

На правах рукописи

МЕЛЬНИКОВА ДАРЬЯ ИГОРЕВНА

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

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ВЛАДИВОСТОК – 2021

Работа выполнена в лаборатории фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Магарламов Тимур Юсифович

Официальные оппоненты: **Андрюков Борис Георгиевич**, доктор медицинских наук, ФГБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии

Киселев Константин Вадимович, кандидат биологических наук, ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

Ведущая организация: ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток

Защита состоится «22» июня 2021 г. в «10-00» часов на заседании диссертационного совета Д 999.204.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «5» мая 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Тюнин А.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Морские организмы, обладающие широким спектром биологически активных веществ, не имеющих аналогов в наземной биоте, имеют значительный потенциал в области разработки лекарственных препаратов и биодобавок. Одним из перспективных направлений фармакологической промышленности является создание лекарств анестетического и анальгетического действия на основе морских токсинов, специфически блокирующих потенциал-зависимые натриевые каналы, таких как сакситоксин, бреветоксин и тетродотоксин (ТТХ) (Wang, 2008; Lago et al., 2015). Преимуществом данных токсинов перед широко используемыми препаратами является ограниченный набор мишеней, обеспечивающий снижение системной токсичности (Newman, Cragg, 2016). Среди вышеуказанных веществ наиболее эффективным является ТТХ, селективно блокирующий 6 из 9 известных натриевых каналов. ТТХ был выделен из многих водных, преимущественно морских, и некоторых земноводных животных, а также водорослей и бактерий (Vane et al., 2014). Многочисленные исследования эффективности ТТХ 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).

Исследуемые в данной работе морские черви типа *Nemertea* являются активными хищниками, использующими токсины в качестве орудия нападения и/или защиты от врагов (Kajihara et al., 2008). 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. 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 токсинов 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 задачи:

1. Провести сравнительный анализ таксономического состава микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсинов немертин.
2. Провести поиск ТТХ-положительных клеток в общих бактериальных высевах ТТХ-содержащих и не содержащих токсинов немертин и в отдельных бактериальных штаммах, выделенных из немертин.
3. Проверить способность экстрактов отдельных бактериальных штаммов, выделенных из немертин, оказывать нейротоксический эффект на культуру клеток мышины 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. 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 немертин, 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 исследований 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 мышинной нейробластомы Neuro-2a (АТСС ССL131) 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 высокоэффек-

тивной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) согласно Бане с соавторами (Vane 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.

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. 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 marine biological resources» (Владивосток, 2017).

Публикации. 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 Беленовой 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены важнейшие вопросы, связанные с распространением ТТХ-продуцирующих бактерий, детектированием токсина в бактериальных образцах и проблемами культивирования ТТХ-продуцентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 классов. Животные 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) в период с июня по август в 2015 и 2019 гг. Все выловленные образцы были любезно определены д.б.н. А.В. Чернышевым (НИЦМБ ДВО РАН), экспертом в области зоологии немертин.

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 *Cephalothrix* cf. *simula* (Iwata, 1952) в работе Беленовой 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 использовали стандартные микробиологические среды для морских бактерий.

Метагеномный анализ микрофлоры немертин. Выделение тотальной ДНК из образцов ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин *Kulikovia alborostrata* (Takakura, 1898), *Micrura* cf. *bella* (Stimpson, 1857), *Cerebratulus* cf. *marginatus* Renier, 1804, *C.* cf. *simula*, *Tubulanus punctatus* (Takakura, 1898),

Quasitetrastemma simpsoni (Chernyshev, 1992), *Parahubrechtia* sp. и *Hubrechtella juliae* Chernyshev, 2003 проводили по протоколу из набора реагентов «E.Z.N.A. Mollusc DNA Kit» (Omega Bio-tek, США). Метагеномный анализ проводили на основе варибельных участков V3 и V4 гена 16S рРНК. Подготовка библиотеки и секвенирование образцов на платформе Miseq (Illumina, США) было проведено фирмой «Macrogen Inc.» в Южной Корее. Первичную обработку полученных последовательностей проводили с использованием программного обеспечения BBDuk (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bb-tools/>). Дальнейший анализ проводили с использованием программного обеспечения «Quantitative Insights into Microbial Ecology 2» (QIIME 2) версия 2019.7. Для проведения сравнительного анализа сообществ были рассчитаны параметры бета-разнообразия с использованием инструментов предлагаемых QIIME 2. Оценку бета-разнообразия проводили с использованием индекса Брея-Кёртиса, коэффициента Жаккара и методов «weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac». 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».

