

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Карагодина Надежда Павловна

**Особенности симбиотических взаимоотношений мшанки  
*Aquiloniella scabra* и ее бактериальных симбионтов**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научный руководитель:

к. б. н., доцент, Вишняков Андрей Эккустадианович

Работа выполнена на кафедре Зоологии беспозвоночных СПбГУ

(зав. каф. – д. б. н., проф., Гранович Андрей Игоревич)

Санкт-Петербург

2019 год

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	2
<b>Обзор литературы</b> .....	5
Симбиотические микроорганизмы у губок.....	6
Симбиотические микроорганизмы у кораллов.....	9
Особенности симбиотических отношений мшанок и бактерий.....	13
<b>Материалы и методы</b> .....	18
Методы световой и электронной микроскопии.....	18
Молекулярные методы для определения систематического статуса бактериальных симбионтов.....	19
<b>Результаты</b> .....	20
Расположение и размерные характеристики фуникулярных тел в зооидах <i>Aquiloniella scabra</i> .....	20
Ультраструктура фуникулярных тел.....	24
Тонкое строение бактериальных симбионтов.....	30
Систематический статус симбионтов.....	33
<b>Обсуждение</b> .....	34
<b>Список литературы</b> .....	40
<b>Благодарности</b> .....	48

## **Введение.**

В природе явление симбиоза многообразно и представлено спектром различных отношений между организмами, в связи с чем существует несколько определений этого явления. Впервые термин «симбиоз» был использован в 1879 году немецким микологом Генрихом де Бари, и определялся как “the living together of *unlike* organisms”. В настоящее время этот термин используется в своем первоначальном значении, то есть для обозначения продолжительного сосуществования организмов разных видов.

По характеру взаимоотношений между организмами принято выделять мутуалистические отношения – приносящие пользу обоим видам, комменсализм – в случае, если выгоду получает только один организм, не нанося при этом вреда другому, и паразитизм – если один из организмов получает выгоду за счет другого. По степени зависимости одного организма от другого принято характеризовать симбиоз как облигатный – в случае, когда существование одного организма невозможно без другого, и факультативный – когда сосуществование организмов не является обязательным условием жизни организмов обоих видов.

Разнообразные симбиотические ассоциации встречаются повсеместно. Они характерны как для одноклеточных, так и многоклеточных организмов и распространены во всех средах обитания. Особенно широко распространены симбиотические отношения с микроорганизмами. Многоклеточные животные предоставляют микроорганизмам огромное число потенциальных экологических ниш. Хотя микроорганизмы в численном и объемном соотношении могут значительно превосходить хозяина, в симбиотической ассоциации традиционно принято называть «хозяином» самого крупного многоклеточного представителя (Gilbert et al. 2012). По некоторым оценкам число бактериальных клеток, населяющих пищеварительный тракт человека, превышает примерно в 10 раз число соматических и половых клеток хозяина (Bäckhed et al. 2005) а объем симбиотических цианобактерий некоторых губок может достигать почти половины объема клеток хозяина (Whitton and Potts, 2000).

Наибольшее внимание исследователей привлекают ассоциации с патогенными микроорганизмами из-за клинического значения данного направления исследований. Однако в последние годы заметен возросший интерес к изучению мутуалистических взаимоотношений между организмами. Для таких отношений также иногда используется термин «симбиоз», только в уже более узком смысле, подчеркивающим характер взаимодействия (Moran, 2006).

Среди морских модульных организмов в наибольшей степени изучены симбиотические ассоциации с микроорганизмами у губок и кораллов. Вместе с мшанками, эти группы беспозвоночных животных являются доминирующими эпибионтами в бентосных сообществах (McKinney and Jackson 1989; Ryland 2005). Однако исследования симбиоза мшанок с микроорганизмами крайне ограничены.

Наличие симбиотических бактерий у мшанок впервые было описано в прошлом веке французской исследовательницей Люто (Lutaud 1964). В большей части ее исследований применялись гистологические методы, и в одной из работ изучение бактериальных симбионтов проводилось при помощи электронной микроскопии (Lutaud 1986). На этом исследовании ультраструктуры симбиотических бактерий и ассоциированных с ними тканей хозяина практически прекратились.

Изучение ультраструктуры организмов является одним из эффективных способов приблизиться к пониманию отношений между хозяином и его симбионтами. Исследование тонкого строения бактериальных клеток и тканей мшанок позволяет говорить о возможном характере взаимодействий в симбиотической системе.

Целью нашей работы стало изучение особенностей взаимоотношений между симбиотическими бактериями и мшанками на примере хейлостомной мшанки *Aquiloniella scabra*, широко распространенной в Белом море.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Собрать колонии *Aquiloniella scabra* и зафиксировать образцы.
2. Описать строение симбиотических бактерий и ассоциированных с ними тканей хозяина на световом и электронно-микроскопическом уровне.
3. Определение систематического положения симбиотических бактерий.
4. Проанализировать полученные результаты и сравнить с литературными данными.

## Обзор литературы

### Обзор литературы

Симбиотические отношения оказывают влияние на различные аспекты жизнедеятельности хозяина. Преимущества, которые получает организм, вступающий в такие взаимоотношения, могут быть различны.

Нередко симбионты задействованы в обеспечении хозяев пищевыми ресурсами. Например, симбиотические водоросли кораллов (*Symbiodinium*) поставляют хозяину до 60% необходимых питательных веществ (Gilbert et al, 2012). Потеря этих симбионтов в результате изменений условий окружающей среды приводит к необратимым последствиям – обесцвечиванию кораллов (“bleaching”) (Rowan, 2004).

В некоторых случаях симбионты переваривают пищу для хозяина, у которого отсутствуют необходимые пищеварительные ферменты. Известный пример таких отношений - термиты *Mastotermes darwiniensis*, питающиеся древесиной и их кишечные симбионты, представленные бактериями, археями и протистами (Gilbert et al., 2012). Интересно отметить в числе кишечной микробиоты термитов симбиотических протистов *Mixotricha paradoxa* (Trichomonadida), которые сами содержат бактериальных симбионтов. Бактерии на поверхности *Mixotricha p.* приводят клетку в движение, в то время как 4 жгутика *Mixotricha p.* только задают направление (Wenzel et al., 2002).

Помимо обеспечения хозяев питательными веществами, а также активного участия в локомоции хозяина, симбиотические микроорганизмы способны регулировать процессы морфогенеза. Так, кишечная микробиота у новорожденных млекопитающих (мышей) вызывает экспрессию определенных генов в клетках кишечника, вовлеченных в такие процессы, как ангиогенез (Hooper et al., 2001).

Кроме того, прокариотические симбионты могут обеспечивать защиту хозяев от вирусов, стимулируя иммунную систему хозяина. Наиболее известным примером таких взаимоотношений является симбиоз бактерии из рода *Wolbachia* с насекомыми. *Wolbachia* вызывает цитоплазматическую несовместимость у хозяев-насекомых, но в то же время штамм вольбахии wMelPop ингибирует репликацию вирусов в организме комара *Aedes aegypti* за счет активации иммунной системы (Cook, McGraw, 2010).

Защитная роль прокариотических симбионтов может быть связана с предотвращением обрастания поверхностей в морской воде. Эта проблема особенно остро стоит для морских седиментаторов, на поверхности которых оседающие микроорганизмы способны создавать пленки, что в дальнейшем ведет к оседанию макроорганизмов, таких как личинки беспозвоночных.

Седиментаторы могут поддерживать свою поверхность свободной от обрастателей за счет вторичных метаболитов, выделяемых симбионтами (Satheesh et al., 2016). Симбиотические бактерии способны продуцировать антибактериальные агенты, препятствующие оседанию свободноживущих прокариот и образованию ими пленок на поверхности, таким образом метаболиты повышают конкурентоспособность симбиотических организмов (Taylor et al., 2007). Среди морских седиментаторов факты наличия вторичных метаболитов с антимикробными свойствами, имеющие бактериальное происхождение, в большей степени описаны у губок и кораллов. Симбиотические ассоциации микроорганизмов с этими беспозвоночными давно стали объектом активных исследований, в то время как изучение симбиоза в другой группе колониальных седиментаторов – мшанок (Bryozoa) – находится только на начальной стадии.

### **Симбиотические микроорганизмы губок.**

Губки являются одной из доминантных групп эпобионтов. Они распространены во всех широтах в пресных и морских водоемах. Интерес к этой группе организмов был вызван во многом в связи с их способностью образовывать симбиотические ассоциации с большим количеством разнообразных микроорганизмов, которые вместе с хозяином синтезируют разнообразные биологически активных вторичные метаболиты.

Разнообразие эукариотических симбионтов-протистов у губок очень велико. Среди них встречаются диатомовые водоросли, динофиты, хлорофиты, красные водоросли (Thacker, Freeman, 2012), а также грибов. Симбиоз губок с грибами детальнее всего изучен в ассоциации с дрожжами. Их наличие было показано в тканях взрослых губок, а также в их ооцитах, вследствие чего предполагается наличие вертикальной передачи симбионта (Maldonado, 2005).

В пресных водах губки часто вступают в симбиоз с одноклеточными водорослями, в первую очередь с зелеными водорослями рода *Chlorella* (Sand-Jensen, 1994). Несмотря на то, что эти симбиотические отношения не носят облигатный характер, зоохлореллы могут

играть важную роль в жизни хозяина, а именно снабжать губок продуктами фотосинтеза (глюкозой, маннозой), а также защищать своих хозяев от избыточного освещения (Wilkinson, 1980). Другие симбиотические одноклеточные водоросли – динофлагелляты из рода *Symbiodinium* – вступают в симбиотические отношения с морскими губками, но преимущественно только с одной группой, а именно со сверлящими губками семейства Clionaidae (Demospongiae). Интересно, что одним из известковых субстратов сверлящих губок являются кораллы, которые также обладают симбиотическими динофлагеллятами рода *Symbiodinium* (Hill et al., 2011).

Прокариотические симбионты губок включают почти все многообразие бактерий и архей (Taylor et al., 2007), а также филогенетическую линию “Poribacteria”, выделенную на основе различий в последовательности 16Sp РНК (<75% сходства с последовательностями известных бактериальных фил), которая встречается исключительно в губках. (Fieseler et al., 2004).

Весьма распространенным в морских местообитаниях является симбиоз губок с цианобактериями. По крайней мере, для 40 родов морских губок описаны вне- и внутриклеточные симбиотические сине-зеленые водоросли (Adams, 2000). В пределах мезохила губок были обнаружены внутри- и внеклеточные симбиотические цианобактерии. Внутриклеточные симбионты могут находиться в вакуолях по одной бактериальной клетке, или в так называемых «цианоцитах» - специализированных археоцитах с крупной вакуолью, содержащей большое число симбионтов. В меньшем количестве бактерии встречались в пищеварительных вакуолях. (Wilkinson, 1978). Цианобактерии обеспечивают хозяина органическими продуктами фотосинтеза в виде глицерина, тем самым обеспечивая процессы жизнедеятельности хозяина (Taylor et al., 2007).

Некоторые симбиотические цианобактерии способны фиксировать не только углерод, но также и азот, снабжая хозяев продуктами ассимиляции, что может быть особенно значимо для губок, населяющих олиготрофные биотопы с низким содержанием азота (Taylor et al., 2007).

Симбиотические ассоциации губок могут включать и других прокариот, например, метанотрофных бактерий. Такие симбиотические ассоциации характерны для глубоководных губок, обитающих в условиях отсутствия освещенности и низкой концентрации органических веществ. Отказавшись от фильтрационного типа питания, губки перешли к хищничеству, но также получают питательные вещества за счет переваривания симбиотических метанотрофных бактерий. Эти симбионты были найдены в пищеварительных вакуолях разных типов клеток взрослой губки, а также в клетках

эмбрионов. В последнем случае бактерий не имели признаков переваривания, что косвенно может говорить о том, что эти бактерии передаются от материнского организма дочернему через оплодотворенные яйцеклетки (Vacelet et al., 1996).

В симбиотической системе хозяину порой приходится регулировать численность симбиотических микроорганизмов, темпы размножения которых могут быть очень высоки в благоприятных условиях, созданных хозяином. Большое количество симбионтов может угнетать функционирование клеток хозяина, вследствие ухудшения внутри- и межклеточного транспорта, а также интоксикации продуктами метаболизма бактерий. Одним из механизмов контроля численности симбионтов является заимствование синтезируемых ими продуктов фотосинтеза (Wilkinson, 1988). Считается, что губки выделяют вещества, которые способны влиять на углеродный метаболизм симбиотических бактерий, тем самым вызывая высвобождение больших количеств ассимилятов из своих симбионтов. Наличие таких веществ было показано в симбиотических системах губки *Haliclona cymaiformis* (и коралла *Plesiastrea versipora*) и их симбиотических водорослей (Grant et al., 2006). Однако в некоторых случаях организм хозяина оказывается не способным контролировать численность симбионтов, что может привести к поражению тканей хозяина. Так, в работе Клауса Рютцлера (Rutzler, 1988) было показано, что при благоприятных условиях симбиотические цианобактерии начинают размножаться так быстро, что архециты губки-хозяина *Geodia papyracea* не способны устранить избыток симбионтов, что в итоге приводит к постепенному разрушению тканей хозяина. В таких случаях губки используют следующий механизм регуляции симбионтов. Они синтезируют вокруг скоплений бактерий большое количество плотно упакованных спонгиновых микрофибрилл (спонгиновый барьер), препятствующих размножению и распространению бактерий в теле губки. Образующиеся из спонгина и бактерий тельца (псевдогеммулы) выводятся из тела губок.

Присутствие симбионтов обнаруживалось не только в соматических клетках губок, но также в мужских и женских половых клетках. Это может указывать на вертикальную передачу симбионтов, причем не только через материнский организм, но также, возможно, через отцовский (Taylor et al., 2007). Вертикальный способ передачи симбионтов, по-видимому, широко распространен в пределах типа Porifera. Наличие симбиотических бактерий в личинках было показано у разных видов всех трех классов губок (Ereskovsky et al., 2005) Сама передача симбионтов от материнского организма к дочернему была прослежена на всех стадиях при помощи методов электронной микроскопии на виде *Halisarca dujardini* в работе Ересковского с соавторами (Ereskovsky



et al., 2005). Симбиотические бактерии были обнаружены во взрослых губках *Halisarca dujardini* в пределах мезохила. Заселяющие ооцит бактерии частично перевариваются в фагосомах, питая развивающийся ооцит. Однако некоторое их количество ~~частично~~ сохраняются в вакуолях. Позже симбионты обнаруживаются между бластомерами и внутри вакуолей в пределах бластомеров. На стадии бластулы бактериальные клетки присутствуют в полости бластулы, а в личинке – в межклеточном пространстве.

