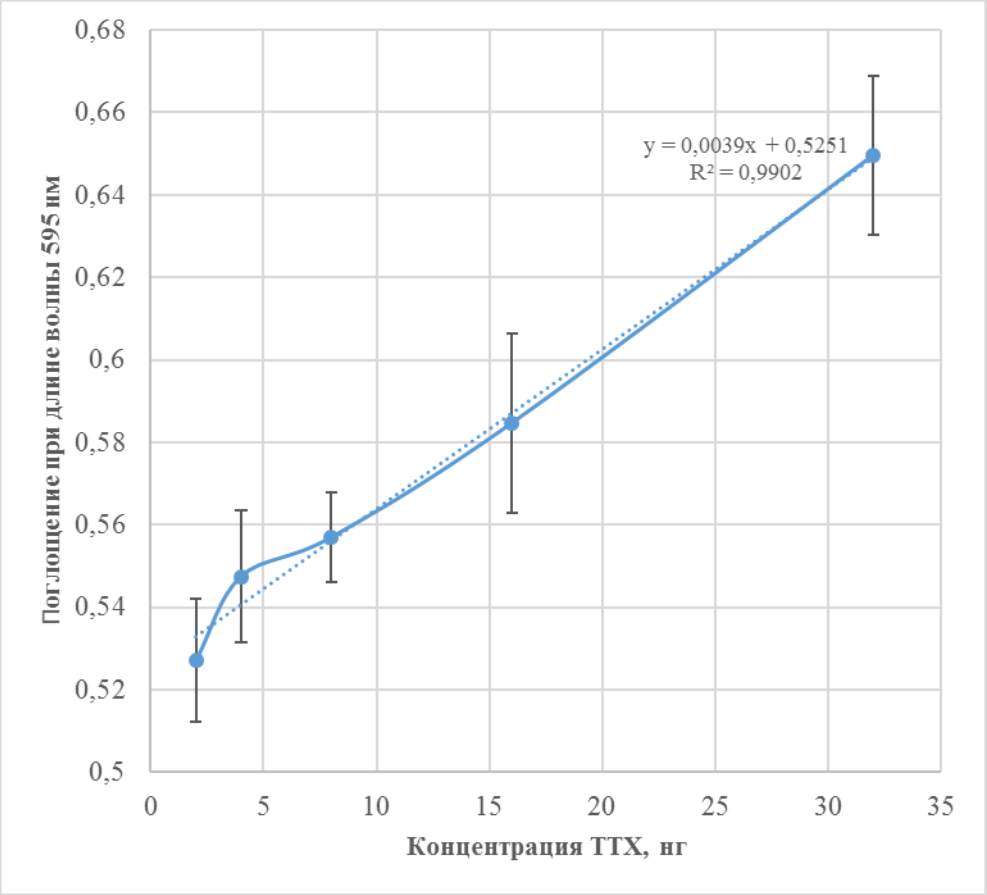


Рисунок 4 - Калибровочная кривая для метода биотестирования на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) для количественного определения концентрации тетродотоксина (ТТХ). Число повторных измерений для каждой концентрации (n) равно 16.

2.7. ВЭЖХ-МС/МС экстрактов клеток штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839

Условия роста штамма. Для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа штамм *C. gottheilii 1839* выращивали на морском агаре DifcoTM Marine Agar 2216 при 23°C в течение двух дней для получения вегетативной культуры и в течение 7 дней для получения культуры, насыщенной спорами (содержание спор в культуре превысило 50%). Вегетативную и насыщенную спорами культуры анализировали отдельно. Сбор бактериальной биомассы с поверхности чашек осуществляли при помощи физиологического раствора и L-образного бактериологического шпателя (Biologix, США). Собранную биомассу осаждали на центрифуге Jouan BR4i при 14000g и 4°C в течение 20 мин, надосадочную жидкость отбирали. Полученный осадок использовали в дальнейшей пробоподготовке.

Выделение и очистка токсинов. Экстракцию токсинов из клеток штамма *C. gottheilii* 1839 проводили следующим образом: бактериальный осадок гомогенизировали в 1% растворе уксусной кислоты в соотношении 1 объем осадка к 9 объемам раствора кислоты с использованием гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) в течение 10 мин (4,5-5,5 М, 10 циклов, по 60 сек каждый). Полученную суспензию осаждали на центрифуге Jouan BR4i при 14000g и 4°С в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость. Далее осадок дважды промывали 1% раствором уксусной кислоты. Всю полученную надосадочную жидкость объединяли и пропускали через фильтрационную колонку SPE Cartridge, Chromafix C18 ec (S) (Macherey-Nagel GmbH & Co., Германия). Колонку промывали 1% раствором уксусной кислоты и объединяли фильтрат. Для удаления белков фильтрат нагревали до 95°С в течение 5 минут с последующим центрифугированием по методике, описанной выше. Дальнейшую экстракцию токсинов проводили с использованием колонки с активированным углем. Для этого 100 мл активированного угля (Sigma-Aldrich, США) поместили в центрифужный концентратор Vivaspin turbo с молекулярным ситом 300 кДа (Sartorius, Германия) и уравновесили дистиллированной водой. На колонку наносили 5 мл бактериального экстракта, перемешивали с углем, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин и центрифугировали при 700g в течение 5 мин. Далее колонку дважды промывали 5 мл дистиллированной воды. Для элюирования токсинов уголь в колонке перемешивали с 1 мл 1% раствора уксусной кислоты в 20% этаноле, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин и центрифугировали. Данный шаг повторяли десять раз. Процедуру экстракции токсинов повторяли до тех пор, пока весь экстракт не был обработан. Элюаты объединяли и досуха упаривали в вакууме. Полученный осадок растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты в соотношении 50 мкл раствора кислоты на 1 мл начального бактериального осадка и использовали для ВЭЖХ-МС/МС.

ВЭЖХ-МС/МС анализ. Анализ на наличие ТТХ и его производных в бактериальных экстрактах вегетативной и насыщенной спорами культур штамма *C. gottheilii* 1839 проводили согласно процедуре, описанной Бэйн с соавторами.

(Bane et al. 2016) с модификациями, указанными ниже. Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре с тройным квадрупольным масс-спектрометром LCMS-8060 (Shimadzu, Япония) на базе Дальневосточного Федерального Университета. Хроматографическое разделение проводили на колонке SeQuant ZIC HILIC (длинна 150 мм, внутренний диаметр 2,1 мм, размер зерна сорбента 5 мкм) (Merck, США) при 40°C. Был установлен двойной градиент, состоящий из подвижной фазы A: аммиака (5 мМ) (PanReac AppliChem, Испания) и муравьиной кислоты (8 мМ) (Sigma-Aldrich, США) в ацетонитриле (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 94:6, деионизованной воды и подвижной фазы B: аммиак (10 мМ) и муравьиная кислота (20 мМ) в воде. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования, описанном в таблице 4. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,2 мл/мин. Перед аналитической колонкой через 2-позиционный 6-портовый клапан была установлена защитная пред-колонка SeQuant ZIC HILIC (длинна 20 мм, внутренний диаметр 2,1 мм, размер зерна сорбента 5 мкм) (Merck, Германия). Через 4,4 мин после начала анализа клапан переключали и защитную колонку промывали изопропанолом (4,4-9 мин) и водой (9-15 мин) при скорости потока 0,3 мл/мин. На 16 мин клапан переключали обратно.

Таблица 4. Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	**Объёмная доля подвижной фазы B, %**
0,0–4,3	15%
4,3–16	25%
16–20	50%

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режимах сканирования (m/z 200–1000) и мониторинга множественных реакций (с англ. Multiple reaction monitoring (MRM)). Параметры источника ионов указаны в таблице 5. Параметры масс-спектрометрического детектирования ТТХ и его производных были использованы согласно Бэйн с соавторами (Bane et al. 2016) (Таблица 6). Масс-спектры снимались при положительной ионизации (энергия соударений составила 35 eV). В качестве стандарта для МС/МС спектров ТТХ и его производных использовали экстракт ТТХ-содержащей немертины *C.* cf. *simula*,

приготовленный Власенко с соавторами (Vlasenko et al., 2018) и раствор коммерческого ТТХ. Расчет концентрации производных ТТХ проводили согласно методике, предложенной Чен с соавторами (Chen et al., 2011). Критериями обнаружения токсина считали соотношение пика MRM перехода ион-предшественника S/N>3, относительную интенсивность пика фрагментного иона >4% и порядок элюции токсинов согласно Бэйн с соавторами (Bane et al. 2016). Валидацию метода проводили с использованием разведений стандарта ТТХ в режиме MRM. Диапазон линейности составлял от 0,6 до 100 нг/мл, степень извлечения от 1 до 100 нг/мл ТТХ - 98,4%, предел количественного определения - 0,6 нг/мл, предел обнаружения - 0,2 нг/мл, и относительное стандартное отклонение - 4,5–14,6%.

Таблица 5. Параметры источника ионов

Параметр	**Значение**
Поток газа-распылителя (N_2)	3 л/мин
Поток газа-осушителя (N_2)	3 л/мин
Поток нагревающего газа (сухой воздух)	17 л/мин
Температура линии десольватации	250°C
Температура границы раздела фаз	380°C

Таблица 6. Параметры масс-спектрометрического детектирования тетродотоксина (ТТХ) и его производных в режиме мониторинга множественных реакций

Вещество	**Ион-предшественник, m/z**	**Фрагментный ион, m/z**	**Энергия соударений, eV**	**Время удерживания, мин**
ТТХ	320.10	302.10	41	14,63-14,66
		162.10	25	
4-эпиТТХ	320.10	302.10	41	12,65
		162.10	25	
5,6,11-тридеоксиТТХ	272.10	254.10	41	5,66
		162.10	25	
5-деоксиТТХ	304.10	286.10	41	8,41-8,42
		176.10	25	
11-деоксиТТХ	304.10	286.10	41	9,74-9,53
		176.10	25	
4,9-ангидроТТХ	302.10	256.10	41	10,84
		162.10	25	
11-норТТХ-6(R)-ол	290.10	272.10	41	10,74
		162.10	25	
11-норТТХ-6(S)-ол	290.10	272.10	41	12,53
		162.10	25	

2.8. Стимуляция спорообразования у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839

Для индукции спорообразования у штамма *C. gottheilii* 1839 использовали стандартные микробиологические методики, включающие длительное культивирование, спорулирующую среду, тепловой и холодовой стресс и осмотический стресс. Для выявления эндоспор и свободных спор брали препараты культуры и окрашивали по методу Пешкова с последующим микроскопированием (см. пункт 2.5.). Для длительного культивирования использовали жидкую питательную среду Y-K. В качестве спорулирующей среды использовали питательный бульон на основе гидролизата казеина (Sigma-Aldrich, США) и дрожжевого экстракта (HiMedia, Индия), обогащенный солями, следующего состава: 1,6% питательный бульон, KH_2PO_4 (13 ммоль 1^{-1}), K_2HPO_4 (28 ммоль 1^{-1}), $MgCl_2 \times 6H_2O$ (0,5 ммоль 1^{-1}) (Sigma-Aldrich, США), $MnCl_2 \times 4H_2O$ (0,01 ммоль 1^{-1}) (Sigma-Aldrich, США), $FeCl_3 \times 6H_2O$ (0,05 ммоль 1^{-1}) (Sigma-Aldrich, США), $ZnCl_2$ (0,05 ммоль 1^{-1}) (Sigma-Aldrich, США), $CaCl_2 \times 6H_2O$ (0,2 ммоль 1^{-1}) (Sigma-Aldrich, США), pH 7,0 (Atrih, Foster, 2001). Исследования воздействия термического стресса на культуру штамма проводили в жидкой питательной среде Y-K. Пробирки с вегетативной культурой помещали в термостат, нагретый или охлажденный до определенной температуры. Диапазон температур, выбранный для исследования, составил 0°C - 75°C, при этом время инкубирования варьировало от 5 - 15 мин для высоких температур до 60 мин для температур ниже 30°C. После температурного воздействия бактерий культивировали в течение 24 ч при 23°C. Препараты культуры делали через 1, 6 и 24 часа после начала культивирования при 23°C. Для индукции спорообразования осмотическим стрессом использовали гипотонические и гипертонические растворы. В качестве гипотонического раствора использовали бидистиллированную воду, в качестве гипертонического – 0,92 M NaCl. Вегетативную культуру *C. gottheilii* 1839, выращенную в жидкой питательной среде Y−K, мягко осаждали на центрифуге Jouan BR4i при 1500g в течение 5 мин, отбирали надосадочную жидкость и заменяли бидистиллированной водой или 0,92 M NaCl. Препараты культуры делали через 1, 6 и 24 часа после замены жидкости.

2.9. Определение полной геномной последовательности штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839

Выделение и секвенирование геномной ДНК. Для выделения геномной ДНК бактериальный штамм *C. gottheilii* 1839 культивировали в 2 мл жидкой питательной среды Y-K при 23°C в течение 24 ч. Для выделения ДНК бактерий осаждали на центрифуге MiniSpin при 3000g в течение 10 мин. Полученный бактериальный осадок суспендировали в 1 мл буфера для лизиса, содержащего 20 мМ Tris-HCL (pH 8,0), 2 мМ ЭДТА, 1,2% Тритон X-100 и 20 мг/мл лизоцима (Sigma-Aldrich, США), и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Тотальную ДНК выделяли с использованием набора реагентов «GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721» (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу, указанному производителем. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реагентов «GeneJET Plasmid Miniprep Kit # K0502» (Thermo Fisher Scientific, США). Качество ДНК оценивали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометров UV5Nano и Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Коэффициент оптической плотности при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм составлял> 1,8 и> 2,0, соответственно. Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей проводили на платформах HiSeq 2500 (Illumina, США) и MinIon (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Секвенирование на платформе HiSeq 2500 было произведено компанией Геноаналитика (Россия). Фрагментацию ДНК проводили с помощью ультразвукового гомогенизатора M220 (Covaris, США). Библиотеки конструировали с использованием набора реагентов «NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit» (Illumina, США) для секвенирования методом парных прочтений со средним целевым размером вставки 200 п.н. Секвенирование на платформе MinIon проводили на базе университета и научно-исследовательского центра города Вагенинген (Нидерланды). Фрагментацию ДНК проводили, пропуская через иглу малого калибра. Фрагментированную ДНК использовали для конструирования библиотеки с помощью набора реагентов «1D Genomic DNA by ligation kit SQK-LSK108», следуя протоколу производителя (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Секвенирование проводили на приборе MinION

(ONT) с использованием проточной ячейки R9.4.1 Flow Cell (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Для оценки качества полученных данных использовали программу FastQC версия 0.11.9 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Прочтения с низким качеством отфильтровывали до начала сборки.

Сборка и аннотация генома. *De novo* сборку прочтений, полученных с HiSeq 2500, осуществляли с помощью геномного ассемблера SPAdes v. 3.7.1 (Nurk et al., 2013) (kmer=127), с последующей обработкой с помощью программы CONTIGuator v. 2.7 (Galardini et al., 2011). Отфильтрованные прочтения с HiSeq 2500 использовали для улучшения сборки *de novo* прочтений с MinIon. Сборку прочтений с MinIon осуществляли с помощью программного обеспечения Staden Package (http://staden.sourceforge.net/). Для объединения контигов в кольцевую хромосому использовали программу Unicycler v. 0.4.8 (Wick et al., 2017), а для проверки качества сборки программу BUSCO (Seppey et al., 2019). Аннотацию генома *C. gottheilii* 1839 проводили с использованием программы «NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP)». Функциональную характеристику генома проводили путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с доступными последовательностями из баз данных, включая «UniProt/Swiss-Prot» и «Non-Redundant Protein Database» (NR) от ресурса NCBI, а также ресурсы «Cluster of Orthologous Groups of proteins» (COG), «Gene Ontology» (GO) и «Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes» (KEGG). Аннотацию генов проводили на базе ресурса eggNOG v. 4.5 (Huerta-Cepas et al., 2019) с использованием инструмента eggnog-mapper (Huerta-Cepas et al., 2017). Гены, кодирующие тРНК и рРНК, определяли с помощью ресурсов tRNAscan-SE v. 2.0 (Chan, Lowe, 2016) и RNAmmer 1.2 (Lagesen et al., 2007), соответственно. Поиск инсерционных последовательностей (с англ. Insertion Sequences (IS)) проводили с помощью онлайн платформы ISFinder (Siguier et al., 2006) с использованием одноименной базы данных (http://www-is.biotoul.fr). Для поиска геномных островков (ГО) использовали онлайн-сервер IslandViewer4 со встроенными методами прогнозирования IslandPick, SIGI-HMM и IslandPath-DIMOB (Bertelli et

al., 2017). Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, (с англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) были обнаружены с помощью онлайн-сервера CRISPRCasFinder (Couvin et al., 2018). Для поиска профагов в геноме использовали онлайн-сервер PHASTER (Arndt et al., 2016, Zhou et al., 2011). Поиск генных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов проводили с использованием программ AntiSMASH v. 5.0 (Blin et al., 2019), со встроенным алгоритмом ClusterFinder, и BAGEL4 (Heel et al., 2018). Круговая карта генома была построена с помощью программы Circos v.0.69-9 (http://www.circos.ca/). Полная последовательность генома *C. gottheilii* 1839 располагается в базе данных GenBank под названием «BioProject PRJNA707608».

Анализ полученного генома. С помощью алгоритма BLASTN в базе данных GenBank NCBI были найдены последовательности гена 16S рРНК близких к *C. gottheilii* 1839 бактериальных штаммов. Филогенетическое дерево *C. gottheilii* 1839 и близких к нему штаммов на основе гена 16S рРНК было построено методом объединения ближайших соседей с использованием программы MEGA X (Kumar et al., 2018). Эволюционные расстояния рассчитаны методом максимального правдоподобия (с англ. Maximum Likelihood Method) (Tamura et al., 2004). Для подтверждения видовой принадлежности штамма были проведены анализ средней нуклеотидной идентичности (с англ. Average Nucleotide Identity (ANI)) и цифровая ДНК-ДНК гибридизация (с англ. digital DNA-DNA hybridization (dDDH)) с двумя близкородственными штаммами, геномы которых были доступны в базе данных GenBank. Значения ANI были рассчитаны с использованием алгоритма BLASTALL (ANIb) и коэффициента частотной корреляции тетрануклеотидов (с англ. tetranucleotide frequency correlation coefficient (Tetra)) при помощи онлайн-сервера JSpecies v 1.2.1 (Richter et al., 2015). Значения dDDH были подсчитаны с помощью онлайн-сервера Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 2.1) (Meier-Kolthoff et al., 2013).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Таксономический состав микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин

Таксономический анализ микробного состава образцов 8-ми видов немертин проводили на основе вариабельных участков V3 и V4 гена 16S рРНК. Для исследования были отобраны ТТХ-содержащие виды немертин – *C.* cf. *simula, T. punctatus, K. alborostrata* и *Q. stimpsoni*, и виды, в которых наличие токсина физико-химическими методами подтверждено не было, - *M.* cf. *bella, C.* cf. *marginatus, Parahubrechtia* sp. и *H. juliae*. По результатам секвенирования было получено 6 328 768 последовательностей, из которых после проверки качества, фильтрации и объединения, в дальнейшем анализе использовалось 1 867 843. На основе полученных последовательностей было определено 457 OTE, представляющих 2 домена, 29 отделов, 65 классов, 99 порядков и 142 семейства. 186 OTE было определено до рода и 67 - до вида. 99,87% OTE было отнесено к домену бактерий, 0,09% - к домену археи и только 0,04% не были определены до какого-либо таксона. Сравнительный анализ последовательностей, входящих в OTE без определенного таксономического положения, с помощью базы данных GenBank показал 83,99% сходство с некультивируемым клоном эвриархеоты OTU_340_915_195 (номер доступа в GenBank JX021824.1), найденным в образцах из окружающей среды.

Широко представленными, с точки зрения количества OTE и числа последовательностей, оказались бактерии из отделов Proteobacteria (192 OTE, 49,7% от общего числа полученных последовательностей), Firmicutes (80 OTE, 16,7%), Bacteroidetes (56 OTE, 10,6%) и Actinobacteria (41 OTE, 3,1%). Многочисленными по числу последовательностей, но с малым количеством OTE, оказались представители Spirochaetes (6 OTE, 2,6%) и Fusobacteria (4 OTE, 3%). На уровне классов в отделе Proteobacteria доминировали представители Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria и Epsilonproteobacteria. Отдел Firmicutes был представлен главным образом классами Bacilli, Clostridia и Erysipelotrichi. Классы Flavobacteriia, Bacteroidia и Saprospirae доминировали в отделе Bacteroidetes. Среди отделов Actinobacteria, Fusobacteria, и

Spirochaetes классы Actinobacteria, Fusobacteriia и Spirochaetes были представлены наиболее широко. Доминирующие среди исследуемых образцов отряды, представленные более 1% последовательностей, перечислены в таблице 7. Среди них, представители Proteobacteria (Burkholderiales, Alteromonadales, Oceanospirillales, Pseudomonadales и Vibrionales), Firmicutes (Lactobacillales и Clostridiales), Bacteroidetes (Bacteroidales и Saprospirales), и Actinobacteria (Actinomycetales) были обнаружены во всех исследуемых видах немертин. На уровне рода отдел Proteobacteria был представлен в большей степени *Methylotenera*, *Arcobacter*, *Cupriavidus*, *Acinetobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Neorickettsia*, *Acinetobacter* и *Vibrio*. Роды *Leuconostoc*, *Tenacibaculum*, *Psychrilyobacter* и *Mycobacterium* преобладали в отделах Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria и Actinobacteria, соответственно.

Таблица 7. – Отряды бактерий, широко представленные в микрофлоре исследуемых немертин

Отдел	**Класс**	**Отряд**	**Число последовательностей**	**% от всех последовательностей**	**Животное-хозяин***
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	33052	1,8	1, 2, 3, 5, 8
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	42290	2,3	все
		Methylophilales	106213	5,7	1, 2, 3, 4, 5, 8
	Deltaproteobacteria	Sva0853	25444	1,3	4
	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	24630	1,3	все
		Oceanospirillales	61356	3,3	все
		Pseudomonadales	44906	2,4	все
		Vibrionales	112254	6	все
	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	92065	4,9	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	223526	11,9	все
	Clostridia	Clostridiales	52415	2,8	все
	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	33817	1,8	1, 2, 3, 4, 6, 8
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	49807	2,7	все
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	123755	6,6	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8
	Saprospirae	Saprospirales	20098	1	все
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	57166	3	все
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	56964	3	2, 4, 8

Примечание. *Животное-хозяин: 1 – *Cephalothrix* cf. *simula*; 2 - *Tubulanus punctatus*; 3 - *Parahubrechtia* sp.; 4 - *Hubrechtella juliae*; 5 - *Cerebratulus* cf. *marginatus*; 6 - *Micrura* cf. *bella*; 7 - *Kulikovia alborostrata*; 8 - *Quasitetrastemma stimpsoni*

На рисунке 5 представлено микробное разнообразие в исследуемых видах немертин на уровне отделов и классов микроорганизмов. На данном рисунке видно, что вклад различных групп микроорганизмов в общий микробный состав значительно различался как между видами немертин, так и между особями одного вида. Среди всех видов немертин наиболее схожий состав микрофлоры имели особи вида *T. punctatus*. Во всех образцах *T. punctatus* наблюдался сдвиг в сторону отдела Proteobacteria (87,3±5,2%), за которым следовали Bacteroidetes (8,5±4,9%) и Firmicutes (1±0,4%). В одном образце *T. punctatus* была обнаружена значительная доля Tenericutes (7,1%). На уровне класса в образцах данного вида преобладали представители Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli и Flavobacteriia, составляющие 87,8±5,2% микробного состава. Относительно схожий таксономический состав микрофлоры наблюдался в образцах *C.* cf. *marginatus*. 70±27,6% их микрофлоры составляли протеобактерии, в большей степени представленные классами Betaproteobacteria (46,2±10,5%) и Alphaproteobacteria (22±18,2%). Два образца *M.* cf. *bella* имели очень сходное таксономическое распределение бактерий как по типу, так и по классу, включая бактериальную OTE, не имеющую таксономического положения (55,2±9,2%), Spirochaetes (44,5±7,9%), Proteobacteria (0,8±0,04%) и Firmicutes (0,4±0,2%). Однако один образец данного вида отличался отсутствием спирохет, большим содержанием Firmicutes (31,4%) и Bacteroidetes (7%) и наличием Verrucomicrobia (1,2%). Образцы *H. juliae* значительно отличались представленностью доминирующих отделов. Так, представленность Proteobacteria варьировала от 29 до 87,7%, Firmicutes – от 0.1 до 36%, а Fusobacteria – от 0,1% до 69,5%. Во всех образцах *H. juliae* были обнаружены археи класса Parvarchaea (0.6±0.7%). Образцы *K. alborostrata*, *C.* cf. *simula* и *Q. stimpsoni* имели относительно схожий микробный состав внутри вида, однако также, как и *H. juliae*, отличались представленностью доминирующих отелов. Микробный состав *Parahubrechtia* sp. был представлен главным образом Proteobacteria (45.3±18.9%) и Firmicutes (46.7±25.1%). Наибольшее разнообразие микрофлоры по сравнению с другими видами немертин было выявлено в образцах *Q. stimpsoni* и *Parahubrechtia sp*.

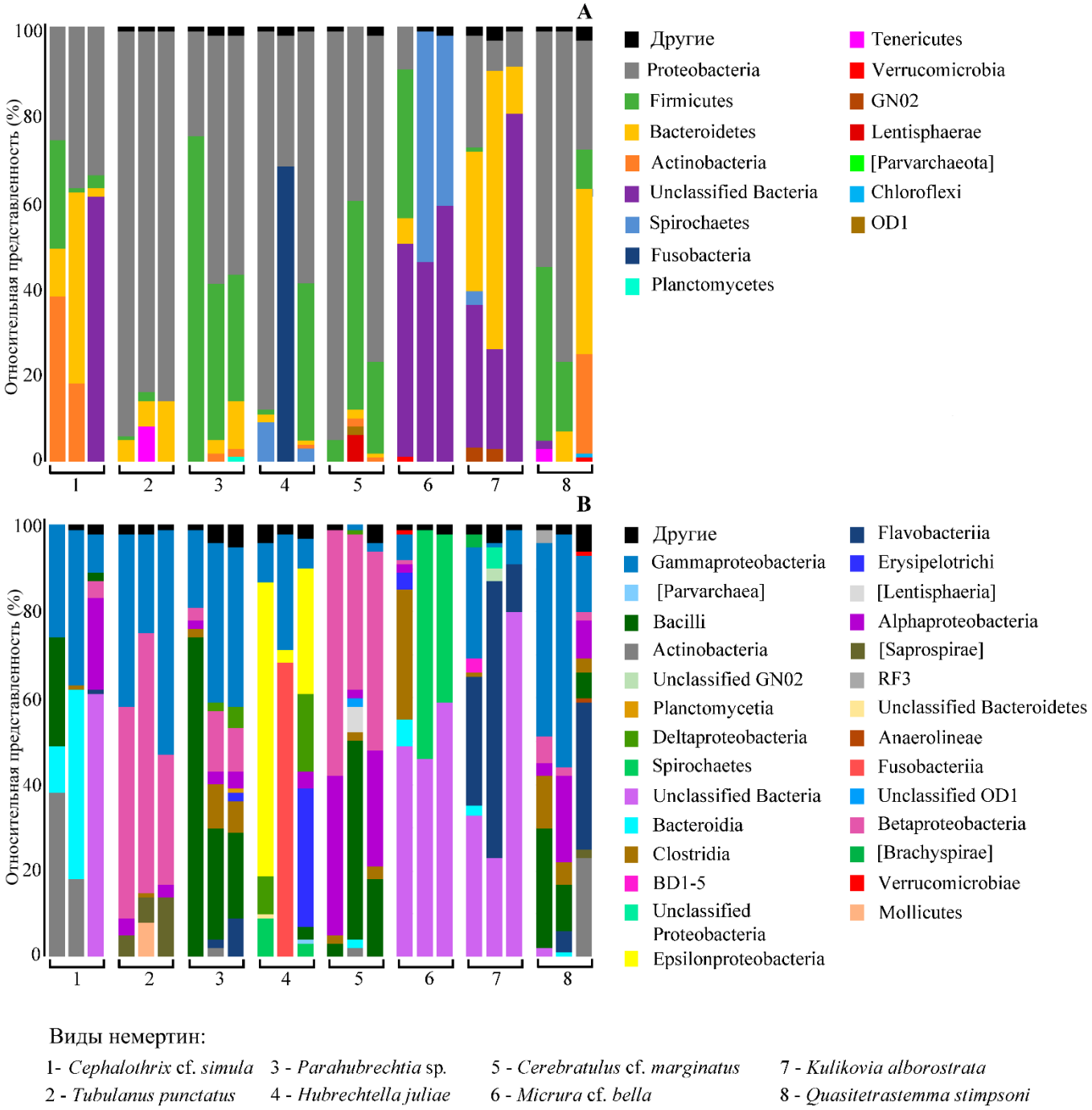


Рисунок 5 - Таксономический состав микробиоты исследуемых немертин на уровнях отделов (**А**) и классов (**В**). График отражает представленность последовательностей гена 16S рРНК (%).