Микробиологический анализ микрофлоры немертин. Для проведения анализа были выбраны ТТХ-содержащие и не содержащие токсин немертины *H. juliae*, *K. alborostrata*, *Q. simpsoni* и *Malacobdella grossa* (Müller, 1776). Получение отдельных бактериальных колоний и фенотипическую характеристику бактериальных штаммов проводили с использованием стандартных микробиологических методик согласно Беленовой с соавторами (2014). Таксономическое определение бактерий на основе гена 16S рРНК проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера на генном анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) по методике Киселева с соавторами (Kiselev et al., 2013). Филогенетическое дерево бактериальных изолятов было построено методом объединения ближайших соседей (Saitou, Nei, 1987) с использованием программы ClustalX вер. 1.8 (Thompson et al. 1997).

Микроскопические исследования. Исследования на светооптическом уровне проводили с использованием микроскопа IX83 (Olympus, Япония). Морфологию бактериальных клеток изучали на окрашенных по Граму препаратах (БиоВитрум, Россия). Выявление эндоспор и свободных спор проводили с помощью окраски по методу Пешкова (Shokur et al., 2016). Ультроструктуру бактериальных клеток исследовали с помощью электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Для выявления ТТХ-положительных бактериальных клеток использовали метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) с поликлональными антителами против ТТХ на микроскопе LSM510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Внутриклеточную локализацию ТТХ исследовали методом электронной иммуноцитохимии с поликлональными антителами против ТТХ на микроскопе Libra 120 (Magarlamov et al., 2017).

Биотестирование экстрактов клеток штаммов *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 на культуре клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131). Экстракты исследуемых штаммов получали путем разрушения бактериального осадка в ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия), осаждения разрушенных клеток, отбора непосадочной жидкости и упаривания в вакуумном испарителе Centrivap Concentrator 2310905 (Labconco, Germany). Полученный после упаривания осадок растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты и пропускали через 3 кДа фильтр Microcon Ultracel YM-3 (Millipore, США). Для анализа использовали культуру клеток мышинной 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). Тестовые растворы, содержащие культуральную среду, различные разведения экстрактов бактерий, а также вератридин в диметилсульфоксиде (Sigma-Aldrich, США) и водный раствор уабаина (Sigma-Aldrich, США) добавляли к культуре клеток. 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) и измерения светопоглощения на спектрофотометре ELx800uv (Bio-Tek Instruments Inc., США) при длине волны 595 нм с референсной длиной волны 630 нм. Для визуального анализа эффекта бактериальных экстрактов на культуру клеток использовали инвертированный микроскоп Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия).

ВЭЖХ-МС/МС экстрактов клеток штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. Для экстракции токсинов из клеток штамма бактериальный осадок гомогенизировали в 1% растворе уксусной кислоты с использованием гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США). Полученную суспензию осаждали, отбирали надосадочную жидкость и пропускали ее через фильтрационную колонку SPE Cartridge, Chromafix C18 ec (S) (Macherey-Nagel GmbH & Co., Германия). Далее использовали колонку с активированным углем. Полученные элюаты упаривали в вакууме и растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты. 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. Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре с тройным квадрупольным масс-спектрометром LCMS-8060 (Shimadzu, Япония) на базе Дальневосточного Федерального Университета. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режимах сканирования (m/z 200–1000) и мониторинга множественных реакций (с англ. Multiple reaction monitoring (MRM)). В качестве стандарта для МС/МС спектров ТТХ и его производных использовали экстракт ТТХ-содержащей немертны *C. cf.*

simula, приготовленный Власенко с соавторами (Vlasenko et al., 2018). 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).

Стимуляция спорообразования у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. Для индукции спорообразования использовали стандартные микробиологические методики, включающие длительное культивирование, спорующую среду, тепловой и холодовой стресс (0°C - 75°C) и осмотический стресс (бидистиллированную воду и 0,92 М раствор NaCl). Для выявления эндоспор и свободных спор брали препараты культуры и окрашивали по методу Пешкова с последующим микроскопированием.