Передача симбиотических организмов может осуществляться и при бесполом размножении. У некоторых видов пресноводных губок внутриклеточные водоросли были обнаружены в геммулах (Simpson, Gilbert, 1973), а в почках некоторых морских губок были найдены цианобактерии (Gaino, 2006), что может служить косвенным доказательством вертикального переноса симбионтов.

Изучение симбиотических ассоциаций микроорганизмов с губками привлекает внимание исследователей во многом в связи с биологической активностью выделяемых из них вторичных метаболитов. Считается, что источником этих биологически активных веществ могут быть симбиотические микроорганизмы (Flatt et al., 2005). Вторичные метаболиты обладают разнообразными свойствами: антибактериальными, противовирусными, противовоспалительными, противоопухолевыми, а также свойствами, препятствующими обрастанию (Taylor et al., 2007).

Метаболиты разнообразны по своей химической природе, они относятся к классам терпеноидов, алкалоидов, пептидов и поликетидов (Taylor et al., 2007). Одним из наиболее известных вторичных метаболитов, выделенных из губок, является халихондрин. Халихондрины - полиэфирные макролиды, обладающие противоопухолевой активностью. Они впервые были выделены в 80-х годах прошлого века из губки *Halichondria okadai* (Hirata, 1986). Из-за сложного строения синтез данных соединений включает много ступеней, вследствие чего промышленное производство халихондринов оказалось невыгодно. Тем не менее более просто устроенный синтетический аналог халихондрина эрибулин, сохраняющий свойства нативного вещества, находится на 3 стадии клинических исследований (Twelves et al., 2010).

### **Симбиотические микроорганизмы кораллов.**

Коралловые рифы являются сложной экосистемой, с которой связана жизнь многообразных морских животных: по некоторым оценкам до 25% всех морских видов населяют рифы (Spalding et al., 2001). Со многими из этих видов кораллы образуют

симбиотические ассоциации, в основе которых лежат разнообразные типы взаимоотношений между хозяином и симбионтом. Большинство исследований рифов сосредоточено на изучении симбиотических систем мадрепоровых кораллов, поскольку они являются главными строителями рифов. Особый интерес связан с изучением симбиоза кораллов с одноклеточными фотосинтетическими динофлагеллятами, также известными как зооксантеллы (*Symbiodinium spp*), которые являются облигатными эндосимбионтами большинства видов кораллов, а также других беспозвоночных, таких как фораминиферы и губки (Blackall et al., 2015)

Род *Symbiodinium* генетически разнообразен и включает 9 клад, которые, в свою очередь, разделяются на типы (van Oppen et al., 2009). Генетическим маркером, по которому принято идентифицировать различные клады *Symbiodinium*, является ядерный ген рибосомального внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) (Padilla-Gamiño, 2012). Для большинства видов мадрепоровых кораллов характерно одновременное присутствие нескольких типов и даже клад *Symbiodinium* (Blackall et al., 2015) в пределах одной колонии, в то время как представители *Octocoralia* в большинстве случаев (до 87%) содержат симбионтов из одной клады (Goulet et al., 2008). Часто соотношение типов симбионтов у мадрепоровых кораллов может быть стабильно (Pettay et al., 2011; McGinley et al., 2012a), однако в ряде случаев описано изменение соотношения типов в ответ на сезонные изменения в среде, на стресс (Hsu et al., 2012). Кроме этого, у одних и тех же видов кораллов на разных стадиях онтогенеза могут встречаться разные сочетания типов *Symbiodinium* (Yamashita et al., 2013). Определенные типы в пределах клад могут оказывать влияние на физические параметры хозяина. Например, типы D обеспечивают устойчивость к более высоким температурам (Berkelmans, van Oppen, 2006). Под воздействием внешних факторов некоторые кораллы становятся более термоустойчивыми за счет смены доминирующего типа симбионтов в их тканях (с С на D). Таким образом, генетическое разнообразие симбиотических водорослей *Symbiodinium* обуславливает разнообразие физиологических функций и может обеспечивать адаптивную пластичность хозяина (Kitano, Oda, 2006b). Роль симбиотических зооксантелл в жизни хозяина на этом не ограничивается. Симбионты снабжают хозяина продуктами фотосинтеза, преимущественно в форме низкомолекулярных липидов и углеводов (Lesser et al., 2004), что может оказывать существенное влияние на скорость кальцификации коралла (Blackall et al., 2015).

Большинство кораллов с внешним оплодотворением приобретают своих симбиотических динофлагеллят из среды. В эксперименте с мадрепоровым кораллом *Fungia scutaria* были

прослежены этапы заселения хозяина симбионтами. Личинки, которые уже приобрели способность к питанию и еще плавают в толще воды, поглощают динофлагеллят из среды вместе с едой. Зооксантеллы попадают в гастральную полость, где фагоцитируются клетками гастродермиса (энтодермы). Уже через час после акта питания (экспозиции с зооксантеллами) симбионты наблюдаются в клетках эктодермы и гастродермы (Schwarz et al., 1999).

Однако у некоторых кораллов передача симбионтов осуществляется от материнского организма к дочернему через оплодотворенные яйцеклетки и далее через личинок. Такой способ переноса симбионтов в большей степени характерен для вынашивающих видов: у 90% из исследованных вынашивающих видов мадрепоровых кораллов наблюдается вертикальный перенос симбиотических водорослей. Виды с внешним оплодотворением также могут передавать симбионтов своему поколению, однако это явление встречается гораздо реже (Baird et al., 2009). Для одного из видов с внешним оплодотворением (*Montipora capitata*) вертикальный перенос симбионтов из родительского организма дочернему был показан с использованием молекулярных маркеров ITS2 (Padilla-Gamiño, 2012).

Симбиотические ассоциации кораллов с другими эукариотическими организмами мало изучены. В основном имеющиеся сведения касаются исследований патогенных организмов. Например, известно, что эндолитические грибы, поселяющиеся в скелете коралла, могут поражать морские перья, а в кораллах рода *Montastraea* нередко встречаются протисты из паразитической группы Apicomplexa (Knowlton, Rohwer, 2003).

Однако, помимо симбиоза с зооксантеллами, известны другие примеры мутуалистических отношений в симбиотической системе кораллов и эукариот. Кораллы могут предоставлять защиту эндолитическим водорослям, которые в свою очередь снабжают хозяина продуктами фотосинтеза, что особенно важно во время «обесцвечивания», когда коралл теряет симбиотических зооксантелл (Fine, Loya, 2002).

Прокариотические симбионты кораллов многочисленны и разнообразны, однако изучены в гораздо меньшей степени, чем симбиотические ассоциации с водорослями *Symbiodinium*. Среди наиболее часто встречающихся таксонов находятся протеобактерии (гамма и альфа протеобактерии). Также из грам отрицательных бактерий обнаружены цианобактерии, Chloroflexu, Bacteroidetes, а среди грам положительных бактерий встречаются Firmicutes и Actinobacteria, а также присутствуют археи (Euarchaeota и Crenarchaeota) (Blackall et al, 2015).

Симбиотические бактерии способны заселять различные ниши, предоставляемые кораллом: внутренние ткани, карбонатный скелет и поверхностный слой слизи, секретируемый хозяином (Rosenberg et al. 2007). Было показано, что до 30% бактериальных симбионтов, выделенных из некоторых видов кораллов, обладают антибиотической активностью. Бактерии таким образом могут конкурировать друг с другом за потенциальные ниши, и вместе с этим обеспечивать защиту хозяина от патогенов (Ritchie, 2006).

Кораллы являются очень специализированным местом обитания, заселять которое способны далеко не все бактерии из окружающей среды. Кроме того, бактерии обычно проявляют специфичность в отношении выбора своего хозяина. Так, кораллы из одного рода (или семейства) обычно содержат схожие бактериальные сообщества. Также оказалось, что в кораллах обитают представители потенциально новых родов или даже более высоких таксономических групп (Sunagawa et al., 2010), из которых некоторые могут являться специфичными эндосимбионтами кораллов. Специфичность ассоциации бактерий с кораллами проявляется не только в отношении вида хозяина, но также зависит от его физиологического состояния. При анализе закономерностей использования источника углерода бактериями, выращенными в культуре из слизистого слоя здоровых кораллов *Acropora cervicornis* и обесцвеченных, удалось обнаружить различия в бактериальных сообществах (Ritchie, Smith's, 1995).

Как и в случае с симбиотическими динофитами, новое поколение кораллов обычно заселяется бактериальными симбионтами из среды. При помощи методов флуоресцентной гибридизации *in situ* для многих видов кораллов было показано, что симбионты приобретаются хозяином уже после оседания личинки и метаморфоза (Sharp et al., 2010). Гораздо реже наблюдается вертикальная трансмиссия. Впервые свидетельства передачи бактериальных симбионтов от родительского организма дочернему были получены в работе Шарп с соавторами (Sharp et al., 2012). При помощи молекулярных методов было показано наличие симбиотических бактерий на разных стадиях развития полипа (*Porites astreoides*), в основании эктодермального слоя недавно вышедшей из материнского организма планулы, 4-дневной планулы, а также на формирующихся мезентериях ювенильного полипа. Существует и промежуточный вариант передачи симбионтов, который заключается в высвобождении симбиотических бактерий материнской колонией

одновременно с выведением половых продуктов в воду, что облегчает заражение потомства симбионтами (Ceh et al., 2013b).

Симбиотические бактерии играют важную роль в жизни хозяина. Кораллы получают от своих симбионтов питательные вещества. К примеру, симбиотическая ассоциация коралла *Montastraea cavernosa* включает помимо зооксантелл также и внутриклеточных цианобактерий, у которых при помощи иммуноцитохимических методов была обнаружена нитрогеназная активность, свидетельствующая о способности симбионтов фиксировать азот и о возможном снабжении хозяина этим лимитирующим элементом (Lesser et al., 2004). У других видов кораллов (*Alcyonium gracillimum* и *Tubastraea coccinea*) было показано наличие разнообразных бактерий, потенциально способных к денитрификации и окислению аммония. Такие симбиотические бактерии могут играть значимую роль в циркуляции азота в пределах организма хозяина (Yang et al., 2013).

Метаболиты, выделяемые разными симбиотическими прокариотами, разнообразны по своей химической природе и, как следствие, по эффекту, оказываемому на организм хозяина. Одни симбионты являются патогенными, вызывая различные болезни. Другие, наоборот, могут обеспечивать устойчивость хозяина к вызываемым микроорганизмами болезням за счет своей антибиотической активности (Ritchie, 2006).

### **Особенности симбиотических отношений мшанок и бактерий**

Мшанки являются колониальными организмами, питающимися взвешенными в воде частицами. Эти животные распространены в морских и пресных водоемах во всех широтах, при этом в некоторых зонах (бореальной и полярной) являются самыми многочисленными организмами-обрастателями (Островский, 2009). Несмотря на это, количество работ, посвященных изучению симбиоза в этой группе животных, очень ограничено. Исследование симбиотических отношений у мшанок проводилось только на видах из самого крупного и разнообразного из современных отрядов – Cheilostomata.

С поверхностью мшанок, как и других морских беспозвоночных, постоянно контактирует огромное число микроорганизмов. Заращение поверхности зооидов, особенно их чувствительных частей, таких как оперкулюм, может привести к ухудшению газообмена и нарушению функционирования зооида (Pukall et al., 2001). Многие виды мшанок способны сохранять свою поверхность свободной от эпибионтов, что может обеспечиваться несколькими защитными механизмами: механической очисткой, при

помощи специализированных непитающихся зооидов колонии, а также при помощи химической защиты (Pukall et al., 2001). Последний зачастую связывают с деятельностью симбиотических бактерий, синтезирующих метаболиты с антимикробной активностью (Kittelman, Harder 2005). У некоторых видов мшанок поверхность зооидов полностью свободна от эпибионтов, что было показано при помощи методов сканирующей микроскопии. Примечательно, что в колониях данных видов отсутствуют гетерозооиды, которые были бы способны очищать поверхность, что может косвенно указывать на химическую природу защиты (Kittelman, Harder, 2005). По-видимому, способность противостоять обрастанию выражена в разной степени у разных видов мшанок. У вида *Flustra foliacea* и *Pentapora fascialis* поверхность зооидов покрыта микроорганизмами неоднородно. В дистальной области, где располагается отверстие зооида и прикрывающий его оперкулюм, обнаружены единичные микроорганизмы на поверхности, в то время как на проксимальной части поверхности зооида отчетливо выражен слой микроорганизмов (Pukall et al., 2001; Sharp et al., 2008). Также существуют виды мшанок (*Conopeum rectum*), поверхность которых густо заселена микроорганизмами (Kittelman, Harder, 2005). Бактерии в таких микрообрастаниях конкурируют друг с другом за счет выделения метаболитов с антимикробными свойствами, что было показано при исследовании бактериальных изолятов из мшанки *Membranipora membranacea*, половина из которых обладала антимикробными свойствами, в основном против грам положительных бактерий (Heindl et al., 2012).

Некоторые бактерии, заселяющие поверхность мшанок, смогли перейти к существованию внутри зооидов колоний, т.е. к эндосимбиозу. Обнаруженные симбиотические бактерии могут быть как внутри-, так и внеклеточными. Внутриклеточные симбионты были описаны только у одного вида мшанок – *Palmicellaria skenei* (Lutaud, 1986). Эти симбионты присутствуют в стенке пищевода во всех функционирующих полипидах в большинстве колоний. Бактерии заселяют клетки эпителия дистального отдела пищевода, который не принимает участия во всасывании питательных веществ и, соответственно, участие симбионтов в процессах пищеварения мало вероятно, и роль их в колонии остается неизвестной.

Примеров внеклеточных бактериальных симбионтов гораздо больше. При этом бактерии встречаются в разных типах зооидов: питающихся аутозооидах и в выполняющих защитную функцию авикуляриях (Lutaud, 1964).

Локализация симбионтов внутри зооида различается в разных группах хейлостомных мшанок. Так, у некоторых видов из группы *Ascophora* бактерии найдены в вестибулярных железах, расположенных вблизи отверстия зооида (Lutaud, 1965). Несколько видов из группы *Anasca* содержат бактерий в фуникулярных тяжах (Woollacott, Zimmer, 1975) – мезотелиальных шнурах с лакунами, выполняющих транспортную функцию внутри и между зооидами, и являющихся, таким образом, аналогом кровеносной системы у мшанок (Carle, Ruppert, 1983) и фуникулярных телах (Lutaud, 1969; Dyrinda, King 1982; Zimmer, Woollacott, 1983) – расширениях фуникулярных тяжей.