При поиске общих ОТЕ для микрофлоры всех исследуемых видов немертин учитывали только ОТЕ, представленные в более 50% образцов (Таблица 8). Из 13 ОТЕ, вошедших в общий микробиом, только OTU_NEM_179 из рода *Cupriavidus* (Betaproteobacteria) был обнаружен во всех 24 образцах немертин. OTU_NEM_358 (Comamonadaceae), бактериальный OTU_NEM_285, не определенный до какого-либо таксономического уровня, и OTU_NEM_132 (OD1) были обнаружены во всех видах немертин (в более 87% образцов). Другие ОТЕ общие для исследуемых

немертин включали представителей Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria (Proteobacteria), Clostridia и Bacilli (Firmicutes) и Actinobacteria (Actinobacteria). Сравнение последовательностей ОТЕ ядра микробиоты немертин, обнаруженных в данном исследовании, с другими последовательностями в базе данных GenBank выявило таксономическое сходство с изолятами, выделенными из проб окружающей среды, в том числе из морской воды и отложений.

Таблица 8. Бактериальные операционные таксономические единицы (ОТЕ), представленные в более 50% образцов немертин

№ ОТЕ	**Таксономеческое положение согласно базе данных Greengenes**	**% образ-цов**	**Животное -хозяин***
OTU_NEM_285	Домен Bacteria	92	все
OTU_NEM_132	Домен Bacteria; отдел OD1	87,5	все
OTU_NEM_306	Домен Bacteria; отдел Actinobacteria; класс Actinobacteria; отряд Actinomycetales; семейство Corynebacteriaceae; *Corynebacterium*	58	1,2,3,4,5,6, 8
OTU_NEM_332	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Alphaproteobacteria; отряд Rhizobiales; семейство Bradyrhizobiaceae	62,5	все
OTU_NEM_179	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Betaproteobacteria; отряд Burkholderiales; семейство Oxalobacteraceae; *Cupriavidus*	100	все
OTU_NEM_358	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Betaproteobacteria; отряд Burkholderiales; семейство Comamonadaceae	92	все
OTU_NEM_454	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Pseudomonadales; семейство Moraxellaceae; *Acinetobacter*	71	1,2,3,4,5,7, 8
OTU_NEM_327	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Pseudomonadales; семейство Moraxellaceae; *Acinetobacter johnsonii*	62,5	1,2,3,4,6,7, 8
OTU_NEM_396	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Vibrionales; семейство Vibrionaceae	62,5	1,2,4,6,7,8
OTU_NEM_95	Домен Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Enterobacteriales; семейство Enterobacteriaceae	75	все
OTU_NEM_126	Домен Bacteria; отдел Firmicutes; класс Clostridia; отряд Clostridiales; семейство Lachnospiraceae	66,7	все
OTU_NEM_315	Домен Bacteria; отдел Firmicutes; класс Clostridia; отряд Clostridiales; семейство Lachnospiraceae; [*Ruminococcus*]	54	1,2,4,6,7,8
OTU_NEM_231	Домен Bacteria; отдел Firmicutes; класс Bacilli; отряд Lactobacillales; семейство Lactobacillaceae; *Lactobacillus*	58	1,2,3,4,5,7, 8

Примечание. *Животное-хозяин: 1 – *Cephalothrix* cf. *simula*; 2 - *Tubulanus punctatus*; 3 - *Parahubrechtia* sp.; 4 - *Hubrechtella juliae*; 5 - *Cerebratulus* cf. *marginatus*; 6 - *Micrura* cf. *bella*; 7 - *Kulikovia alborostrata*; 8 - *Quasitetrastemma stimpsoni*

Для оценки различий в таксономическом составе микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин была построена диаграмма Венна (Рисунок 6). Анализ показал, что 13 ОТЕ для ТТХ-содержащих видов (Таблица 9) и 10 ОТЕ для не содержащих токсин немертин являются уникальными (Таблица 10). В микрофлоре, характерной для токсичных видов, преобладали представители

отрядов Alteromonadales, Pseudomonadales, Oceanospirillales и Vibrionales (Gammaproteobacteria). Среди Gammaproteobacteria в микрофлоре не содержащих токсин немертин были выявлены только представители Pseudomonadales и Oceanospirillales, хотя были представлены и другие классы протеобактерий. В микрофлоре нетоксичных немертин было обнаружено большее разнообразие Firmicutes по сравнению с ТТХ-содержащими видами.

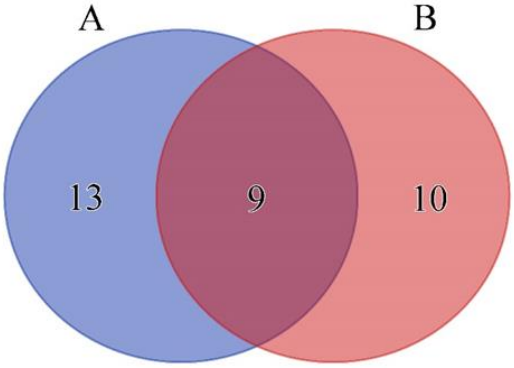


Рисунок 6 - Диаграмма Венна. Число общих и уникальных операционных таксономических единиц (OTE) в микрофлоре тетродотоксин-содержащих (**A**) и не содержащих токсин (**B**) немертин.

Таблица 9. Уникальные бактериальные операционные таксономические единицы (OTE), представленные в более 50% образцов тетродотоксин-содержащих немертин

№ OTE	**Таксономеческое положение согласно базе данных Greengenes**	**% образ-цов**	**Животное-хозяин***
OTU_NEM_34	Царство Bacteria; отдел Actinobacteria; класс Actinobacteria; отряд Actinomycetales; семейство Propionibacteriaceae; *Propionibacterium acnes*	58	все
OTU_NEM_263	Царство Bacteria; отдел Bacteroidetes; класс Flavobacteriia; отряд Flavobacteriales; семейство Flavobacteriaceae	58	все
OTU_NEM_288	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria	67	1,2,4
OTU_NEM_102	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Alteromonadales; семейство Alteromonadaceae; *Alteromonas*	67	все
OTU_NEM_158	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Alteromonadales; семейство Colwelliaceae	67	2,3,4
OTU_NEM_446	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Alteromonadales; семейство Moritellaceae; *Moritella*	58	2,3,4
OTU_NEM_19	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Alteromonadales; семейство Psychromonadaceae; *Psychromonas*	58	2,3,4
OTU_NEM_327	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Pseudomonadales; семейство Moraxellaceae; *Acinetobacter johnsonii*	83	все

№ OTE	Таксономеческое положение согласно базе данных Greengenes	% образ-цов	Животное-хозяин*
OTU_NEM_114	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Oceanospirillales; семейство Oceanospirillaceae; *Marinomonas*	58	2,3,4
OTU_NEM_2	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Vibrionales; семейство Pseudoalteromonadaceae; *Pseudoalteromonas*	67	все
OTU_NEM_396	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Vibrionales; семейство Vibrionaceae	92	все
OTU_NEM_45	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Vibrionales; семейство Vibrionaceae; *Listonella anguillarum*	67	все
OTU_NEM_315	Царство Bacteria; отдел Firmicutes; класс Clostridia; отряд Clostridiales; семейство Lachnospiraceae, [*Ruminococcus*]	67	все

Примечание. *Животное-хозяин: 1 – *Cephalothrix* cf. *simula*; 2 - *Tubulanus punctatus*; 3 - *Kulikovia alborostrata*; 4 - *Quasitetrastemma stimpsoni*

Таблица 10. Уникальные бактериальные операционные таксономические единицы (OTE), представленные в более 50% образцов не содержащих тетродотоксин немертин

№ OTE	Таксономеческое положение согласно базе данных Greengenes	% образ-цов	Животное -хозяин*
OTU_NEM_306	Царство Bacteria; отдел Actinobacteria; класс Actinobacteria; отряд Actinomycetales; семейство Corynebacteriaceae; *Corynebacterium*	67	все
OTU_NEM_14	Царство Bacteria; отдел Bacteroidetes; класс Saprospirae; отряд Saprospirales; семейство Chitinophagaceae; *Sediminibacterium*	58	все
OTU_NEM_103	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Alphaproteobacteria; отряд Rhizobiales; семейство Xanthobacteraceae	58	все
OTU_NEM_287	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Epsilonproteobacteria; отряд Campylobacterales; семейство Campylobacteraceae; *Arcobacter*	58	все
OTU_NEM_98	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Pseudomonadales; семейство Pseudomonadaceae; *Pseudomonas nitroreducens*	58	все
OTU_NEM_94	Царство Bacteria; отдел Proteobacteria; класс Gammaproteobacteria; отряд Oceanospirillales; семейство Endozoicimonaceae	58	2,3,4
OTU_NEM_156	Царство Bacteria; отдел Firmicutes; класс Clostridia; отряд Clostridiales	58	все
OTU_NEM_134	Царство Bacteria; отдел Firmicutes; класс Bacilli; отряд Lactobacillales	58	2,3,4
OTU_NEM_138	Царство Bacteria; отдел Firmicutes; класс Bacilli; отряд Lactobacillales; семейство Leuconostocaceae	58	2,3,4
OTU_NEM_208	Царство Bacteria; отдел Firmicutes; класс Bacilli; отряд Lactobacillales; семейство Leuconostocaceae; *Leuconostoc*	58	2,3,4

Примечание. *Животное-хозяин: 1 - *Micrura* cf. *bella*; 2 - *Cerebratulus* cf. *marginatus*; 3 - *Parahubrechtia* sp.; 4 - *Hubrechtella juliae*

Для проведения сравнительного анализа микробных сообществ исследуемых немертин были рассчитаны параметры бета-разнообразия. Оценку бета-разнообразия проводили на основе кластерного анализа PCoA с использованием индекса Брея-Кёртиса, коэффициента Жаккара и методов «weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac». На рисунке 7А представлены данные PCoA анализа на основе индекса Брея-Кёртиса (pseudo-F=4,5, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте). На графике наблюдается разделение образцов на три непересекающихся кластера. Образцы *T. punctatus* вместе с двумя образцами *C.* cf. *simula* формируют один кластер. Основу другого кластера составляют образцы *M.* cf. *bella* и *K. alborostrata*. Все остальные немертины входят в третий кластер. Заслуживает внимания тот факт, что образцы немертин одного вида, за исключением *C.* cf. *simula*, имеют схожую представленность OTE и группируются близко друг к другу. На рисунке 7В представлены данные PCoA анализа на основе коэффициента Жаккара (pseudo-F=1,7, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте). Данные выявили значительные различия между немертинами по количеству уникальных OTE по отношению к общему числу OTE. Только образцы *C.* cf. *marginatus*, *Parahubrechtia* sp. и *K. alborostrata* оказались схожими в составе OTE и формировали отдельный кластер. Два образца *C.* cf. *simula* также входили в данный кластер. Остальные образцы немертин значительно отличались друг от друга.

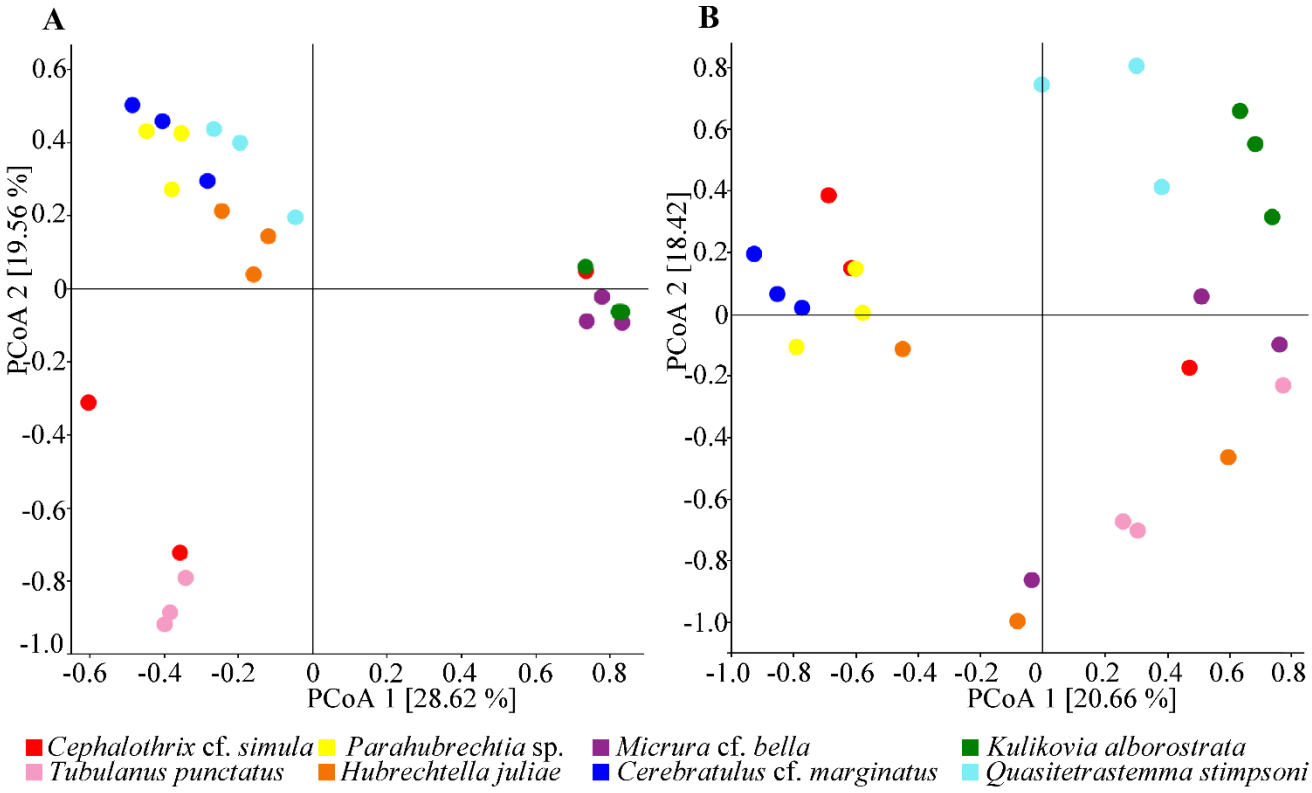


Рисунок 7 - Анализ главных координат (PCoA) на основе индекса Брея-Кёртиса (**A**) и коэффициента Жаккара (**B**) для микробных сообществ немертин. Графики отражают расстояния между сообществами в исследуемых образцах (n = 24). На осях указан процент объясненной вариации.

Для анализа филогенетического состава сообществ использовали методы «weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac». На рисунке 8 представлены данные PCoA для обоих методов (Рисунок 8A. weighted UniFrac, pseudo-F=3,8, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте; Рисунок 8B. unweighted UniFrac, pseudo-F=1,8, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте). По относительному обилию таксонов образцы немертин разделились на два отдельных кластера, где образцы *K. alborostrata* и *M.* cf. *bella* и один образец *C.* cf. *simula* формировали один кластер, а все остальные немертины входили в состав другого кластера (Рисунок 8A). По наличию таксонов были обнаружены существенные различия как между разными видами немертин, так и между образцами внутри вида (Рисунок 8B).

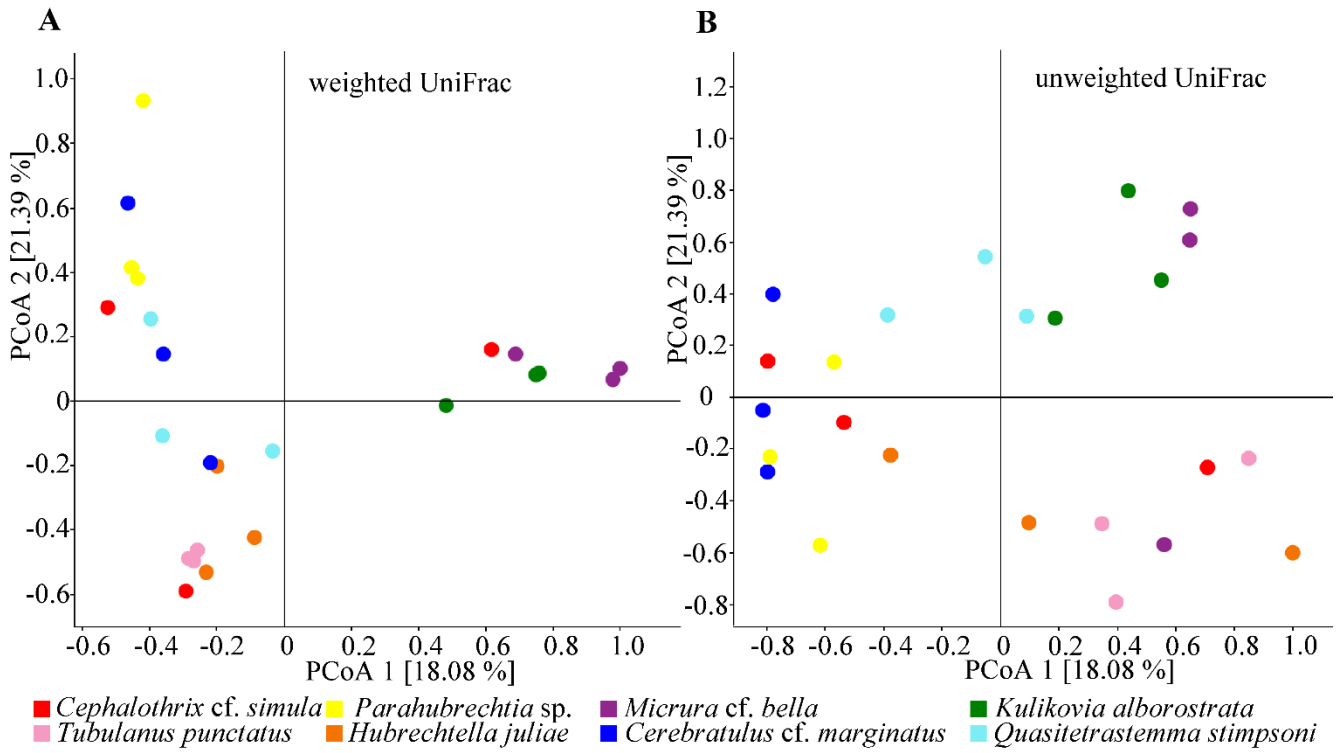


Рисунок 8 - Анализ главных координат (PCoA) на основе методов «weighted UniFrac» (**A**) и «unweighted UniFrac» (**B**) для микробных сообществ немертин. Графики отражают расстояния между сообществами в исследуемых образцах (n = 24). На осях указан процент объясненной вариации.

3.2. Анализ культивируемой микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин

Анализ состава микробных сообществ немертин проводили с использованием стандартных микробиологических методик. В исследовании использовали немертин *M. grossa*, *H. juliae*, *Q. stimpsoni* и *K. alborostrata*. Из проб 4-х видов немертин было выделено в чистые культуры и охарактеризовано 38 штаммов гетеротрофных бактерий: 21 штамм из *Q. stimpsoni*, 7 – из *K. alborostrata*, 6 – из *M. grossa*, 4 – из *H. juliae*. Идентификацию бактериальных изолятов проводили с учетом их морфологических, культуральных и фенотипических характеристик и на основе анализа нуклеотидного состава участка гена 16S рРНК. Изоляты были отнесены к трем филогенетическим группам: Gammaproteobacteria (76,3% от общего числа изолятов), Alphaproteobacteria (7,9%) и Firmicutes (15,8%). Грамотрицательные бактерии преобладали среди микрофлоры немертин и составили 84,2% от общего числа изолятов. Они были представлены главным

образом *Pseudoalteromonas* spp. (19 штаммов) и *Shewanella* spp. (7 штаммов). Также были выделены два штамма *Ruegeria* spp. и по одному штамму из родов *Defluviicoccus*, *Vibrio*, *Pseudomonas* и *Alteromonas*. Все 6 грамположительных изолятов принадлежали роду *Bacillus*. По результатам анализа нуклеотидного состава участка гена 16S рРНК было выявлено, что практически все изолированные штаммы имели 99-100% сходство с близкородственными типовыми штаммами (Рисунок 9), последовательности которых для сравнения были взяты в GenBank (Таблица 11). Изолят *Defluviicoccus* sp. 1933 имел 98% сходство с *Defluviicoccus vanus* str. Ben, а изолят *Bacillus* sp. 1941 оказался близок сразу к двум штаммам: *Bacillus aerius* str. 24K и *Bacillus altitudinis* str. 41KF2b.

Ассоциированная с *Q. stimpsoni* микрофлора была представлена главным образом родом *Pseudoalteromonas* (88,2% от общего числа штаммов). Также были выявлены по два штамма *Bacillus* spp. и *Shewanella* spp., и по одному штамму родов *Vibrio* и *Pseudomonas*. В составе микрофлоры *K. alborostrata* обнаружены *Defluviicoccus* (1 штамм), *Bacillus* (3 штамма) и *Shewanella* (3 штамма). Бактерии, ассоциированные с *M. grossa*, принадлежали родам *Alteromonas* (1 штамм), *Ruegeria* (2 штамма) и *Pseudoalteromonas* (3 штамма). По одному представителю родов *Pseudoalteromonas* и *Bacillus* и два штамма *Shewanella* spp. выявлены в *H. juliae*.

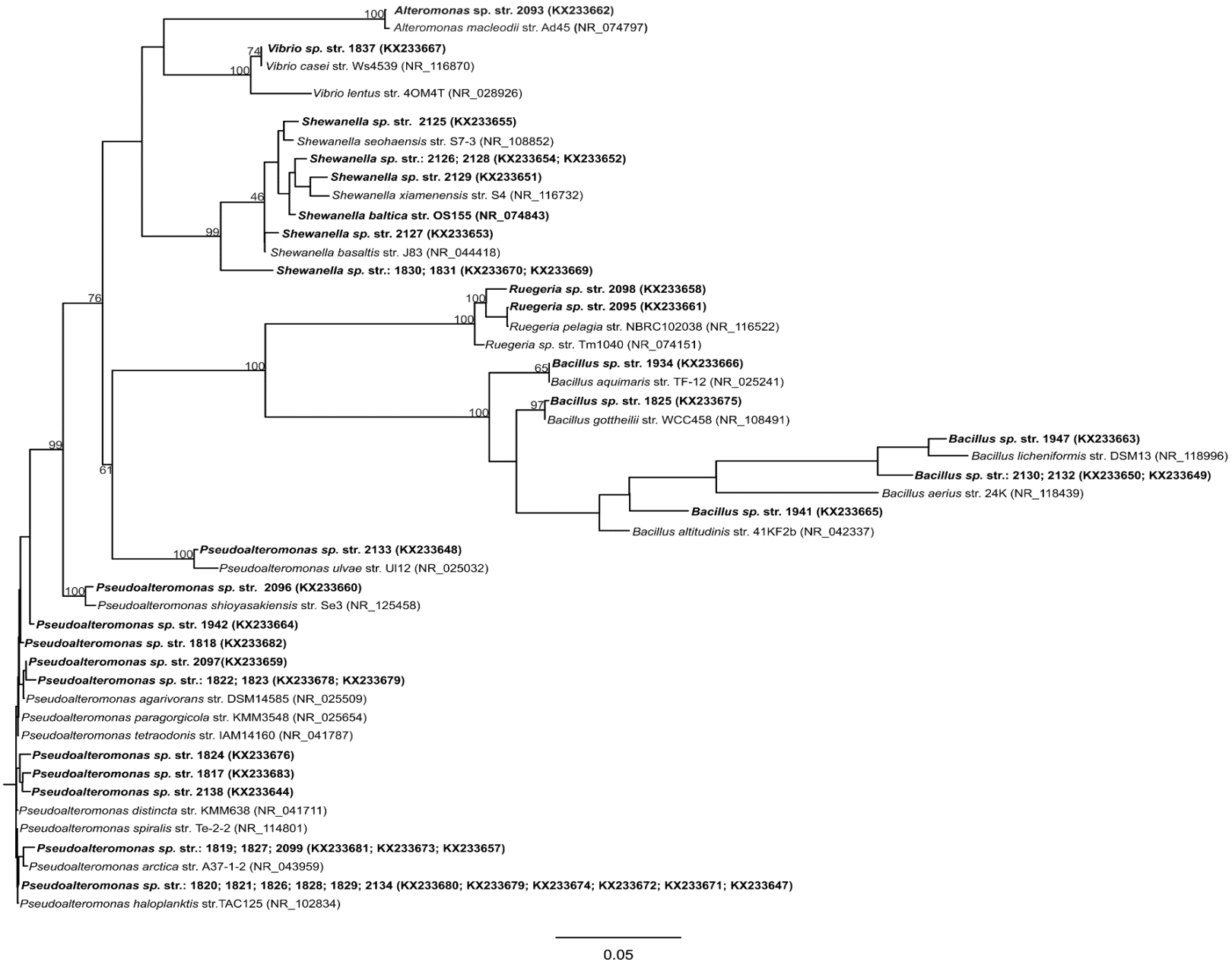


Рисунок 9 - Филогенетическое дерево бактериальных изолятов, выделенных из немертин, и родственных им бактерий, построенное на основе последовательности гена 16S рРНК методом объединения ближайших соседей. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на 100 нуклеотидов. Цифрами обозначена статистическая достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев, определенная с помощью бутстрэп анализа. Жирным шрифтом обозначены изоляты, выделенные из немертин.

Таблица 11. Таксономическое положение бактериальных штаммов, ассоциированных с немертинами *Quasitetrastemma stimpsoni*, *Kulikovia alborostrata*, *Malacobdella grossa* и *Hubrechtella juliae* на основании анализа нуклеотидного состава участка гена 16S рРНК.