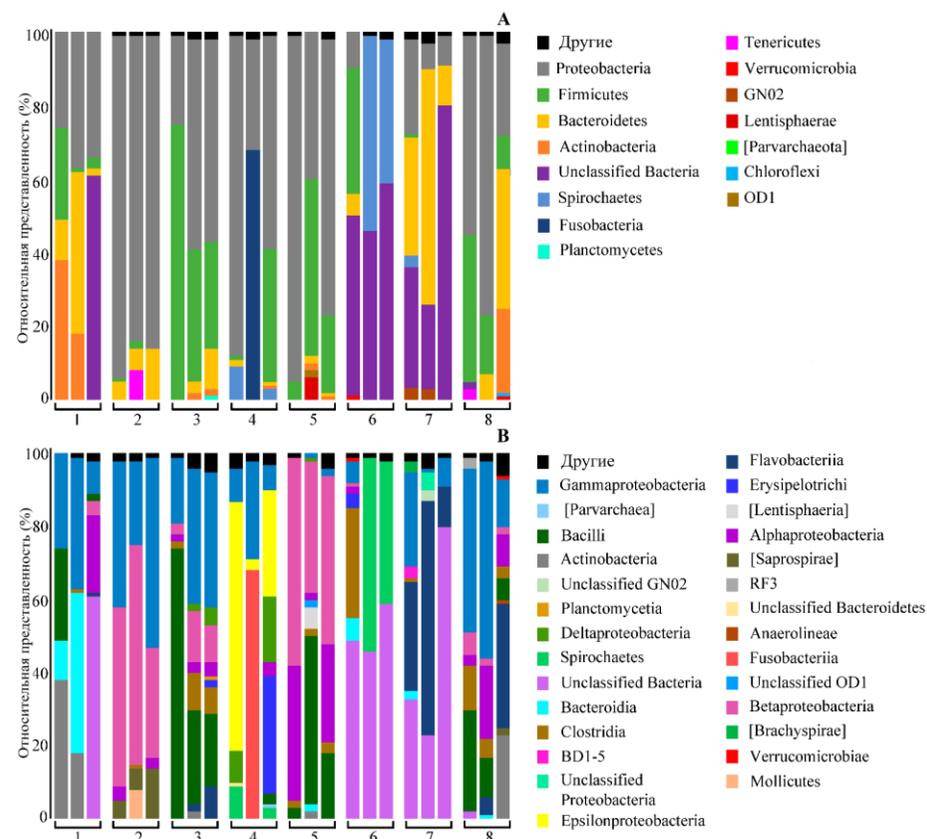
Определение полной геномной последовательности штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. Для выделения тотальной и плазмидной ДНК использовали наборы реагентов «GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721» и «GeneJET Plasmid Miniprep Kit # K0502» (Thermo Fisher Scientific, США). Выделение проводили согласно протоколам, указанным производителем. 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). Секвенирование на платформе MinIon проводили на базе университета и научно-исследовательского центра города Вагенинген (Нидерланды). Для de novo сборки прочтений, полученных с HiSeq 2500, использовали геномный ассемблер SPAdes v. 3.7.1 (Nurk et al., 2013) ($kmer=127$) и программу 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. 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 проводили с использованием программы «NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP)». Функциональную характеристику генома проводили путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с доступными последовательностями из различных баз данных. Круговая карта генома была построена с помощью программы Circos v.0.69-9. 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). Подтверждение видовой принадлежности штамма было проведено с помощью анализа средней нуклеотидной идентичности (с англ. Average Nucleotide Identity (ANI)) на онлайн-сервере JSpecies v 1.2.1 (Richter et al., 2015) и цифровой

ДНК-ДНК гибридизации (с англ. digital DNA-DNA hybridization (dDDH)) на сервере Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 2.1) (Meier-Kolthoff et al., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксономический состав микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсинов немертин. 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 операционных таксономических единиц (ОТЕ), представляющих 2 домена, 29 отделов, 65 классов, 99 порядков и 142 семейства. 186 ОТЕ было определено до рода и 67 - до вида. 99,87% ОТЕ было отнесено к домену бактерий, 0,09% - к домену археи и только 0,04% не были определены до какого-либо таксона. Широко представленными, с точки зрения количества ОТЕ и числа последовательностей, оказались бактерии из отделов Proteobacteria (192 ОТЕ, 49,7% от общего числа полученных последовательностей), Firmicutes (80 ОТЕ, 16,7%), Bacteroidetes (56 ОТЕ, 10,6%) и Actinobacteria (41 ОТЕ, 3,1%). Многочисленными по числу последовательностей, но с малым количеством ОТЕ, оказались представители Spirochaetes (6 ОТЕ, 2,6%) и Fusobacteria (4 ОТЕ, 3%). На рисунке 1 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.

Сравнительный анализ на основе индекса Брея-Кёртиса (pseudo-F=4,5, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте) показал, что образцы немертин одного вида, за исключением *C. cf. simula*, имеют схожую представленность ОТЕ и группируются близко друг к другу (Рисунок 2А). Анализ на основе коэффициента Жаккара (pseudo-F=1,7, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте) показал значительные различия между немертинами по количеству уникальных ОТЕ по отношению к общему числу ОТЕ (Рисунок 2В). 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 3А. weighted UniFrac, pseudo-F=3,8, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте). По наличию таксонов были обнаружены существенные различия как между разными видами немертин, так и между образцами внутри вида (Рисунок 3В. unweighted UniFrac, pseudo-F=1,8, p=0,001, PERMANOVA, 999 пермутаций в каждом тесте).