Бактериальные симбионты были обнаружены не только во взрослых колониях мшанок, но также и в специальных углублениях на поверхности личинок некоторых видов (Woollacott 1981; Zimmer, Woollacott, 1983; Boyle et al., 1987; Anderson, Haygood, 2007).

Наличие симбиотических бактерий на личиночной стадии является одним из признаков вертикального переноса симбионтов. С помощью методов флуоресцентной гибридизации *in situ* было показано наличие симбионтов на всех стадиях жизненного цикла *Bugula neretina* (Sharp et al., 2007). Первоначально симбионты были найдены в просветах фуникулярных тяжей, ведущих к оциальному пузырьку – выпячиванию стенки тела, закрывающему вход в выводковую камеру (Woollacott, Zimmer, 1975). В этом месте бактерии, чтобы оказаться в личинке, должны покинуть лакуны фуникулярного тяжа и проникнуть в гипертрофированные эпителиальные клетки стенки зооида, которые участвуют в снабжении эмбриона питательными веществами (Moosbrugger et al., 2012). Пройдя через эпителиальные клетки и через кутикулу, симбионты оказываются в полости выводковой камеры (Sharp et al., 2007). После пересечения оболочки оплодотворения бактерии заселяют углубление (синус) на аборальном полюсе личинки (Woollacott, 1981). После прикрепления личинки к субстрату начинается процесс метаморфоза, в ходе которого эпителий синуса вместе с бактериями вытягивается из углубления и мигрирует в направлении орального полюса. В результате изменений конфигурации личинки эпителий с бактериями сжимается вокруг апикального органа и погружается внутрь развивающейся особи. В питающейся анцеструле с развитым лофофором симбионты были найдены в почке, из которой в последующем сформируется следующий зооид колонии. Передача бактерий в ходе почкования зооидов, вероятнее всего, происходит при помощи фуникулярных тяжей (Sharp et al., 2007).

Несколько иной механизм передачи предполагается для бактериальных симбионтов *Watersipora* (Zimmer, Woollacott, 1983). Во взрослых колониях симбионты находятся в

скоплениях (patches), что соответствует фуникулярным телам – расширениям фуникулярных тяжей по Люто (Lutaud, 1969). Бактерии не были найдены в поздних эмбрионах, у которых уже полностью сформировано углубление на поверхности, хотя наблюдается, что симбионты концентрируются в крупных фуникулярных телах у выводковых камер. В течение нескольких минут после выхода из оболочки, личинка остается связанной с материнским зооидом тяжами слизи. Тяжи выходят из отверстия зооида, через которое выворачивается полипид, к оральному полюсу личинки. Авторы предполагают, что заселение личинки бактериями вероятно, происходит именно в это время (Zimmer, Woollacott, 1983).

Также не исключается возможность горизонтального переноса симбионтов, поскольку по последним данным было выявлено присутствие симбиотических бактерий “*Ca. Endobugula sertula*” мшанки *Bugula neretina* в пробах морской воды (Hai Li et al., 2018).

Систематическое положение бактериальных симбионтов было определено для нескольких видов мшанок. У исследованных видов симбиотические бактерии относятся к филе Proteobacteria, представители которой часто вступают в симбиотические отношения (Kerstens et al., 2006). Симбионты *Bugula neretina* и *Bugula simplex* (*Candidatus Endobugula sertula* и *Candidatus Endobugula glebosa* соответственно) относятся к Gammaproteobacteria (Haygood, Davidson, 1997; Lim, Haygood, 2004), в то время как симбиотические бактерии двух видов *Watersipora* (*W. subtorquata* и *W. arcuata*) – к Alphaproteobacteria (*Candidatus Endowatersipora palomitas* и *Candidatus Endowatersipora rubus* соответственно) (Anderson, Haygood, 2007).

Значение бактерий в жизни хозяина во многом определяется свойствами вторичных метаболитов, выделяемых симбионтами. Наиболее хорошо изученными вторичными метаболитами являются бриостатины – циклические макролиды с антилейкемическим действием (Pettit et al., 1982). Всего был выделен 21 природный вариант бриостатинов (Yu, 2015). Известно, что бриостатины не оказывают влияния на процессы метаморфоза и оседания личинки, но способны обеспечивать химическую защиту личинок от поедания мальками рыб (Loranik et al., 2004a-b). Синтез бриостатина осуществляется и во взрослых колониях. Существует, по крайней мере, три криптических вида *B. neretina*, два из которых обладают различными, но филогенетически близкими симбионтами и имеют разный набор бриостатинов (Davidson, Haygood, 1999; Methew et al., 2017). Функция бриостатина во взрослых колониях не связана с защитой от хищников (Loranik et al., 2004a), и, вероятнее всего, сопряжена с предотвращением обрастания мшанок другими организмами (Sharp et al., 2007). В экспериментах также показано, что колонии *B. neretina*,



выращенные из личинок, обработанных антибиотиком (и, таким образом, лишенных бактерий) продуцируют значительно меньше личинок. По-видимому, снижение плодовитости колоний, лишенных симбионтов, связано с отсутствием синтезируемых ими бриостатинов. Было показано, что эти соединения являются модуляторами протеин киназы-C (Methew et al., 2016) – сигнального белка, вовлеченного в множество клеточных процессов, в том числе в инициацию созревания ооцитов во время оогенеза (Kalive et al., 2010). Позже выяснилось, что различия в оогенезе между колониями, лишенными симбиотических бактерий, и колониями с симбионтами отсутствуют. Эти данные указывают на то, что симбионты не оказывают влияния на строение и функционирование ovaries, но потенциально влияют на раннюю дифференцировку женских половых клеток (Methew et al.2017).

## **Материалы и методы.**

Колонии бореально-арктической хейлостомной мшанки *Aquiloniella scabra* (van Beneden, 1848) (Candidae) были собраны с глубины 5-10 метров при помощи водолазной техники вблизи острова Матренин (губа Чупа, Кандалакшский залив, Белое море) в районе УНБ Беломорская Санкт-Петербургского государственного университета.

### **1. Методы световой и электронной микроскопии.**

Колонии мшанок были зафиксированы в 2,5% глутаральдегиде на 0,1М кокадилатном буфере (pH 7,3). Постфиксация проводилась 1% -ным раствором тетроксид осмия (OsO<sub>4</sub>). Затем проводилась двукратная отмывка в кокадилатном буфере по 20 минут. Декальцинацию проводили в 5% -ном водном растворе ЭДТА в течение 6 часов. После трех стадий 20-минутной промывки кокадилатным буфером участки колоний с аутозооидами дегидратировали в градуированной серии этанола (30-50-70-80-90-96-100%) по 15 минут в каждом растворе, с последующей дегидротацией в растворе 100% этанола :ацетон (1:1) в течение 10 минут, в ацетоне 3 раза по 20 минут, в смесях ацетон:смола (3:1, 1:1 по 30 минут, 1:3 на ночь). Затем фрагменты колоний погружались в смолу (Spurr) на 2-3 часа, после чего переносились в лунки заливочной формы, заполненные смолой. Полимеризация эпоксиблоков проводилась в термостате (60°) в течение суток.

Изучению тонких срезов на ТЕМ предшествовала световая микроскопия полутонких срезов толщиной 1,0 мкм. Часть полутонких срезов была окрашена по Ричардсону, другая часть – тройной окраской по Хамфей-Питтману (Richardson et al, 1960; Humphey and Pittman, 1974). Окрашенные полутонкие срезы анализировали с использованием светового микроскопа Zeiss Axio Imager.A1. Ультратонкие срезы переносились на медные бленды с подложкой из формвара и контрастировались уранилацетатом (20 минут) и цитратом свинца (4 минуты). Отконтрастированные срезы исследовали с помощью электронных микроскопов Jeol JEM-1400 и Jeol JEM-2100.

Изготовление полутонких и ультратонких срезов, а также использование электронных микроскопов производились на базе ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

## 2. Молекулярные методы для определения систематического статуса бактериальных симбионтов.

Личинки *Aquiloniella scabra* были зафиксированы в 96% молекулярном спирте. Перед фиксацией личинки отмывались в двух сменах стерильной морской воды. Экстракции ДНК предшествовала дополнительная отмывка в трех сменах чистого 96% спирта. Для экстракции ДНК использовался набор реактивов «Arcturus PicoPure DNA Extraction Kit». ПЦР проводили при помощи набора компании Евроген «Encyclo Plus PCR kit» по рекомендованному производителем протоколу. Программа амплификатора:

- 1) начальная денатурация 95° (5мин)
- 2) 30 циклов: денатурация 95° 30 сек, отжиг праймеров: 16 циклов с понижением от 62° до 55° и 14 циклов на 55° (по 30 сек), элонгация 72° (40 сек)
- 3) Финальная элонгация 72° (3 мин)

Для амплификации использовались пары праймеров, специфичных для 16S рДНК бактерий: 515F – 1391R, 27F – 519R, 642F и 1445R.

27F 5' GAGTTTGATCNTGGCTCAG 3'

519R 5' GTNТTACNGCGGCKGCTG 3'

515F 5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3'

1391R 5' GACGGGCGGTGTGTRCA 3'

642F 5' AAATHYGTGCCAGCAGC 3'

1445R 5' GTCRTCCYDCCTCCTC 3'

Секвенирование осуществляли на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ при участии Алексея Машарского.

Полученные в результате секвенирования последовательности 16S рДНК использовались для сопоставления с базами данных приложения Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Применялся алгоритм анализа megablast для выявления последовательностей с наибольшей степенью гомологии в общей базе данных нуклеотидных последовательностей (“nucleotide collection (nr/nt”).

## Результаты.

### 1. Расположение и размерные характеристики фуникулярных тел в зооидах *Aquiloniella scabra*.

Колонии мшанки *Aquiloniella scabra* имеют вид прямостоячих разветвленных веточек (рис.1). Большая часть колонии состоит из питающихся зооидов (аутозооидов), рядом с которыми располагаются гетерозооиды, выполняющие защитные функции – авикулярии и виброкулярии. Питающиеся зооиды состоят из цистида – обызвествленной стенки тела, выстланной эпителием, которые окружают полость зооида с фуникулярными тяжами, и полипида – подвижной части зооида, включающей петлевидный кишечник, венчик щупалец (лофофор) и ассоциированную с ними мускулатуру. В полости всех исследованных аутозооидов с сформированным лофофором содержатся бактерии, находящиеся в фуникулярных телах (ФТ) (рис.2). ФТ встречаются в разных участках зооида: под фронтальной стенкой (рис.3), на которой находится отверстие для выворачивания полипида, под кишечником у обращенной к субстрату базальной стенки (рис.4), либо на некотором удалении от стенки в пространстве полости зооида. В целом, можно сказать, что расположение ФТ чаще приурочено к дистальной части зооида, которая находится ближе к границе с более молодым зооидом колонии. В гетерозооидах *Aquiloniella scabra* фуникулярные тела с бактериями нами обнаружены не были.

Транспорт метаболитов внутри и между зооидами колонии может осуществляться с помощью фуникулярной системы – совокупности фуникулярных тяжей, образующих сеть в полости зооидов и подходящих к коммуникационным порам между соседними зооидами. Расширения таких тяжей, содержащих бактерии, называются фуникулярными телами.

В зооидах обычно присутствует несколько ФТ. В некоторых случаях ФТ могут занимать до трети объема полости зооида (рис.5). Их минимальный размер составляет  $5,6 \times 4,2$  мкм, тогда как самые крупные достигают  $31,6 \times 3,0$  мкм.

ФТ были найдены как во взрослых питающихся зооидах, так и в молодых зооидах с формирующимся полипидом. В молодых зооидах было обнаружено наибольшее число тел с бактериями – 9 ФТ в плоскости среза. Однако они часто были меньше по размеру, чем большинство ФТ в питающихся зооидах. Расположение ФТ в молодом зооиде было приурочено к латеральным стенкам дистальной части зооида (рис.6). Количество бактерий

в телах коррелирует с их размером. Число бактериальных клеток в небольших телах не превышает полутора десятков, тогда как в крупных телах их число не меньше нескольких десятков (на плоскости среза). Маленькие тела, содержащие небольшое число бактерий, предположительно, соответствуют начальной стадии развития.