Источник выделения	№ штамма	№ в GenBank	Близкородственный организм	Идентичность, %
Quasitetrastemma stimpsoni	1817	KX233683	*Pseudoalteromonas spiralis* str. Te-2-2 (NR_114801)	99
	1818	KX233682	*Pseudoalteromonas paragorgicola* str. KMM3548 (NR_025654)	99
	1819	KX233681	*Pseudoalteromonas arctica* str. A37-1-2 (NR_043959)	100
	1820	KX233680	*Pseudoalteromonas haloplanktis* str. TAC125 (NR_102834)	100
	1821	KX233679		99
	1822	KX233678	*Pseudoalteromonas hodoensis* str. H7 (NR_126232)	99
	1823	KX233677		
	1824	KX233676	*Pseudoalteromonas distincta* str. KMM638 (NR_041711)	99
	1825	KX233675	*Bacillus gottheilii* str. WCC458 (NR_108491)	99
	1826	KX233674	*Pseudoalteromonas haloplanktis* str. TAC125 (NR_102834)	100
	1827	KX233673	*Pseudoalteromonas arctica* str. A37-1-2 (NR_043959)	100
	1828	KX233672	*Pseudoalteromonas haloplanktis* str. TAC125 (NR_102834)	99
	1829	KX233671		100
	1830	KX233670	*Shewanella halifaxensis* str. HAW-EB4 (NR_074822)	99
	1831	KX233669		100
	1836	KX233668	*Pseudomonas guineae* str. M8P (NR_042607)	100
	1837	KX233667	*Vibrio casei* str. Ws4539 (NR_116870)	100
	2132	KX233649	*Bacillus aerius* str. 24K (NR_118439)	100
	2133	KX233648	*Pseudoalteromonas ulvae* str. Ul12 (NR_025032)	99
	2134	KX233647	*Pseudoalteromonas haloplanktis* str. TAC125 (NR_102834)	100
	2138	KX233644	*Pseudoalteromonas tetraodonis* str. NBRC 103034 (NR_114187)	100
Kulikovia alborostrata	1933	-	*Defluviicoccus vanus* str. Ben (NR_041771)	98
	1934	KX233666	*Bacillus aquimaris* str. TF-12 (NR_025241)	100
	1941	KX233665	*Bacillus aerius* str. 24K (NR_118439) *Bacillus altitudinis* str. 41KF2b (NR_042337)	100
	2127	KX233653	*Shewanella basaltis* str. J83 (NR_044418)	99
	2128	KX233652	*Shewanella baltica* str. OS155 (NR_074843)	100
	2129	KX233651	*Shewanella xiamenensis* str. S4 (NR_116732)	99
	2130	KX233650	*Bacillus aerius* str. 24K (NR_118439)	100
Malacobdella grossa	2093	KX233662	*Alteromonas macleodii* str. Ad45 (NR_074797)	99
	2095	KX233661	*Ruegeria pelagia* str. NBRC102038 (NR_116522)	99
	2096	KX233660	*Pseudoalteromonas shioyasakiensis* str. Se3 (NR_125458)	99
	2097	KX233659	*Pseudoalteromonas agarivorans* str. DSM14585 (NR_025509)	99
	2098	KX233658	*Ruegeria* sp. str. Tm1040 (NR_074151)	99
	2099	KX233657	*Pseudoalteromonas arctica* str. A37-1-2 (NR_043959)	99
Hubrechtella juliae	1942	KX233664	*Pseudoalteromonas tetraodonis* str. IAM14160 (NR_041787)	99
	1947	KX233663	*Bacillus safensis* isolate PSB5 (LT703514)	100
	2125	KX233655	*Shewanella seohaensis* str. S7-3 (NR_108852)	99
	2126	KX233654	*Shewanella baltica* str. OS155 (NR_074843)	99

Примечание. (-) – штамм не депонирован в GenBank

Методом КЛСМ с использованием поликлональных антител против ТТХ было установлено наличие ТТХ-положительных бактериальных клеток в микрофлоре *H. juliae* и *K. alborostrata* (Рисунок 10А, В). Какие-либо ТТХ-положительные клетки в микрофлоре *M. grossa* и *Q. stimpsoni* отсутствовали. Из 38 бактериальных изолятов ТТХ-положительные клетки были выявлены только в штамме *Pseudoalteromonas* sp. 1942, выделенном из *H. juliae* (Рисунок 10С).

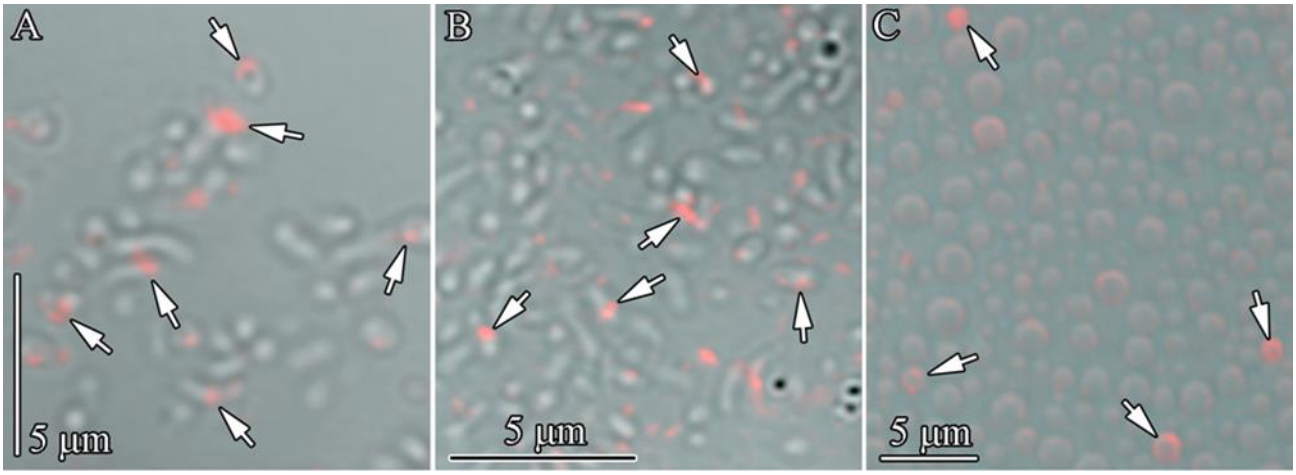


Рисунок 10 - Микрофотографии (Z-проекции) общих бактериальных высевов из *Kulikovia alborostrata* (**A**) и *Hubrechtella juliae* (**B**) и культуры клеток штамма *Pseudoalteromonas* sp. 1942 (**C**), полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с антителами против тетродотоксина (ТТХ). Стрелки указывают на ТТХ-положительные бактериальные клетки.

3.3. Нейротоксический эффект экстрактов штаммов *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 на культуру клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131)

Способность штаммов *C. gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 продуцировать ТТХ-подобные токсины была показана с помощью метода биотестирования на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131)). Эффект бактериальных экстрактов на культуру клеток оценивали, как визуально согласно Когуре с соавторами (Kogure et al., 1988), так и количественно с использованием красителя МТТ и замера светопоглощения на спектрофотометре при длине волны 595нм (Manger et al., 1993).

Экстракты *C. gottheilii* 1839 оказывали токсический эффект на культуру клеток, эквивалентный 28 нг ТТХ. Так, показатель оптической плотности в контроле в среднем составил 0,451 (Рисунок 11А). При добавлении к культуре клеток ТТХ в концентрации от 2 нг/мл до 32 нг/мл показатель оптической плотности изменялся в диапазоне от 0,5 до 0,595. При добавлении к культуре клеток экстракта *C. gottheilii* 1839 в разбавлении 1 к 50, показатель оптической плотность составил 0,585, что соответствует диапазону показателей оптической плотности для ТТХ в концентрации 16-32 нг/мл. Экстракты *Pseudoalteromonas* sp. 1942 оказывали токсический эффект на культуру клеток, эквивалентный 1,8 нг ТТХ. Показатель оптической плотности в контроле в среднем составил 0,578 (Рисунок 11В). При добавлении к культуре клеток ТТХ в концентрации от 2 нг/мл до 8 нг/мл показатель оптической плотности изменялся в диапазоне от 0,655 до 0,621. При добавлении к культуре клеток экстракта *Pseudoalteromonas* sp. 1942 в разбавлении 1 к 50 показатель оптической плотности составил 0,615. Штамм *C. gottheilii* 1839, обладающий сильным токсическим эффектом, был выбран для дальнейших исследований.

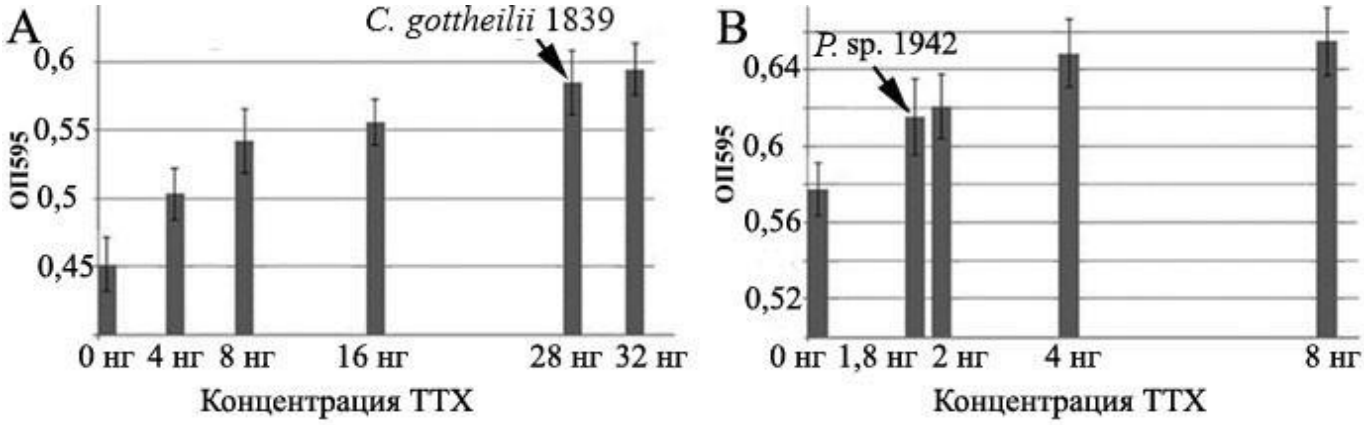


Рисунок 11 – Концентрация тетродотоксин-подобных токсинов в экстрактах *Cytobacillus gottheilii* 1839 (*C. gottheilii* 1839) (**А**) и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 (*P.* sp. 1942) (**В**). ОП595-показатель оптической плотности при длине волны 595 нм.

Визуальный эффект экстракта *C. gottheilii* 1839 в разбавлении 1 к 50 на клетки культуры продемонстрирован на рисунке 12. В чистой среде без добавления вератридина, уабаина, ТТХ или экстрактов бактерий большинство клеток распластано по поверхности субстрата, какие-либо морфологические патологии в

клетках не наблюдаются (Рисунок 12A). После добавления вератридина и уабаина количество клеток в культуре снижается, клетки округляются и разрушаются (Рисунок 12B). При добавлении к культуре клеток смеси вератридина, уабаина и ТТХ жизнеспособность клеток повышается, многие клетки остаются распластанными по субстрату, количество округленных клеток значительно снижается (Рисунок 12C). Подобный эффект, но выраженный в меньшей степени, наблюдается и при добавлении экстракта *C. gottheilii 1839* в разведении 1 к 50 (Рисунок 12D). В больших разведениях экстракта бактерии выживаемость клеток сильно снижется.

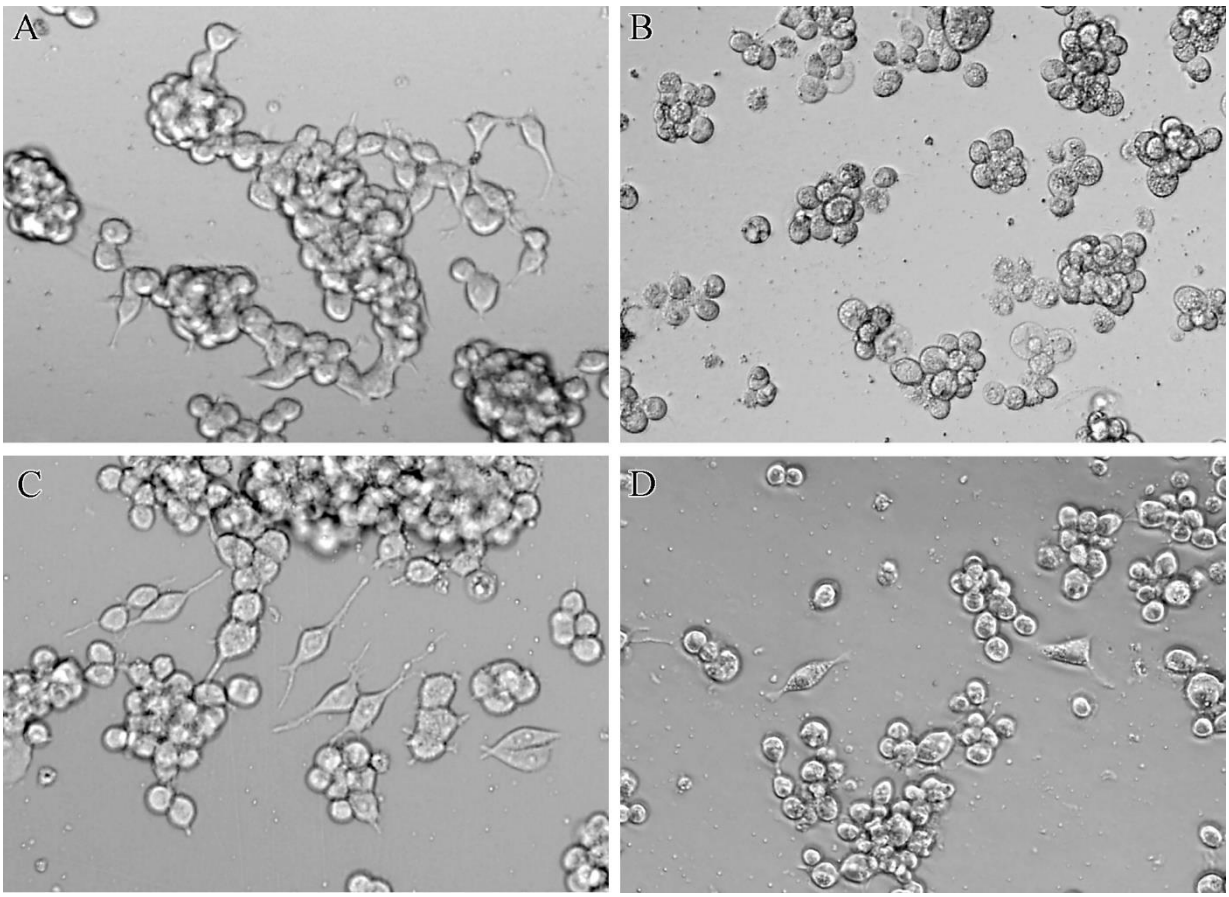


Рисунок 12 – Вид культуры клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) в чистой среде (A) и при добавлении: вератридина и уабаина (B), вератридина, уабаина и тетродотоксина (C) и вератридина, уабаина и экстракта *Cytobacillus gottheilii* 1839 в разбавлении 1 к 50. Микрофотографии сделаны при увеличении 400x.

3.4. ТТХ и его производные в штамме *Cytobacillus gottheilii* 1839

Поиск ТТХ и его производных проводили в вегетативной и споровой культурах штамма *C. gottheilii* 1839, выращенного на твердой питательной среде. ТТХ был обнаружен только в экстракте споровой культуры (Рисунок 13А, Таблица 12). Спектр фрагментации МС/МС выявил характерные фрагментные ионы ТТХ с m/z 320, 302 и 162, соответствующие $(M+H)^+$, $(M+H-H_2O)^+$ и $(M+H-C_3H_7O_6)^+$ (Рисунок 13В). В споровой культуре штамма были также обнаружены пик со временем удерживания 5,66 мин и МРМ переходами 272.10 > 254.10 и 272.10 > 162.10, соответствующий 5,6,11-тридеоксиТТХ (Рисунок 14А), и пик со временем удержания 10,94 мин и МРМ переходами 290.10 > 272.10 и 290.10 > 162.10, соответствующий 11-норТТХ-6(R)-ол (Рисунок 14В). Однако концентрация данных токсинов была ниже лимита подсчета (<0,6 нг/мл), что не позволило получить их спектры фрагментации.

Таблица 12. Концентрация тетродотоксина (ТТХ) и его производных в вегетативной и споровой культурах *Cytobacillus gottheilii* 1839

Тип культуры	Количество токсина	ТТХ	5,6,11-тридеоксиТТХ	11-норТТХ-6(R)-ол
Вегетативная	нг/мл экстракта	-	-	-
	нг/л бактериальной массы	-	-	-
Споровая	нг/мл экстракта	0,751	+	+
	нг/л бактериальной массы	30,04	+	+

Примечание. –: не обнаружен; +: ниже предела количественного определения

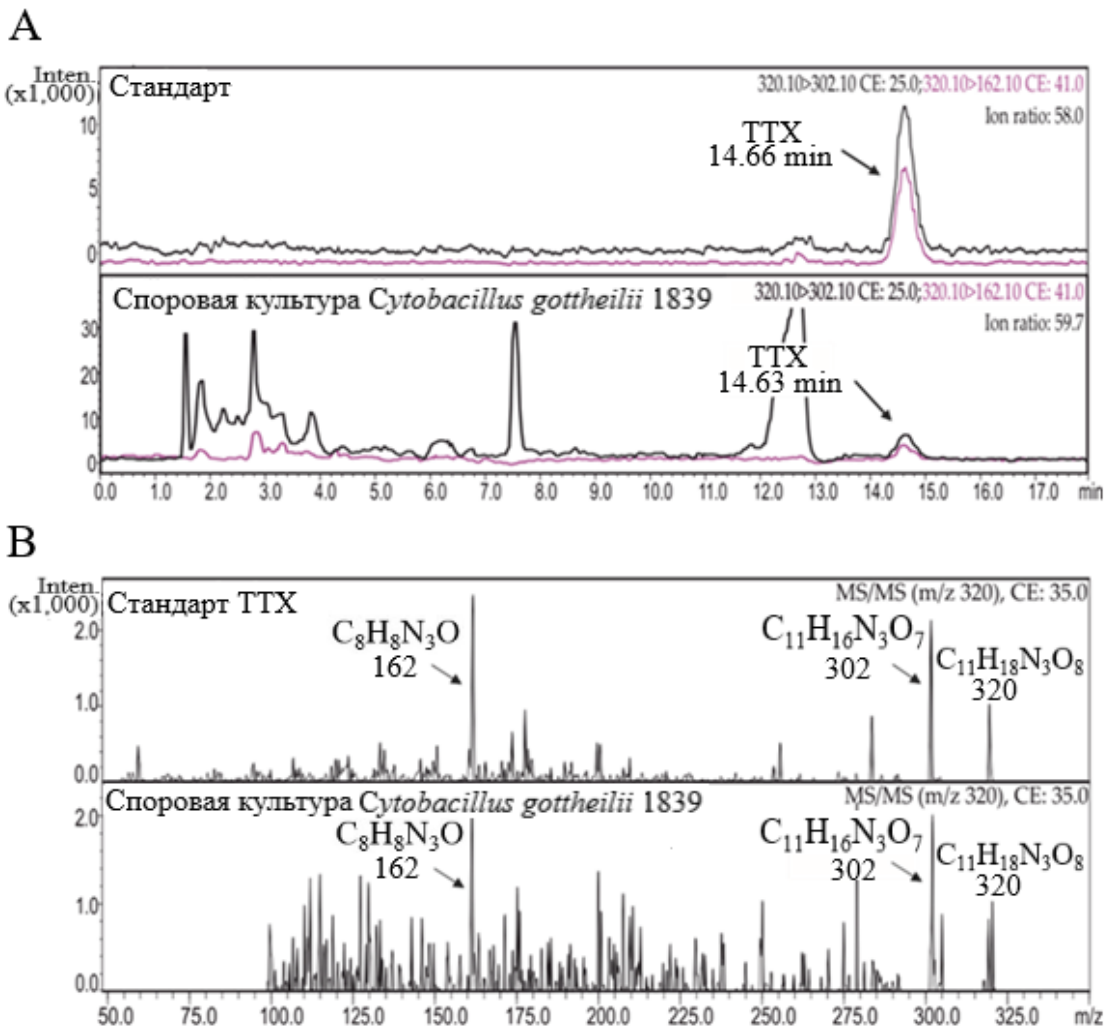


Рисунок 13 – Тетродотоксин (TTX) в споровом экстракте *Cytobacillus gottheilii* 1839. Хроматограммы (**A**) и масс-спектры (**B**) стандарта TTX и спорового экстракта штамма, полученные с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. В качестве стандарта TTX использовали коммерческий раствор TTX в концентрации 1 нг/мл.

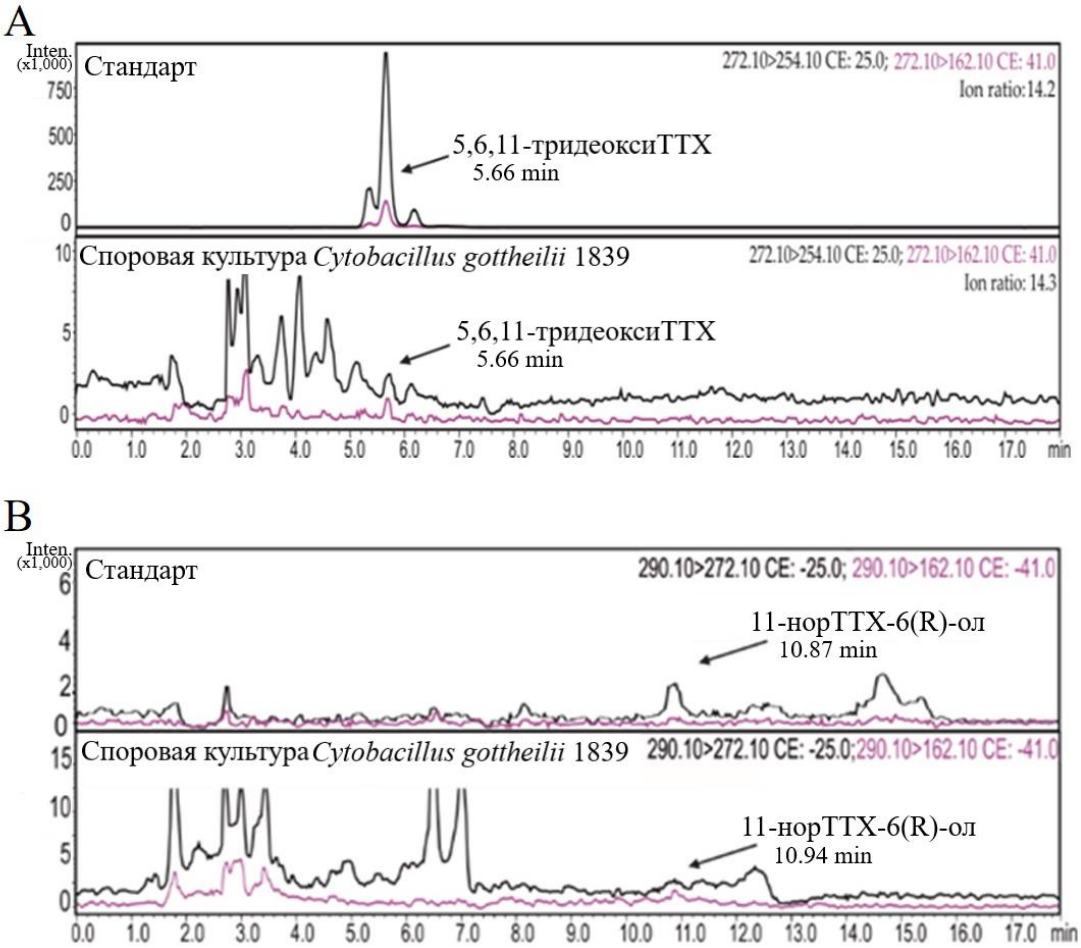


Рисунок 14 – 5,6,11-тридеоксиТТХ (**А**) и 11-норТТХ-6(R)-ол (**В**) в споровом экстракте *Cytobacillus gottheilii* 1839. Хроматограммы стандартов токсинов и спорового экстракта штамма, полученные в результате высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. В качестве стандарта 5,6,11-тридеоксиТТХ и 11-норТТХ-6(R)-ол использовали экстракт тетродотоксин (ТТХ)-содержащей немертины *Cephalothrix* cf. *simula*, приготовленный Власенко с соавторами (Vlasenko et al., 2018).

3.5. Жизненный цикл штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 при выращивании на твердых и жидких питательных средах

Жизненный цикл штамма *C. gottheilii* 1839 исследовали на твердой и жидкой питательных средах с помощью световой микроскопии. Для выявления эндоспор и свободных спор использовали окраску по методу Пешкова (Рисунок 15). В первые 12 часов после начала культивирования на твердой питательной среде бактерии представляли собой палочки длиной 4,4-5,22 мкм и шириной 0,47-0,68 мкм (Таблица 13). Большая часть бактерий была собрана в цепочки по 4-5 клеток в каждой. Длина цепочек варьировала от 14,91 до 26,11 мкм. Каких-либо эндоспор внутри бактерий, а также свободных спор выявлено не было. На первые сутки

около 29% бактериальной культуры содержало эндоспоры (Рисунок 16). Эндоспоры *C. gottheilii* 1839 представляли собой короткие расширенные палочки, длиной 1,35–1,69 мкм и шириной 0,86-1,22 мкм (Таблица 13). Длина материнской клетки, содержащей эндоспору, на первые сутки составляла 3,18–3,88 мкм, а ее ширина варьировала от 0,61 мкм в материнской части до 1,23 мкм в области эндоспоры. Форма таких материнских клеток часто напоминала теннисные ракетки. Бактериальные клетки, в основном, располагались разрозненно и изредка формировали цепочки из 2-3 клеток. В последующие сутки концентрация спор увеличивалась, и к концу культивирования 72% культуры было представлено свободными спорами (Рисунок 16). Также встречались бактерии с эндоспорами (около 3% культуры) и бактерии без эндоспор (около 25% культуры). Свободные споры *C. gottheilii* 1839 были длиной 1,43–1,89 мкм и шириной – 0,91–1,12 мкм.

Таблица 13. Вариативность размеров клеток штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 в процессе смены жизненных фаз

Время культивирования	**Вегетативные клетки, мкм**		**Эндоспоры, мкм**		**Материнская клетка с эндоспорой, мкм**			**Свободные споры, мкм**	
	L	**B**	**L**	**B**	**L**	**B1**	**B2**	**L**	**B**
12 ч	4,47± 0,75	0,57± 0,1	-	-	-	-	-	-	-
24 ч	2,91± 0,4	0,67± 0,13	1,52± 0,17	1,04± 0,18	3,53± 0,35	0,53± 0,08	1,04± 0,18	-	-
6 сут	3,04± 0,65	0,60± 0,09	1,46± 0,23	1,11± 0,12	3,4± 0,37	0,52± 0,06	1,11± 0,12	1,66± 0,23	1,01± 0,11

Примечание. L – длина; B – ширина; B1 – ширина в узкой части клетки; B2 – ширина в широкой части клетки.