Виды немертин:

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

Рисунок 1 - Таксономический состав микробиоты исследуемых немертин на уровнях отделов (А) и классов (В). График отражает представленность последовательностей гена 16S рПНК (%).

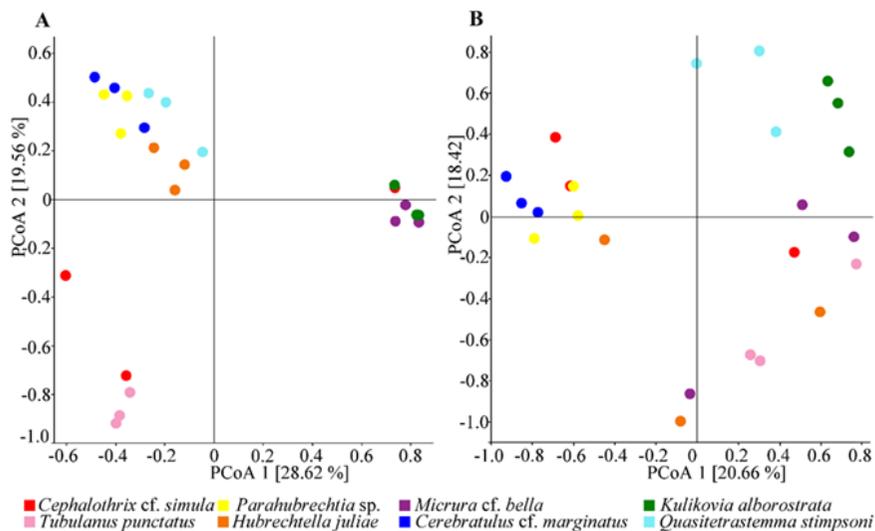


Рисунок 2 - Анализ главных координат (PCoA) на основе индекса Брея-Кёртиса (А) и коэффициента Жаккара (В) для микробных сообществ немертин. Графики отражают расстояния между сообществами в исследуемых образцах (n = 24). На осях указан процент объясненной вариации.

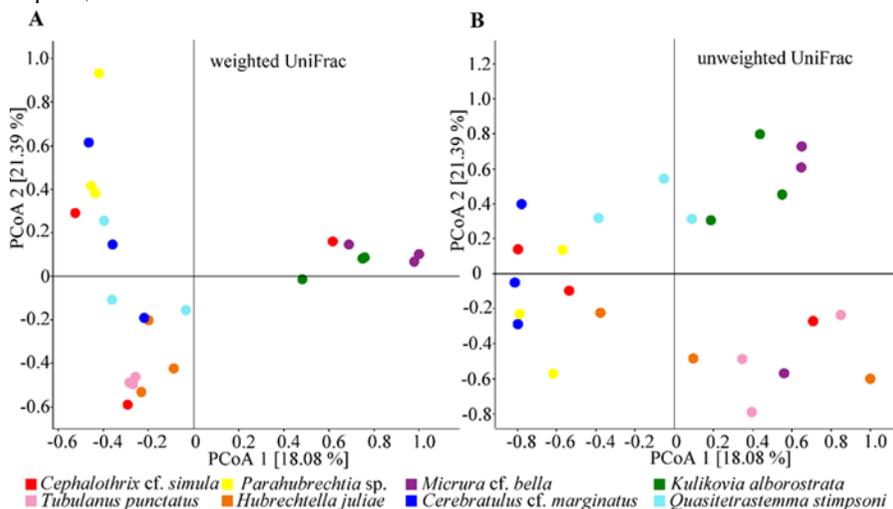


Рисунок 3 - Анализ главных координат (PCoA) на основе методов «weighted UniFrac» (А) и «unweighted UniFrac» (В) для микробных сообществ немертин. Графики отражают расстояния между сообществами в исследуемых образцах (n = 24). На осях указан процент объясненной вариации.

Анализ культивируемой микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсинов немертин. Из проб 4-х видов немертин было выделено в чистые культуры и охарактеризовано 38 штаммов гетеротрофных бактерий. 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. Из выделенных изолятов 15 показали антимикробную активность в отношении хотя бы одной тестовой культуры. Все изученные бактерии проявили полирезистентность к антибиотикам. Методом КЛСМ с использованием поликлональных антител против ТТХ было установлено наличие ТТХ-положительных бактериальных клеток в микрофлоре *H. juliae* и *K. alborostrata* (Рисунок 4А, В). Из 38 бактериальных изолятов ТТХ-положительные клетки были выявлены в штамме *Pseudoalteromonas* sp. 1942, выделенном из *H. juliae* (Рисунок 4С).