Рисунок 1. Верхушка колонии *Aqiloniella scabra*.  
Шкала 500 мкм (Фото О.Н. Котенко)

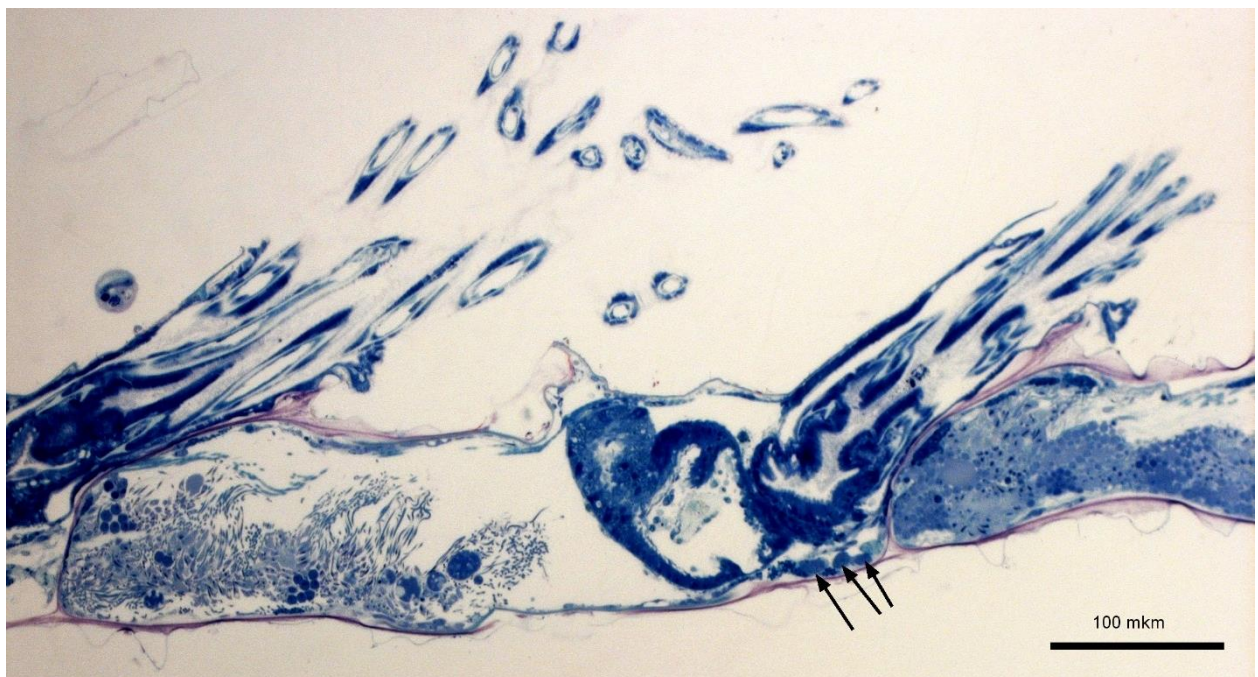


Рисунок 2. Фуникулярные тела (стрелки) в полости аутозооида *A. scabra* (продольный срез). Шкала 100 мкм



Рисунок 3. Фуникулярное тело (стрелка) под фронтальной мембраной в зооиде *A. scabra* (продольный срез). Шкала 20 мкм

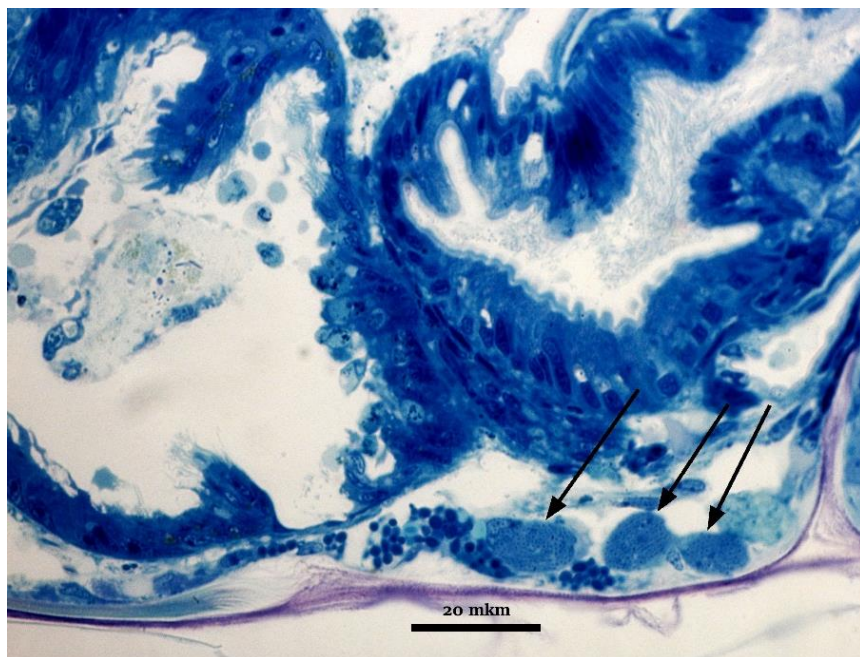
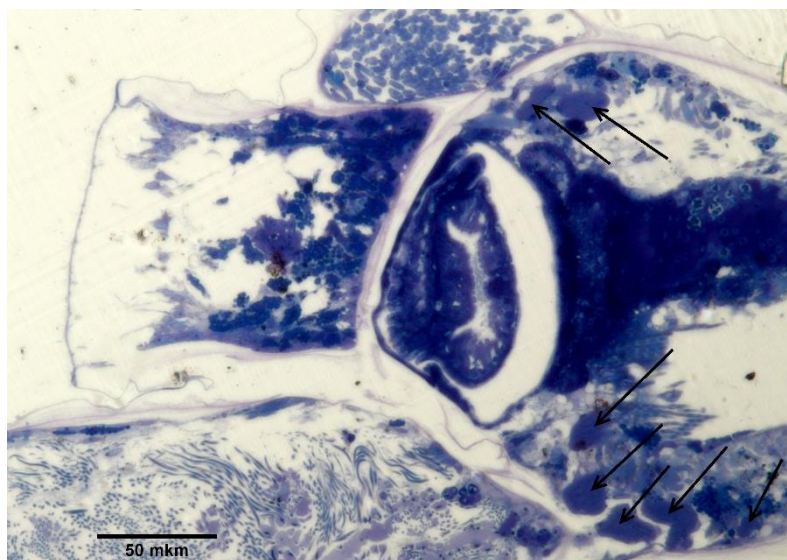


Рисунок 4. Фуникулярные тела (стрелками) у базальной стенки зооида *A. scabra* (продольный срез). Шкала 20 мкм



*Рисунок 5. Крупные фуникулярные тела (стрелками) в полости зооида A. scabra (продольный срез). Шкала 20 мкм*



*Рисунок 6. Фуникулярные тела (стрелками) у латеральных стенок зооида A. scabra с формирующимся полипидом (фронтальный срез). Шкала 50 мкм*

## 2. Ультраструктура фуникулярных тел.

Каждое зрелое фуникулярное тело представляет собой совокупность бактерий и окружающих их клеток (рис. 7). В большинстве исследованных ФТ бактериальные клетки плотно уложены, располагаясь параллельно друг другу вдоль длинной оси (рис. 8). В небольших ФТ симбионты располагаются менее упорядоченно и на большем расстоянии друг от друга (рис. 9).

Бактерии окружены клеткой, края которой смыкаются, образуя плотные контакты (рис.10). Ее, в свою очередь, покрывают плоские клетки с электронно-светлой цитоплазмой, продолжающиеся в фуникулярные тяжи (рис.11).

Клетка, которая непосредственно прилегает к бактериям, имеет электронно-плотную цитоплазму, содержащую активно функционирующее ядро, митохондрии, аппарат Гольджи, мультивезикулярные тела, многочисленные свободные рибосомы и хорошо развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум (рис.12). Эта клетка образует многочисленные цитоплазматические выросты. Размер и форма выростов варьируют, но их диаметр не превышает 300 нм. Они входят в пространства между бактериальными клетками, доходя до центральной части ФТ. На некоторых срезах видно, что цитоплазматические выросты могут разветвляться в промежутках между бактериями (рис.13). В небольших по размеру телах единичные бактерии окружены частями клетки хозяина с большим объемом цитоплазмы. Узкие цитоплазматические выросты в таких ФТ не обнаружены (рис.14).

Аутозооиды *Aquiloniella scabra*, как и у многих других видов мшанок, со временем претерпевают процесс дегенерации полипида, в ходе которого из разрушающихся клеток образуется так называемое «бурое тело». Из клеток стенки тела цистида со временем может формироваться новый полипид. ФТ с бактериями сохраняются в течение этих процессов дегенерации и регенерации полипида и имеют строение, сходное с таковым активно питающихся зооидов.

Несколько иное строение наблюдается у ФТ, обнаруженных в зооиде с формирующимся полипидом. В этом зооиде все ФТ расположены на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 15). Соседние ФТ могут прилегать вплотную друг к другу, при этом мембраны окружающих бактерий клеток двух соседних тел, образуют межклеточные контакты (рис. 16). На границе этих ФТ нет клеток с электронно-светлой цитоплазмой, которые обычно



покрывают клетки, окружающие бактерий. Возможно, такое строение указывает на незавершенность процесса формирования этих тел, которые в последующем за счет образования внешнего электронно-светлого слоя клеток потеряют контакт друг с другом.

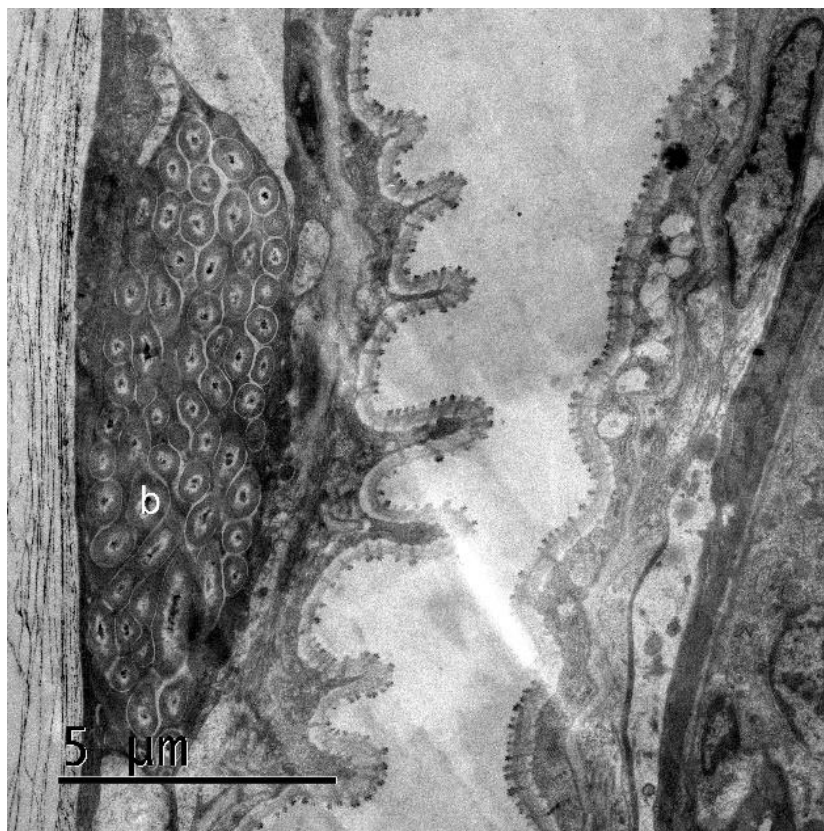


Рисунок 7. фуникулярное тело *A. scabra* с бактериями (*b* – бактерии); шкала 5 мкм

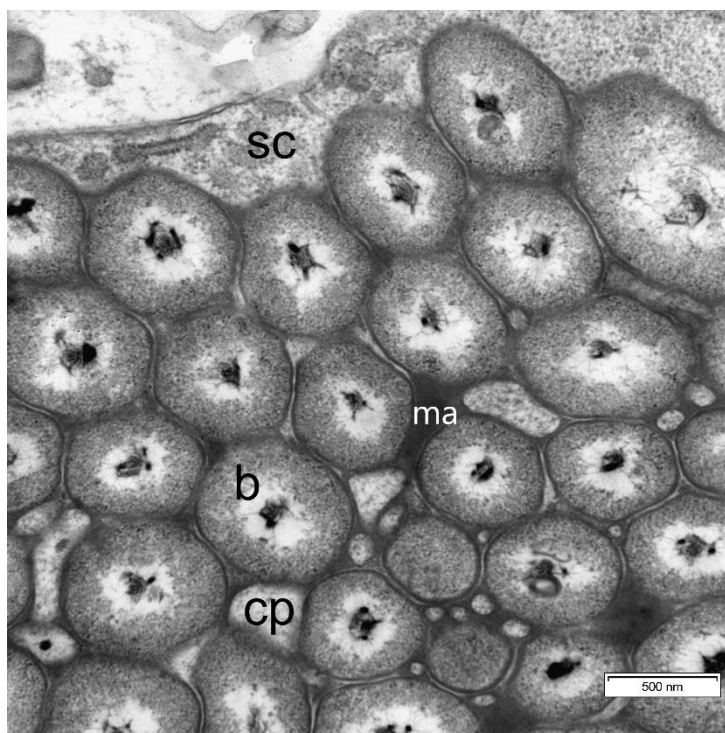


Рисунок 8. Участок фуникулярного тела *A. scabra* с параллельно расположенными бактериальными клетками (*b* – бактерии, *cp* – цитоплазматические выросты, *sc* – клетка, окружающая бактерии, *ma* – матрикс в пространствах между бактериями) Шкала 500 нм



Рисунок 9. Участок небольшого фуникулярного тела *A. scabra* с неправильным расположением бактерий (*b* – бактерии, *sc* – клетка, окружающая бактерии, *ec* – внешняя клетка) Шкала 1 мкм

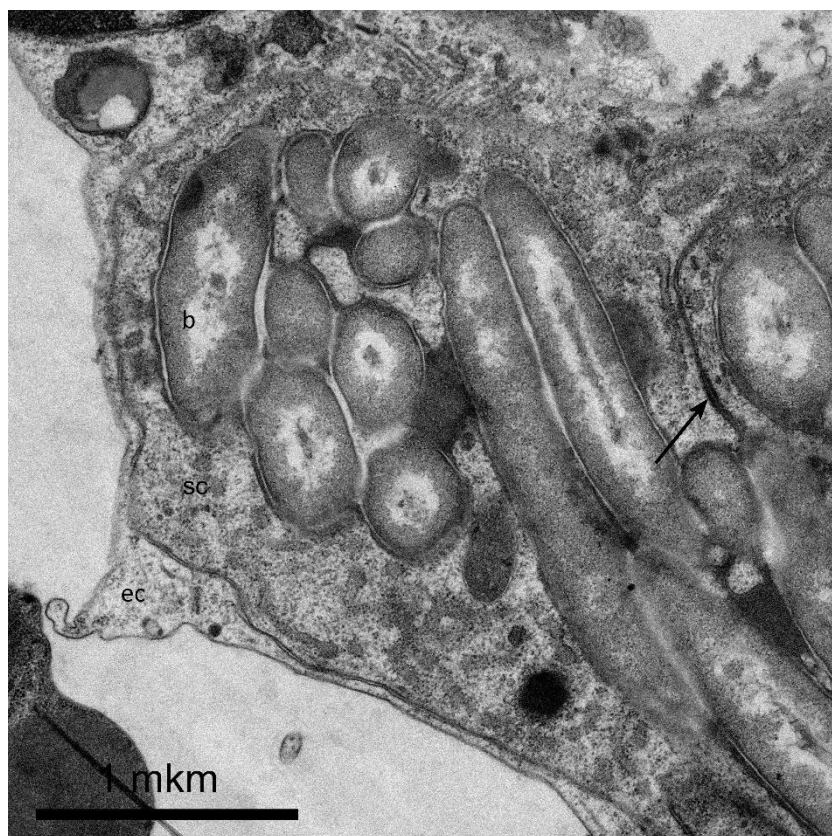


Рисунок 10. Участок фуникулярного тела *A. scabra* с плотным контактом (*sc* – клетка, прилегающая к бактериям, *ec* – внешние клетки, *b* – бактерии, стрелка – клеточный контакт) Шкала 1 мкм