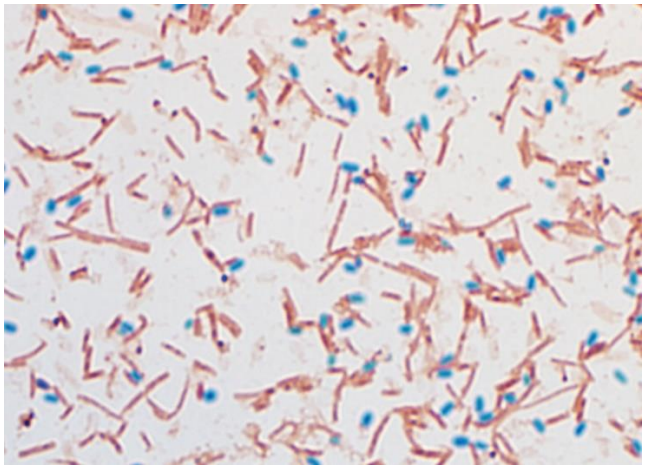


Рисунок 15 – Микрофотография культуры *Cytobacillus gottheilii* 1839, окрашенной по методу Пешкова, при увеличении 1000х. Синим цветом окрашены споры бактерий, вегетативные клетки имеют красный окрас.

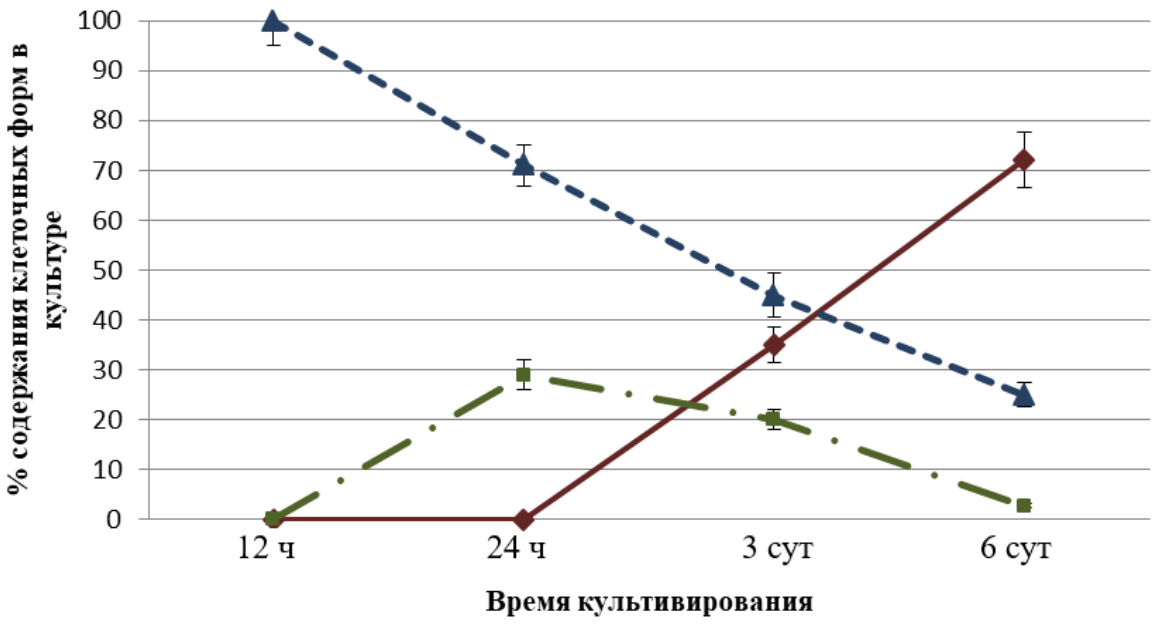


Рисунок 16 - Динамика культивирования штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 на твердой среде. (♦) - % спор; (■) - % эндоспор; (▲) - % вегетативных клеток в бактериальной культуре.

Через 12 ч после начала культивирования штамма *C. gottheilii* 1839 на жидкой питательной среде бактерии представляли собой одиночные палочки длиной 2,48–2,78 мкм и шириной 0,42–0,44 мкм. Часть бактерий была собрана в парные палочки и цепочки по 3-4 клетки в каждой. Длина цепочек варьировала от 3,94 до 5,42 мкм. В первые шесть суток эндоспоры в культуре обнаружены не были. К концу срока культивирования в культуре были выявлены единичные свободные споры, концентрация которых не превышала 1%. Свободные споры штамма при культивировании на жидкой среде представляли собой клетки длиной 0,78–1,27 мкм и шириной 0,37-0,75 мкм.

Бактерии, выращенные на твердой среде, характеризовались слабым разделением на область цитоплазмы и нуклеоида (Рисунок 17А). Толщина цитоплазмы варьировала от 0,2 до 0,3 мкм. Цитоплазма была представлена плотноупакованным мелкозернистым компонентом. Область нуклеоида имела вид узкой полоски, расположенной в центральной части клетки. Содержимое нуклеоида было представлено плотно расположенными гранулярным и фибриллярным компонентами. Бактерии, выращенные на жидкой среде, имели четкое разделение на область цитоплазмы и нуклеоида (Рисунок 18А). Область цитоплазмы была представлена рыхло-упакованным мелкогранулярным

веществом, в котором встречались отдельные участки с гомогенным компонентом средней электронной плотности. Толщина цитоплазмы варьировала от 0,05 до 0,2 мкм. Область нуклеоида была широкой и представлена рыхло расположенными гранулярным и фибриллярным компонентами. Бактерии, выращенные как в жидкой, так и на твердой среде, содержали в цитоплазме вакуоли с электронносветлым содержимым (Рисунок 17A). Клеточная стенка бактерий состояла из внутреннего муреинового слоя, плазматической мембраны и внешнего белкового, или S-слоя (Рисунок 17B). S-слой формировал множество мелких волнообразных складок.

В культурах, полученных с твердой и жидкой сред, присутствовали делящиеся клетки на разных этапах клеточного цикла. В бактериальной культуре, выращенной на твердой среде, наблюдалось как бинарное (Рисунок 17C), так и асимметричное деление (Рисунок 17D). В культуре бактерий в жидкой среде наблюдалось только бинарное деление. В результате бинарного деления дочерние клетки не расходились, а были разделены друг от друга вегетативной септой, состоящей из двух плотных слоев, разделённых прослойкой светлого материала (Рисунок 17C). Внешний белковый слой клеточной стенки окружал дочерние клетки и не принимал участия в формировании вегетативной септы.

На твердой среде в результате асимметричного деления спорулирующей клетки формировался спорангий, состоящий из двух областей: более крупной – материнской, меньшей - будущей споры (Рисунок 17D). Материнская область и будущая спора имели свои собственные клеточные мембраны и были отделены друг от друга спорулирующей септой. Спорулирующая септа состояла из двух светлых слоев, симметрично разделенных одним плотным слоем, являющимся продолжением внутренней оболочки материнской клетки. Снаружи спорангиум был покрыт единым внешним слоем клеточной стенки. На следующем этапе спорообразования происходило погружение дочерней клетки вглубь материнской (Рисунок 17E). Материнская клетка с одной из сторон формировала один вырост (филоподию), который постепенно обволакивал будущую спору. За счет такого одностороннего окружения будущая спора смещалась на боковую сторону

материнской клетки. Во время инвагинации спорулирующая септа была ассоциирована с крупной мезосомой (Рисунок 17F). На последующих этапах формирования эндоспоры мезосомы отсутствовали. Недавно сформированные «ранние» споры, или предспоры, были окружены двойной цитоплазматической мембраной: внутренней, собственной мембраной предспоры, и наружной, мембраной материнской клетки, с едва различимым (толщиной до 45 нм) разделительным слоем (кортексом) средней электронной плотности (Рисунок 17G). Снаружи «ранние» эндоспоры окружала оболочка, состоящая из 1-2 концентрических слоев (Рисунок 17G). Протопласт ранней и поздней эндоспоры был представлен плотноупакованным гранулярно-фибриллярным содержимым. У более зрелых эндоспор внешняя оболочка состояла из двух концентрических слоев (толщиной по 4 нм), разделенных тонким (толщиной около 5 нм) электронопрозрачным слоем (Рисунок 17H). Внутренняя оболочка зрелых эндоспор представляла собой гомогенную субстанцию высокой электронной плотности с ламеллярной организацией в некоторых местах (от двух до пяти, чаще четырех слоев мембраны). Кортекс представлял собой обширный (до 0,5 мкм) слой электронносветлого вещества (Рисунок 17I, J). Внешняя оболочка спор, только что вышедших из материнской клетки, была образована 4-5 концентрическими слоями (Рисунок 17I, J). Толщина внешней оболочки споры составляла около 48 нм, внутренней – 45 нм. Каких-либо дополнительных слоев, в том числе экзоспорума, вокруг свободных спор обнаружено не было.

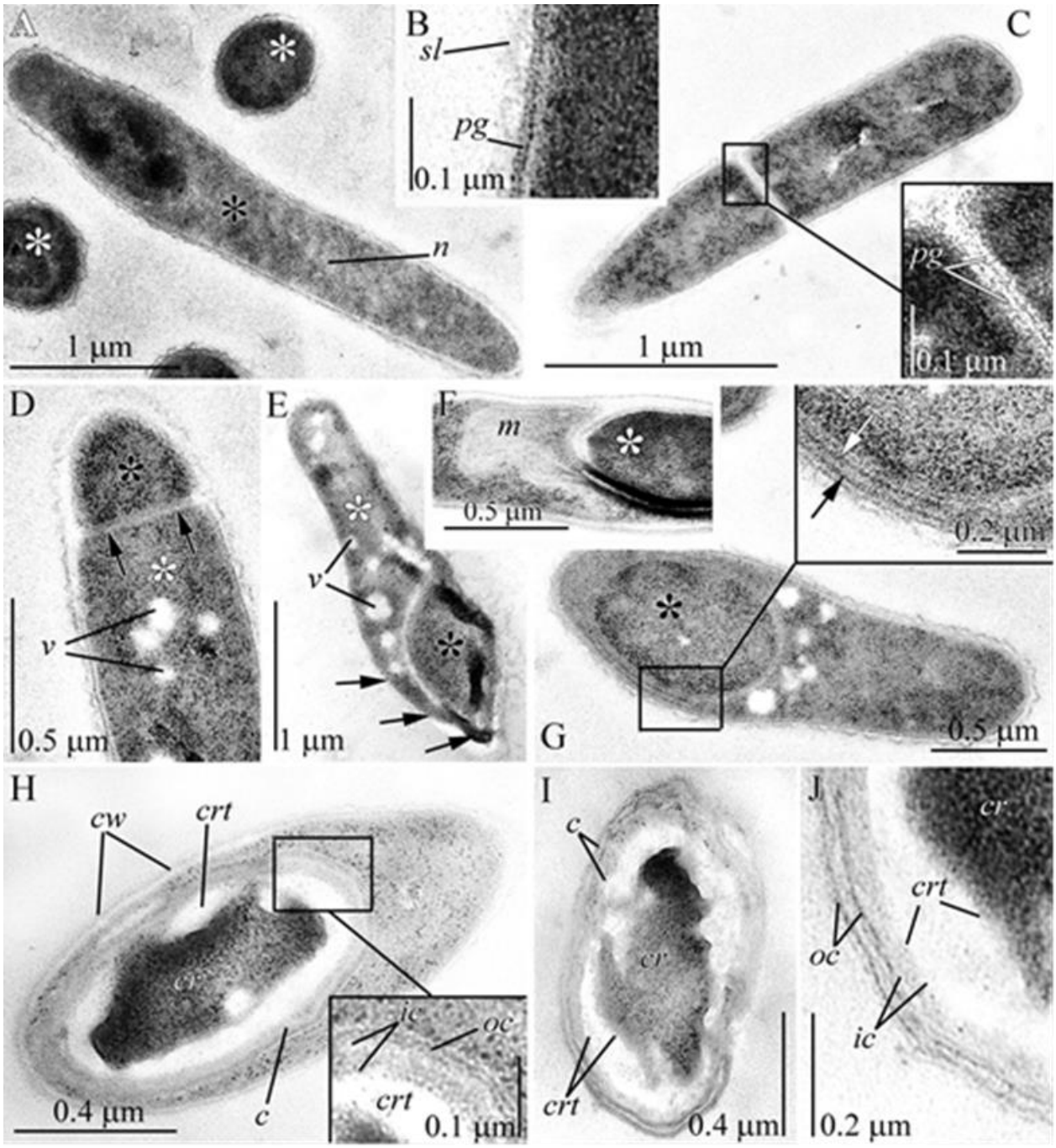


Рисунок 17 - Электронно-микроскопические изображения *Cytobacillus gottheilii* 1839, культивируемого на плотной питательной среде. **A** – продольный (черная звездочка) и поперечный (белые звездочки) профиль бактериальных клеток; **n** – область нуклеоида; **B** - бактериальная клеточная стенка; **pg** – пептидогликан; **sl** – белковый S-слой; **C** симметричное деление бактериальной клетки (сформированная вегетативная септа); **D** – спорангий, состоящий из более крупной материнской клетки (белая звездочка), и меньшей – будущей споры (черная звездочка); **v** – везикула; **E** – окружение проспоры (черная звездочка) филоподией материнской клетки (белая звездочка); **F** – мезосомоподобные структуры, локализованные около проспоры (белая звездочка); **m** – мезосомоподобные структуры; **G** – незрелая эндоспора (черная звездочка) внутри материнской клетки; **H** – зрелая эндоспора; **cw** – клеточная стенка; **crt** – кортекс ; **c** – оболочка споры; **ic** - внутренний слой оболочки споры; **oc** – наружный слой оболочки споры; **I** – свободная спора; **cr** – протопласт; **J** – Строение зрелой споры (от центра к периферии): протопласт, кортекс, оболочка, состоящая из внутреннего и внешнего слоев.

В бактериальной культуре, выращенной на жидкой среде, были выявлены только свободные споры. Внешняя оболочка спор была представлена двумя концентрическими слоями, разделенными друг от друга электроннопрозрачным слоем шириной 15–25 нм; толщина внешнего слоя варьировала от 5 до 10 нм, а внутреннего – от 12 до 20 нм (Рисунок 18В). Внутренняя оболочка споры представляла собой слой гомогенного вещества средней электронной плотности (толщиной от 20 до 30 нм). Кортекс был образован обширным электронносветлым слоем (толщиной от 30 до 100 нм). Протопласт (диаметром 0,3–0,5 мкм) имел четкое разделение на цитоплазму и область нуклеоида (Рисунок 18С). Ширина цитоплазмы не превышала 0,2 мкм, цитоплазма состояла из плотноупакованного мелкогранулярного вещества высокой электронной плотности. Область нуклеоида (диаметром около 0,4 мкм) состояла из фибриллярно-гранулярного вещества средней электронной плотности. С внешней стороны протопласт был окружен клеточной стенкой, к внутреннему слою пептидогликана которой примыкала плазматическая мембрана, а к внешнему слою - S-слой.

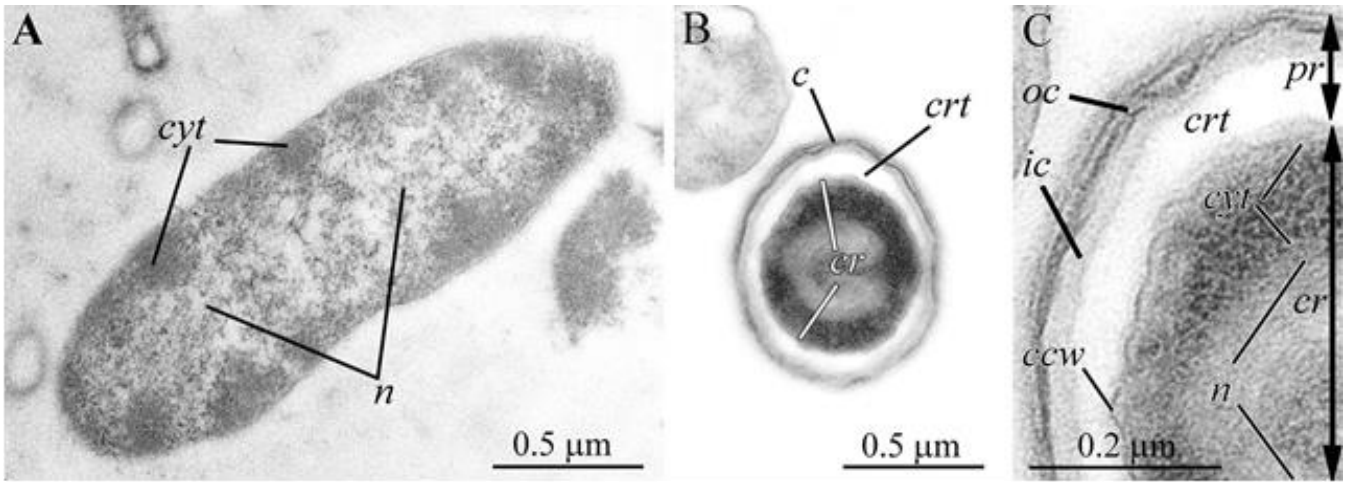


Рисунок 18 - Электронно-микроскопические изображения *Cytobacillus gottheilii* 1839, культивируемого на жидкой питательной среде. **A** – продольный профиль бактериальной клетки; **cyt** – цитоплазма клетки; **n** – область нуклеоида; **B** – свободная спора; **c** – оболочка споры; **crt** – кортекс; **C** – строение свободной споры (от центра к периферии): протопласт, кортекс, оболочка, состоящая из внутреннего и внешнего слоев; **cr** – протопласт; **ic** - внутренний слой оболочки споры; **oc** – наружный слой оболочки споры; **ccw** – клеточная стенка споры; **pr** – защитный слой.

3.6. Стимуляция спорообразования у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839

Для стимуляции спорообразования у штамма *C. gottheilii* 1839 использовали стандартные микробиологические методики включающие, длительное культивирование в жидкой питательной среде, температурное воздействие при диапазоне от 0°C до 75°C, гипертонический (0,92 М хлорид натрия) и гипотонический (бидистиллированная вода) растворы и спорулирующую среду (Таблица 14). Эффективным для данного штамма триггером к спорообразованию оказалось воздействие осмотическим шоком. При этом, наилучший результат был получен при стимуляции спорообразования 0,92 М раствором хлорида натрия, позволившим получить значительное увеличение количества спор уже в первые часы после начала инкубирования в растворе. Хуже всего оказалось воздействие высоких температур (60°C и 75°C), которое не только не вызвало формирование спор, но и привело к деструктивным изменениям в бактериях, таким как разрушение клеточной стенки и выход плазмодия.

Таблица 14. Эффективность стандартных методов стимуляции спорообразования в отношении штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839

Метод стимуляции спорообразования	**Время воздействия**	**Концентрация спор, %**
Длительное культивирование в жидкой среде	1–7 сут	до 1
Спорулирующая среда	1–7 сут	до 2
Бидистиллированная вода	1 ч	35,2±5,2
	6 ч	27,1±4,7
	24 ч	9,6±1,5
0,92 М раствором хлорида натрия	1 ч	36,2±8,9
	6 ч	24,3±7,0
	24 ч	23,4±4,8
Воздействие низких/высоких температур	5–60 мин	менее 1

Исследование культуры штамма *C. gottheilii* 1839, подвергнутой воздействию 0,92 М раствора хлорида натрия, с помощью КЛСМ с антителами против ТТХ показало, что уже через 5 мин после начала инкубирования в растворе, около 2% бактериальных клеток имели токсин-положительную метку (Рисунок 19А).

Одиночные или множественные ТТХ-положительные метки имели терминальное расположение в клетках. Через 30 мин после начала инкубирования концентрация ТТХ-положительных клеток увеличилась до 8–12%. При этом наблюдалось размещение ТТХ-положительной метки по периферии клеток (Рисунок 19B). Спустя час инкубирования количество клеток с ТТХ-положительной меткой достигало 15-18%. Метка была представлена преимущественно узким сплошным кольцом по периферии клетки и иногда заполняла всю клетку (Рисунок 19C).

С помощью ТЭМ через 60 мин после начала инкубации в 0,92 М растворе хлорида натрия было выявлено два типа спор: с оформленным (Рисунок 19D) и неоформленным (Рисунок 19F) протопластом. Споры с оформленным протопластом имели, типичную для бацилл, структуру и состояли из плотно упакованного протопласта, покрытого двумя защитными слоями: внешней пластинчатой электронноплотной оболочкой и внутренним широким электронносветлым кортексом (Рисунок 19G). Споры данного типа имели форму коротких палочек 1,00±0,06 мкм в длину и 0,5±0,04 мкм в ширину. Споры с неоформленным протопластом состояли из слабо упакованного фибринозного протопласта, окруженного пластинчатой оболочкой (Рисунок 19E). Такие споры были 1,18±0,08 мкм в длину и 0,7±0,07 мкм в ширину. Споры с неоформленным протопластом преобладали и составляли около 70% от общего числа спор. С помощью иммуноэлектронной микроскопии с антителами против ТТХ в спорах, образованных в течение первого часа после стимуляции, были выявлены ТТХ-положительные структуры (Рисунок 19F). При этом, оболочка и кортекс спор имели интенсивную ТТХ-положительную метку, а протопласт окрашивался менее интенсивно.

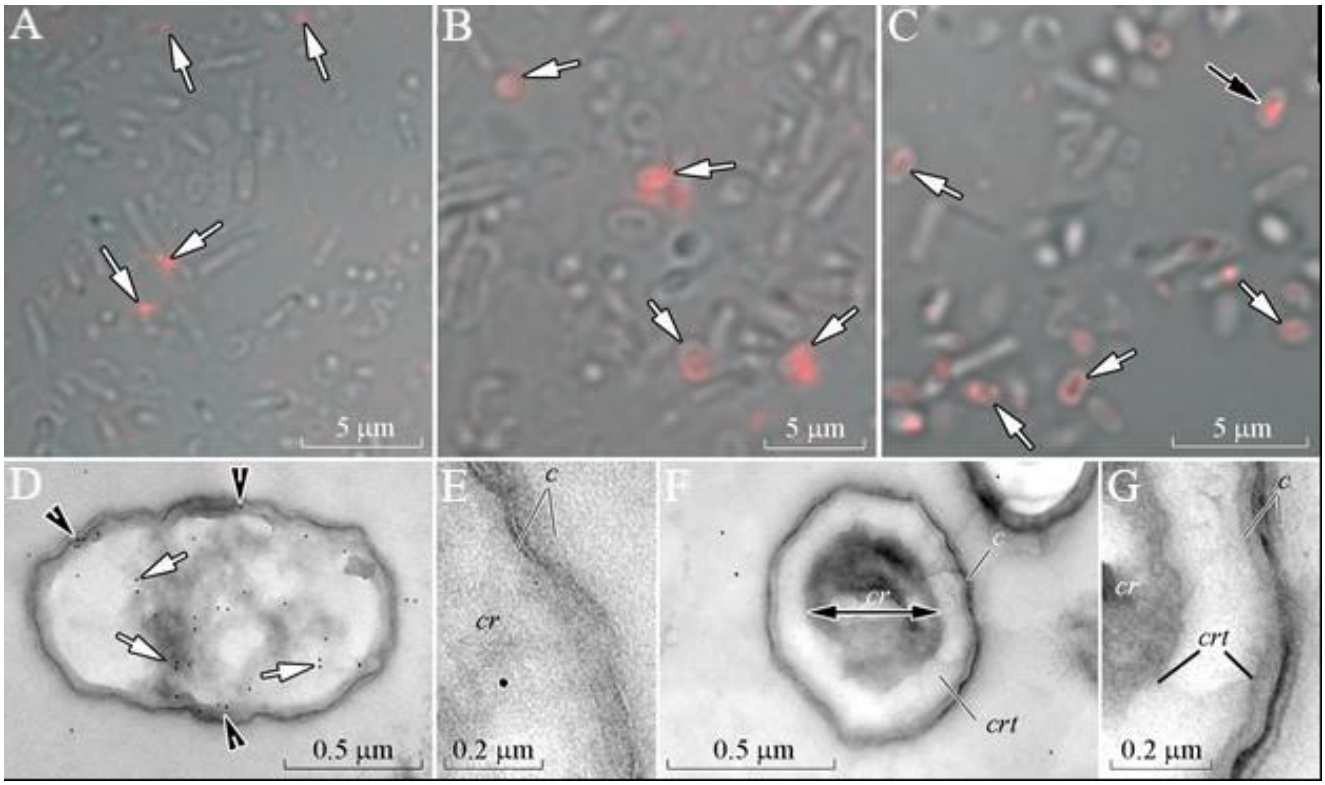


Рисунок 19 - Изображения (Z-проекции), полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (**A-C**), и иммуноэлектронные микрофотографии (**D-G**) окрашенных антителами против TTX клеток штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 после стимуляции спорообразования. **A-C** – панорамный вид бактериальной культуры через 5 (**A**), 30 (**B**) и 60 (**C**) мин после начала стимуляции спорообразования. Белыми стрелками отмечены одиночные или множественные TTX-положительные метки, расположенные на концах или периферии клетки. Черная стрелка указывает на TTX-положительную метку, занимающую всю область клетки. **D** – спора с неоформленным протопластом, образованная через 60 мин после начала стимуляции спорообразования. Черные стрелки указывают на множественные TTX-положительные метки в области оболочки и кортекса споры. Белые стрелки указывают на единичные метки в области протопласта. **E** – фрагмент споры с неоформленным протопластом: протопласт (**cr**) окружен пластинчатой оболочкой (**c**). **F** – спора с оформленным протопластом, сформированная через 60 мин после начала стимуляции спорообразования; (**crt**) – кортекс. **G** – фрагмент споры с оформленным протопластом: протопласт окружен защитными слоями (оболочкой и кортексом).

3.7. Анализ полного генома штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839

Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательностей гена 16S рРНК, показал, что штамм, ранее определенный как *Bacillus* sp. 1839, наиболее близок к *Cytobacillus gottheilii* (Рисунок 20). К настоящему времени только две полные последовательности генома этого вида были депонированы в базу данных

NCBI (Таблица 15). Данные геномы были использованы для уточнения видовой принадлежности штамма с помощью индексов ANI и dDDH. Значения ANI между исследуемыми штаммами составляли более 97%, что превышает стандартный порог разделения видов в 95% (Таблица 16). Рассчитанные значения dDDH находились в диапазоне 79,6–85,9%, что также превышает пороговое значение разделения видов DDH в 70% (Таблица 17). Согласно результатам анализов штамм *Bacillus* sp. 1839 был классифицирован как *Cytobacillus gottheilii*.

Таблица 15. Основные характеристики геномов наиболее близких к *Cytobacillus gottheilii* 1839 видов.

Организм	**№ доступа в GenBank NCBI**	**Уровень сборки**	**Размер (п.н.)**	**ГЦ (%)**	**Общее число кодирующих последовательностей**	**Число генов**	**Число белок-кодирующих генов**	**Число РНК**
Cytobacillus gottheilii Marseille-P3555	NZ_FUVC00000000.1	Скаффолд	4719939	39,1	4492	4621	4452	129
Cytobacillus gottheilii FJAT-2394	NZ_KV440945	Геном	4584535	39,0	4370	4475	4310	105

Таблица 16. Значения средней нуклеотидной идентичности (ANI) и коэффициента частотной корреляции тетрануклеотидов (Tetra) между *Cytobacillus gottheilii* 1839 и близкородственными штаммами *Cytobacillus* spp.

	***Bacillus* sp. 1839**			***Cytobacillus gottheilii* Marseille-P3555**			***Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394**		
	ANIb (%)	**Совпадающие нуклеотиды (%)**	**Tetra**	**ANIb (%)**	**Совпадающие нуклеотиды (%)**	**Tetra**	**ANIb (%)**	**Совпадающие нуклеотиды (%)**	**Tetra**
***Bacillus* sp. 1839**	*			97,55	85,95	0,99891	97,55	85,95	0,99892
***Cytobacillus gottheilii* Marseille-P3555**	97,32	86,16	0,99891	*			100,00	99,49	1,0
***Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394**	97,34	86,18	0,99892	100,00	99,47	1,0	*		

Примечание. *Звездочкой обозначено сравнение штамма с самим собой.