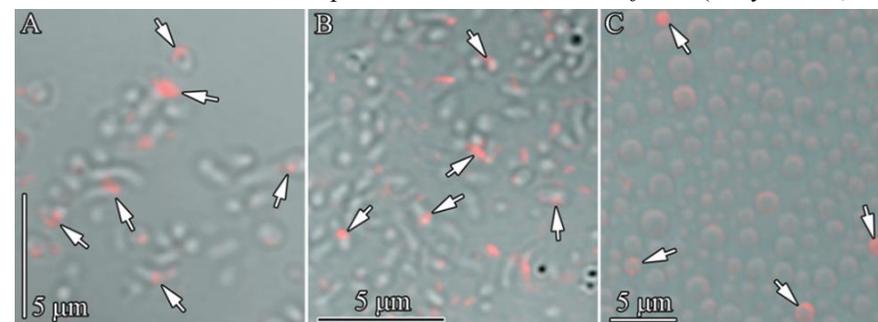


Рисунок 4 – Микрофотографии (Z-проекция) общих бактериальных высевок из *Kulikovia alborostrata* (А) и *Hubrechtella juliae* (В) и культуры клеток штамма *Pseudoalteromonas* sp. 1942 (С), полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с антителами против тетродотоксина (ТТХ). Стрелки указывают на ТТХ-положительные бактериальные клетки.

Нейротоксический эффект экстрактов штаммов *Cytobacillus gottheilii* 1839 и *Pseudoalteromonas* sp. 1942 на культуру клеток мышечной нейробластомы *Neuro-2a* (ATCC CCL131). Экстракты *C. gottheilii* 1839 оказывали токсический эффект на культуру клеток, эквивалентный 28 нг ТТХ. Экстракты *Pseudoalteromonas* sp. 1942 оказывали токсический эффект на культуру клеток, эквивалентный 1,8 нг ТТХ. Штамм *C. gottheilii* 1839, обладающий сильным токсическим эффектом, был выбран для дальнейших исследований.

ТТХ и его производные в штамме *Cytobacillus gottheilii* 1839. Поиск ТТХ и его производных проводили в вегетативной и споровой культурах штамма. ТТХ был обнаружен в экстракте споровой культуры в концентрации 0,751 нг/мл бактериального осадка. При пересчете на кг бактериальной массы

выход ТТХ составил 30,04 нг. 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, и пик со временем удерживания 10,94 мин и МРМ переходами 290.10 > 272.10 и 290.10 > 162.10, соответствующий 11-норТТХ-6(R)-ол. Однако концентрация данных токсинов была ниже лимита подсчета (<0.6 ng/mL), что не позволило получить их спектры фрагментации.

*Жизненный цикл штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 при выращивании на твердых и жидких питательных средах.* Исследования жизненного цикла бактерии проводили на жидкой и твердой питательных средах в течение 6 суток культивирования. На первые сутки культивирования на твердой среде около 29% бактериальной культуры содержало эндоспоры. В последующие сутки концентрация спор увеличивалась, и к концу культивирования 72% культуры было представлено свободными спорами. При культивировании штамма на жидкой среде единичные свободные споры, концентрация которых не превышала 1%, были выявлены на шестые сутки. Электронно-микроскопические исследования жизненного цикла показали, что штамм *C. gottheilii* 1839 имеет те же стадии формирования спор, что и ряд других видов бацилл (Рисунок 5). Отличия от других бацилл заключались в способе формирования псевдоподы и погружении будущей эндоспоры вглубь материнской клетки.

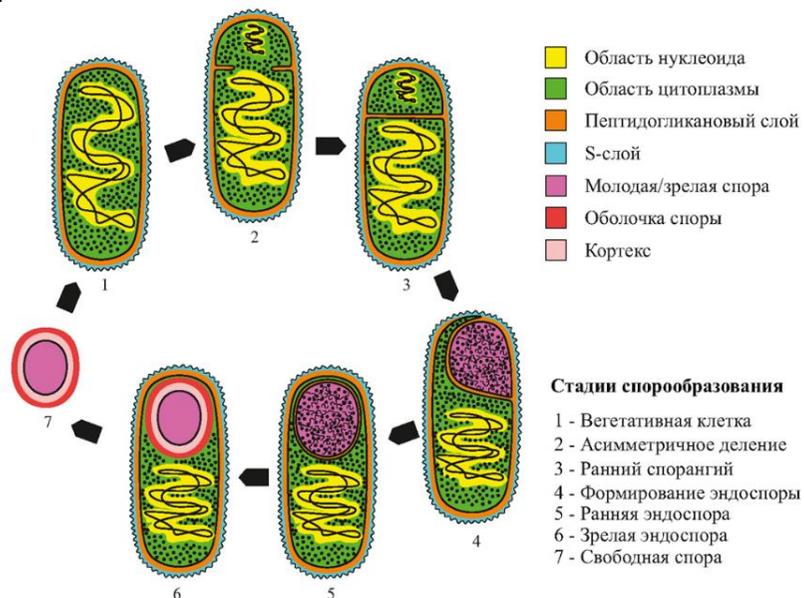


Рисунок 5 – Основные стадии формирования спор у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839.