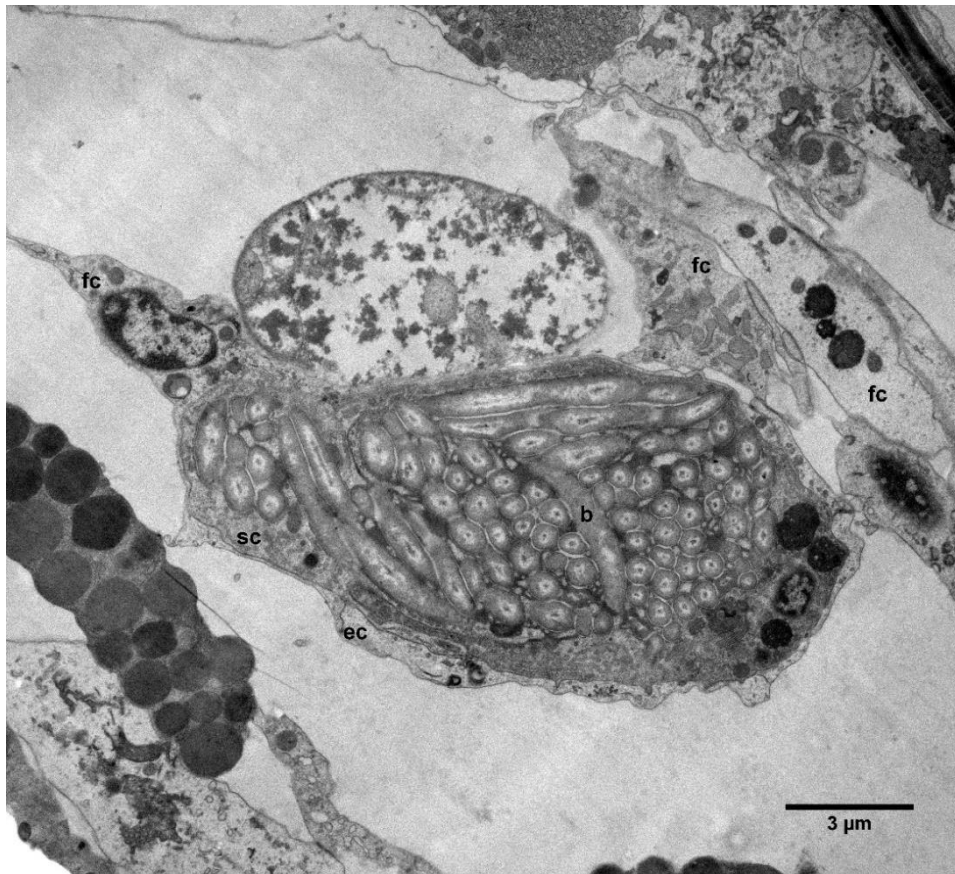


Рисунок 11. Фуникулярное тело в полости зооида *A. scabra* (*sc* – клетка, прилегающая к бактериям, *ec* – внешние клетки, *b* – бактерии, *fc* – клетки фуникулярного тяжа). Шкала 3 мкм

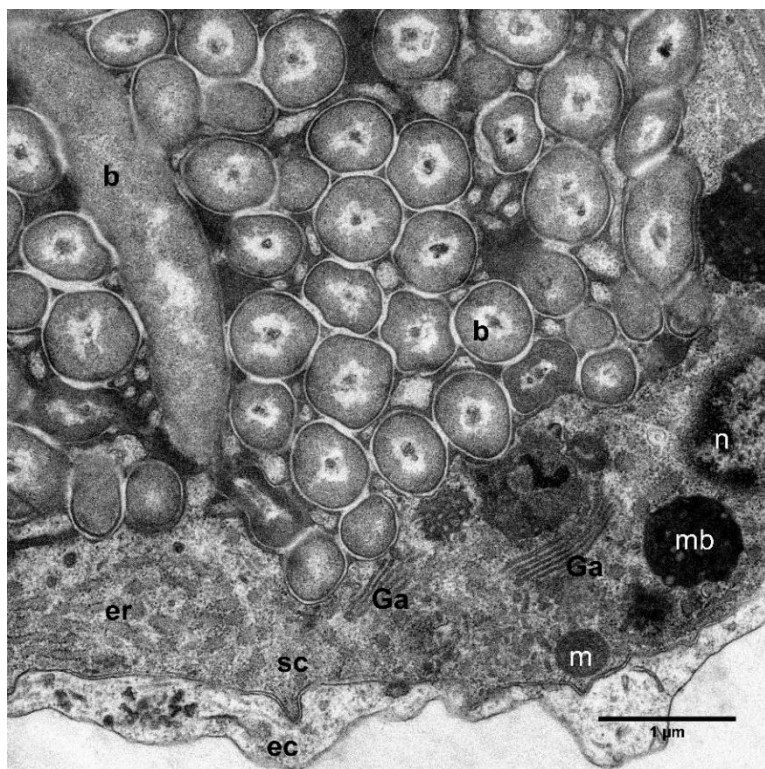


Рисунок 12. Участок фуникулярного тела *A. scabra* (*sc* – клетка, прилегающая к бактериям, *ec* – внешние клетки, *b* – бактерии, *er* – эндоплазматический ретикулум, *Ga* – аппарат Гольджи, *m* – митохондрии, *n* – ядро, *mb* – мультивезикулярное тело). Шкала 1 мкм

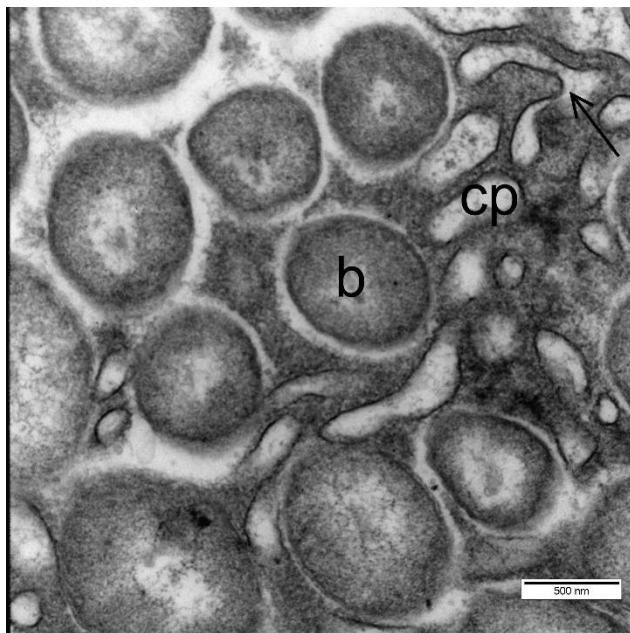


Рисунок 13. Участок фуникулярного тела *A. scabra* с цитоплазматическими выростами (*b* – бактерии, *cp* – цитоплазматические выросты, стрелка – ветвящийся цитоплазматический вырост). Шкала 500 нм

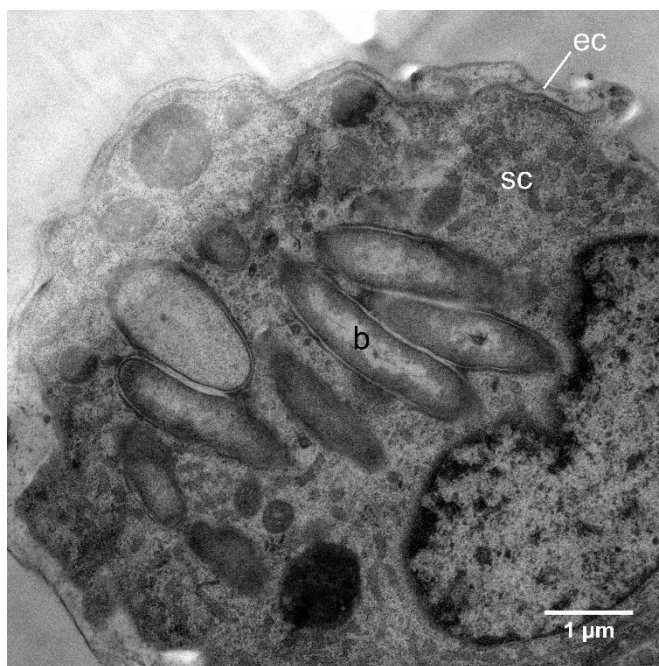


Рисунок 14. Небольшое фуникулярное тело *A. scabra* (*sc* – клетка, прилегающая к бактериям, *ec* – внешние клетки, *b* – бактерии). Шкала 1 мкм

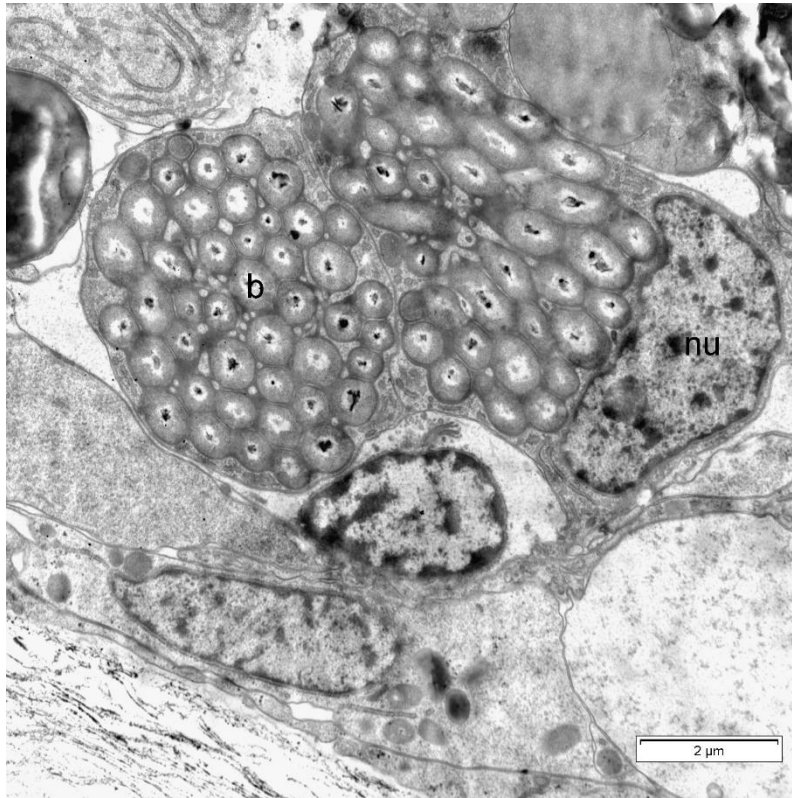


Рисунок 15. Два близких фуникулярных тела *A. scabra* (*b* – бактерии, *nu* – ядро клетки, примыкающей к бактериям одного из тел). Шкала 2 мкм

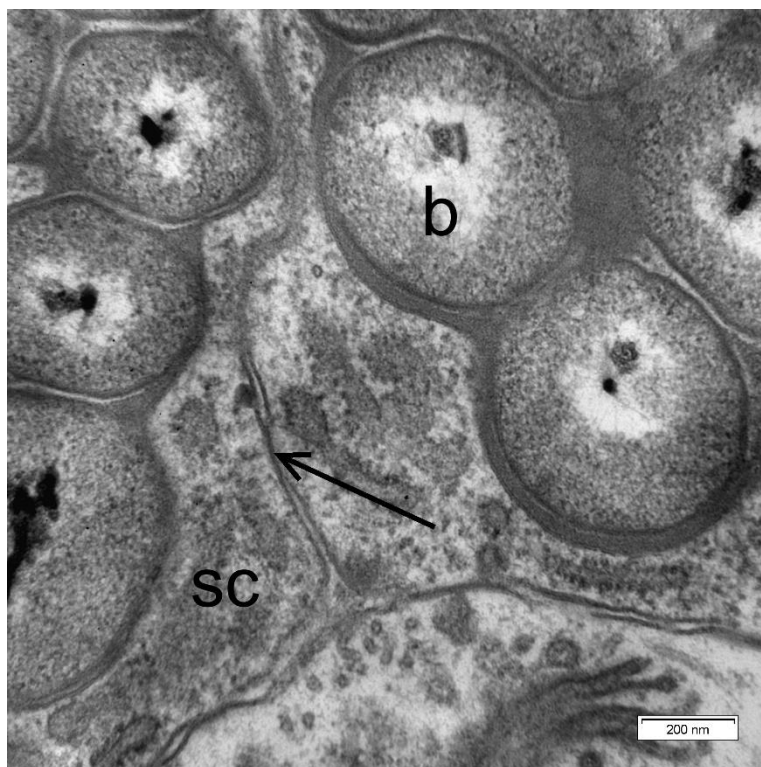


Рисунок 16. Щелевидный контакт между клетками двух соседних фуникулярных тел *A. scabra* (*sc* – клетка, прилегающая к бактериям одного из фуникулярных тел, *b* – бактерии, стрелка – межклеточный контакт). Шкала 200 нм

### 3. Тонкое строение бактериальных симбионтов

Бактериальные клетки округлые в поперечном сечении, имеют вытянутую форму. Их размер составляет 0,5 - 0,7 мкм в диаметре и до 8,5 мкм в длину. Центральная часть бактерий занята нуклеоидом, который на фотографиях виден как сеть местами утолщающихся электронно-плотных тяжей на фоне электронно-прозрачной цитоплазмы. Электронно-плотная периферическая цитоплазма содержит большое количество рибосом. Внутренняя плазматическая мембрана хорошо различима (рис. 17). У некоторых бактерий хорошо видна внешняя мембрана, что позволяет говорить о принадлежности симбионтов к грамотрицательным бактериям (рис. 18). Широкая электронно-прозрачная зона, соответствующая периплазматическому пространству, окружает клетку и часто сливается с подобной зоной соседних близко расположенных бактерий, когда внешняя мембрана разрушается. В пределах этой зоны встречаются фрагменты мембраны, которые, возможно, являются остатками наружной мембраной клеток (рис. 19). Пространство между бактериями занято электронно-плотным матриксом, выделяемым клеткой, окружающей бактерий, или самими бактериями (Рис. 8). В матриксе видны трубчатые структуры, похожие на фимбрии бактерий или жгутики (рис. 20).

Исследование бактериальных симбионтов при помощи электронной микроскопии проводилось не только на взрослых колониях, но также и на небольшом количестве личинок *A. scabra*, однако эти исследования не дали положительных результатов. Предположительно, данные личинки оказались абортивными, в следствие чего не были заселены бактериальными симбионтами.