Таблица 17. Значения цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH) между *Cytobacillus gottheilii* 1839 и близкородственными штаммами *Cytobacillus* spp.

Исследуемый геном	Контрольный геном	Формула 1			Формула 2			Формула 3		
		DDH (%)	Модель C.I. (%)	Расстояние	DDH (%)	Модель C.I. (%)	Расстояние	DDH (%)	Модель C.I. (%)	Расстояние
Bacillus sp. 1839	*Cytobacillus gottheilii* Marseille-P3555	83,7	79,8 – 86,9	0,1140	79,6	76,6 – 82,2	0,0239	85,9	82,8 – 88,5	0,1351
Bacillus sp. 1839	*Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394	83,7	79,9 – 86,9	0,1137	79,6	76,6 – 82,2	0,0239	85,9	82,8 – 88,6	0,1349

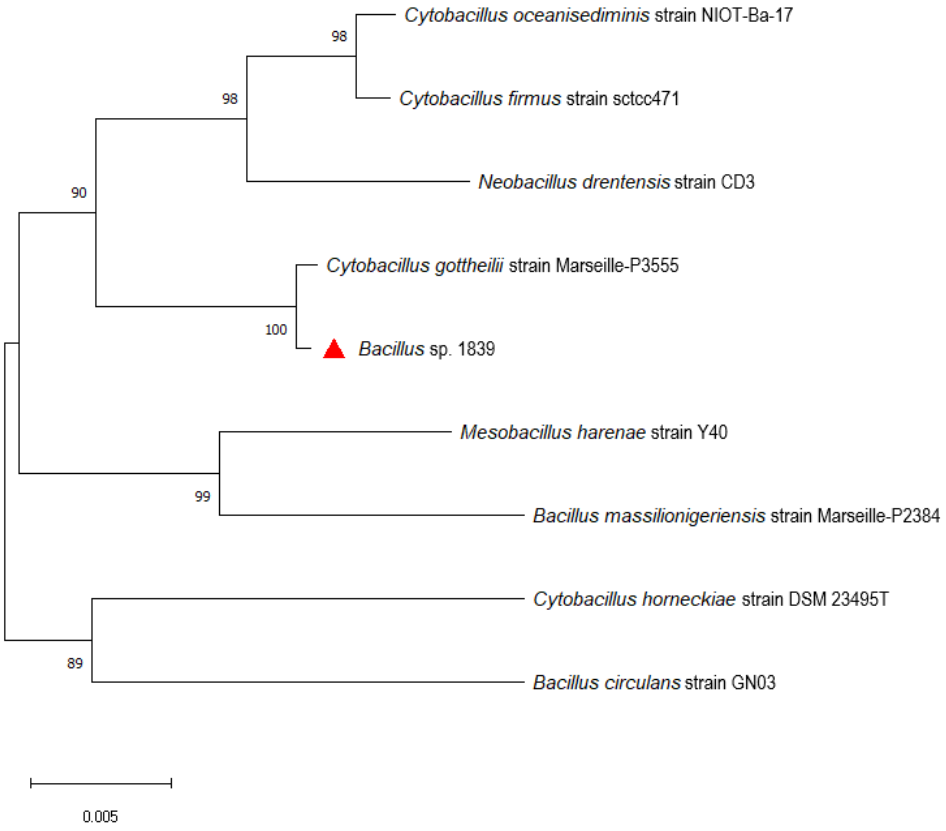


Рисунок 20 - Филогенетическое дерево *Bacillus* sp. 1839 и других близкородственных штаммов, построенное на основе последовательности гена 16S рРНК методом объединения ближайших соседей. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на 1000 нуклеотидов. Цифрами обозначена статистическая достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев, определенная с помощью бутстрэп анализа. Красным треугольником обозначен штамм *Bacillus* sp. 1839.

Специфические особенности генома штамма *C. gottheilii* 1839 приведены в таблице 19 и на рисунке 21. Согласно результатам анализа полной нуклеотидной последовательности геном *C. gottheilii* 1839 представлен одной кольцевой

хромосомой размером 4,6 Мб (Рисунок 21А) и плазмидой размером 0,06 Мб (Рисунок 21В). Содержание ГЦ пар нуклеотидов всего генома составляет 39,18%. Геном включает 4527 генов, из которых 4369 (96,5%) генов определяют синтез белков, 119 (2,6%) – синтез молекул РНК, и 39 (0,9%) генов относится к псевдогенам (Таблица 18). Мобильный генетический пул штамма представлен IS, ГО, CRISPR локусами и профагами. Большинство выявленных IS относится к семейству IS1182 (76), за которым следуют IS3 (10), IS21 (3), IS4 (1), IS110 (1) и IS1595 (1). Один из ГО, обнаруженный в геноме, был определен, как интактный профаг. Всего в геноме штамма было определено четыре профаговых области, две из которых неполные и две интактные, что указывает на перенесенную фаговую инфекцию.

Из всего пула генов, только 3508 (77,5%) было отнесено к основным функциональным группам генов согласно номенклатуре COG (Таблица 19), при этом 22,8% из них относятся к группе генов с неизвестной функцией. Как видно из данных, приведенных в таблице 20, наибольшее число генетических детерминант в клетке определяет транскрипцию (K, 6,2%), транспорт и метаболизм аминокислот (E, 5,8%), углеводов (G, 4,9%) и неорганических ионов (P, 5,7%). Достаточно высокий процент генов участвует также в сигнальной трансдукции (T, 4,4%).

Таблица 18. Основные характеристики генома *Cytobacillus gottheilii* 1839

Показатель	**Значение**	
	Хромосома	**Плазмида**
Размер генома, п.н.	4 584 688	61 233
ГЦ состав, %	39,18	33,91
Общее число генов	4458	69
Общее число кодирующих последовательностей	4339	69
Числок белок-кодирующих генов	4300	69
Гены рРНК	11, 10, 10 (5S, 16S, 23S)	0
Гены тРНК	83	0
Гены некодирующей РНК	5	0
Число псевдогенов	39	0
Число инсерционных последовательностей	92	0
Число геномных островков	9	0
Число коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (с англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR))	2	0
Число профагов	4	0

Таблица 19. Связь генов, определяющихся в геноме штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 с основными функциональными группами генов согласно номенклатуре групп ортологичных генов (с англ. Cluster of Ortologous Genes (COG))

Код группы согласно COG	**Количество генов в штамме**	**% от общего числа белок-кодирующих генов в геноме штамма**	**Описание функций группы**
ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ			
B	1	0,02	Структура и динамика хроматина
J	171	3,9	Трансляция, синтез рибосом
K	269	6,2	Транскрипция
L	197	4,5	Репликация, рекомбинация и репарация
МЕТАБОЛИЗМ			
C	189	4,3	Энергетический метаболизм клетки
E	255	5,8	Транспорт и метаболизм аминокислот
F	88	2	Транспорт и метаболизм нуклеотидов
G	213	4,9	Транспорт и метаболизм углеводов
H	100	2,3	Транспорт и метаболизм коферментов
I	88	2	Транспорт и метаболизм липидов
P	248	5,7	Транспорт и метаболизм неорганических ионов
Q	29	0,7	Биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов
КЛЕТОЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ И СИГНАЛИНГ			
D	36	0,8	Контроль клеточного цикла, деление клеток, деление хромосомы
M	170	3,9	Биогенез клеточной стенки/ мембраны/ оболочки клетки
N	43	1	Подвижность клеток
O	113	2,6	Посттрансляционная модификация, оборот белка в клетке, шапероны
T	191	4,4	Механизмы передачи сигнала
U	38	0,9	Внутриклеточный транспорт, секреция и везикулярный транспорт
V	75	1,7	Защитные механизмы
ПЛОХО ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫЕ ГЕНЫ			
S	994	22,8	Функция неизвестна
-	848	19,5	Не относится ни к одной COG группе

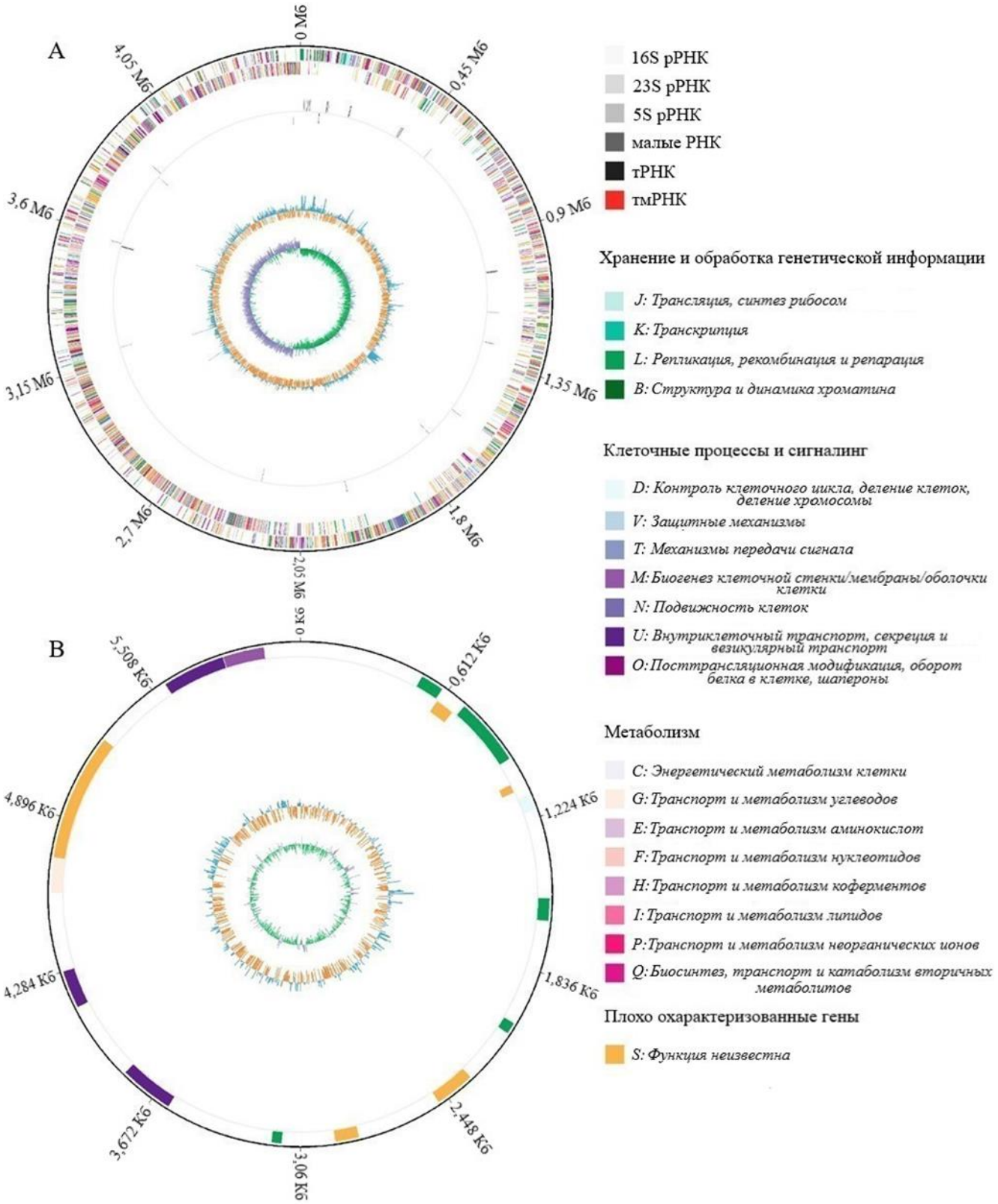


Рисунок 21 - Круговая карта хромосомы (**A**) и плазмиды (**B**) штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. По направлению снаружи внутрь: первое кольцо отражает размер генома; второе и третье кольца отражают положение белок-кодирующих генов на смысловой и антисмысловой цепях, соответственно; четвертое и пятое кольца отражают положение РНК-кодирующих генов на смысловой и антисмысловой цепях, соответственно; шестое кольцо является гистограммой Г+Ц состава (голубой>39,18%, оранжевый≤39,18%); седьмое кольцо отражает Г+Ц skew (зеленый - Г%>Ц%, фиолетовый - Г%<Ц%).

Использование базы данных метаболических путей PATHWAY от ресурса KEGG позволило отнести 2314 генов исследуемого штамма к 212 категориям, среди которых наибольшую долю составили «Метаболические пути» (547 генов), «Биосинтез вторичных метаболитов» (254 гена), «Микробный метаболизм в различных средах» (129 генов), «Биосинтез аминокислот» (104 гена), «Биосинтез кофакторов» (112), «Двухкомпонентные системы в передаче сигнала» (91), «ABC-транспортеры» (90) и «Углеродный метаболизм» (81). Аргинин является единственным, на данный момент, предполагаемым источником гуанидинового фрагмента молекулы ТТХ при ее биосинтезе (Chau et al., 2011). В результате поиска в базе данных KEGG было выявлено 17 генов с установленной ортологией, продукты которых составляют полный путь биосинтеза аргинина через ацетильный цикл (Рисунок 22). Кроме того, в геноме штамма были обнаружены последовательности, соответствующие транскрипционному фактору регуляции метаболизма аргинина argR и белку, регулирующему утилизацию аргинина, rocR.

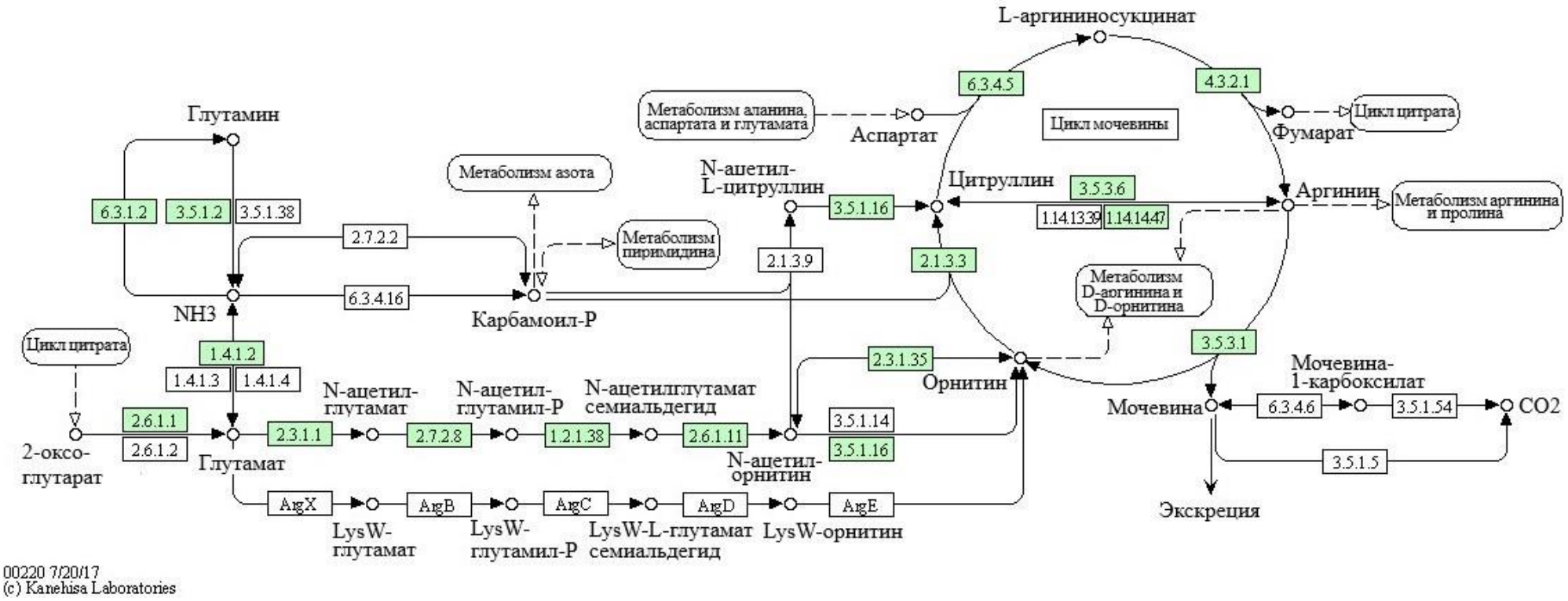


Рисунок 22 - Путь биосинтеза аргинина в бактериях. Зеленым обозначены ферменты, гены которых, были обнаружены в геноме штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. Пунктирные стрелки указывают на переход к сопряженным метаболическим путям. Кружками обозначены продукты реакций. Схема биосинтеза построена с помощью ресурса KEGG PATHWAY Database. Наименование ферментов согласно номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии (с англ. International Union of Biochemistry and Molecular Biology): **6.3.1.2**: глутаминсинтетаза; **3.5.1.2**: глутаминаза; **3.5.1.38**: глутамин(аспарагин)аза; **1.4.1.2**: глутаматдегидрогеназа; **1.4.1.3**: глутаматдегидрогеназа [НАД (Ф) +]; **1.4.1.4**: глутаматдегидрогеназа [НАДФ +]; **2.6.1.1**: аспартатаминотрансфераза; **2.6.1.2**: аланин-трансаминаза; **2.3.1.1**: N-ацетилглутаматсинтаза; **2.7.2.8**: ацетилглутаматкиназа; **1.2.1.38**: N-ацетил-гамма-глутамил-фосфат-редуктаза; **2.6.1.11**: ацетилорнитин-аминотрансфераза; **3.5.1.14**: аминоацилаза; **3.5.1.16**: ацетилорнитин-деацетилаза; 2.3.1.35: глутамат N-ацетилтрансфераза; **2.1.3.3**: орнитинкарбамоилтрансфераза; **6.3.4.5**: аргининосукцинат-синтаза; **4.3.2.1**: аргининосукцинат-лиаза; **3.5.3.6**: аргинин-дезаминаза; **1.14.13.39**: синтаза оксида азота;**1.14.14.47**: синтаза оксида азота; **3.5.3.1**: аргиназа; **6.3.4.6**: карбоксилаза мочевины; 3.5.1.54: аллофанат гидролаза; 3.5.1.5: уреаза; 2.7.2.2: карбаматкиназа; 6.3.4.16: карбамоилфосфатсинтаза; 2.1.3.9: N-ацетилорнитин карбамоилтрансфераза; ArgX: глутамат-LysW-лигаза; ArgB: [белок-носитель аминогруппы]-L-2-аминоадипат-6-киназа; ArgC: LysW-гамма-L-альфа-аминоадипил-6-фосфат/LysW-L-глутамил-5-фосфатредуктаза; ArgD: LysW-гамма-L-лизин/LysW-L-орнитинаминотрансфераза; ArgE: [белок-носитель аминогруппы]-лизин/орнитин гидролаза.

С помощью программ AntiSMASH v. 5.0 и BAGEL4 в геноме штамма *C. gottheilii* 1839 был проведен поиск кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов, включая гены кодирующие поликетиды, нерибосомные пептиды, терпены, аминогликозиды и рибосом синтезированные и посттрансляционно модифицированные пептиды. AntiSMASH выявил 4 предполагаемых кластера генов, два из которых кодируют синтез терпенов, один отвечает за синтез поликетидсинтазы типа III, и один кодирует сразу два вещества – линейный азол(ин)-содержащий пептид YcaO (LAP) и тиопептид YcaO (Табл. 20). С помощью BAGEL4 удалось выделить еще один кластера генов, отвечающий за синтез предшественника бактериоцина UviB (Таблица 20).

Таблица 20. Предполагаемые кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов в геноме штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839, найденные с использованием програмнного обеспечения (А) AntiSMASH v. 5.0 и (Б) BAGEL4, и их схожесть с известными кластерами генов.

№ кластера	**Расположение на геноме (п.н.)**	**Длина кластера (п.н.)**	**Наиболее похожий известный кластер**	**% схожести генов**
Кластер 1(А)	348 477 – 367 415	18 939	Кластер генов биосинтеза терпена штамма *Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394 (NZ_KV440945_c4)	88
Кластер 2(А)	431 948 – 476 894	44 947	Кластер генов биосинтеза тиопептида штамма *Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394 (NZ_KV440945_c3)	82
Кластер 3(А)	973 108 – 1 001 917	28 810	Кластер генов биосинтеза терпена штамма *Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394 (NZ_KV440945_c2)	89
Кластер 4(А)	2 777 409 – 2 818 491	41 083	Кластер генов биосинтеза поликетидсинтазы типа III штамма *Cytobacillus gottheilii* FJAT-2394 (NZ_KV440945_c1)	100
Кластер 5(Б)	1 628 807 – 1 649 023	20 216	Кластер генов биосинтеза бактериоцина UviB *Cytobacillus gottheilii* MA-4680 (NBRC 14893)	45,4

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на повышенный интерес к ТТХ-содержащим животным, данные об их микробном сообществе крайне скудны. Тем не менее, изучение микробного разнообразия ТТХ-содержащих организмов необходимо для понимания процессов происхождения и накопления токсина. В данной работе с использованием метагеномного подхода на основе гена 16S рРНК нами было охарактеризовано микробное сообщество ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин, а также проведен сравнительный анализ их микрофлоры (Melnikova, Magarlamov, 2020). Ранее метагеномный анализ в отношении немертин был использован только в одной работе, описывающей микробиом двух образцов ТТХ-содержащей немертины *C. simula* (Turner et al., 2018). Сравнительный анализ данной работы и наши исследования показали, что в микрофлоре всех изученных немертин преобладают одни и те же типы бактерий, а именно Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria. Некоторое сходство наблюдалось и в составе наиболее представленных порядков, в частности, порядки Rickettsiales, Alteromonadales, Pseudomonadales и Vibrionales встречались среди всех исследуемых образцов. На уровне рода, *Alteromonas*, *Pseudomonas* и *Vibrio* были относительно многочисленными, как в микрофлоре *C. simula*, изученного Тернер с соавторами (Turner et al., 2018), так и у исследованных нами видов. При этом стоит отметить достаточно высокое разнообразие в микрофлоре, как разных видов немертин, так и среди образцов одного вида. Несмотря на большое число обнаруженных в исследовании ОТЕ, только 13 вошло в общий микробиом всех немертин. Такое небольшое количество общих ОТЕ может быть связано с различными предпочтениями в питании, так как диета этих животных разнообразна и включает в себя полужидкие, мягкие или частично переваренные останки членистоногих, кольчатых червей (в основном олигохет и полихет), нематод и небольшую долю живых и мертвых моллюсков и рыб (MCDermott, Roe, 1985; Chernyshev et al., 2014). Виды рода *Cephalothrix* питаются также другими немертинами и практикуют каннибализм (MCDermott, Roe, 1985). Статистические данные, полученные в настоящем исследовании, показали, что образцы одного

вида немертин имеют большее сходство бактериального состава по сравнению с образцами разных видов. Единственным исключением стала немертина *C.* cf. *simula*, все образцы которой сильно различались по микробному составу. Микробные сообщества *K. alborostrata* и *M.* cf. *bella* оказались схожи в относительном обилии таксонов. Кластерный анализ PCoA с использованием индекса Брея-Кёртиса выявил сходство в микрофлоре *Parahubrechtia* sp., *C.* cf. *marginatus*, *Q. stimpsoni* и *H. juliae*. На основании этих результатов сложно говорить о взаимосвязи между филогенией немертин и их бактериальным сообществом. Среди морских беспозвоночных, в ряде исследований на губках было показано, что близкородственные виды имеют большее сходство в составе микробиома, чем более дальние родственники (Montalvo, Hill, 2011; Schöttner et al., 2013; Souza et al., 2017). В данной работе *K. alborostrata* и *M.* cf. *bella*, относящиеся к одному семейству - Lineidae, имели сходный состав микрофлоры, при этом микробные сообщества *Parahubrechtia* sp. и *T. punctatus*, относящихся к семейству Tubulanidae, и *C.* cf. *marginatus* и *K. alborostrata*, из семейства Lineidae, значительно различались.

По результатам метагеномного анализа нами была рассмотрена взаимосвязь между ТТХ-продуцирующими бактериями и наличием токсина в немертинах. Способность продуцировать ТТХ была заявлена среди представителей 31 рода бактерий, выделенных из различных ТТХ-содержащих организмов, морской и пресноводной среды (Magarlamov et al., 2017). Род *Vibrio*, широко распространенный в морских экосистемах, во многих работах отмечается как основной бактериальный продуцент ТТХ. Первое упоминание о взаимосвязи между присутствием вибрионов и синтезом токсина у немертин принадлежит Кэролл с соавторами (Carroll et al., 2003). Однако, способность бактерий рода *Vibrio* продуцировать токсин ставилась под сомнение. Так, Стрэнд с соавторами обнаружили, что соединение, продуцируемое штаммом *V. alginolyticus*, выделенным из немертины *L. longissimus*, имеет схожую с ТТХ молекулярную массу, но отличается от токсина по времени удерживания и характеру фрагментации МС/МС и не обладает токсическим эффектом (Strand et al., 2016).

Тем не менее, в недавнем исследовании Тернер с соавторами с помощью ВЭЖХ-МС/МС подтвердили способность штамма *V. alginolyticus*, выделенного из немертины *Cephalothrix rubifrons*, синтезировать ТТХ (Turner et al., 2018). В настоящей работе было выявлено, что бактерии рода *Vibrio* широко представлены в микрофлоре немертин и преобладают у ТТХ-содержащих видов. Вид *V. alginolyticus* не был обнаружен у исследуемых немертин, однако, вид *Listonella anguillarum* (=*Vibrio anguillarum*), также упоминаемый в качестве ТТХ-продуцента (Simidu et al., 1987), был найден среди всех ТТХ-содержащих немертин. Интересно, что другие представители Gammaproteobacteria, для которых была показана продукция ТТХ, включая *Pseudomonas, Shewanella, Alteromonas, Marinomonas* и *Pseudoalteromonas*, были обнаружены нами во всех исследуемых немертинах с преобладанием в ТТХ-содержащих *K. alborostrata* и *Q. stimpsoni*. Бактерии рода *Bacillus*, представители которого обладают способностью к синтезу ТТХ, преобладали в микрофлоре не содержащих токсин немертин, преимущественно в *H. juliae* и *Parahubrechtia* sp., и в ТТХ-содержащей *Q. stimpsoni*. Более того, поиск последовательности гена 16S рРНК, сходной с данной последовательностью у штамма *C. gottheilii* 1839, среди массива данных метагеномного анализа выявил 16 последовательностей с 97% сходства в образце *Q. stimpsoni*. В начале исследования предполагалось найти наибольшее число бактерий, исторически связанных с продукцией ТТХ, в *C.* cf. *simula*, как самом токсичном виде немертин, известном на сегодняшний день. Однако бактерии, связанные с синтезом ТТХ, были обнаружены нами во всех исследуемых немертинах, с преобладанием в ТТХ-содержащих видах. Наличие ТТХ-продуцирующих бактерий в микрофлоре не содержащего токсин животного согласуется с данными исследования Тернер с соавторами, в котором в микрофлоре нетоксичной немертины *C. rubifrons* был обнаружен ТТХ-продуцирующий штамм *V. alginolyticus* (Turner et al., 2018). Тем не менее, очевидна тенденция к накоплению большего количества ТТХ-продуцентов в микрофлоре ТТХ-содержащих видов животных по сравнению с видами, не содержащими токсин. В исследованиях на рыбах фугу было показано, что печень нетоксичных видов обладает специфической способностью адсорбировать ТТХ в

концентрациях, соизмеримых с токсичными видам (Nagashima et al., 2018). В качестве возможных причин отсутствия токсичности животного при потенциальной возможности накопления ТТХ, авторы указали экологические особенности обитания и физиологические особенности организма, такие как резистентность к токсину и механизм его восприятия. Влияние экологических факторов и поведения животного на содержание ТТХ изучено достаточно слабо и оставляет множество вопросов. Так, предполагается, что ТТХ может выступать в качестве феромона для привлечения самцов во время нереста ТТХ-содержащих рыб *T. niphobles* (Matsumura, 1995), а неполовозрелые молодые особи *T. rubripes* распознают токсин с помощью обонятельного органа в качестве ориентира на питание ТТХ-содержащей пищей (Okita et al., 2013). При этом в экспериментах по кормлению нетоксичные виды рыбы фугу предпочитали избегать ТТХ-содержащих мальков и питаться не содержащими токсин личинками артемии и медаки (Itoi et al., 2014). Влияние механизмов резистентности на содержание ТТХ в животном представляется более очевидным. Сайто с соавторами показали, что токсичные виды рыбы фугу обладают большей резистентностью к ТТХ, соответственно нетоксичные виды не способны аккумулировать высокие его концентрации (Saito et al., 1985). Более того, специфический ТТХ-связывающий белок, предположительно участвующий в связывании и переносе ТТХ, был обнаружен в ТТХ-содержащих рыбах фугу, и в нетоксичных видах отсутствовал (Hashiguchi et al., 2015). Исследования на рыбах фугу и наши данные, полученные на немертинах, указывают на то, что как ТТХ-содержащие, так и не содержащие токсин виды животных имеют доступ к бактериальным и пищевым источникам ТТХ, однако, только ТТХ-содержащие виды обладают направленными механизмами накопления и использования токсина.