*Стимуляция спорообразования у штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839.* Эффективным для штамма триггером к спорообразованию оказалось воздействие осмотическим шоком. Наилучший результат был получен при стимуляции 0,92 М раствором NaCl. Исследование индуцированной культуры с помощью КЛСМ с антителами против ТТХ показало, что уже через 5 мин после начала стимуляции около 2% бактериальных клеток имели точечную токсин-положительную метку (Рисунок 6А). Спустя 30 мин культивирования метка размещалась по периферии клеток (Рисунок 6В). К часу около 15-18% клеток имело ТТХ-положительную метку (Рисунок 6С). С помощью электронной иммуноцитохимии с антителами против ТТХ в индуцированной культуре было выявлено два типа спор: с оформленным (Рисунок 5D, E) и неоформленным (Рисунок 5F, G) протопластом. ТТХ-положительная метка была ассоциирована преимущественно с оболочкой и кортексом спор с неоформленным ядром.

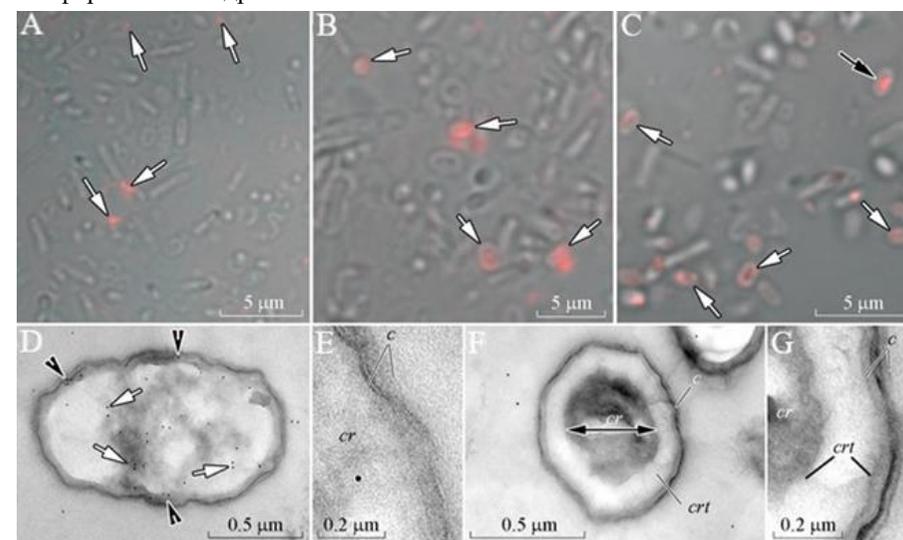


Рисунок 5 - Изображения (Z-проекции), полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (A-C), и иммуноэлектронной микротографии (D-G) окрашенных антителами против ТТХ клеток штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839 после стимуляции спорообразования. A-C – панорамный вид бактериальной культуры через 5 (A), 30 (B) и 60 (C) мин после начала стимуляции спорообразования. D – спора с неоформленным протопластом. E – фрагмент споры с неоформленным протопластом: протопласт (cr) окружен пластинчатой оболочкой (c). F – спора с оформленным протопластом: (crt) – кортекс. G – фрагмент споры с оформленным протопластом: протопласт окружен защитными слоями (оболочкой и кортексом). Стрелками отмечены ТТХ-положительные метки.

Анализ полного генома штамма *Cytobacillus gottheilii* 1839. Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательностей гена 16S рРНК и полного генома, позволил классифицировать штамм, ранее определенный как *Bacillus* sp. 1839, как *Cytobacillus gottheilii* 1839.

Согласно результатам анализа полной нуклеотидной последовательности геном *C. gottheilii* 1839 представлен одной кольцевой хромосомой размером 4,6 Мб и плазмидой размером 0,06 Мб. 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 относятся к псевдогенам. Мобильный генетический пул штамма представлен инсерционными последовательностями (IS), геномными островками (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, при этом 22,8% из них относятся к группе генов с неизвестной функцией. Наибольшее число генетических детерминант в клетке определяет транскрипцию, транспорт и метаболизм аминокислот, углеводов и неорганических ионов. Достаточно высокий процент генов участвует также в сигнальной трансдукции.