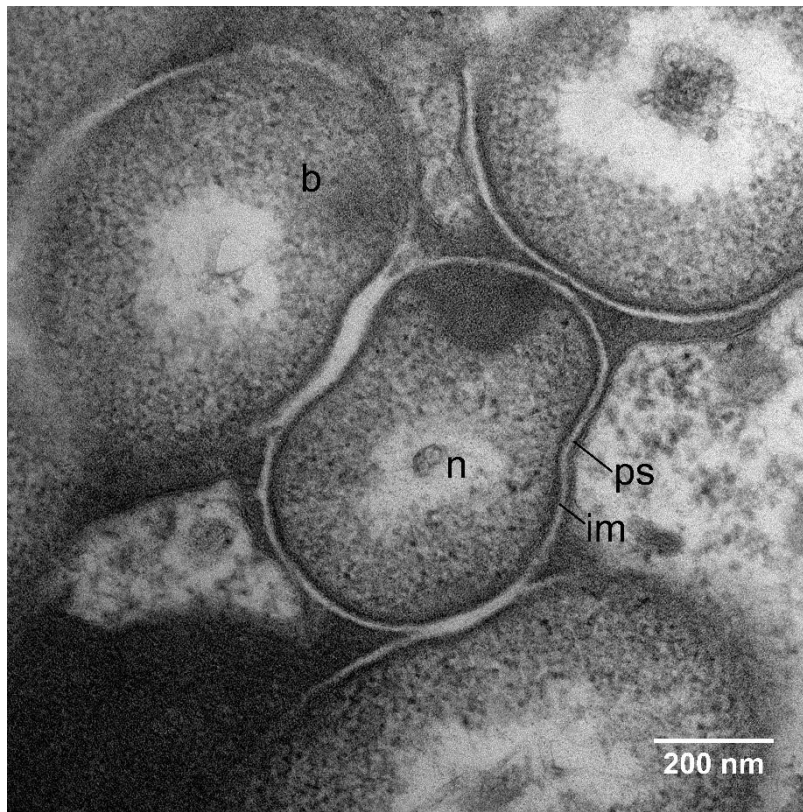


Рисунок 17. Бактериальные симбионты *A. scabra* (*b* – бактерии, *n* – зона нуклеоида, *im* – внутренняя плазматическая мембрана, *ps* – периплазматическое пространство) Шкала 200 нм

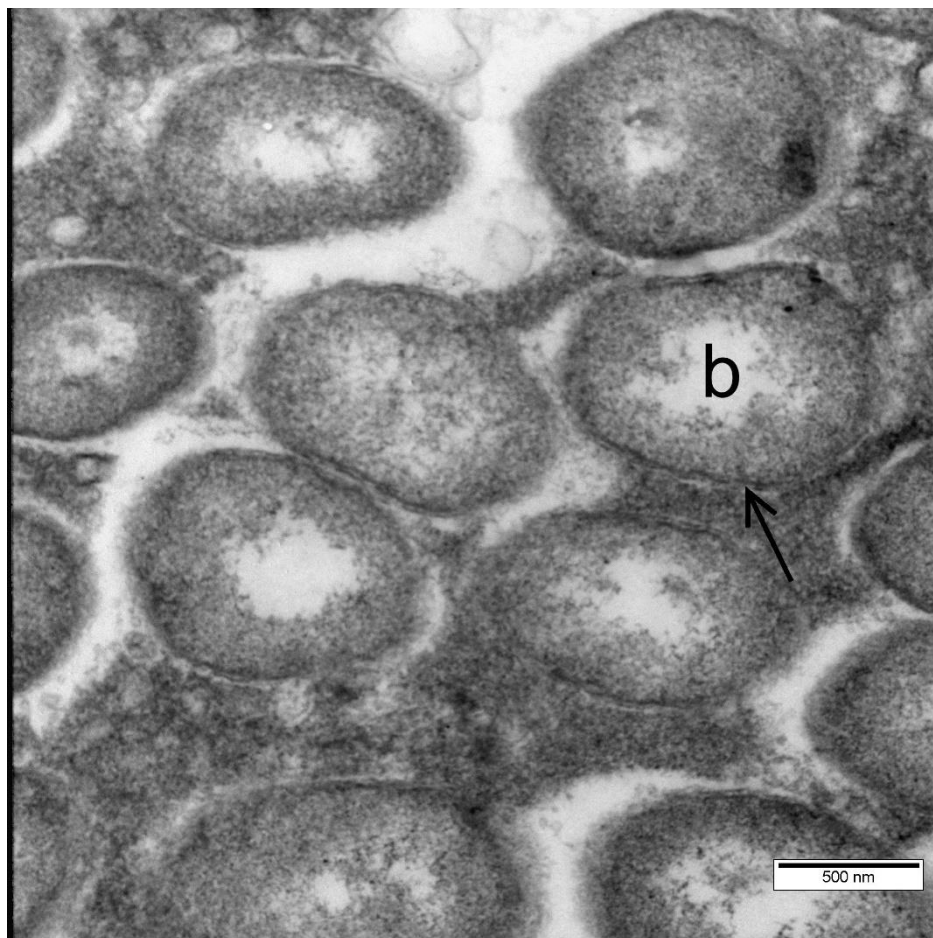


Рисунок 18. Бактериальные симбионты *A. scabra* (*b* – бактерии, стрелка – внешняя плазматическая мембрана) Шкала 500 нм

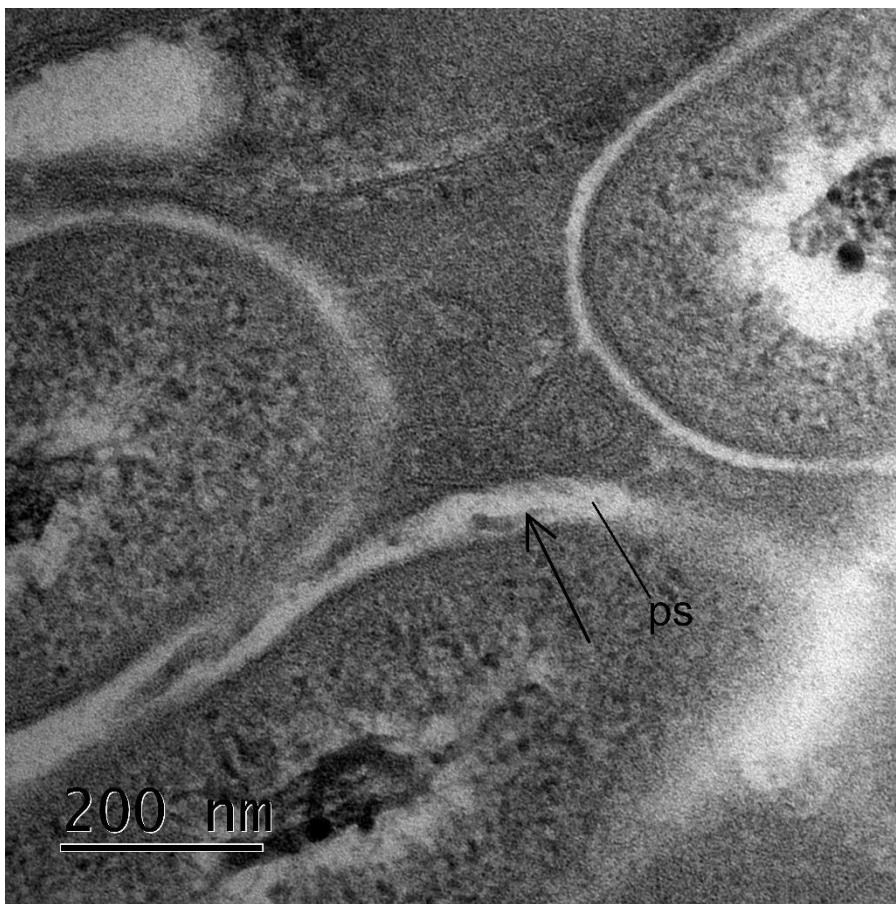


Рисунок 19. Периплазматическое пространство симбиотических бактерий *A. scabra* с фрагментами внешней мембраны (ps – периплазматическое пространство,, стрелка – фрагменты внешней плазматической мембраны)  
Шкала 200 нм

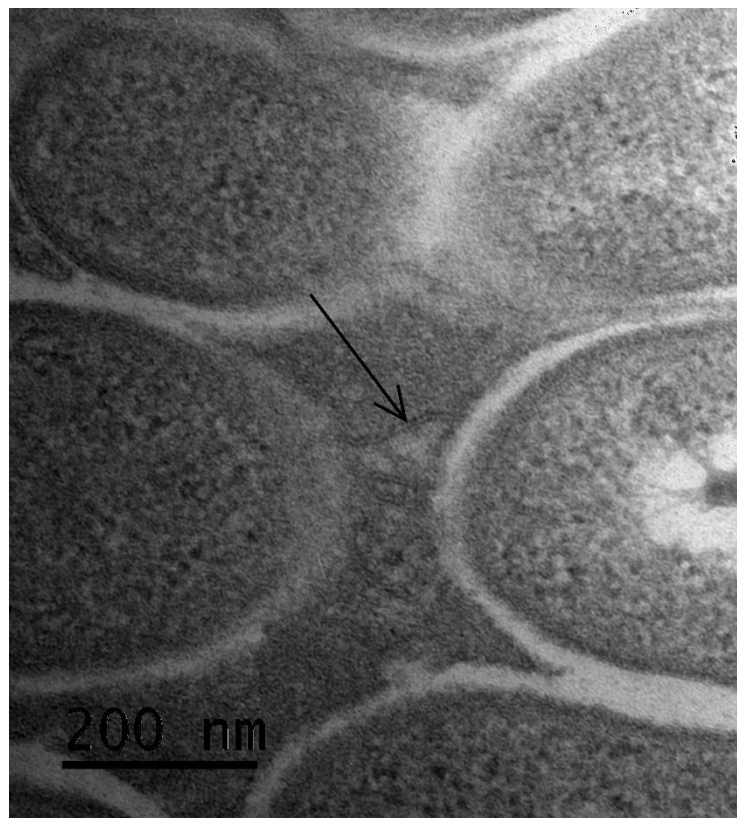


Рисунок 20. Пространство между симбиотическими бактериями *A. scabra* (стрелка – фимбрии или жгутики) Шкала 200 нм



#### 4. Систематический статус симбионтов

Для определения систематического положения бактериальных симбионтов мшанок молекулярными методами, удобнее всего использовать их личинок, которые содержат большие скопления симбиотических бактерий в палиальном синусе (углублении на поверхности личинки), тогда как контаминация другими бактериями практически отсутствует. Использование зооидов с ФТ для экстракции бактериальной ДНК симбионтов приводит к значительной контаминации посторонними бактериями, располагающимися на поверхности зооидов и в их кишечнике. В нашей работе значительная часть собранных личинок *A. scabra* была использована для определения систематического положения симбионтов.

Используя три пары универсальных 16S рРНК бактериальных праймеров для ПЦР на основе ДНК, выделенной из личинок, мы получили три последовательности длиной 610, 895, 670 ти оснований. Результаты анализа с использованием megablast показали, что для пары праймеров 27F – 519R наибольшую степень гомологии по отношению к последовательностям бактериального симбионта *A.scabra* имеют несколько последовательностей некультивируемых бактерий (98,58%), а также последовательность *Psychrobacter sanguinis* strain K11A2 (98,57%) Последовательность нуклеотидов, полученная для пары праймеров 515F – 1391R показала наибольший процент гомологии в отношении нескольких последовательностей некультивируемых бактерий (81,19%), а также четырех линий *Psychrobacter sanguinis* (80,93%). Высокая степень гомологии (91,14%) также наблюдалась в отношении линий *Psychrobacter* к анализируемой последовательности, полученной при амплификации с парой праймеров 642F и 1445R.

Род *Psychrobacter* относится к филе Proteobacteria, классу Gammaproteobacteria. Протеобактерии являются Грам отрицательными бактериями, что соответствует данным, полученным с помощью электронного микроскопа. Многие представители этой филы являются симбиотическими организмами, хотя по различным данным, полученным для рода *Psychrobacter*, эти бактерии чаще встречаются, как свободно живущие формы в различных океанах.

## Обсуждение.

Устойчивые симбиотические ассоциации, возникнув на определенной стадии развития хозяина, обычно сохраняются на протяжении всей его жизни. Длительность существования отдельных зооидов в колониях мшанок зависит от способности полипидов регенерировать. У большинства видов мшанок в зооидах наблюдаются сменяющие друг друга процессы дегенерации и регенерации полипидов, следствием чего является увеличение жизни зооида по отношению к полипиду.

В связи с этим важным вопросом является то, как долго существуют ФТ с симбионтами в колонии *Aquiloniella scabra* и что с ними происходит во время процессов рециклизации полипида. В нашей работе симбиотические бактерии мшанки *A. scabra* были обнаружены в зооидах с формирующимся полипидом, в зооидах с активно функционирующим полипидом, а также в зооидах с остаточными (бурыми) телами, где произошла регенерация. Это отражает способность бактерий существовать в зооидах, которые могут не обладать сформированным пищедобывающим аппаратом и, соответственно, получают необходимые питательные вещества для развития нового полипида от других питающихся зооидов колонии через фуникулярную систему. Аналогичная ситуация характерна *Bugula turbinata*, у которой зооиды во время последовательных стадий регенерации и дегенерации полипида сохраняют ФТ с симбионтами (Lutaud, 1969).

Однако есть другие варианты, в которых процессы дегенерации и последующей регенерации затрагивают не только полипид, но и ФТ. Так дегенерация полипида у мшанок *Bicellariella ciliata* сопровождается также разрушением ФТ. Данное явление может быть связано с непродолжительной жизнью аутозооидов этого вида, поскольку полипиды после разрушения обычно не регенерируют, и аутозооид утрачивает свою исходную функцию (Lutaud, 1969). Можно сказать, что продолжительность существования ФТ скорее зависит от времени жизни зооида, в котором оно расположено, а не полипида. У другого вида (*Caberea ellisii*) ФТ разрушаются и формируются заново в пределах одного зооида, однако эти процессы не связаны с циклом развития полипида (Lutaud, 1969). Возможно, что у *A. scabra* ФТ с бактериями тоже могут иметь собственный цикл разрушения и формирования *de novo* несмотря на то, что в нашем исследовании мы достоверно не обнаружили эти разрушающиеся структуры в аутозооидах.