В рамках данной работы был также проведен анализ культивируемой микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин (Melnikova et al., 2017). Впервые анализ таксономического состава культивируемой микрофлоры немертин, на примере токсичной немертины *C. simula*, был проведен Беленевой с соавторами (Beleneva et al., 2014). В настоящей работе была изучена микрофлора

немертин *M. grossa*, *H. juliae*, *K. alborostrata* и *Q. stimpsoni*. В обоих исследованиях отмечено преобладание бактерий класса Gammaproteobacteria, что согласуется с данными о составе морских микробных сообществ (Giovannoni, Rappe, 2000). При этом в микрофлоре *C. simula* преобладали бактерии рода *Vibrio* (Beleneva et al., 2014). Вибрионы были выделены и из ряда немертин, выловленных у берегов Англии (Carroll et al., 2003; Turner et al., 2018). В симбиотической микрофлоре изученных нами немертин был обнаружен только один культивируемый штамм из рода *Vibrio*. Отсутствие разнообразия вибрионов в данной работе может свидетельствовать о недостатке дополнительных факторов роста из организма хозяина при культивировании в лабораторных условиях, что также отмечалось в работе Беленевой с соавторами. Доминирующими среди культивируемой микрофлоры исследуемых немертин оказались бактерии рода *Pseudoalteromonas*, характерные для микрофлоры многих морских беспозвоночных (Romanenko et al., 2008). Бактерии рода *Bacillus* и *Shewanella* были обнаружены нами в свободноживущих немертинах *H. juliae*, *Q. stimpsoni* и *K. alborostrata*. В микрофлоре немертины *M. grossa*, являющейся симбионтом двустворчатых моллюсков рода *Mya*, бактерий рода *Bacillus* обнаружено не было. Хотя бактерии рода *Bacillus* чаще встречаются в донных осадках, чем в воде и ассоциациях с животными, они были выделены и из некоторых ТТХ-содержащих организмов, включая осьминога *Hapalochlaena maculosa* (Hwang et al., 1989), несколько видов рыбы фугу (*T. rubripes* (Wu et al., 2005a), *T. obscurus* (Wang and Fan, 2010) и *A. hispidus* (Bragadeeswaran et al., 2010)) и немертину *C. simula* (Beleneva et al., 2014).

Поскольку основной фокус исследования направлен на ТТХ-продуцирующую активность бактерий, ассоциированных с немертинами, культивируемая микрофлора, включая первичные высевы и отдельные штаммы, была нами проанализирована на наличие ТТХ-положительных меток с помощью метода КЛСМ с использованием поликлональных антител против ТТХ. В результате, ТТХ-положительные бактериальные клетки были выявлены в первичных бактериальных высевах из немертин *H. juliae* и *K. alborostrata*. В высевах из *Q. stimpsoni* и *M. grossa* ТТХ-положительной активности обнаружено не было. Наличие самого токсина с

помощью физико-химических методов было показано для *K. alborostrata* и *Q. stimpsoni* (Vlasenko et al., 2018). В *M. grossa* ТТХ не был обнаружен (Магарламов, Чернышев, не опубликованные данные), а в *H. juliae* токсин был найден только с помощью иммуногистохимии с антителами против ТТХ (Магарламов, Чернышев, неопубликованные данные) и методом ВЭЖХ-МС/МС доказан не был. Результаты анализа культивируемой микрофлоры немертин подтверждают проведенные нами метагеномные исследования, а также работы других авторов, упомянутые выше, показывающие, что ТТХ-продуцирующие бактериальные штаммы могут быть обнаружены в микрофлоре нетоксичного или условно токсичного животного. Анализ первичного бактериального высева позволяет оценить присутствие или отсутствие в микрофлоре животного ТТХ-продуцентов, что может быть недоступно при последующих пересевах, поскольку многие ассоциативные бактерии теряют способность к росту и синтезу токсина вне организма хозяина при дальнейшем культивировании на искусственных лабораторных средах (Wang et al., 2008). Так, Кэрол с соавторами показали, что концентрация ТТХ в экстрактах из вторичных высевов бактерий, выделенных из немертин, значительно уменьшается по сравнению с экстрактами первичных высевов (Carroll et al. 2003). При анализе отдельных штаммов в нашей работе, ТТХ-положительные клетки были выявлены только в штамме *Pseudoalteromonas* sp. 1942, выделенном из *H. juliae*. В штаммах, выделенных из *K. alborostrata*, ТТХ-положительная активность не наблюдалась. Штамм *Pseudoalteromonas* sp. 1942 показал 99% генетическое сходство со штаммом *P. tetraodonis* IAM 14160, выделенным из рыбы фугу *F. poecilonotus*, способным продуцировать ТТХ в симбиозе с организмом хозяина (Ivanova et al., 2001). В настоящем исследовании штамм *Pseudoalteromonas* sp. 1942 проявлял ТТХ-положительную активность при многократных пересевах на стандартные микробиологические среды в отсутствие компонентов тела червя и был выбран для дальнейшего исследования вместе с штаммом *C. gottheilii* 1839, не теряющим ТТХ-положительную активность при постоянном культивировании с 2014 года (Beleneva et al., 2014; Magarlamov et al., 2014).

Не секрет, что бактерии, имеющие относительно небольшой геном в сочетании с широко известными механизмами регуляции генов, являются наиболее предпочтительной модельной системой для изучения различных путей биосинтеза. Однако, для того, чтобы штамм-продуцент можно было использовать для раскрытия путей биосинтеза ТТХ, он должен не только стабильно его продуцировать, но и обладать токсичностью, достаточной для детектирования физико-химическими методами. Метод КЛСМ, используемый нами ранее, является высокочувствительным и позволяет визуализировать токсин в клетках, однако не дает количественной его оценки. Для подтверждения способности штаммов *C. gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 продуцировать токсины гуанидинового ряда, к которым относится ТТХ и его производные, и предварительной количественной оценки продукции был использован метод биотестирования на культуре клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131). Данный метод основан на способности токсинов, блокирующих натриевые каналы, конкурентно взаимодействовать с их активаторами на линиях клеток мышиной нейробластомы. Таким образом, можно оценить общую токсичность образца, но не содержание в нем отдельных токсинов. Результаты анализа показали, что экстракты штамма *C. gottheilii* 1839 оказывали высокий токсический эффект на культуру клеток, эквивалентный 28 нг ТТХ. Токсический эффект экстрактов *Pseudoalteromonas* sp. 1942 был значительно ниже и составлял в эквиваленте 1,8 нг ТТХ. Ввиду более высокой токсичности, штамм *C. gottheilii* 1839 был выбран для дальнейших исследований.

В 2014 году Магарламов с соавторами, используя иммуноэлектронную и иммунофлуоресцентную микроскопию с антителами против ТТХ, показали, что ТТХ-положительная метка ассоциирована преимущественно с эндоспорами и свободными спорами штамма *C. gottheilii* 1839 (Magarlamov et al., 2014). Поэтому поиск ТТХ и его производных проводили в насыщенной спорами и вегетативной культурах штамма, в отдельности. ВЭЖХ-МС/МС анализ экстрактов бактерии выявил наличие ТТХ и двух его производных - 5,6,11-тридеоксиТТХ и 11-норТТХ-6(R)-ол, в споровой культуре (Melnikova et al., 2019). В вегетативной культуре

токсинов обнаружено не было, что согласуется с полученными ранее с помощью иммунологических методов данными. Несмотря на разнообразие методов, используемых при исследовании бактериальной продукции ТТХ, метод ВЭЖХ-МС/МС является наиболее доказательным. Однако существует ряд трудностей, связанных с его использованием на бактериальных экстрактах, наиболее значительными из которых являются низкая концентрация искомых веществ и большое количество примесей. Дополнительные процедуры очистки, используемые при подготовке бактериальных образцов, всегда приводят к потере и без того низких концентраций токсинов, поэтому обнаружение ТТХ и его производных в бактериальных образцах данным методом носит скорее качественный, чем количественный характер. Так, в настоящем исследовании только концентрация ТТХ была выше лимита подсчета, концентрация же его производных не позволяет осуществить количественную оценку.

Низкая концентрация ТТХ, обнаруживаемая в бактериальной культуре ТТХ-продуцентов, в разы уступает концентрации токсина в ТТХ-содержащих животных (Lago et al., 2015). В ряде работ было показано, что низкая продукция токсина бактериальными штаммами и в дальнейшем полная его потеря при культивировании на искусственных средах связаны с отсутствием оптимальных условий для роста бактерий и фазой роста культуры (Gallach, Birkbeck, 1993; Carroll et al., 2003; Wang et al., 2010; Jal, Khora, 2015). В настоящем исследовании очевидна взаимосвязь между продукцией ТТХ и фазой жизненного цикла штамма *C. gottheilii* 1839, в частности формированием спор. Исследования жизненного цикла бактерии проводили на жидкой и твердой питательных средах (Shokur et al., 2016). При длительном культивировании на твердой среде концентрация спор увеличивалась постепенно с течением времени. В первые 12 часов культивирования бактерии формировали длинные цепочки по 4-5 клеток, что указывает на активную стадию деления. К 24 часам после начала культивирования около 29% бактериальных клеток содержало эндоспоры и уже к шестым суткам концентрация свободных спор достигала 72%. Длительное культивирование в жидкой среде не приводило к появлению большого числа эндоспор и свободных спор. Одной из причин

спорогенеза является ограниченный доступ к энергетическим» сахарам (Errington, 2003). Согласно этой гипотезе, на твердой среде питательные вещества быстро исчезают вблизи колонии, и бактерии испытывают дефицит углеводов. Данная гипотеза может объяснять активный процесс спорообразования штаммом *C. gottheilii* 1839 на твердой питательной среде и его отсутствие в жидкой среде с быстрой диффузией углеводов.

Электронно-микроскопические исследования жизненного цикла показали, что штамм *C. gottheilii* 1839 имеет те же стадии формирования спор, что и ряд других видов бацилл. Основные стадии, выявленные на электронно-микроскопическом уровне, включают в себя: неравномерное деление, приводящее к появлению спорангия; погружение дочерней клетки вглубь материнской; формирование ранней эндоспоры; формирование дополнительных защитных оболочек вокруг споры, что приводит к появлению поздней эндоспоры; разрушение материнского организма с последующим выходом споры в окружающую среду (Рисунок 22). Несмотря на сходства стадий спорообразования, были выявлены различия в способе формирования псевдоподы и погружении будущей эндоспоры вглубь материнской клетки. Для большинства спорообразующих видов бацилл характерна симметричная миграция мембраны материнской клетки вокруг проспоры, или, так называемый, равномерный обхват будущей споры (Gerhardt, Ribi, 1964; Greene et al., 1971; Holt et al, 1975; Errington, 2003). В случае штамма *C. gottheilii* 1839, после неравномерного деления материнской клетки формируется одна «филлоподия», которая обхватывает будущую спору с одной стороны. Такой «неравномерный» обхват приводит к постепенному смещению будущей споры на боковую сторону материнской клетки. Частично неравномерный обхват будущей споры, при котором движение одной филлоподии преобладало над движением другой, был описан для *Bacillus thuringiensis* (Bechtel, Bulla, 1976). Известно, что миграция материнской мембраны вокруг будущей споры связана с так называемыми «белками-поглощения» (Tocheva et al., 2013). «Белки-поглощения» скапливаются на периферии диска деления и запускают механизм постепенного «наползания» материнской оболочки на будущую эндоспору. В случае с исследуемым нами

штаммом такие белки могут скапливаются на одной из сторон диска деления, что приводит к формированию одиночной филлоподии. Кроме того, были выявлены различия в ультраструктуре бактерий, выращенных на разных средах. Клетки бактерий, выращенные на твердой среде, отличались конденсированным хроматином и плотным расположением гранулярного компонента цитоплазмы. Клетки бактерий, выращенных в жидкой среде, в свою очередь, имели деконденсированный нуклеоид и рыхлое расположение гранулярного компонента. Подобное «разбавление» цитоплазмы происходит за счет накопления резервных веществ (Wang, Levin, 2009) и в совокупности с деконденсацией нуклеоида свидетельствует о более высоком уровне биосинтетической активности в клетках штамма, растущих в жидкой среде. Ультраструктурные различия были выявлены и в строении спор. Споры штамма, полученные в ходе культивирования на твердой среде, обладали более толстой оболочкой, состоящей из 3-5 концентрических слоев. Оболочка спор с жидкой среды была представлена двумя слоями. Образование дополнительных защитных оболочек у спор может быть связано с тем, что твердая среда, обеспечивающая меньший доступ к питательным веществам, быстрые темпы накопления продуктов метаболизма и избыток кислорода, формирует экстремальные условия роста данного штамма.

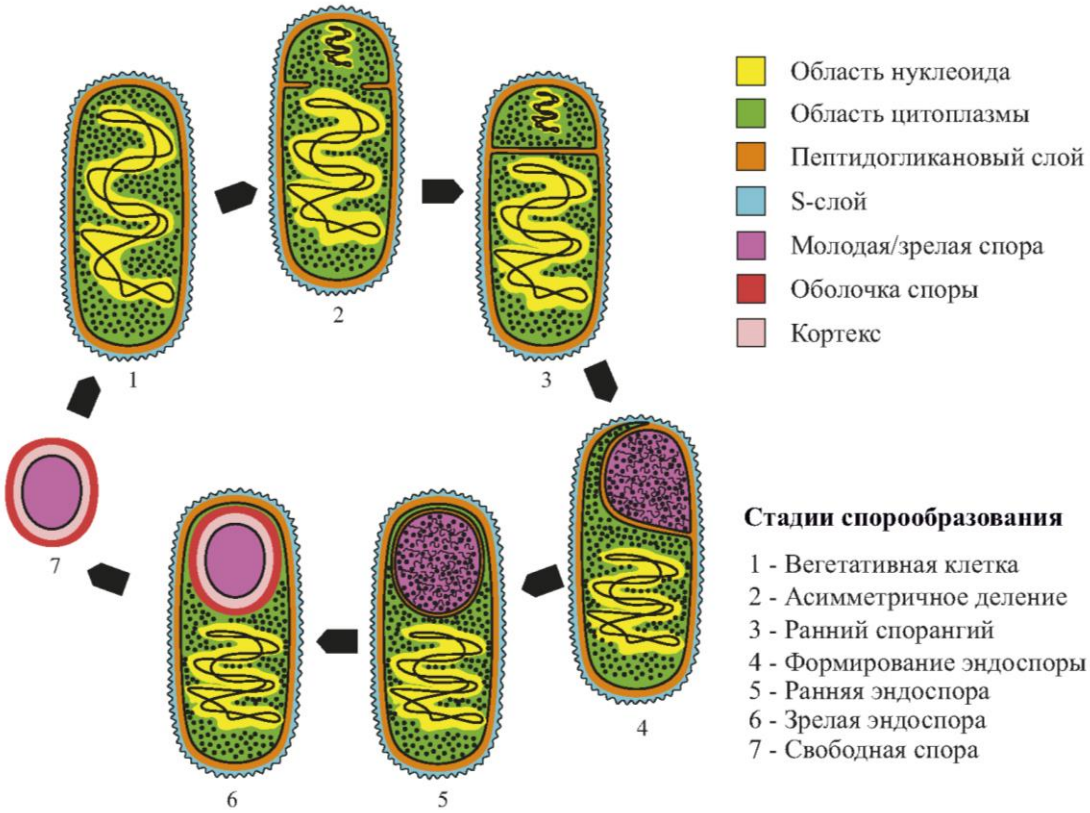


Рисунок 23 – Основные стадии формирования спор у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839.

Низкая продукция ТТХ в лабораторных условиях может быть компенсирована быстрыми темпами роста и накопления биомассы и продуктов метаболизма, характерными для бактерий. Для штамма *C. gottheilii* 1839 повышенной продукции токсина можно добиться за счет увеличения темпов спорообразования (Magarlamov et al., 2017). Стимуляция синтеза различных токсинов при спорообразовании была показана для ряда бактерий, включая Cry-токсин для *B. thuringiensis* (Banerjee-Bhatnagar, 1998; Juarez-Hernandez et al., 2015), ларвицидный токсин для *Bacillus sphaericus* (Hire et al., 2009) и токсины A и B для *Clostridium difficile* (Karlsson et al., 2008). Для стимуляции спорообразования штамма *C. gottheilii* 1839 нами было выбрано длительное культивирование в жидкой питательной среде, температурное воздействие, осмотический шок и спорулирующая среда. Интересно, что наиболее эффективный фактор, вызывающий спорообразование большинства бацилл, - температура, не вызывал формирование спор у исследуемого штамма. Бактерии рода *Bacillus* растут в очень широком диапазоне температур, однако, для видов, обитающих в морской воде, температурный оптимум роста и процессов спорообразования сильно отличается. Для большинства известных морских видов

Bacillus характерны оптимальные температуры роста 20 - 30°C, но они могут расти и при температурах 0–15°C (Rüger et al., 2000). В настоящем исследовании, температуры ниже 30°C не влияли на спорообразование штамма, а высокие температуры, стимулирующие спорообразование у наземных видов, приводили к гибели культуры в течение первых нескольких часов с момента термической обработки. Спорулирующая среда и длительное культивирование в жидкой питательной среде также не имели значительного воздействия на спорообразование *C. gottheilii* 1839, что может говорить о схожести состава используемых растворов и естественной среды обитания данного штамма. Эффективным для *C. gottheilii* 1839 условием стимуляции спорообразования оказалось изменение осмотичности. При этом лучший результат был получен при использовании гипертонического раствора. В гипотоническом растворе также наблюдался быстрый рост количества спор, однако деструктивные изменения в вегетативных клетках привели к практически полному отмиранию культуры. Нетипичной оказалась и скорость формирования спор у штамма *C. gottheilii* 1839. У большинства представителей рода *Bacillus* спорообразование занимает в среднем до 8 часов (Young, Fitz-James, 1959). При стимуляции спорообразования *C. gottheilii* 1839 уже через час после начала инкубации в гипотоническом или гепертоническом растворах, в культуре наблюдались свободные споры. Среди других бацилл быстрое спорообразование было показано для вида *Bacillus cereus*, у которого формирование септы и деление клетки на проспору и материнскую часть происходило в течение 15 мин, а последующий процесс поглощения проспоры занимал еще 45 мин (Young, Fitz-James, 1959). Иммуноэлектронная микроскопия с антителами против ТТХ показала, что в первые минуты после стимуляции спорообразования штамма *C. gottheilii* 1839 ТТХ-положительная метка была представлена в виде одиночных гранул. К первому часу интенсивность метки увеличивалась, и токсин перераспределяется по периферии клетки. Электронномикроскопические исследования позволили детализировать данные КЛСМ и показали, что ТТХ-положительная метка была локализована только в спорах с неоформленным метаболически активным протопластом и ассоциирована

преимущественно с оболочкой и протопластом. Отсутствие ТТХ-положительной метки в спорах с оформленным протопластом вероятно связано с отсутствием метаболической активности.

Зависимость бактериальной продукции ТТХ от целого ряда внешних условий и внутренних физиологических факторов позволяет предположить, что синтез токсина свойственен многим бактериям, но происходит лишь при определенных условиях, поэтому далеко не всегда может быть выявлен в культуре (Magarlamov et al., 2017). Именно факультативность синтеза ТТХ может объяснить феномен отсутствия ТТХ-положительных бактерий у некоторых ТТХ-содержащих животных (Lehman et al., 2004). Следует учитывать и то, что ТТХ-продуцентами могут быть некультурабельные формы бактерий. Очевидно, что дальнейший прогресс в исследовании природных источников ТТХ невозможен без расшифровки биосинтеза ТТХ и его функции в бактериальных клетках. Ввиду сложной молекулярной структуры, состоящей из циклического гуанидинового фрагмента, сшитого с сильно оксигенированным диоксоадамантановым углеродным скелетом с пятью гидроксильными группами (Chau et al., 2011), путь биосинтеза ТТХ оставляет множество вопросов. Лишь недавно были предприняты первые попытки расшифровать генетические основы биосинтеза ТТХ в бактериях. Так, Лиу с соавторами показали положительную корреляцию между копиями плазмиды pNE-1 и концентрацией ТТХ в бактериях *Aeromonas* sp. Ne-1 (Liu et al., 2015). В другой работе в предполагаемых ТТХ-продуцентах были обнаружены нерибосомальная пептидсинтетаза (НРПС) и поликетидсинтаза (ПКС), рассматриваемые рядом авторов в качестве предполагаемых ферментов биосинтеза гуанидиновой группы ТТХ (Pratheepa et al., 2016). В настоящее время биосинтез ТТХ неизвестен, существует только несколько предполагаемых путей его синтеза. Предполагается, что уникальный углеродный скелет ТТХ может быть образован через поликетид (Woodward, Gougoutas, 1964), разветвленный сахар (C_5) (Kotaki, Shimizu, 1993) или изопрен (C_5) (Yasumoto et al., 1988). Гуанидиновый фрагмент молекулы ТТХ, обеспечивающий его токсичность, может быть получен от донора, такого как аргинин (Рисунок 23), двумя путями: через амидинотрансферазу или с

помощью НРПС и ПКС ферментов (Chau et al., 2011). При этом, оба пути имеют параллели с уже известными путями биосинтеза природных соединений и в равной степени возможны. Так, перенос амидино-группы с l-аргинина с помощью амидинотрансферазы был показан в биосинтезе сакситоксина, сходного с ТТХ по молекулярной массе, наличию гуанидинового фрагмента и способу действия (Kellmann et al., 2008). НРПС и ПКС представляют собой многофункциональные ферментные комплексы, которые участвуют в синтезе многих вторичных метаболитов. В пользу возможного участия данных ферментов в синтезе ТТХ говорит и то, что гены кодирующие амидинострансферазу и НРПС и ПКС системы, как правило, располагаются в одном кластере генов (Chau et al., 2011).

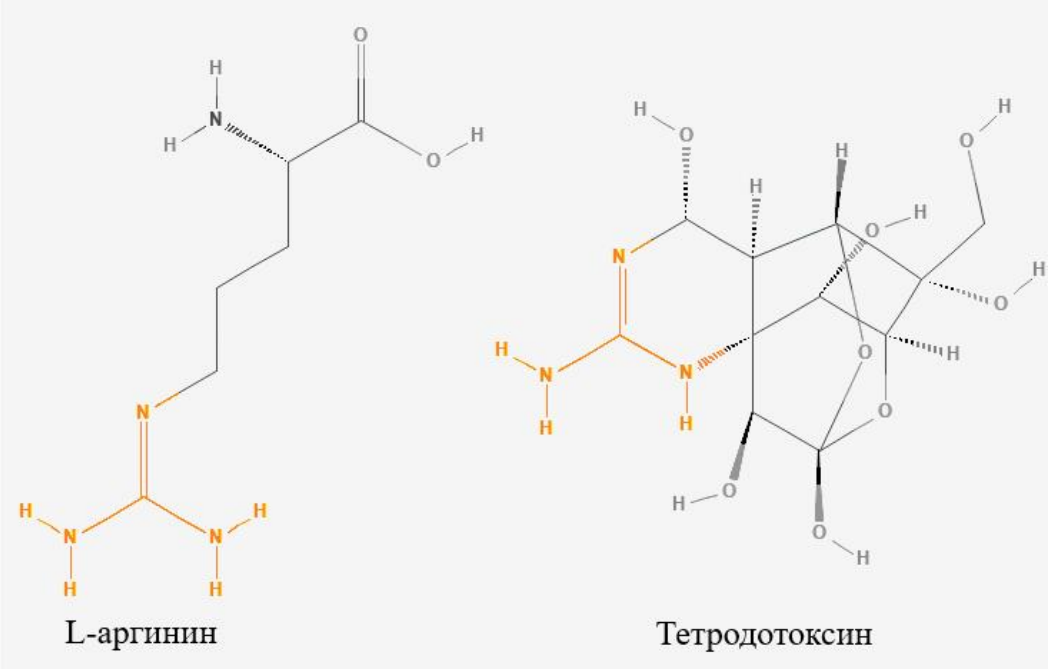
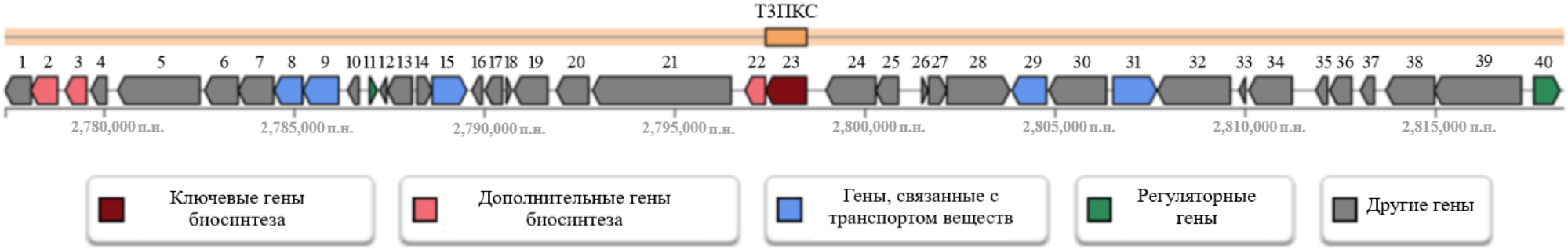


Рисунок 24 – Химические структуры молекул L-аргинина и тетродотоксина. Гуанидиновые группы молекул обозначены оранжевым цветом.

По аналогии с сакситоксином, молекулой, необходимой для образования гуанидиновой группы ТТХ, считается аргинин. В геноме штамма *C. gottheilii* 1839 был обнаружен полный пул генов, кодирующих биосинтез и регуляцию метаболизма аргинина, что говорит о возможности использования данной аминокислоты, в том числе и для синтеза токсина. Помимо этого, в исследуемом штамме был обнаружен предполагаемый кластер генов биосинтеза ПКС типа III (Рисунок 24). ПКС модули содержат ацилтрансферазу, которая выбирает

предпочтительный ацил-кофермент А (коА) тиоэфирный субстрат, ацильный белок-носитель (acyl carrier protein (ACP)) и кетосинтазу, которая катализирует конденсацию двух ACP-связанных субстратов (Shimizu et al., 2017). ПКС, как правило, содержат и дополнительные каталитические домены, выполняющие внутримолекулярную циклизацию собираемой молекулы. По аналогии с сакситоксином, в качестве субстратов для сборки ТТХ могут быть использованы ацетил-коА и аргинин. К дополнительным генам биосинтеза в данном кластере относится и ген, кодирующий S-аденозилметионин-зависимую метилтрансферазу класса I. Предполагается, что данный фермент также участвует в биосинтезе сакситоксина, превращая ацетил в пропионил на начальных этапах образования токсина (Kellmann et al., 2008), что может быть актуально и для ТТХ. Интересен и тот факт, что данный кластер содержит гены спорообразования, кодирующие белок оболочки споры CotD и малый кислоторастворимый споровый белок L, участвующий в кристаллизации нуклеоида. Связь продукции ТТХ в штамме *C. gottheilii* 1839 со спорообразованием может предполагать ассоциацию генов синтеза токсина с генами, участвующими в процессе формирования спор.

В геноме исследуемого штамма не были обнаружены гены, кодирующие амидинотрансферазу – ключевой фермент биосинтеза сакситоксина, необходимый для присоединения второй гуанидиновой группы токсина. В работе Пратепа с соавторами в ТТХ-продуцирующих штаммам *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* гены синтеза амидинотрансферазы также отсутствовали (Pratheepa et al., 2016). При этом ТТХ содержит только один гуанидиновый фрагмент, который, вероятно, может быть получен при встраивании молекулы аргинина на начальном этапе образования токсина.



№ п/п	Размер (п.н.)	Продукты предполагаемых генов	№ п/п	Размер (п.н.)	Продукты предполагаемых генов
1	693	Белок семейства AIM24	21	3639	Динамин-подобный белок
2	711	S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза класса I	22	534	Изопренилцистеин-карбоксил-метилтрансфераза
3	564	Сахар-зависимая О-ацетилтрансфераза	23	1083	Поликедисинтаза типа III
4	423	Регулятор транскрипции MntH	24	1314	Пермеаза пуриновых нуклеозидов
5	2157	ДНК-топоизомераза класса III	25	597	Ксантин-фосфорибозилтрансфераза
6	888	АВС-транспортер, пермеаза	26	150	Субъединица 2А цитохром с-оксидазы
7	933	АВС-транспортер, пермеаза	27	480	Цитохром с-оксидаза
8	753	АВС транспортер, АТФ-связывающий белок	28	1659	Субъединица 1 цитохром с-оксидазы типа III
9	936	АВС транспортер, периплазматический белок	29	912	Транспортер семейства EamA
10	294	Гипотетический белок	30	1515	Карбоксипептидаза семейства M32
11	201	Белок с доменом холодового шока	31	1146	Транспортер семейства MFS
12	177	Белок с доменом цинкового пальца	32	1920	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза
13	657	Белок, подобный обратной транскриптазе	33	171	Гипотетический белок
14	408	Белок, подобный обратной транскриптазе	34	1143	S-аденозилметионин-зависимая РНК метилтрансфераза класса I
15	912	Транспортер семейства DMT	35	306	Регулятор клеточного деления GpsB
16	276	Гипотетический белок	36	570	Белок, содержащий домен DUF1273
17	462	Галопероксидаза из семейства PAP2	37	366	Белок оболочки споры CotD
18	138	Малый кислоторастворимый споровый белок L	38	1281	Гипотетический белок
19	891	5'-3' экзонуклеаза	39	2286	Хеликаза DEAD/DEAH-box
20	846	Серотрансфераза	40	684	Регулятор транскрипции семейства Crp/Fnr

Рисунок 25 - Структурная организация кластера генов биосинтеза поликетидсинтазы типа III (Т3ПКС) штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. Шкала показывает расположение и длину кластера генов. Схематическое изображение кластера генов построено с использованием программного обеспечения AntiSMASH v. 5.0.

Важным инструментом, позволяющим прогнозировать биосинтез ТТХ, является структура его производных, обнаруженных у многих токсин-содержащих животных (Bane et al., 2014). Согласно Йоца-Ямашита с соавторами (Yotsu-Yamashita et al., 2013), поздние стадии биосинтеза и метаболизма ТТХ и его производных могут включать в себя два пути окисления 5,6,11-тридеоксиТТХ до ТТХ: первый - через 5,11-дидеоксиТТХ до 5-деоксиТТХ и 11-деоксиТТХ; второй - через 6,11-дидеоксиТТХ с последующим окислением до 11-деоксиТТХ (Рисунок 25). Авторы также предположили, что 11-охоТТХ и 11-норТТХ-6(S)-ол являются окисленными метаболитами ТТХ.

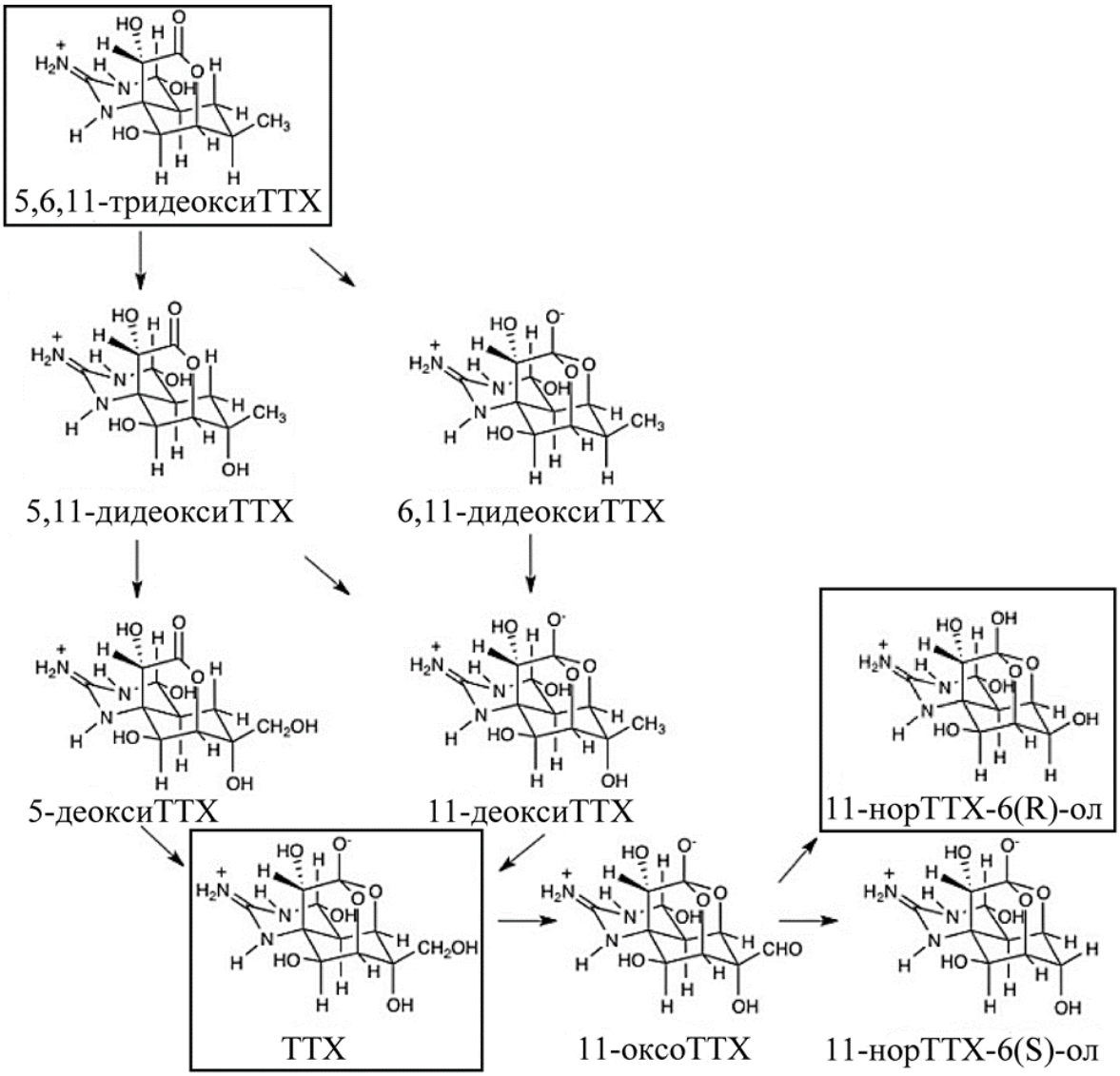


Рисунок 26 – Схема последних стадий биосинтеза тетродотоксина (ТТХ) (по: Yotsu-Yamashita et al., 2013, с дополнениями). В рамки выделены токсины, обнаруженные в споровом экстракте штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839.

Поскольку конверсия между ТТХ и его производными в животных обнаружена не была, предполагается, что реакции окисления протекают у ТТХ-продуцирующих микроорганизмов (Kono et al., 2008; Yotsu-Yamashita et al., 2013; Ueyama et al., 2018). Однако, до настоящей работы никакие производные в бактериях обнаружены не были. В данном исследовании в штамме *C. gottheilii* 1839 помимо ТТХ были обнаружены 5,6,11-тридеоксиТТХ и 11-норТТХ-6(R)-ол. Превалирующая концентрация ТТХ указывает на то, что он является основным продуктом биосинтетического пути у бактерий. Присутствие в бактериальном экстракте главного предполагаемого предшественника ТТХ, 5,6,11-тридеоксиТТХ, подтверждает гипотезу о том, что реакции окисления, приводящие к образованию токсина на последних стадиях биосинтеза, происходят в микроорганизмах. И наконец, обнаружение 11-норТТХ-6(R)-ол указывает на возможность дальнейшего метаболизма ТТХ в бактериях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования в области биотехнологии микроорганизмов направлены главным образом на получение бактериальных культур с высоким биосинтетическим показателем. В данной работе нами был изучен биосинтетический потенциал микрофлоры морских червей типа Nemertea, направленный на продукцию ТТХ. Отсутствие биотехнологического способа получения ТТХ, при широких перспективах его использования в фармакологической отрасли, связано с быстрой потерей бактериальными штаммами, выделяемыми из ТТХ-содержащих животных, способности продуцировать токсин в лабораторных условиях. В настоящем исследовании были изучены бактериальные сообщества ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин, в результате чего была выявлена взаимосвязь между наличием бактерий, ассоциированных с синтезом ТТХ, и токсичностью животного. При этом, было показано, что источником для выделения ТТХ-продуцирующих бактерий могут являться как ТТХ-содержащие, так и не содержащие токсин представители данного типа животных. Для бактериального штамма *C. gottheilii* 1839, выделенного ранее из высокотоксичной немертины *C. simula*, в данной работе был подтвержден синтез ТТХ в споровой культуре. Это первый бактериальный штамм, способный продуцировать ТТХ в течение длительного времени в лабораторных условиях. Кроме того, в споровой культуре штамма были обнаружены производные ТТХ, подтверждающие участие бактерий в метаболизме токсина. Нами было показано, что достаточно низкий выход ТТХ (30 нг на литр бактериального осадка), получаемый из споровой фракции штамма *C. gottheilii* 1839, может быть компенсирован увеличением темпов спорообразования под воздействием гипертонического стресса. Другой подход к биотехнологическому производству ТТХ может быть основан на поиске молекулярных основ биосинтеза токсина и увеличении эффективности экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез. В данном исследовании был впервые получен полный геном ТТХ-продуцирующего бактериального штамма, при анализе которого был выявлен кластер генов биосинтеза ПКС типа III, кодирующий ферменты, предположительно участвующие в синтезе ТТХ. Являясь мультифункциональными ферментативными комплексами, ПКС модули участвуют в синтезе множества вторичных метаболитов бактерий и представляют практический интерес для биотехнологии. Доказательство участия продуктов найденных генов в синтез ТТХ может стать темой для новых исследований биосинтеза токсина.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин представителей типа Nemertea, выявил присутствие бактерий, способных к продукции ТТХ, в обеих группах животных.
2. ТТХ-положительные бактериальные клетки выявлены в культивируемой микрофлоре ТТХ-содержащей немертины *Kulikovia alborostrata* и не содержащей токсин *Hubrechtella juliae*, в которой при анализе отдельных изолятов обнаружен ТТХ-положительный штамм *Pseudoalteromonas* sp. 1942.
3. Показано, что штаммы симбионты немертин *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 оказывают нейротоксический эффект на культуру клеток мышиной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131).
4. Показано, что бактериальный штамм *Cytobacillus gottheilii* 1839 способен продуцировать ТТХ и его производные в споровой культуре, в количестве не менее 30 нг на кг бактериальной массы.
5. Показано, что жизненный цикл ТТХ-продуцирующего штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 в норме включает стадии формирования спор, характерные для других видов бацилл, с отличием в способе формирования псевдоподы и погружении будущей эндоспоры вглубь материнской клетки. Воздействие гипертонического стресса на штамм *Cytobacillus gottheilii* 1839 приводит к увеличению темпов спорообразования и продукции ТТХ в ходе метаболически активной стадии формирования споры.
6. В геноме штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 найден кластер генов биосинтеза поликетидсинтазы типа III, кодирующий ферменты, предположительно участвующие в синтезе ТТХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arndt D. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool / D. Arndt, J.R. Grant, A. Marcu, T. Sajed, A. Pon, Y. Liang, D.S. Wishart // Nucleic Acids Research. – 2016. – V. 44. – No. W1. – P. W16– W21.
2. Asakawa M. Instrumental analysis of tetrodotoxin / M. Asakawa, Y. Shida, K. Miyazawa, T. Noguchi // In Chromatography—the most versatile method of chemical analysis; Calderon, L.A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia. – 2012. – P. 245–270.
3. Asakawa M. Highly toxic ribbon worm *Cephalothrix simula* containing tetrodotoxin in Hiroshima bay, Hiroshima prefecture, Japan / M. Asakawa, K. Ito, H. Kajihara // Toxins (Basel). – 2013. – V. 5. – No. 2. – P. 376–395.
4. Atrih A. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species / A. Atrih, S.J. Foster // J. Appl. Microbiol. – 2001. – V. 91. – No. 2. – P. 364–372.
5. Auawithoothij W. *Shewanella putrefaciens*, a major microbial species related to tetrodotoxin (TTX)-accumulation of puffer fish *Lagocephalus lunaris* / W. Auawithoothij, A. Noomhorm // J. Appl. Microbiol. – 2012. – V. 113. – No. 2. – P. 459–465.
6. Bane V. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection / V. Bane, M. Lehane, M. Dikshit, A. O'Riordan, A. Furey // Toxins (Basel). – 2014. – V. 6. – No. 2. – P. 693–755.
7. Bane V. High-resolution mass spectrometry analysis of tetrodotoxin (TTX) and its analogues in puffer fish and shellfish / V. Bane, B. Brosnan, P. Barnes, M. Lehane, A. Furey // Food. Addit. Contam. – 2016. – V. 33. – No. 9. – P. 1468–1489.
8. Banerjee-Bhatnagar N. Modulation of cry IV A toxin protein expression by glucose in *Bacillus thuringiensis israelensis* / N. Banerjee-Bhatnagar // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – V. 252. – No. 2. – P. 402–406.
9. Bechtel D.B. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* / D.B. Bechtel, L.A. Bulla // J. Bacteriol. – 1976. – V. 127. – No. 3. – P. 1472–1481.

10. Beleneva I.A. Taxonomic composition of bacteria associated with cultivated mollusks *Crassostrea lugubris* and *Perna viridis* and with the water of the Gulf of Nha Trang lagoon, Vietnam / I.A. Beleneva, N.V. Zhukova, H. Le Lan, D.H. Nguyen Tran // Microbiology. – 2007. – V. 76. – No. 2. – P. 220–228.
11. Beleneva I.A. Characterization, identification, and screening for tetrodotoxin production by bacteria associated with the ribbon worm (Nemertea) *Cephalotrix simula* (Ivata, 1952) / I.A. Beleneva, T.Yu. Magarlamov, A.D. Kukhlevsky // Microbiology. – 2014. – V. 83. – No. 3. – P. 220–226.
12. Bertelli C. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets / C. Bertelli, M.R. Laird, K.P. Williams, B.Y. Lau, G. Hoad, G.L. Winsor, F.S.L. Brinkman // Nucleic Acids Research. – 2017. – V. 45. – P. W30–W35.
13. Blin K. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline / K. Blin, S. Shaw, K. Steinke, R. Villebro, N. Ziemert, S.Y. Lee, M.H. Medema, T. Weber // Nucleic Acids Research. – 2019. – V. 47. – No. W1. – P. 81–87.
14. Bragadeeswaran S. Biomedical and pharmacological potential of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from marine pufferfish *Arothron hispidus* (Muller, 1841) / S. Bragadeeswaran, D. Therasa, K. Prabhu, K. Kathiresan // J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. – 2010. – V. 16. – No. 3. – P. 421–431.
15. Campbell S. Bacterial production of tetrodotoxin in the pufferfish *Arothron hispidus* / S. Campbell, R.M. Harada, S.V. DeFelice, P.K. Bienfang, Q.X. Li // Nat. Prod. Res. – 2009. – V. 23. – No. 17. – P. 1630–1640.
16. Carroll S. The production of tetrodotoxin-like substances by nemertean worms in conjunction with bacteria / S. Carroll, E.G. McEvoy, R. Gibson // J. Exp. Mar. Bio. Ecol. – 2003. – V. 288. – No. 1. – P. 51–63.
17. Cassiday L. First report of TTX in a European trumpet shell / L. Cassiday // Anal. Chem. – 2008. – V. 80. – No. 15. – P. 5675.

18. Chan P.P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes / P.P.Chan, T.M. Lowe // Nucleic Acids Research. – 2016. – V. 44. – No. W1. – P. W54– W57.
19. Chau R. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin / R. Chau, J.A. Kalaitzis, B.A. Neilan // Aquat. Toxicol. – 2011. – V. 104. – No. 1–2. – P. 61–72.
20. Chen X.W. Separation, identification and quantification of tetrodotoxin and its analogs by LC-MS without calibration of individual analogs / X.W. Chen, H.X. Liu, Y.B. Jin, S.F. Li, X. Bi, S. Chung, S.S. Zhang, Y.Y. Jiang // Toxicon. – 2011. – V. 57. – No. 6. – P. 938–943.
21. Cheng C.A. Microflora and tetrodotoxin-producing bacteria in a gastropod, *Niotha clathrata* / C.A. Cheng, D.F. Hwang, Y.H. Tsai, H.C. Chen, S.S. Jeng, T. Noguchi, K. Ohwada, K. Hasimoto // Food Chem. Toxicol. – 1995. – V. 33. – No. 11. – P. 929–934.
22. Chernyshev A.V. Nemertean biodiversity in the Sea of Japan and adjacent areas / In: Song S., Adrianov A.V., Lutaenko K.A., Xiao-Xia S., editors. // Marine Biodiversity and Ecosystem Dynamics of the Northwest Pacific Ocean. Publishing House of Science; Beijing, China. – 2014. – P. 119–135.
23. Couvin D. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins / D. Couvin, A. Bernheim, C. Toffano-Nioche, M. Touchon, J. Michalik, B. Néron, E.P.C. Rocha, G.Vergnaud, D. Gautheret, C. Pourcel // Nucleic Acids Research. – 2018. – V. 46. – No. W1. – W246–W251.
24. Do H.K. Identification of deep-sea-sediment bacteria which produce tetrodotoxin / H.K. Do, K. Kogure, U. Simidu // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – V. 56. – No. 4. – P. 1162–1163.
25. Do H.K. Tetrodotoxin production of actinomycetes isolated from marine sediment / H.K. Do, K. Kogure, C. Imada, T. Noguchi, K. Ohwada, U. Simidu // J. Appl. Microbiol. – 1991. – V. 70. – No. 6. – P. 464–468.
26. Do H.K. Presence of tetrodotoxin and tetrodotoxin-producing bacteria in freshwater sediments / H.K. Do, K. Hamasaki, K. Ohwada, U. Simidu, T. Noguchi,

Y. Shida, K. Kogure // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – No. 11. – P. 3934–3937.

27. Echt C.S. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa / C.S. Echt, L.A. Erdahl, T.J. McCoy // Genome. – 1992. – V. 35. – No. 1. – P. 84–87.
28. Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis* / J. Errington // Nat. Rev. Microbiol. – 2003. – V. 1. – No. 2. – P. 118–126.
29. Galardini M. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes / M. Galardini, E.G. Biondi, M. Bazzicalupo, A. Mengoni // Source Code Biol. Med. – 2011. – V. 6. – P. 11–16.
30. Gallacher S. Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis* / S. Gallacher, T.H. Birkbeck // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – No. 11. – P. 3981–3983.
31. Gerhardt P. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus* / P. Gerhardt, E. Ribi // J. Bacteriol. – 1964. – V. 88. – No. 6. – P. 1774–1789.
32. Giovannoni S. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes / S. Giovannoni, M. Rappe // Microbial Ecology of the Oceans. Wiley-Liss. New York. N.Y. – 2000. – P. 47–84.
33. Greene R.A. Correlation of light and electron microscopic observations of sporulation in *Bacillus megaterium* / R.A. Greene, S.C. Holt, E.R. Leadbetter, R.A. Slepecky // Spore Research. – 1971 – P.161-174.
34. Hagen N.A. Canadian tetrodotoxin study group. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer pain: A randomized, double blind, parallel design multicenter study / N.A. Hagen, P. du Souich, B. Lapointe, M. Ong-Lam, B. Dubuc, D. Walde, R. Love, A.H. Ngoc// J. Pain Symptom Manag. – 2008. – V. 35. – No. 4. – P. 420–429.
35. Hagen N.A. A multicentre open-label safety and efficacy study of tetrodotoxin for cancer pain / N.A. Hagen, B. Lapointe, M. Ong-Lam, B. Dubuc, D. Walde, B. Gagnon, R. Love, R. Goel, P. Hawley, A.H. Ngoc, et al. // Curr. Oncol. – 2011. – V. 18. – No. 3. – P. e109– e116.

36. Hagen N.A. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer-related pain: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design trial / N.A. Hagen, L. Cantin, J. Constant, T. Haller, G. Blaise, M. Ong-Lam, P. du Souich, W. Korz, B. Lapointe // Pain Res. Manag. – 2017. – V. 2017. –P. 7212713.
37. Hashiguchi Y. Characterization and evolutionary analysis of tributyltin-binding protein and pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin-binding protein genes in toxic and nontoxic pufferfishes / Y. Hashiguchi, J.M. Lee, M. Shiraishi, S. Komatsu, S. Miki, Y. Shimasaki, N. Mochioka, T. Kusakabe, Y. Oshima // J. Evol. Biol. – 2015. – V. 28. – No. 5. – P. 1103–1118.
38. Hashimoto K. New aspects of tetrodotoxin / K. Hashimoto, T. Noguchi, S. Watabe //In microbial toxins in foods and feeds ed. Poland, A.E. et al. New York, NY: Plenum. – 1990. – P. 575–588.
39. van Heel A.J. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins / A.J. van Heel, A. de Jong, C. Song, J.H. Viel, J. Kok, O.P. Kuipers // Nucleic Acids Research. – 2018. – V. 46. – No. W1. – P. 278–281.
40. Hire R.S. Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein / R.S. Hire, A.B. Hadapad, T.K. Dongre, V. Kumar // J. Invertebrate Pathol. – 2009. – V. 101. – No. 2. – P. 106–111.
41. Holt S.C. Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus* / S.C. Holt, J.J. Gauther, D.J. Tipper // J. Bacteriol. – 1975. – V. 122. – No. 3. – P. 1322–1338.
42. Honda S. Toxification of cultured puffer fish Takifugu rubripes by feeding on tetrodotoxin-containing diet / S. Honda, O. Arakawa, T. Takatani, K. Tachibana, M. Yagi, A. Tanigawa, T. Noguchi // Nippon Suisan Gakkaishi. – 2005. – V. 71. – No. 5. – P. 815–820.
43. Huerta-Cepas J. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper / J. Huerta-Cepas, K. Forslund, L.P. Coelho, D. Szklarczyk, L.J. Jensen, C. von Mering, P. Bork // Mol. Biol. Evol. – 2017. – V. 34. – No. 8. – P. 2115–2122.
44. Huerta-Cepas J. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses / J.

Huerta-Cepas, D. Szklarczyk, D. Heller, A. Hernández-Plaza, S.K. Forslund, H. Cook, D.R. Mende, I. Letunic, T. Rattei, L.J. Jensen, C. von Mering, P. Bork // Nucleic Acids Research. – 2019. – V. 47. – No. D1. – P. 309–314.

45. Huot R.I. Protection against nerve toxicity by monoclonal antibodies to the sodium channel blocker tetrodotoxin / R.I. Huot, D.L. Armstrong, T.C. Chanh // J. Clin. Investig. – 1989. – V. 83. – No. 6. – P. 1821–1826.
46. Hwang D.F. Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus* / D.F. Hwang, O. Arakawa, T. Saito, T. Noguchi, U. Simidu, K. Tsukamoto, Y. Shida, K. Hashimoto // Mar. Biol. – 1989. – V. 100. – No. 3. – P. 327–332.
47. Hwang D.F. Tetrodotoxin secretion from the lined moon shell *Natica lineata* in response to external stimulation / D.F. Hwang, C.H. Chueh, S.S. Jeng // Toxicon. – 1990. – V. 28. – No. 10. – P. 1133–1136.
48. Hwang D.F. Occurrence of tetrodotoxin related toxins in the gastropod mollusk *Niotha clathrata* from Taiwan / D.F. Hwang, L.C. Lin, S.S. Jeng // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1992. – V. 55. – No. 1. – P. 63–67.
49. Hwang D.F. Microflora and tetrodotoxin-producing bacteria in the lined moon shell *Natica lineata* / D.F. Hwang, C.A. Cheng, H.C. Chen, S.S. Jeng, T. Noguchi, K. Ohwada, K. Hashimoto // Fish. Sci. – 1994. – V. 60. – No. 5. – P. 567–571.
50. Itoi S. Larval pufferfish protected by maternal tetrodotoxin / S. Itoi, S. Yoshikawa, K. Asahina, M. Suzuki, K. Ishizuka, N. Takimoto, R. Mitsuoka, N. Yokoyama, A. Detake, C. Takayanagi, M. Eguchi, R. Tatsuno, M. Kawane, S. Kokubo, S. Takanashi, A. Miura, K. Suitoh, T. Takatani, O. Arakawa, Y. Sakakura, H. Sugita // Toxicon. – 2014. – V. 78. – P. 35–40.
51. Ivanova E.P. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description / E.P. Ivanova, L.A. Romanenko, M.H. Matté, G.R. Matté, A.M. Lysenko, U. Simidu, K. Kita-Tsukamoto, T. Sawabe, M.V. Vysotskii, G.M. Frolova, V. Mikhailov, R. Christen, R.R. Colwell // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51. – No. 3. – P. 1071–1078.

52. Jal S. An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin / S. Jal, S.S. Khora // J. Appl. Microbiol. – 2015. – V. 119. – No. 4. – P. 907–916.

53. Juarez-Hernandez E.O. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* producing endochitinase ChiA74Δsp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti* / E.O. Juarez-Hernandez, L.E. Casados-Vazquez, M.C. del Rincon-Castro, R. Salcedo-Hernandez, D.K. Bideshi, J.E. Barboza-Corona // J. Appl. Microbiol. – 2015. – V. 119. – No. 6. – P. 1692–1699.

54. Kajihara H. Taxonomic identity of a tetrodotoxin-accumulating ribbon-worm *Cephalothrix simula* (Nemertea: Palaeonemertea): a species artificially introduced from the Pacific to Europe / H. Kajihara, S. Sun, A.V. Chernyshev, H. Chen, K. Ito, M. Asakawa, S.A. Maslakova, J.L. Norenburg, M. Strand, P. Sundberg, F. Iwata // Zoological Science. – 2013. – V. 30. – No. 11. – P. 985–997.

55. Kajihara H. Resolving a 200-year-old taxonomic conundrum: Neotype designation for *Cephalothrix linearis* (Nemertea: Palaeonemertea) based on a topotype from Bergen, Norway / H. Kajihara // Fauna Nor. – 2019. – V. 39. – P. 39–76.

56. Kao C.Y. Structure-activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin, and analogues / C.Y. Kao // Ann N.Y. Acad. Sci. – 1986. – V. 479. – No. 1. – P. 52–67.

57. Karlsson S. Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism / S. Karlsson, L.G. Burman, T. Akerlund // Microbiology (Reading). – 2008. – V. 154. – No. 11. – P. 3343–3436.

58. Katikou P. First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece) / P. Katikou, D. Georgantelis, N. Sinouris, A. Petsi, T. Fotaras // Toxicon. – 2009. – V. 54. – No. 1. – P. 50–55.

59. Kaufman B. Protection against tetrodotoxin and saxitoxin intoxication by a cross-protective rabbit anti-tetrodotoxin antiserum / B. Kaufman, D.C. Wright, W.R. Ballou, D. Monheit // Toxicon. – 1991. – V. 29. – No. 6. – P. 581–587.

60. Kellmann R. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria / R. Kellmann, T.K. Mihali, Y.J. Jeon, R.

Pickford, F. Pomati, B.A. Neilan // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – No. 13. – P. 4044–4053.

61. Kiselev K.V. Involvement of the cell-specific pigment genes pks and sult in the bacteria defense response of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* / K.V. Kiselev, N.V. Ageenko, V.V. Kurilenko // Dis. Aquat. Organ. – 2013. – V. 103. – No. 2. – P. 121–132.
62. Kiselev K.V. The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency / K.V. Kiselev, A.S. Dubrovina, A.P. Tyunin // J. Plant Physiol. – 2015. – V. 175. – P. 59–67.
63. Kogure K. Accumulation of tetrodotoxin in marine sediment / K. Kogure, H.K. Do, E.V. Thuesen, K. Nanba, K. Ohwada, U. Simidu // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1988. – V. 45. – P. 303–305.
64. Kogure K. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins / K. Kogure, M.L. Tamplin, U. Simidu, R.R. Colwell // Toxicon. – 1988. – V. 26. – No. 2. – P. 191–197.
65. Kono M. Examination of transformation among tetrodotoxin and its analogs in the living cultured juvenile puffer fish, kusafugu, *Fugu niphobles* by intramuscular administration / M. Kono, T. Matsui, K. Furukawa, T. Takase, K. Yamamori, H. Kaneda, D. Aoki, J.H. Jang, M. YotsuYamashita // Toxicon. – 2008. – V. 52. – P. 714–720.
66. Kotaki Y. 1-Hydroxy-5,11-dideoxytetrodotoxin, the first N-hydroxy and ring-deoxy derivative of tetrodotoxin found in the newt *Taricha granulosa* / Y. Kotaki, Y. Shimizu // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – V. 115. – No. 3. – P. 827–830.
67. Kumar S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // Mol. Biol. Evol. – 2018. – V. 35. – No. 6. – P. 1547–1549.
68. Kungsuwan A. Tetrodotoxin producing bacteria from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* / A. Kungsuwan, T. Noguchi, O. Arakawa, U. Simidu, K. Tsukamoto, Y. Shida, K. Hashimoto // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1988. – V. 54. – No. 10. – P. 1799–1802.

69. Lagesen K. RNammer: consistent annotation of ribosomal RNA genes / K. Lagesen, P. Hallin, E.A. Rødland, H-H. Staerfeldt, T. Rognes, D.W. Ussery // Nucleic Acids Research. – 2007. – V. 35. – No. 9. – P. 3100–3108.
70. Lago J. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses / J. Lago, L.P. Rodríguez, L. Blanco, J.M. Vieites, A.G. Cabado // Marine Drugs. – 2015. – V. 13. – No. 10. – P. 6384–6406.
71. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing / D.J. Lane // In Nucleic acid techniques in bacterial systematic. John Wiley and Sons. Chichester. – 1991. – P. 115–175.
72. Lee M.J. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiates* / M.J. Lee, D.Y. Jeong, W.S. Kim, H.D. Kim, C.H. Kim, W.W. Park, Y.H. Park, K.S. Kim, H.M. Kim, D.S. Kim // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – No. 4. – P. 1698–1701.
73. Lehman E.M. No evidence for an endosymbiotic bacterial origin of tetrodotoxin in the newt *Taricha granulosa* / E.M. Lehman, E.D. Brodie Jr, E.D. Brodie 3rd // Toxicon. – 2004. – V. 44. – No. 3. – P. 243–249.
74. Li Z. Puffer fish gut microbiota studies revealed unique bacterial co-occurrence patterns and new insights on tetrodotoxin producers / Z. Li, J. Tian, Y. Lai, C-H. Lee, Z. Cai, C-F. Yu // Marine Drugs. – 2020. – V. 18. – No. 5. – P. 278–289.
75. Liu J. Production level of tetrodotoxin in *Aeromonas* is associated with the copy number of a plasmid / J. Liu, F. Wei, Y. Lu, T. Ma, J. Zhao, X. Gong, B. Bao // Toxicon. – 2015. – V. 101. – P. 27–34.
76. Lu Y. *Bacillus horikoshii*, a tetrodotoxin-producing bacterium isolated from the liver of puffer fish / Y. Lu, R. Yi // Ann. Microbiol. – 2009. – V. 59. – No. 3. – P. 453–458.
77. Lyu Y.S. Low dose of tetrodotoxin reduces neuropathic pain behaviors in an animal model / Y.S. Lyu, S.K. Park, K. Chung, J.M. Chung // Brain Res. – 2000. – V. 871. – No. 1. – P. 98–103.
78. Magarlamov T.Y. Tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. from the ribbon worm (Nemertea) *Cephalothrix simula* (Iwata, 1952) / T.Y. Magarlamov, I.A. Beleneva, A.V. Chernyshev, A.D. Kuhlevsky // Toxicon. – 2014. – V. 85. P. 46–51.

79. Magarlamov T.Yu. Rapid production of tetrodotoxin-like compounds during sporulation in a marine isolate *Bacillus* sp. 1839 / T.Yu. Magarlamov, D.I. Melnikova, O.A. Shokur, E.A. Gorobets // Microbiology (Moscow). – 2017. – V. 86. – No. 2. – P. 192–196.
80. Magarlamov T.Y. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems / T.Y. Magarlamov, D.I. Melnikova, A.V. Chernyshev // Toxins (Basel) – 2017. – V. 9. – No. 5. – P. 166–186.
81. Manger R.L. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins / R.L. Manger, L.S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, M.M. Wekell // Anal. Biochem. – 1993. – V. 214. – No. 1. – P. 190–194.
82. Maran B.A. Isolation and characterization of bacteria from the copepod *Pseudocaligus fugu* ectoparasitic on the panther puffer *Takifugu pardalis* with the emphasis on TTX / B.A. Maran, E. Iwamoto, J. Okuda, S. Matsuda, S. Taniyama, Y. Shida, M. Asakawa, S. Ohtsuka, T. Nakai, G.A. Boxshall // Toxicon. – 2007. – V. 50. – No. 6. – P. 779–790.
83. Matsui T. Production of tetrodotoxin by the intestinal bacteria of a puffer fish *Takifugu niphobles* / T. Matsui, S. Taketsugu, K. Kodama, A. Shiba-Ishii, K. Yamamori, C. Shimizu, A. Shira-Ishi // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1989. – V. 55. – No. 12. – P. 2199–2203.
84. Matsumura K. Tetrodotoxin as a pheromone / K. Matsumura // Nature. – 1995. – V. 378. – No. 6557. – P. 563–564.
85. Matsumura K. No ability to produce tetrodotoxin in bacteria / K. Matsumura // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – No. 5. – P. 2393–2394.
86. McDermott J.J. Food, feeding behavior and reeding ecology of Nemerteans / J.J. McDermott, P. Roe // Am. Zool. – 1985. – V. 25. – No. 1. – P. 113–125.
87. McDonald D. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea / D. McDonald, M.N. Price, J. Goodrich, E.P. Nawrocki, T.Z. DeSantis, A. Probst, G.L. Andersen, R. Knight, P. Hugenholtz // ISME J. – 2012. – V. 6. – No. 3. – P. 610–618.

88. Meier-Kolthoff J.P. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions / J.P. Meier-Kolthoff, A.F. Auch, H-P. Klenk, M. Göker // BMC Bioinformatics. – 2013. – V. 14. – P. 60.
89. Melnikova D.I. The taxonomic composition, characteristics, and neurotoxic activities of ribbon worm-associated bacteria from the Sea of Japan / D.I. Melnikova, I.A. Beleneva, A.P. Tyunin, T.Yu. Magarlamov // Russian Journal of Marine Biology. – 2017. – V. 43. – No. 5. – P. 383–391.
90. Melnikova D.I. Addressing the issue of tetrodotoxin targeting / D.I. Melnikova, Y.S. Khotimchenko, T.Yu. Magarlamov // Marine Drugs. – 2018. – V. 16. – No. 10. – P. 352–366.
91. Melnikova D.I. Stable tetrodotoxin production by *Bacillus* sp. strain 1839 / D.I. Melnikova, A.E. Vlasenko, T.Yu. Magarlamov // Marine Drugs. – 2019. – V. 17. – No. 12. – P. 704–710.
92. Melnikova D.I. The microbial community of tetrodotoxin-bearing and non-tetrodotoxin-bearing ribbon worms (Nemertea) from the Sea of Japan / D.I. Melnikova, T.Yu. Magarlamov // Marine Drugs. – 2020. – V. 18. – No. 3. – P. 177–194.
93. Montalvo N.F. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts / N.F. Montalvo, R.T. Hill // Appl Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – No. 20. – P. 7207–7216.
94. Mosher H.S. Occurrence and origin of tetrodotoxin / H.S. Mosher, F.A. Fuhrman // In: Seafood Toxins, Ragelis, E.P. (Ed.). American Chemical Society, Washington, DC. – 1984. – P. 333–344.
95. Nagashima Y. Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish / Y. Nagashima, A. Ohta, X. Yin, S. Ishizaki, T. Matsumoto, H. Doi, T. Ishibashi // Marine Drugs. – 2018. – V. 16. – No. 1. – P. 17–27.
96. Narita H. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus* / H. Narita, S. Matsubara, N. Miwa, S. Akahane,

M. Murakami, T. Goto, M. Nara, T. Noguchi, T. Saito, Y. Shida, K. Hashimoto // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1987. – V. 53. – No. 4. – P. 617–621.

97. Newman D.J. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development / D.J. Newman, G.M. Cragg // Marine Drugs. – 2014. – V. 12. – No. 1. – P. 255–278.
98. Newman D.J. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play" / D.J. Newman, G.M. Cragg // Planta. Med. – 2016. – V. 82. – No. 9-10. – P. 775–789.
99. Nguyen T.H. Biological activities of tetrodotoxin-producing Enterococcus faecium AD1 isolated from puffer fishes / T.H. Nguyen, H.N. Nguyen, D.V. Nghe, K.H. Nguyen // BioMed. Res. Int. – 2015. – V. 2015. – P. 973235.
100. Nieto F.R. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain / F.R. Nieto, E.J. Cobos, M.A. Tejada, C. Sánchez-Fernández, R. González-Cano, C.M. Cendán // Marine Drugs. – 2012. – V. 10. – No. 2. – P. 281–305.
101. Noguchi T. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus* / T. Noguchi, J.K. Jeon, O. Arakawa, H. Sugita, Y. Deguchi, Y. Shida, K. Hashimoto // J. Biochem. – 1986. – V. 99. – No. 1. – P. 311–314.
102. Noguchi T. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis* / T. Noguchi, D.F. Hwang, O. Arakawa, H. Sugita, Y. Deguchi, Y. Shida, K. Hashimoto // Mar. Biol. – 1987. – V. 94. – No. 4. – P. 625–630.
103. Noguchi T. Current methodologies for detection of tetrodotoxin / T. Noguchi, Y. Mahmud // J. Toxicol. – 2001. – V. 20. – No. 1. – P. 35–50.
104. Nurk S. Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads / S. Nurk, A. Bankevich, D. Antipov, A.A. Gurevich, A. Korobeynikov, A. Lapidus, A.D. Prjibelski, A. Pyshkin, A. Sirotkin, Y. Sirotkin, R. Stepanauskas, S.R. Clingenpeel, T. Woyke, J.S. McLean, R. Lasken, G. Tesler, M.A. Alekseyev, P.A. Pevzner // J Comput Biol. – 2013. – V. 20. – No. 10. – P. 714–737.

105. Okita K. Puffer smells tetrodotoxin / K. Okita, H. Yamazaki, K. Sakiyama, H. Yamane, S. Niina, T. Takatani, O. Arakawa, Y. Sakakura // Ichthyol. Res. – 2013. – V. 60. – No. 4. – P. 386–389.
106. Pedregosa F. Scikit-learn: Machine learning in Python / F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, E. Duchesnay // J. Mach. Learn. Res. – 2011. – V. 12. – P. 2825–2830.
107. Pratheepa V. Bacterial diversity and tetrodotoxin analysis in the viscera of the gastropods from Portuguese coast / V. Pratheepa, A. Alex, M. Silva, V. Vasconcelos // Toxicon – 2016. – V. 119. – P. 186–193.
108. Richter M. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison / M. Richter, R. Rosselló-Móra, F.O. Glöckner, J. Peplies // Bioinformatics. – 2015. – V. 32. – No. 6. – P. 929–931.
109. Ritchie K.B. A tetrodotoxin-producing marine pathogen / K.B. Ritchie, I. Nagelkerken, S. James, G.W. Smith // Nature. – 2000. – V. 404. – P. 354.
110. Rodríguez, I. The association of bacterial C9-based TTX-like compounds with *Prorocentrum minimum* opens new uncertainties about shellfish seafood safety / I. Rodríguez, A. Alfonso, E. Alonso, J.A. Rubiolo, M. Roel, A. Vlamis, P. Katikou, S.J. Jackson, M.S. Menon, A. Dobson, L.M. Botana // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – P. 40880.
111. Rodríguez P. Liquid chromatography-mass spectrometry method to detect tetrodotoxin and its analogues in the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters / P. Rodríguez, A. Alfonso, P. Otero, P. Katikou, D. Georgantelis, L.M. Botana // Food Chemistry. – 2012. – V. 132. – No. 2. – P. 1103–1111.
112. Rodríguez P. First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe / P. Rodríguez, A. Alfonso, C. Vale, C. Alfonso, P. Vale, A. Tellez, L.M. Botana // Anal Chem. – 2008. – V. 80. – No. 14. – P. 5622–5629.

113. Rognes T. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics / T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, F. Mahé // PeerJ. – 2016. – V. 4. – P. e2584.
114. Romanenko L.A. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities / L.A. Romanenko, M. Uchino, N.I. Kalinovskaya, V.V. Mikhailov // Microbiol. Res. – 2008. – V. 163. – No. 6. – P. 663–644.
115. Rüger H.J. New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species / H.J. Rüger, D. Fritze, C. Spröer // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – V. 50. – No. 3. – P. 1305–1313.
116. Saito T. Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers / T. Saito, T. Noguchi, T. Harada, O. Murata, K. Hashimoto // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1985. – V. 51. – No. 7. – P. 1175–1180.
117. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 1987. – V. 4. – No. 4. – P. 406–425.
118. Schöttner S. Relationships between host phylogeny, host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges / S. Schöttner, F. Hoffmann, P. Cárdenas, H.T. Rapp, A. Boetius, A. Ramette // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – No. 2. – P. 1–11.
119. Seppey M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness / M. Seppey, M. Manni, E.M. Zdobnov // Methods Mol. Biol. – 2019. – V. 1962. – P. 227–245.
120. Shimizu D. Predation differences between wild and hatchery-reared tiger puffer *Takifugu rubripes* juveniles in a salt pond mesocosm / D. Shimizu, K. Sakiyama, Y. Sakakura, T. Takatani, Y-I. Takahashi // Nippon Suisan Gakkaishi. – 2007. – V. 73. – No. 3. – P. 461–469.
121. Shimizu Y. Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics / Y. Shimizu, H. Ogata, S. Goto // ChemBioChem. – 2017. – V. 18. – No. 11. – P. 1714–1715.

122. Shiomi K. Detection of tetrodotoxin-like compounds in two species of puffer fishes (*Lagocephalus lunaris lunaris* and *Fugu niphobles*) / K. Shiomi, H. Inaoka, H. Yamanaka, T. Kikuchi // Toxicon. – 1985. – V. 23. – No. 2. – P. 331–336.

123. Shokur O.A. Life cycle of tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. on solid and liquid medium: light and electron microscopy studies / O.A. Shokur, T.Yu. Magarlamov, D.I. Melnikova, E.A. Gorobets, I.A. Beleneva// Russian Journal of Marine Biology. – 2016. – V. 42. – No. 3. – P. 252–257.

124. Siguier P. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences / P. Siguier, J. Pérochon, L. Lestrade, J. Mahillon, M. Chandler // Nucleic Acids Research. – 2006. – V. 34. – P. D32– D36.

125. Simidu U. Marine bacteria which produce tetrodotoxin / U. Simidu, T. Noguchi, D.F. Hwang, Y. Shida, K. Hashimoto // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. – No. 7. – P. 50–65.

126. Simidu U. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin / U. Simidu, K. Kita-Tsukamoto, T. Yasumoto, M. Yotsu // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1990. – V. 40. – No. 4. – P. 331–336.

127. Smibert R.M. Phenotypic characterization / R.M. Smibert, N.R. Krieg // In Methods for general and molecular bacteriology. Washington: D.C: American Soc. Microbiol. – 1994. – P. 607–655.

128. Souza D.T. Analysis of bacterial composition in marine sponges reveals the influence of host phylogeny and environment / D.T. Souza, D.B. Genuario, F.S.P. Silva, C. Pansa, V.N. Kavamura, F.C. Moraes, R.G. Taketani, I.S. Melo, J. Olson // FEMS Microbiol. Ecol. – 2017. – V. 93. – No. 1. – P. 1–11.

129. Stokes A.N. An improved competitive inhibition enzymatic immunoassay method for tetrodotoxin quantification / A.N. Stokes, B.L. Williams, S.S. French // Biol. Proced. Online. – 2012. – V. 14. – P. 3.

130. Strand M. The bacterial (*Vibrio alginolyticus*) production of tetrodotoxin in the ribbon worm *Lineus longissimus*—just a false positive? / M. Strand, M. Hedström, H. Seth, E.G. McEvoy, E. Jacobsson, U. Göransson, H.S. Andersson, P. Sundberg // Marine Drugs. – 2016. – V. 14. – No. 4. – P. 63–74.

131. Sugita H. Changes in microflora of a puffer fish *Fugu niphobles*, with different water temperatures / H. Sugita, J. Iwata, C. Miyajima, T. Kubo, T. Noguchi, K. Hashimoto, Y. Deguchi // Mar. Biol. – 1989. – V. 101. – No. 3. – P. 299–304.

132. Tamura K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) – 2004. – V. 101. – P. 11030–11035.

133. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. – 2013. – V. 30. – No. 12. – P. 2725–2729.

134. Thompson J.D. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, D.G. Higgins // Nucleic Acids Research. – 1997. – V. 25. – No. 24. – P. 4876–4882.

135. Thuesen E.V. Bacterial production of tetrodotoxin in four species of Chaetognatha / E.V. Thuesen, K. Kogure // Biol. Bull. – 1989. – V. 176. – No. 2. – P. 191–194.

136. Tocheva E.I. Peptidoglycan transformations during *Bacillus subtilis* sporulation / E.I. Tocheva, J. López-Garrido, H.V. Hughes, J. Fredlund, E. Kuru, M.S. VanNieuwenhze, Y.V. Brun, K. Pogliano, G.J. Jensen // Molecular Microbiology. – 2013. – V. 88. – No. 4. – P. 673–686.

137. Tu N. Detection of tetrodotoxin-producing *Providencia rettgeri* T892 in *Lagocephalus* pufferfish / N. Tu, Q. Tu, H. Tung, D. Hieu, S. Romero-Jovel // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 30. – No. 6. – P. 1829–1835.

138. Turner A.D. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014 / A.D. Turner, A. Powell, A. Schofield, D.N. Lees, C. Baker-Austin // Euro Surveill. – 2015. – V. 20. – No. 2. – P. 1–33.

139. Turner A.D. New invasive nemertean species (*Cephalothrix simula*) in England with high levels of tetrodotoxin and a microbiome linked to toxin metabolism / A.D. Turner, D. Fenwick, A. Powell, M. Dhanji-Rapkova, C. Ford, R.G. Hatfield, A. Santos, J. MartinezUrtaza, T.P. Bean, C. Baker-Austin, P. Stebbing // Marine Drugs. – 2018. – V. 16. – No. 11. – P. 452–472.

140. Ueyama N. Spiro bicyclic guanidino compounds from pufferfish: Possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments / N. Ueyama, K. Sugimoto, Y. Kudo, K. Onodera, Y. Cho, K. Konoki, M. Yotsu-Yamashita // Chem. Eur. J. – 2018. – V. 24. – No. 28. – P. 7250–7258.
141. Vaelli P.M. The skin microbiome facilitates adaptive tetrodotoxin production in poisonous newts / P.M. Vaelli, K.R. Theis, J.E. Williams, L.A. O'Connell, J.A. Foster, H.L. Eisthen // Elife. – 2020. – V. 9. – P. e53898.
142. Vlasenko A.E. Tetrodotoxin and its analogues profile in nemertean species from the Sea of Japan / A.E. Vlasenko, P.V. Velansky, A.V. Chernyshev, V.G. Kuznetsov, T.Yu. Magarlamov // Toxicon. – 2018. – V. 156. – P. 48–51.
143. Wang J. Isolation and characterization of a *Bacillus* species capable of producing tetrodotoxin from the puffer fish *Fugu obscurus* / J. Wang, Y. Fan // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 26. – No. 10. – P. 1755–1760.
144. Wang J. Isolation of a *Lysinibacillus fusiformis* strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish *Fugu obscurus* and the characterization of this strain / J. Wang, Y. Fan, Z. Yao // Toxicon – 2010. – V. 56. – No. 4. – P. 640–643.
145. Wang J.D. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle / J.D. Wang, P.A. Levin // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – V. 7. – No. 11. – P. 822–827.
146. Wang X.J. Toxin-screening and identification of bacteria isolated from highly toxic marine gastropod *Nassarius semiplicatus* / X.J. Wang, R.C. Yu, X. Luo, M.J. Zhou, X.T. Lin // Toxicon. – 2008. – V. 52. – No. 1. – P. 55–61.
147. Watabe S. Monoclonal antibody raised against tetrodonic acid, a derivative of tetrodotoxin / S. Watabe, Y. Sato, M. Nakaya, K. Hashimoto, A. Enomoto, S. Kaminogawa, K. Yamauchi // Toxicon. – 1989. – V. 27. – No. 2. – P. 265–268.
148. Wei F. Identification of tetrodotoxin-producing bacteria from goby *Yongeichthys criniger* / F. Wei, T. Ma, X. Gong, N. Zhang, B. Bao // Toxicon. – 2015. – V. 104. – P. 46–51.
149. Wick R.R. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads / R.R. Wick, L.M. Judd, C.L. Gorrie, K.E. Holt // PLoS Comput. Biol. – 2017. – V. 13. – No. 6. – P. 1005595.

150. Williams B.L. Behavioral and chemical ecology of marine organisms with respect to tetrodotoxin / B.L. Williams // Marine Drugs. – 2010. – V. 8. – No. 3. – P. 381–398.

151. Woodward R. The structure of tetrodotoxin / R. Woodward, J. Gougoutas // J. Am. Chem. Soc. – 1964. – V. 86. – No. 22. – P. 5030–15030.

152. Wu Z. (a) Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea of China / Z. Wu, Y. Yang, L. Xie, G. Xia, J. Hu, S. Wang, R. Zhang // Toxicon. – 2005. – V. 46. – No. 4. – P. 471–476.

153. Wu Z. (b) A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes* / Z. Wu, L. Xie, G. Xia, J. Zhang, Y. Nie, J. Hu, S. Wang, R. Zhang // Toxicon. – 2005. – V. 45. – No. 7. – P. 851–859.

154. Yang G. A novel TTX-producing *Aeromonas* isolated from the ovary of *Takifugu obscurus* / G. Yang, J. Xu, S. Liang, D. Ren, X. Yan, B. Bao // Toxicon. – 2010. – V. 56. – No. 3. – P. 324–329.

155. Yasumoto T. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin / T. Yasumoto, D. Yasumura, M. Yotsu, T. Michishita, A. Endo, Y. Kotaki // Agric. Biol. Chem. – 1986. – V. 50. – No. 3. – P. 793–795.

156. Yasumoto T. New tetrodotoxin analogs from the newt *Cynops ensicauda* / T. Yasumoto, M. Yotsu, M. Murata, H. Naoki // J. Am. Chem. Soc. – 1988. – V. 110. – No. 7. – P. 2344–2345.

157. Yasumoto T. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography / T. Yasumoto, T. Michishita // Agric. Biol. Chem. – 1985. – V. 49. – No. 10. – P. 3077–3080.

158. Yotsu M. Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish / M. Yotsu, T. Yamazaki, Y. Meguro, A. Endo, M. Murata, H. Naoki, T. Yasumoto // Toxicon. – 1987. – V. 25. – No. 2. – P. 225–228.

159. Yotsu-Yamashita M. First identification of 5, 11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and characterization of major fragment ions of tetrodotoxin and its analogs by high resolution ESI-MS/MS / M. Yotsu-Yamashita, Y. Abe, Y. Kudo, R. Ritson-Williams, V.J. Paul, K. Konoki, Y. Cho, M. Adachi, T. Imazu, T. Nishikawa, M. Isobe // Marine Drugs. – 2013. – V. 11. – No. 8. – P. 2799–2813.

160. Young I.E. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation, the formation of spores in *Bacillus cereus* / I.E. Young, P.C. Fitz-James // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1959. – V. 6. – No. 3. – P. 467–469.

161. Yu C.F. Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes / C.F. Yu, P.H. Yu, P.L. Chan, Q. Yan, P.K. Wong // Toxicon. – 2004. – V. 44. – No. 6. – P. 641–647.

162. Yu V.C. Isolation and identification of a new tetrodotoxin-producing bacterial species, *Raoultella terrigena*, from Hong Kong marine puffer fish *Takifugu niphobles* / V.C. Yu, P.H. Yu, K.C. Ho, F.W. Lee // Marine Drugs. – 2011. – V. 9. – No. 11. – P. 2384–2396.

163. Zhou Y. PHAST: a fast phage search tool / Y. Zhou, Y. Liang, K.H. Lynch, J.J. Dennis, D.S. Wishart // Nucleic Acids Research. – 2011. – V. 39. – No. W1. – P. W347– W352.