Аргинин является единственным, на данный момент, предполагаемым источником гуанидинового фрагмента молекулы ТТХ при ее биосинтезе (Chau et al., 2011). В геноме штамма было выявлено 17 генов с установленной ортологией, продукты которых составляют полный путь биосинтеза аргинина через ацетильный цикл. Кроме того, были обнаружены последовательности, соответствующие транскрипционному фактору регуляции метаболизма аргинина *argR* и белку, регулирующему утилизацию аргинина, *rocR*. В геноме штамма также было обнаружено 5 предполагаемых кластеров генов, два из которых кодируют синтез терпенов, один кодирует синтез поликетидсинтазы (ПКС) типа III, один кодирует сразу два вещества – линейный азол(ин)-содержащий пептид *YcaO* (LAP) и тиопептид *YcaO* C и один кодирует синтез предшественника бактериоцина *UviB*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на повышенный интерес к ТТХ-содержащим животным, данные об их микробных сообществах крайне скудны. Сравнительный анализ микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин выявил достаточно высокое таксономическое разнообразие бактерий в микрофлоре как разных видов немертин, так и образцов одного вида. При этом образцы одно-

го вида немертин имели большее сходство бактериального состава по сравнению с образцами разных видов. Нами была также 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). В настоящей работе бактерии, аффилированные с синтезом ТТХ, были обнаружены во всех исследуемых немертинах с преобладанием в ТТХ-содержащих. что 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. Проведенные нами исследования культивируемой микрофлоры немертин подтвердили данные метагеномного анализа. Так, ТТХ-положительные бактериальные клетки были выявлены в первичных высевах ТТХ-содержащей немертины *K. alborostrata* и не содержащей токсин *H. juliae*, более того единственный ТТХ-положительный штамм, выявленный в данном исследовании, был выделен из *H. juliae*. Наличие ТТХ-продуцирующих бактерий в микрофлоре не содержащего токсин животного согласуется с данными исследования Тернер с соавторами, в котором в микрофлоре нетоксичной немертины *Cephalothrix rubifrons* был обнаружен ТТХ-продуцирующий штамм *Vibrio alginolyticus* (Turner et al., 2018).

Штаммы *Pseudoalteromonas* sp. 1942 и *C. gottheilii* 1839, выделенный ранее из немертины *C. cf. simula*, проявляли ТТХ-положительную активность при многократных пересевах на стандартные микробиологические среды в отсутствие компонентов тела червя в течение длительного срока, что делает их уникальными объектами для изучения биосинтеза ТТХ. Используемый нами для предварительной количественной оценки продукции ТТХ, метод биотестирования на культуре клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a (ATCC CCL131) позволил выбрать для дальнейших исследований штамм *C. gottheilii* 1839, обладающий более высокой токсичностью. С помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа в споровом экстракте штамма были обнаружены ТТХ и его производные 5,6,11-тридеокситТТХ и 11-норТТХ-6(R)-ол.

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. В результате было показано, что длительное культивирование на твердой среде приводит к переходу более 70% культуры в споровые формы. При этом штамм имеет те же стадии формирования спор, что и ряд других видов ба-

цилл с отличием в способе формирования псевдоподы. Известно, что миграция материнской мембраны вокруг будущей споры связана с так называемыми «белками-поглощения», которые скапливаются на периферии диска деления и запускают механизм постепенного «наползания» материнской оболочки на будущую эндоспору. (Tocheva et al., 2013). В случае с исследуемым нами штаммом такие белки могут скапливаются на одной из сторон диска деления, что приводит к формированию одиночной филлоподии.

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. Стимуляция синтеза различных токсинов при спорообразовании была показана для ряда бактерий, включая Cry-токсин для *Bacillus thuringiensis* (Banerjee-Bhatnagar, 1998; Juarez-Hernandez et al., 2015), ларвицидный токсин для *Bacillus sphaericus* (Hire et al., 2009) и токсины А и В для *Clostridium difficile* (Karlsson et al., 2008). Нами были подобраны эффективные условия стимуляции спорообразования для *C. gottheilii* 1839, позволившие получить достаточно высокий процент спор, содержащих токсин, уже в первый час после начала стимуляции. При этом 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 клетки.

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. Именно факультативность синтеза ТТХ может объяснить феномен отсутствия ТТХ-положительных бактерий у некоторых ТТХ-содержащих животных (Lehman et al., 2004). Очевидно, что дальнейший прогресс в исследовании природных источников ТТХ невозможен без расшифровки биосинтеза ТТХ и его функции в бактериальных клетках. 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 (C5) (Kotaki, Shimizu, 1993) или изопрен (C5) (Yasumoto et al., 1988). Гуанидиновый фрагмент молекулы ТТХ, обеспечивающий его токсичность, может быть получен от донора, такого как аргинин, двумя путями: через амидинотрансферазу или с помощью НРПС и ПКС ферментов (Chau et al., 2011). 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 предполагае-

мый кластер генов биосинтеза ПКС типа III. 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 АСР-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. Интересен и тот факт, что данный кластер содержит гены спорообразования, кодирующие белок оболочки споры CotD и малый кислоторастворимый спорный 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.