Взаимное влияние организмов в симбиотической системе может затрагивать различные функциональные аспекты. Во многих случаях симбионты участвуют в обеспечении своих

хозяев продуктами питания, получая взамен убежище и необходимые ресурсы для поддержания своей жизнедеятельности. Дополнительные ресурсы также необходимы для обеспечения процесса размножения симбионта, которое может контролироваться хозяином.

В колониях *Aquiloniella scabra* симбиотические бактерии проявляют признаки полноценно функционирующих организмов, способных в числе прочего размножаться внутри ФТ. Тела с симбионтами обнаружены нами в различных частях активно функционирующей колонии. Они могут различаться по своим размерам и по количеству симбионтов внутри них, но во всех случаях бактерии имеют вид метаболически активных клеток. Мелкие ФТ содержат небольшое число симбионтов, расположение которых неупорядоченно, однако, вследствие увеличения количества бактерий и их упорядочивания, ФТ тоже растут. Клетка, окружающая бактерий, по мере возрастания числа симбионтов изменяет свою форму: она «растягивается» и уплощается. Наблюдаемые различия в размерах и форме ФТ, а также различное соотношение объемов клеток симбионта и хозяина в таких телах характерны и для других видов мшанок (Lutaud, 1969). У исследованных видов, как и у *A. scabra*, наблюдалась пролиферация бактерий вместе с изменением формы клеток хозяина.

Как известно, процесс размножения требует больших энергетических затрат. Необходимые для размножения ресурсы симбионты способны заимствовать у своих хозяев. В симбиотической ассоциации мшанки *A. scabra* с бактериями наблюдаются явные признаки наличия трофической связи между симбионтом и хозяином. Ультраструктурные исследования клеток ФТ выявили ряд особенностей, характерных для синтетически активных клеток: клетка, которая непосредственно примыкает к бактериям, имеет хорошо развитый эндоплазматический ретикулум, а также активно функционирующее ядро. Кроме того, эта клетка образует многочисленные ветвящиеся цитоплазматические выросты, проходящие в пространства между бактериями, тем самым во много раз увеличивая площадь своей поверхности, что способствует усилению процессов секреции или всасывания. Также в пространствах между бактериями виден электронно-плотный матрикс, который может быть как продуктом синтеза бактерий, так и клеток хозяина. Все это однозначно указывает на идущие процессы обмена метаболитами между хозяином и симбионтом.

В симбиотических системах разных организмов можно обнаружить разные варианты морфологических адаптаций, которые могут свидетельствовать о разных возможностях усиления взаимодействия между хозяином и симбионтами. Подобные фуникулярным телам образования не обнаружены в других группах животных, однако признаки

изменения тканей или клеток хозяина под действием симбионтов встречаются повсеместно. У губок так называемые “цианоциты” представляют собой видоизмененные архециты с огромной вакуолью, заполненной симбиотическими цианобактериями (Wilkinson, 1978). Другим возможным примером модифицирующего влияния бактериальных симбионтов на клетки хозяина являются бактериоциты муравьев рода *Camponotus*. В кишечнике муравьев среди эпителиальных клеток гастродермиса встречаются видоизмененные клетки, содержащие бактерий. Приобретая и поддерживая бактерий, эти клетки увеличиваются в размерах и утрачивают микровиллы на апикальной поверхности, характерные для эпителиальных клеток кишечника (Schroder et al, 1996). Среди насекомых известен пример ассоциации с симбиотическими бактериями, сопровождающийся образованием специальных органов, содержащих симбионтов. У тлей таким органом является бактериосома, состоящая из десятков бактериоцитов, в вакуолях которых содержатся бактерии (Baumann, 1995). Другим примером органа, специализированного для поддержания симбиотических бактерий, являются фотофоры головоногого моллюска *Euprymna scolopes* (Sepiolida). Бактериальные симбионты живут в полостях пальцевидных каналах фотофоров. Эпителиальные клетки, выстилающие каналы, образуют многочисленные микровиллы. Примечательно то, что эти клетки, после заселения каналов бактериями, многократно увеличивают количество микроворсинок и сильно увеличиваются в размерах, меняя форму и секретировав в полость с бактериями различные вещества (Visick, McFall-Ngai, 2000).

У мшанок (*Palmicellaria skenei*) (Lutaud, 1986) симбионты находятся во внутренних впячиваниях покровного эпителия в основании вестибулюма, называемых вестибулярными органами. Бактерии, расположенные в полости вестибулярного органа, контактируют с выстилающей внутреннюю стенку эпителием, покрытым кутикулой. Эпителиальные клетки образуют многочисленные микроворсинки, проникающие в слой кутикулы, что, как и в случае *A. scabra*, увеличивает поверхность клеток для интенсификации обменных процессов.

Известно, что симбиотические бактерии, живущие в зооидах мшанок, в период полового размножения способны попадать из фуникулярных тел в личинок, находящихся вне пределов зооида в специальных камерах, овицеллах (Sharp et al., 2007). Вопрос, каким образом осуществляется перемещение бактериальных симбионтов внутри зооида, остается открытым. Подвижность бактериальных клеток может обеспечиваться посредством жгутиков, а также фимбрий, с помощью которых бактериальные клетки могут связываться с субстратом, а затем “подтягиваться” к нему, разбирая фимбриии

(McBride, 2001). Бактериальные симбионты *A. scabra*, по всей видимости, не обладают жгутиками. Однако структуры, похожие на фимбрии, обнаруживались в пространствах между бактериями внутри ФТ. Возможно, с их помощью симбионты перемещаются по лакунам фуникулярных тяжей и в пространстве выводковой камеры, где “ползут” по поверхности личинки и забираются в специальное углубление (паллиальный синус и другие) на поверхности.

Возможен также другой механизм локомоции, который встречается у бактерий из филы Proteobacteria – скользящее движение без использования фимбрий (McBride, 2001). Наши данные, полученные с помощью молекулярных методов, указывают на принадлежность симбиотических бактерий мшанки *A. scabra* к граммотрицательным бактериям из филы Proteobacteria. Результаты ультраструктурных исследований строения симбиотических бактерий не противоречат молекулярным данным, указывая на принадлежность симбионтов к граммотрицательным бактериям. Другие бактериальные симбионты, обнаруженные у мшанок, также описаны с помощью молекулярных методов как Протеобактерии (Haygood, Davidson, 1997; Lim, Haygood, 2004; Anderson, Haygood, 2007), и такой способ перемещения может предполагаться универсальным для этого варианта симбиоза.

Обнаруженный нами бактериальный симбионт *A. scabra* принадлежит к роду *Psychrobacter*. Как уже было сказано в главе Результаты, бактерии из рода *Psychrobacter* широко распространены в морских местообитаниях и приспособлены к росту и размножению при низких температурах (психротолерантны) (Bowman, 2006). Они способны синтезировать биологически активные вторичные метаболиты, обладающие антимикробными свойствами (Li et al, 2008). Это качество может быть полезным бактериям не только при обитании в толще воды, но и при колонизации различных поверхностей, в том числе поверхностей разных животных, как это описано для хейлостомных мшанок *Membranipora membranacea* (Heindl et al, 2012) и *Flustra foliacea* (Pukall et al, 2001). Использование метаболитических продуктов эпибионтов в качестве средства защиты от обрастания другими организмами могло быть важным эволюционным фактором, который привел к формированию симбиотической ассоциации, когда бактерии с поверхности переселились внутрь организма хозяина, продолжая выполнять защитные функции, но уже в другом контексте.

Появление бактериальных симбионтов у мшанок в молодых зооидах, включая первичного, который образуется в ходе метаморфоза из личинки, возможно разными способами. Зооиды могут приобретать бактерий из внешней среды (например, через

пищеварительный тракт) или симбионты могут передаваться дочернему поколению через личинку и далее от первичного зооида переноситься к новообразующимся в ходе роста колонии.

Перемещение бактерий от старого зооида во вновь формирующийся может осуществляться при помощи транспортной системы колонии – фуникулярной системы с фуникулярными телами. При этом симбионты могут проникать в отпочковывающиеся зооиды через поры между соседними зооидами (Lutaud, 1969). В нашей работе с *A. scabra* с передачей симбиотических бактерий новым зооидам может быть связана наблюдаемая концентрация ФТ в зооиде, расположенном перед отпочковывающимся зооидом на конце веточки колонии.

Предположение, что первичный аутозооид и формирующаяся из него новая колония получают бактериальных симбионтов через личинку в результате вертикального переноса от материнского организма, а не из внешней среды, подкрепляется рядом данных.

В нашей работе было показано, что в колониях *A. scabra* ФТ могут занимать различные участки в пределах аутозооида. Так, ФТ часто наблюдались в пространстве между восходящей петлей кишечника и стенкой зооида, вблизи отверстия, через которое оплодотворенная яйцеклетка попадает в полость выводковой камеры. Концентрация ФТ в области выводковой камеры также была отмечена у другого вида мшанок – *Watersipora arcuata* (Zimmer, Woollacott, 1983). Такое расположение может быть связано с перемещением бактериальных симбионтов в составе ФТ в направлении к выводковой камере для обеспечения миграции бактерий к личинкам. Исследования на разных видах мшанок (*Bugula neretina*, *Watersipora subtorquata*, *Watersipora arcuata*), с использованием метода FISH показали присутствие видоспецифичных бактерий в колониях, личинках и анцеструлах (Sharp et al., 2007; Anderson, Haygood, 2007). На основании этого предполагается, что бактерии в составе фуникулярных тяжей через формирующийся ооциальный пузырек (вырост стенки тела в полость выводковой камеры) переходят на поверхность личинки и сохраняются там до выхода личинки из выводковой камеры, а далее – до стадии метаморфоза и формирования первичного зооида.

Аналогичная схема перехода бактериальных симбионтов из тел аутозооидов к личинкам, из которых будет формироваться новое поколение мшанок, очень вероятна и для исследуемого нами вида *A. scabra*. Наша работа в дальнейшем предполагает использование различных методов, включая электронную микроскопию, флуоресценцентную *in situ* гибридизацию и молекулярные методы для ответа на вопрос,

является ли предложенная для других видов схема вертикального переноса валидной для *A. scabra*, и если да, то как и каким способом происходит перемещение бактерий из тела зооида в личинку, когда бактериям необходимо пройти достаточно большой путь, включающий клеточные и кутикулярные преграды.

## Список литературы.

1. Островский А.Н. Эволюция полового размножения мшанок отряда Cheilostomata. // СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2009. 403 с.
2. Adams, D. G. (2000). symbiotic interactions. In *The Ecology of Cyanobacteria* (pp. 523–561).
3. Anderson, C. M., & Haygood, M. G. (2007).  $\alpha$ -proteobacterial symbionts of marine bryozoans in the genus *Watersipora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 303–311. <https://doi.org/10.1128/AEM.00604-06>
4. Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*, 307(5717), 1915-1920.
5. Baird, A. H., Guest, J. R., & Willis, B. L. (2009). Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 551-571.
6. Baumann, P., Lai, C. Y., Baumann, L., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A., & Clark, M. A. (1995). Mutualistic associations of aphids and prokaryotes: Biology of the genus *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 1–7.
7. Begg, T. G., & Amer, S. (2006). The Genus *Thiomargarita*. 1156–1163.
8. Berkelmans, R., & van Oppen, M. J. . (2006). The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a ‘nugget of hope’ for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1599), 2305–2312. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3567>
9. Boyle, P. J., Maki, J. S., & Mitchell, R. (1987). Mollicute identified in novel association with aquatic invertebrate. *Current Microbiology*, 15(2), 85–89. <https://doi.org/10.1007/BF01589367>
10. Carle, K. J., & Ruppert, E. E. (1983). Comparative ultrastructure of the bryozoan funiculus: a blood vessel homologue. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 21(3), 181-193.
11. Ceh, J., van Keulen, M., & Bourne, D. G. (2013). Intergenerational transfer of specific bacteria in corals and possible implications for offspring fitness. *Microbial ecology*, 65(1), 227-231. Cook, P. E., & McGraw, E. A. (2010). *Wolbachia pipientis*: An expanding bag of tricks to explore for disease control. *Trends in Parasitology*, 26(8), 373–375. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.05.006>



12. Davidson, S. K., & Haygood, M. G. (1999). Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont "Candidatus *Endobugula sertula*." *Biological Bulletin*, 196(3), 273–280. <https://doi.org/10.2307/1542952>
13. Dyrinda, P. E. J., & King, P. E. (2009). Sexual reproduction in *Epistomia bursaria* (Bryozoa: Cheilostomata), an endozooidal brooder without polypide recycling. *Journal of Zoology*, 198(3), 337–352. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1982.tb02080.x>
14. Ereskovsky, A., Gonobobleva, E., Biology, A. V.-M., & 2005, undefined. (n.d.). Morphological evidence for vertical transmission of symbiotic bacteria in the viviparous sponge *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarcida). Springer. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00227-004-1489-1>
15. Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., & Hentschel, U. (2004). Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6), 3724-3732.
16. Fine, M., & Loya, Y. (2002). Endolithic algae: an alternative source of photoassimilates during coral bleaching. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1497), 1205–1210. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1983>
17. Flatt, P. M., Gautschi, J. T., Thacker, R. W., Musafija-Girt, M., Crews, P., & Gerwick, W. H. (2005). Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea* (Lamellodysidea) herbacea and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* by CARD-FISH analysis. *Marine Biology*, 147(3), 761-774.
18. Gaino, E., Scalera Liaci, L., Sciscioli, M., & Corriero, G. (2006). Investigation of the budding process in *Tethya citrina* and *Tethya aurantium* (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology*, 125(2), 87–97. <https://doi.org/10.1007/s00435-006-0015-z>
19. Gilbert, S. F., Sapp, J., & Tauber, A. I. (2018). *A Symbiotic View of Life : We Have Never Been Individuals* Author ( s ): Scott F . Gilbert , Jan Sapp and Alfred I . Tauber Source : *The Quarterly Review of Biology* , Vol . 87 , No . 4 ( December 2012 ) , pp . 325-341 Published by : The University of Chicag. 87(4), 325–341.
20. Goulet, T. L., Simmons, C., & Goulet, D. (2008). Worldwide biogeography of *Symbiodinium* in tropical octocorals. *Marine Ecology Progress Series*, 355, 45-58.
21. Grant, A. J., Trautman, D. A., Menz, I., & Hinde, R. (2006). Separation of two cell signalling molecules from a symbiotic sponge that modify algal carbon metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(1), 92-98.

22. Haygood, M. G., & Davidson, S. K. (1997). Small-Subunit rRNA Genes and In Situ Hybridization with Oligonucleotides Specific for the Bacterial Symbionts in the Larvae of the Bryozoan. *Microbiology*, 63(11), 4612–4616.
23. Heindl, H., Thiel, V., Wiese, J., Imhoff, J. F., Kiwiz, K. W., & Ozeanforschung, H. (2012). Bacterial isolates from the bryozoan *Membranipora membranacea* : influence of culture media on isolation and antimicrobial activity. 17–32.  
<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.155>
24. Hill, M., Allenby, A., Ramsby, B., Schönberg, C., & Hill, A. (2011). Symbiodinium diversity among host clonoid sponges from Caribbean and Pacific reefs: Evidence of heteroplasmy and putative host-specific symbiont lineages. *Molecular phylogenetics and evolution*, 59(1), 81-88.
25. Hirata, Y., & Uemura, D. (1986). Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure and Applied Chemistry*, 58(5), 701-710.
26. Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881-884.
27. Hsu, C. M., Keshavmurthy, S., Denis, V., Kuo, C. Y., Wang, J. T., Meng, P. J., & Chen, C. A. (2012). Temporal and spatial variations in symbiont communities of catch bowl coral *Isopora palifera* (Scleractinia: Acroporidae) on reefs in Kenting National Park, Taiwan. *Zool Stud*, 51(8), 1343-1353.
28. Jensen, K. S., & Pedersen, M. F. (1994). Photosynthesis by symbiotic algae in the freshwater sponge, *Spongilla lacustris*. *Limnology and Oceanography*, 39(3), 551–561.  
<https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.3.0551>
29. Kalive, M., Faust, J. J., Koeneman, B. A., & Capco, D. G. (2009). Involvement of the PKC family in regulation of early development. *Molecular Reproduction and Development*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mrd.21112>
30. Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. In *The Prokaryotes*. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_1](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1)
31. Kitano, H., & Oda, K. (2006). Self-Extending Symbiosis: A Mechanism for Increasing Robustness Through Evolution. *Biological Theory*, 1(1), 61–66.  
<https://doi.org/10.1162/biot.2006.1.1.61>
32. Kittelmann, S., & Harder, T. (2005). Species- and site-specific bacterial communities associated with four encrusting bryozoans from the North Sea , Germany. 327, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.06.020>

33. Knowlton, N., Rohwer, F., Knowlton, N., & Rohwer, F. (2003). Multispecies Microbial Mutualisms on Coral Reefs : 162(May 2019).
34. Lesser, M. P., Mazel, C. H., Gorbunov, M. Y., & Falkowski, P. G. (2004). Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science*, 305(5686), 997-1000.
35. Li, Hai, Mishra, M., Ding, S., & Miyamoto, M. M. (2019). Diversity and Dynamics of “Candidatus Endobugula” and Other Symbiotic Bacteria in Chinese Populations of the Bryozoan, *Bugula neritina*. *Microbial Ecology*, 77(1), 243–256. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1233-x>
36. Li, Huayue, Lee, B. C., Kim, T. S., Bae, K. S., Hong, J., Choi, S. H., ... Jung, J. H. (2008). Bioactive cyclic dipeptides from a marine sponge-associated bacterium, *Psychrobacter* sp. *Biomolecules and Therapeutics*, 16(4), 356–363. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2008.16.4.356>
37. Lim, G. E., & Haygood, M. G. (2004). “Candidatus Endobugula glebosa,” a specific bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula simplex*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4921–4929. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4921-4929.2004>
38. Linda L. Blackall, B. W. and Madeleine J. H. V. O. (2015). Coral — the world ’ s most diverse symbiotic ecosystem. *Molecular Ecology*, (24), 5330–5347. <https://doi.org/10.1111/mec.13400>
39. Lopanik, N., Gustafson, K. R., & Lindquist, N. (2004). Structure of bryostatin 20: A symbiont-produced chemical defense for larvae of the host bryozoan, *Bugula neritina*. *Journal of Natural Products*, 67(8), 1412–1414. <https://doi.org/10.1021/np040007k>
40. Lopanik, N., Lindquist, N., & Targett, N. (2004). Potent cytotoxins produced by a microbial symbiont protect host larvae from predation. *Oecologia*, 139(1), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1487-5>
41. Lutaud,1964, Sur la structure et le role des glandes vestibulaires et sur la nature de certains organes de la cavite cystidienne chez les Bryozoaires chilostomes. *Cah Biol Mar* 5:201-231
42. Lutaud,1965, Sur la presence de microorganismes specifiques dans les glandes vestibulaires et dans l'aviculaire de *Palmicellaria skenei* (Ellis et Solander), Bryozoaire Chilostome. *Cah Biol Mar* 6:181-190
43. Lutaud,1969, La nature des corps funiculaires des cellularines, Bryozoaires Chilostomes. *Arch Zool ExpGen* 110:2-30

44. Lutaud, 1986, L'infestation du myoepithelium de l'oesophage par des microorganismes pigmentes et la structure des organes a bacteries du vestibule chez le Bryoxoaire Chilostome Palmicellaria skenei (E. et S.). *Can J zool* 64:1842-1851
45. Maldonado, M., Cortadellas, N., Trillas, M. I., & Rutzler, K. (2005). Endosymbiotic yeast maternally transmitted in a marine sponge. *The Biological Bulletin*, 209(2), 94-106.
46. McBride, M. J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 49-75.
47. Mathew, M., Bean, K. I., Temate-Tiagueu, Y., Caciula, A., Mandoiu, I. I., Zelikovsky, A., & Lopanik, N. B. (2016). Influence of symbiont-produced bioactive natural products on holobiont fitness in the marine bryozoan, *Bugula neritina* via protein kinase C (PKC). *Marine Biology*, 163(2), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2818-x>
48. Mathew, M., Schwaha, T., Ostrovsky, A. N., & Lopanik, N. B. (2018). Symbiont-dependent sexual reproduction in marine colonial invertebrate: morphological and molecular evidence. *Marine Biology*, 165(1). <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3266-y>
49. McGinley, M. P., Aschaffenburg, M. D., Pettay, D. T., Smith, R. T., LaJeunesse, T. C., & Warner, M. E. (2012). Symbiodinium spp. in colonies of eastern Pacific Pocillopora spp. are highly stable despite the prevalence of low-abundance background populations. *Marine Ecology Progress Series*, 462, 1-7.
50. McKinney, F. K., & Jackson, J. B. (1991). *Bryozoan evolution*. University of Chicago Press.
51. Moosbrugger, M., Schwaha, T., Walzl, M. G., Obst, M., & Ostrovsky, A. N. (2012). The placental analogue and the pattern of sexual reproduction in the cheilostome bryozoan *Bicellariella ciliata* (Gymnolaemata). *Frontiers in Zoology*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-29>
52. Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current Biology : CB*, 16(20), R866-71. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.019>
53. Rowan, R. (2004). Coral bleaching: thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature*, 430(7001), 742
54. van Oppen, M. J., Baker, A. C., Coffroth, M. A., & Willis, B. L. (2009). Bleaching resistance and the role of algal endosymbionts. In *Coral bleaching* (pp. 83-102). Springer, Berlin, Heidelberg.
55. Padilla-Gamiño, J. L., Pochon, X., Bird, C., Concepcion, G. T., & Gates, R. D. (2012). From Parent to Gamete: Vertical Transmission of Symbiodinium (Dinophyceae)

- ITS2 Sequence Assemblages in the Reef Building Coral *Montipora capitata*. PLoS ONE, 7(6), e38440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038440>
56. Pettay, D. T., Wham, D. C., Pinzon, J. H., & Lajeunesse, T. C. (2011). Genotypic diversity and spatial–temporal distribution of Symbiodinium clones in an abundant reef coral. *Molecular Ecology*, 20(24), 5197-5212.
57. Pettit, G. R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, D. L., Arnold, E., & Clardy, J. (1982). Isolation and structure of bryostatin 1. *Journal of the American Chemical Society*, 104(24), 6846–6848. <https://doi.org/10.1021/ja00388a092>
58. Riitzler, K. (1988). Mangrove sponge disease induced by cyanobacterial symbionts : failure of a primitive immune system ? (February 1985).
59. Ritchie, K. B., & Smith, G. W. (1995). Preferential carbon utilization by surface bacterial communities from water mass, normal, and white-band diseased *Acropora*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(4), 345-352.
60. Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355.
61. Ryland, J. S. (2005). Bryozoa: an introductory overview (pp. 9-20). na.
62. Satheesh, S., Ba-akdah, M. A., & Al-Sofyani, A. A. (2016). Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(3), 26-35.
63. Schröder, D., Deppisch, H., Obermayer, M., Krohne, G., Stackebrandt, E., Hölldobler, B., ... Gross, R. (1996). Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): Systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular Microbiology*, 21(3), 479–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02557.x>
64. Schwarz, J. A., Krupp, D. A., & Weis, V. M. (1999). Late larval development and onset of symbiosis in the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *The Biological Bulletin*, 196(1), 70-79.
65. Ritchie, K. B. (2006). Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322, 1-14.
66. Sharp, J. H., Winson, M. K., Wade, S., Newman, P., Bullimore, B., Lock, K., ... Porter, J. S. (2008). Differential microbial fouling on the marine bryozoan *Pentapora fascialis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(4), 705–710. <https://doi.org/10.1017/S0025315408001215>

67. Sharp, Jasmine H., Winson, M. K., & Porter, J. S. (2007). Bryozoan metabolites: An ecological perspective. *Natural Product Reports*, 24(4), 659–673.  
<https://doi.org/10.1039/b617546e>
68. Sharp, K. H., Distel, D., & Paul, V. J. (2012). Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *ISME Journal*, 6(4), 790–801. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.144>
69. Simpson, T. L., & Gilbert, J. J. (1973). Gemmulation, gemmule hatching, and sexual reproduction in fresh-water sponges I. The life cycle of *Spongilla lacustris* and *Tubella pennsylvanica*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 422-433.
70. Spalding, M., Spalding, M. D., Ravilious, C., & Green, E. P. (2001). *World atlas of coral reefs*. Univ of California Press.
71. Sunagawa, S., Woodley, C. M., & Medina, M. (2010). Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PLoS ONE*, 5(3), 1–7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009554>
72. Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 295–347. <https://doi.org/10.1128/membr.00040-06>
73. Thacker, R. W., & Freeman, C. J. (2012). Sponge-Microbe Symbioses. *Recent Advances and New Directions*. In *Advances in Marine Biology* (1st ed., Vol. 62).  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394283-8.00002-3>
74. Twelves, C., Cortes, J., Vahdat, L. T., Wanders, J., Akerele, C., & Kaufman, P. A. (2010). Phase III trials of eribulin mesylate (E7389) in extensively pretreated patients with locally recurrent or metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer*, 10(2), 160-163.
75. Vacelet, J., Fiala-Médioni, A., Fisher, C. R., & Boury-Esnault, N. (1996). Symbiosis between methane-oxidizing bacteria and a deep-sea carnivorous cladorhizid sponge. *Marine Ecology Progress Series*, 145, 77-85.
76. van Oppen, M. J. H., Baker, A. C., Coffroth, M. A., & Willis, B. L. (2009). Bleaching Resistance and the Role of Algal Endosymbionts. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69775-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69775-6_6)
77. Verlag, F. (2020). Microbial diversity of cultivatable bacteria associated with the North Sea bryozoan *Flustra foliacea*. *633(2001)*, 623–633.
78. Visick, K. L., & McFall-Ngai, M. J. (2000). An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1779-1787.

79. Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle, G., & König, H. (2003). Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. *European journal of protistology*, 39(1), 11-23.
80. Whitton, B. A. (2012). Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, 9789400738, 1–760. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
81. Wilkinson, C. R., & Cheshire, A. C. (1988). Growth Rate of Jamaican Coral Reef Sponges After Hurricane Allen. *The Biological Bulletin*, 175(1), 175–179. <https://doi.org/10.2307/1541905>
82. Wilkinson, C R, Histologie, L., & Bernard, C. (1978). Microbial Associations in Sponges . III . Ultrastructure of the in situ Associations in Coral Reef Sponges. 185, 177–185.
83. Wilkinson, Clive R. (1980). Nutrient translocation from green algal symbionts to the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Hydrobiologia*, 75(3), 241–250. <https://doi.org/10.1007/BF00006488>
84. Woollacott, R. M. (1981). Bacteria Associated with Bryozoan Larvae. *Marine Biology*, 65, 155–158. Retrieved from //a1978fv54600959
85. Woollacott, Robert M., & Zimmer, R. L. (1975). A simplified placenta-like system for the transport of extraembryonic nutrients during embryogenesis of *Bugula neritina* (bryozoa). *Journal of Morphology*, 147(3), 355–377. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051470308>
86. Yamashita, H., Suzuki, G., Hayashibara, T., & Koike, K. (2013). *Acropora* recruits harbor “rare” *Symbiodinium* in the environmental pool. *Coral Reefs*, 32(2), 355-366.
87. Yang, S., Sun, W., Zhang, F., & Li, Z. (2013). Phylogenetically Diverse Denitrifying and Ammonia-Oxidizing Bacteria in Corals *Alcyonium gracillimum* and *Tubastraea coccinea*. *Marine Biotechnology*, 15(5), 540–551. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9503-6>
88. Yu, H. B., Yang, F., Li, Y. Y., Gan, J. H., Jiao, W. H., & Lin, H. W. (2015). Cytotoxic bryostatin derivatives from the South China sea bryozoan *bugula neritina*. *Journal of Natural Products*, 78(5), 1169–1173. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00081>
89. ZIMMER, R. L., & WOOLLACOTT, R. M. (1983). Mycoplasma-Like Organisms: Occurrence with the Larvae and Adults of a Marine Bryozoan. *Science*, 220(4593), 208–210. <https://doi.org/10.1126/science.220.4593.208>

## **Благодарности**

Хотелось бы выразить свою благодарность и признательность моему научному руководителю Вишнякову Андрею Эксустадиановичу за чуткое руководство, ценные советы и замечания, приобретение методологических навыков, а также за огромное терпение. Также хотелось бы поблагодарить Островского Андрея Николаевича за руководство и всяческое содействие на всех этапах работы. Огромную благодарность хотелось бы выразить Котенко Ольге Николаевне, Беликовой Елене Владимировне и Квач Анне Юрьевне за предоставленный материал для работы, а также за практические советы. Искренне благодарю своих одногруппников и весь коллектив кафедры за внимание, поддержку и за доброе отношение.

В завершении выражаю благодарность ресурсному центру СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».