Важным инструментом, позволяющим прогнозировать биосинтез ТТХ, является структура его производных, обнаруженных у многих токсинсодержащих 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. Авторы также предположили, что 11-охоТТХ и 11-норТТХ-6(S)-ол являются окисленными метаболитами ТТХ. 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, за исключением химически равновесных токсину 4-эпиТТХ и ангидро-ТТХ, в бактериях обнаружены не были. Присутствие в бактериальном экстракте *C. gottheilii* 1839 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. 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 аналоги 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 мышины 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Shokur O.A., Magarlamov T.Yu., **Melnikova D.I.**, Gorobets E.A., Beleneva I.A. Life cycle of tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. on solid and liquid medium: light and electron microscopy studies // Russian Journal of Marine Biology. – 2016. – V. 42. – № 3. – P. 252 – 257.
2. Magarlamov T.Yu., **Melnikova D.I.**, Shokur O.A., Gorobets E.A. Rapid production of tetrodotoxin-like compounds during sporulation in a marine isolate *Bacillus* sp. 1839 // Microbiology (Moscow). – 2017. – V. 86. – № 2. – P. 192 – 196.
3. **Melnikova D.I.**, Beleneva I.A., Tyunin A.P., Magarlamov T.Yu. The taxonomic composition, characteristics, and neurotoxic activities of ribbon worm-associated bacteria from the Sea of Japan // Russian Journal of Marine Biology. – 2017. – V. 43. – № 5. – P. 383 – 391.
4. Magarlamov T.Yu., **Melnikova D.I.**, Chernyshev A.V. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems // Toxins (Basel). – 2017. – V. 9. – № 5. – P. 166 – 185.
5. **Melnikova D.I.**, Khotimchenko Y.S., Magarlamov T.Yu. Addressing the issue of tetrodotoxin targeting // Marine Drugs. – 2018. – V. 16. – № 10. – P. 352 – 366.
6. **Melnikova D.I.**, Vlasenko A.E., Magarlamov T.Yu. Stable tetrodotoxin production by *Bacillus* sp. strain 1839 // Marine Drugs. – 2019. – V. 17. – № 12. – P. 704 – 710.
7. **Melnikova D.I.**, Magarlamov T.Yu. The microbial community of tetrodotoxin-bearing and non-tetrodotoxin-bearing ribbon worms (Nemertea) from the Sea of Japan // Marine Drugs. – 2020. – V. 18. – № 3. – P. 177 – 194.

Работы, опубликованные в материалах региональных и международных научных конференций:

8. **Мельникова Д.И.**, Горобец Е.А. Особенности процесса спорообразования тетродотоксин-продуцирующего штамма *Bacillus* sp. 1839 // Материалы Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам, г. Владивосток, апрель 2015 г. – Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2015. С. 278.
9. **Melnikova D.I.**, Gorobets E.A., Shokur O.A., Magarlamov T.Yu. Induction of sporulation and tetrodotoxin synthesis in marine bacteria *Bacillus* sp. 1839 //

Proceedings of the International Scientific Conference «Future of Biomedicine 2015», Vladivostok, Russia, September 2-7, 2015. – Vladivostok: FEFU Press, 2015. P.89.

10. Горобец Е.А., Кузнецов В.Г., **Мельникова Д.И.** Биоинформативный анализ, как ключ к раскрытию путей биосинтеза мощного гуанидинового нейротоксина в бактериях-продуцентах // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Концепции фундаментальных и прикладных научных исследований», г. Омск, ноябрь 2016 г. – Уфа: МЦИИ ОМЕГА САЙНС, 2016. С.39-40.

11. Кузнецов В.Г., **Мельникова Д.И.** Проблемы детектирования тетродотоксина в экстрактах морских гидробионтов // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Внедрение результатов инновационных разработок: проблемы и перспективы», г. Екатеринбург, ноябрь 2016 г. – Уфа: МЦИИ ОМЕГА САЙНС, 2016. С.3-4.

12. **Melnikova D.I.**, Beleneva I.A., Magarlamov T.Yu. (2017) Search for new bacterial producers of tetrodotoxin (perspective analgesic agent) for pharmaceutical industry // Abstracts of the International Scientific Conference «Scientific and Technological Developments of Research and Monitoring of Marine Biological Resources», Vladivostok, Russia, May 22-24, 2017. – Vladivostok: FEFU Press, 2017. P. 80.

МЕЛЬНИКОВА ДАРЬЯ ИГОРЕВНА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук