

Санкт-Петербургский Государственный Университет

*На правах рукописи*

Миронов Тимофей Иванович

НОВАЯ МОДЕЛЬНАЯ СИМБИОТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ИНFUЗОРИЯ *PARAMECIUM*  
*MULTIMICRONUCLEATUM* / БАКТЕРИЯ *CA. TRICHORICKETTSLIA MOBILIS*

Научная специальность: 1.5.22. Клеточная биология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доцент, кандидат биологических наук,  
Сабанеева Е. В.

Санкт-Петербург

2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Список сокращений.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Введение.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Обзор литературы.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Понятие симбиоза и проблема классификации симбиозов.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 История исследования симбиозов.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Симбионты протистов.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Эндосимбионты амёб.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Эндосимбионты жгутиконосцев.....</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Эндосимбионты инфузорий.....</b>	<b>22</b>
2.6.1 Цитоплазматические эндосимбионты инфузорий.....	23
2.6.2 Внутриядерные эндосимбионты инфузорий.....	26
Бактерии рода <i>Holospira</i> , порядок <i>Holosporales</i> .....	26
Холоспороподобные бактерии.....	27
Другие внутриядерные эндосимбионты.....	28
<b>2.7 Риккетсии и риккетсиоподобные бактерии.....</b>	<b>29</b>
2.7.1 Семейство <i>Ca. Midichloriaceae</i> .....	30
2.7.2 Семейство <i>Rickettsiaceae</i> .....	32
<b>2.8 Современные направления исследований симбиозов между протистами и другими микроорганизмами.....</b>	<b>33</b>
2.8.1 Эволюционный аспект проблемы симбиоза между протистами и другими микроорганизмами.....	34
2.8.2 Экологическое значение симбиотических ассоциаций протистов с другими микроорганизмами.....	38
2.8.3 Тонкие механизмы взаимодействия протистов и их эндосимбионтов.....	41
2.8.4 Методические подходы к исследованию симбиотических систем инфузорий.....	45
<b>3. Материал и методы .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Получение клеточных культур.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Прижизненные наблюдения.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Экспериментальное заражение.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4 Проверка наличия киллер-эффекта.....</b>	<b>50</b>

3.5 Окрашивание тотальных препаратов инфузорий по Фельгену.....	50
3.6 Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).....	50
3.7 Негативное контрастирование.....	51
3.8 Атомно-силовая микроскопия.....	52
3.9 Выделение ДНК и характеристика генов 18S рРНК хозяина и 16S рРНК эндосимбионта.....	52
3.10 Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH).....	52
3.11 Филогенетический анализ.....	53
3.12 Обработка антибиотиками.....	54
3.13 Экстракция и фракционирование антимикробного пептидного комплекса FLIP7.....	55
3.14 Обработка инфузорий пептидным комплексом FLIP7.....	56
3.15 Проверка активности отдельных фракций FLIP.....	57
<b>4. Результаты.....</b>	<b>58</b>
4.1 Общая характеристика симбиотической системы <i>Paramecium multimicronucleatum</i> / <i>Ca.</i> <i>Trichorickettsia mobilis</i> .....	58
4.1.1 Идентификация вида инфузорий клона LSA11-2.....	58
4.1.2 Локализация подвижного эндосимбионта в инфузориях <i>P. multimicronucleatum</i> клона LSA11-2.....	59
4.1.3 Морфология и ультраструктура эндосимбионта инфузорий клона <i>P. multimicronucleatum</i> LSA11-2.....	62
4.1.4 Филогенетическое положение и таксономическая принадлежность подвижных внутриядерных эндосимбионтов инфузорий <i>P. multimicronucleatum</i> клона LSA11-2.....	64
4.1.5 Биологические свойства парамеций клона LSA11-2 и их эндосимбионтов <i>Ca.</i> <i>Trichorickettsia mobilis</i> .....	68
4.2 Принадлежность макронуклеарных эндосимбионтов из клонов <i>P. multimicronucleatum</i> <i>Busnau</i> , Kp154-4 и AB9-4 к виду <i>Ca. Trichorickettsia mobilis</i> .....	68
4.3 Влияние различных антимикробных препаратов на симбиотическую систему <i>Paramecium multimicronucleatum</i> / <i>Ca. Trichorickettsia mobilis</i> .....	69

4.3.1 Влияние антибиотиков на жизнеспособность партнеров симбиотической системы <i>P. multimicronucleatum</i> / <i>Ca. T. mobilis</i> .....	69
4.3.2 Ультраструктура и локализация трихориккетсий после воздействия ампициллином.....	74
4.3.3 Влияние комплекса антибактериальных пептидов FLIP7 на симбиотическую систему <i>P. multimicronucleatum</i> / <i>Ca. T. mobilis</i> .....	77
4.3.4 Локализация и ультраструктура бактерий <i>Ca. T. mobilis</i> после обработки инфузорий-хозяев смесью антимикробных пептидов FLIP7.....	79
4.3.5 Влияние отдельных фракций FLIP7 на жизнеспособность инфузорий и их способность поддерживать заражение бактерией <i>Ca. T. mobilis</i> .....	82
<b>5. Обсуждение .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1 Внутрядерная локализация подвижных эндосимбионтов инфузории <i>P. multimicronucleatum</i>.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2 Жгутики у бактерий порядка <i>Rickettsiales</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3 Филогенетическое положение и таксономическая принадлежность подвижных внутрядерных эндосимбионтов.....</b>	<b>87</b>
<b>5.4 Встречаемость вида <i>Ca. Trichorickettsia mobilis</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>5.5 Значение исследований группы «немодельных <i>Rickettsiales</i>».....</b>	<b>89</b>
<b>5.6 Чувствительность симбиотической системы <i>P. multimicronucleatum</i>/<i>Ca. T. mobilis</i> к действию антибиотиков.....</b>	<b>90</b>
<b>5.7 Выход внутрядерных бактерий в цитоплазму клетки-хозяина .....</b>	<b>92</b>
<b>5.8 Образование персистирующих клеток в результате обработки ампициллином и хлорамфениколом.....</b>	<b>92</b>
<b>5.9 Природа содержащих эндосимбионтов вакуолей в инфузориях, обработанных ампициллином.....</b>	<b>94</b>
<b>5.10 Действие комплекса антимикробных пептидов FLIP-7 на стабильность симбиотической системы <i>P. multimicronucleatum</i>/<i>Ca. T. mobilis</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>99</b>
<b>Благодарности.....</b>	<b>100</b>
<b>Список используемой литературы.....</b>	<b>101</b>

**Список сокращений**

- ДИК – дифференциально-интерференционный контраст;
- Ма – макронуклеус, вегетативное ядро инфузорий;
- Ми – микронуклеус, диплоидное генеративное ядро;
- ПГА гранулы – полигидроксиалканоатные гранулы;
- РПБ – риккетсиоподобные бактерии;
- РТ – ретикулярные тельца;
- СТ – группа возбудителей сыпного тифа;
- ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия;
- ЭТ – элементарные тельца;
- FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*;
- FLIP7 – (fly larvae immune peptides) иммунные пептиды личинки мухи;
- HLB – холоспороподобные бактерии;
- MIC – (minimal inhibitory concentration) минимальная ингибирующая концентрация;
- SFG – (spotted fever group) риккетсии, вызывающие пятнистые лихорадки;
- TG – (typhus group) риккетсии, вызывающие тифы.

## 1. Введение

### Актуальность исследования

Симбиоз – это широко распространенный в природе феномен длительного совместного сожительства неродственных организмов. На сегодняшний день известно большое количество симбиотических ассоциаций, в которые вовлечены практически все группы живых организмов. Под термином симбиоз в настоящее время понимают совместное существование организмов, принадлежащих к разным видам, независимо от того, положительное или отрицательное влияние они оказывают друг на друга, т.е. в том же смысле, в котором термин «симбиоз» изначально был предложен Антоном де Бари (de Bary, 1879). Среди всего многообразия симбиотических систем особое положение занимают эндосимбиозы протистов. Их частая встречаемость в природе прежде всего связана со способностью многих протистов питаться путем фагоцитоза (Schweikert et al., 2013). Попавшие в фагосому микроорганизмы могут избежать лизосомной деградации в клетке-хозяине и со временем превратиться в эндосимбионтов.

Симбиозы, в которых в качестве клетки-хозяина выступает протист, представляют огромный интерес как для исследователей в области экологии микроорганизмов, так и с точки зрения эволюционной биологии. В последнее время в литературе широко обсуждается предложенная Линн Маргулис концепция холобионта (Margulis, 1991), согласно которой организм с населяющим его наследуемым эндосимбионтом рассматривается как единое целое. В современной интерпретации этой концепции холобионт обладает хологеномом, т.е. суммарным геномом макроорганизма и всех ассоциированных с ним микроорганизмов. При этом холобионт подвержен действию естественного отбора и претерпевает эволюционные изменения (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008; Bordenstein, Theis, 2015; Theis et al., 2016). Исследования симбиотических систем, в которых в качестве макроорганизма выступает одноклеточный эукариот-протист, то есть взаимодействия между партнерами происходят на клеточном уровне организации, могут создать хорошую основу для дальнейшей разработки концепции холобионта. Очевидно, что при исследовании таких моделей важным фактором является ее стабильность, т.е. устойчивость к действию различных внешних факторов, в том числе к действию антибиотиков и антимикробных пептидных комплексов.

Применение концепции холобионта к исследованиям симбиозов у протистов может также привести к новому подходу в таксономии этих организмов, образно названному

«таксономией нового поколения», в котором эндосимбионты и ассоциированные с ними признаки протиста рассматриваются как важные таксономические признаки (Serra et al., 2020).

Другим важным аспектом изучения эндосимбиозов протистов является выяснение тонких механизмов взаимодействия между партнерами на клеточном уровне организации. Анализ этих механизмов может пролить свет на некоторые мало изученные функции эукариотической клетки. Кроме того, в последнее время исследования симбиотических систем у протистов приобрело особую актуальность в связи с появлением в литературе все большего числа сообщений о находках в клетках различных протистов микроорганизмов, идентичных или родственных внутриклеточным патогенам человека и животных (Molmeret et al., 2005; Ferrantini et al., 2009; Schrallhammer et al., 2013). Так, оказалось, что амёбы рода *Acanthamoeba* могут нести в своей цитоплазме опасных возбудителей пневмоний человека – *Legionella* или *Mycobacterium* (Steinert et al., 1998; Horn, Wagner, 2004), а инфузории часто выступают в качестве хозяев для риккетсиоподобных бактерий (РПБ) (Ferrantini et al., 2009; Schrallhammer et al., 2013). На основании этих данных было высказано предположение, что протисты могут выступать в качестве природного резервуара для микроорганизмов, потенциально патогенных для человека (Molmeret et al., 2005; Fokin et al., 2014). Поэтому поиск и исследование новых симбиотических систем, образованных протистами и другими микроорганизмами, имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

### Цель и задачи исследования

**Цель работы:** Описать новую модельную симбиотическую систему, образованную инфузорией *Paramecium multimicronucleatum* и подвижной внутриядерной бактерией, и исследовать стабильность этой системы при воздействии антибиотиками и антимикробными пептидами.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Охарактеризовать морфологию и ультраструктуру подвижного эндосимбионта макронуклеуса инфузории *Paramecium multimicronucleatum*.
2. Определить филогенетические связи и таксономическое положение эндосимбионта макронуклеуса инфузории *Paramecium multimicronucleatum*.
3. Оценить устойчивость симбиотической системы, образованной инфузорией *Paramecium multimicronucleatum* и подвижной внутриядерной бактерией к действию антибиотиков, имеющих разный механизм действия.
4. Оценить устойчивость/чувствительность симбиотической системы к действию смеси антимикробных пептидов FLIP7 и ее отдельных хроматографических фракций.

### Основные положения, выносимые на защиту

1. Описан новый вид бактерий из семейства *Rickettsiaceae* (порядок *Rickettsiales*) *Ca. Trichorickettsia mobilis*.
2. Отдельные представители сем. *Rickettsiaceae* (порядок *Rickettsiales*) могут иметь хорошо выраженный жгутиковый аппарат.
3. Симбиотическая система *Paramecium multimicronucleatum/Ca. Trichorickettsia mobilis* стабильна при воздействии антибиотиков и антимикробных пептидов, причем стабильность симбиотической системы связана с формированием персистирующих форм бактерий.
4. В силу своей стабильности симбиотическая система *Paramecium multimicronucleatum/Ca. Trichorickettsia mobilis* представляет собой удобную модель для дальнейшей разработки концепции холобионта.

### Научная новизна исследования

Впервые с помощью морфологических и молекулярных методов исследования описан новый вид внутриядерных симбиотических бактерий, обитающих в макронуклеусе инфузории *Paramecium multimicronucleatum/Ca. Trichorickettsia mobilis*. Установлена принадлежность этого вида к семейству *Rickettsiaceae* (*Rickettsiales*). Впервые у представителя семейства *Rickettsiaceae* продемонстрировано наличие жгутиков. Впервые установлено, что симбиотическая система *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* обладает высокой устойчивостью к действию ряда антибиотиков, в том числе используемых для лечения риккетсиозов у человека. Впервые показана также высокая устойчивость симбиотической системы *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* к действию комплекса антимикробных пептидов FLIP7 и его отдельных фракций. Впервые предложено рассматривать симбиотическую систему *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* в качестве модели для дальнейшего развития концепции холобионта.

### Теоретическое и прикладное значение исследования

Выявленные морфологические особенности вида *Ca. Trichorickettsia mobilis* (наличие жгутикового аппарата) вынуждают пересмотреть диагноз не только семейства *Rickettsiaceae*, но и всего порядка *Rickettsiales*. Кроме того, встает вопрос о необходимости переосмысления возможных путей эволюции бактерий этого порядка. Полученные данные, свидетельствующие о высокой стабильности симбиотической системы *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis*,



позволяют рассматривать данную симбиотическую систему в качестве удобной модели для дальнейшей разработки концепции холобионта.

Поскольку работа с патогенными микроорганизмами ограничена существенными техническими и организационными требованиями, дальнейшие исследования данной симбиотической системы имеют важное практическое значение, так как близкое родство *Ca. T. mobilis* и патогенных для человека риккетсий дает возможность использовать данную симбиотическую систему как модель для изучения тонких механизмов взаимодействия риккетсий с эукариотической клеткой.

Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по клеточной биологии, симбиозу и экологии микроорганизмов для студентов биологических специальностей высших учебных заведений.

### **Личный вклад автора**

Результаты, представленные в диссертации, получены лично автором. Секвенирование и филогенетический анализ проводили совместно с коллегами из Университета Пизы (Италия) (Vannini, Mironov et al., 2014). Получение комплекса антимикробных пептидов FLIP7 и его хроматографических фракций выполнил Андрей Юрьевич Яковлев (лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых СПбГУ). Результаты работы обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

### **Апробация результатов работы**

Результаты работы доложены и обсуждены на 17-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2013), VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013), 17-ом Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (Санкт-Петербург, 2014), 7-й молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020).

### **Финансовая поддержка работы**

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты № 15-04-06410, № 18-04-00562) и Российского Научного Фонда (проект № 22-24-00335).

## Публикации

По теме исследования опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах первого квартиля SJR, индексируемых в системах WoS и/или Scopus, и 8 публикаций в материалах международных и всероссийских конференций.

### Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) Vannini C., Boscaro V., Ferrantini F., Benken K., **Mironov T.**, Schweikert M., Görtz H., Fokin S., Sabaneyeva E., Petroni G., 2014. Flagellar movement in two bacteria of the family *Rickettsiaceae*: a re-evaluation of motility in an evolutionary perspective. PLoS One. 9(2), e87718.
- 2) **Mironov T.**, Sabaneyeva E., 2020. A robust symbiotic relationship between the ciliate *Paramecium multimicronucleatum* and the bacterium *Ca. Trichorickettsia mobilis*. Frontiers in Microbiology. 11, 603335.
- 3) **Mironov T.**, Yakovlev A., Sabaneyeva E., 2022. Together forever: Inseparable partners of the symbiotic system *Paramecium multimicronucleatum*/*Ca. Trichorickettsia mobilis*. Symbiosis. 1-12.

### Тезисы докладов:

- 1) **Миронов Т.**, Яценко В., Бенкен К., Фокин С., Швейкерт М., Сабанеева Е., 2013. Новая трехкомпонентная симбиотическая система (протист-бактерия-вирус) в клетке инфузории *Paramecium multimicronucleatum*. VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», Россия, Иркутск. 98-99.
- 2) **Mironov T.**, Benken K., Boscaro V., Fokin S., Schweikert M., Sabaneyeva E., 2013. Rickettsia-like motile intranuclear endobionts of the ciliate *Paramecium multimicronucleatum*. The 17th international pushchino school conference of young scientists «Biology – the science of the XXI century», Россия, Пущино. 57-58.
- 3) **Mironov T.**, Yashenko V., Benken K., Boscaro V., Fokin S., Schweikert M., Sabaneyeva E., 2013. A triple symbiotic system in *Paramecium multimicronucleatum*. Ciliates as a model system to study genome evolution, mechanisms and non-Mendelian inheritance and environmental adaptation, Estonia, Tallinn. 61.
- 4) Sabaneyeva E., **Mironov T.**, Szokoli F., Castelli M., Pasqualetti C., Kaltz O., Petroni G., 2014. Sensitivity to antibiotic in *Trichorickettsia mobilis*. Frontiers in ciliate genome evolution adaptation, and symbiosis, Italy, Piza. 10-11.
- 5) **Миронов Т.**, Бенкен К., Сабанеева Е., 2014. Нарушение пространственной организации макронуклеуса инфузории *Paramecium multimicronucleatum*, зараженного подвижным эндонуклеобионтом *Trichorickettsia mobilis*, Россия. Цитология. 56, 672.

- 6) Sabaneyeva E., **Mironov T.**, Vannini C., Boscaro V., Ferrantini F., Benken K., Schweikert M., Görtz H., Fokin S., Petroni G., 2015. *Paramecium* and its motile endosymbionts: for better and for worse. VII European congress of protistology, Spain. 189.
- 7) **Миронов Т.**, Яковлев А., Черныш С., Сабанеева Е., 2020. Стабильность симбиотической системы инфузория *Paramecium multimicronucleatum*/бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis* при воздействии противобактериальными агентами. Гены и Клетки. 15(3), 193-194.
- 8) Сабанеева Е.В., **Миронов Т.И.**, Яковлев А.Ю., Черныш С.И. 2021. Концепция холобионта и эндосимбиотические системы инфузорий. Наука СПбГУ 2021 Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, с. 50-51

## 2. Обзор литературы

### 2.1 Понятие симбиоза и проблема классификации симбиозов

Феномен симбиоза представляет собой одно из наиболее противоречивых и обсуждаемых явлений природы. Понятие «симбиоз» было предложено еще в XIX веке Генрихом Антоном де Бари (1831-1888), как общий термин, означающий совместное существование несходных организмов и не уточняющий, каков характер взаимоотношений между партнерами в системе – мутуализм, комменсализм или паразитизм (цит. по: Oulhen et al, 2016).

В настоящее время термин «симбиоз» используется именно в этом, широком понимании этого слова и отражает недостаточную изученность взаимоотношений между хозяином и симбионтом, а также возможность перехода от одного типа отношений к другим. Например, в симбиотической ассоциации инфузория *Paramecium biaurelia*/бактерия *Holospora caryophila* во время фазы логарифмического роста культуры протиста между партнерами устанавливаются мутуалистические отношения, а в стационарной фазе роста культуры инфузорий бактерии переходят к паразитизму, причем бактерии, принадлежащие к разным клонам одного вида, могут оказывать разное влияние на клетку-хозяина (Bella et al., 2016). Более того, несмотря на то что бактерии рода *Holospora* являются энергетическими паразитами (потребляют АТФ хозяина) (Görtz, Schmidt, 2005), в некоторых условиях, таких как осмотический стресс (Duncan et al., 2010) или перепад температуры (Fujishima et al., 2005), их присутствие способствует повышению жизнеспособности инфузории-хозяина. Кроме того, стабильность симбиотической системы в большой мере зависит от внешних факторов. Так, при культивировании инфузории *P. bursaria*, несущей в своей цитоплазме водорослей *Chlorella*, в темноте происходит постепенная деградация симбионта в пищеварительных вакуолях хозяина (Kodama, Fujishima, 2014).

В связи с тем, что далеко не всегда удается определить характер взаимоотношений хозяина и симбионта, самой востребованной является классификация, разделяющая симбиотические системы в зависимости от локализации симбионта. Данная классификация позволяет вносить в одну из трех групп еще очень слабо изученные симбиотические ассоциации (Nardon, Charles, 2001): эктосимбионты, эндосимбионты и эндоцитобионты.

I. Эктосимбиоз. Оба участника симбиоза взаимодействуют только поверхностями. Меньший организм симбиотической ассоциации называют эктосимбионтом. Он никогда не проникает внутрь хозяина. Такой тип симбиоза встречается как между многоклеточными организмами, например, между колониями кольчатых червей рода *Branchiobdellidans* и

пресноводными ракообразными (Williams et al., 2013), так и одноклеточными, как в случае симбиотической ассоциации между инфузорией *Paramecium primaurelia* и бактерией *Ca. Deianiraea vastatrix* (Castelli et al., 2019).

II. Эндосимбиоз. Внутреннее пространство организма хозяина служит средой обитания для симбионта (эндосимбионта). Такое взаимодействие обычно не ведет к проникновению симбионта внутрь клеток организма хозяина. Наиболее часто эндосимбиотические ассоциации обнаруживаются в пищеварительном тракте, внутренних полостях, а иногда и во внутренних органах (Taylor et al., 2007; Donaldson et al., 2016). Классическим примером такого симбиоза является ассоциация питающихся древесиной термитов со жгутиконосцами из отрядов *Hypermastigida* и *Oxymonadida* (Stingl et al., 2005).

III. Эндоситобиоз. Большую часть жизненного цикла симбионт находится внутри клеток хозяина, причем симбионт может находиться в везикуле, образовавшейся с помощью мембраны клетки-хозяина (вакуоли), или свободно лежать в цитозоле. Вакуоли клеток организма хозяина, занятые симбионтами, именуется симбионтосомами. В отечественной литературе традиционно используется термин «симбионтофорная вакуоль». У многоклеточных организмов клетки, содержащие эндобионтов, называют бактериоцитами (Szklarzewicz, Michalik, 2017) или мицетоцитами (Douglas, 1989). Например, симбиотические бактерии или, *Buchnera aphidicicola*, живут в бактериоцитах (Braendle et al., 2003). Такие клетки нередко формируют специализированные структуры, бактериомы.

Симбиозы представлены во всех биоценозах, а вступать в симбиотические ассоциации способны представители всех царств живых организмов.

## 2.2 История исследования симбиозов

Идеи Антона де Бари получили дальнейшее развитие в работах Андрея Сергеевича Фаминцына (1835-1918), который некоторое время проработал во Фрайбурге под руководством де Бари. В своей работе А.С. Фаминцын высказывал предположение о симбиотическом происхождении хлоропластов (Famincyn, 1912).

Немалый вклад в исследование симбиотических систем внес отечественный исследователь Константин Сергеевич Мережковский (1855-1921). Его исследования были направлены на изучение способов видообразования и разработку систематики современных живых организмов. Центральным механизмом образования крупных филогенетических групп, по мнению Мережковского, является симбиоз (Мережковский, 1909). Согласно его концепции, все жизненные формы образовались из двух независимых линий — микоплазмы и амeboплазмы. Микоплазма появилась раньше и дала начало цианобактериям и пластидам.

Амебоплазма, по предположению Мережковского, появилась позднее, когда автотрофы уже сформировали субстрат для питания гетеротрофов. В современном представлении, микоплазме соответствуют прокариоты, а амебоплазме — эукариоты. При этом все современное видовое разнообразие животных и растений является результатом симбиоза Монеры (безъядерный мезофильный гетеротроф) с бактериями. Второй раунд симбиоза, согласно взглядам Мережковского, связан с инвазией фототрофов в клетки некоторых ядерных организмов, что привело к появлению растений. Что касается грибов, то Мережковский объединил их с бактериями в "микоидное царство" в силу схожести физиологии и строения: экстремальной выживаемости в неблагоприятных условиях и наличия большого количества азота в клеточной стенке (Рис. 1). При этом дыхание и наличие ядра для Мережковского являлось вторичным признаком (Мережковский, 1909; Kowallik, Martin, 2021). Работы Мережковского положили начало теории симбиогенеза.

Всего через 11 лет после выхода работы Мережковского, другой отечественный исследователь Борис Михайлович Козо-Полянский (1890-1957) сформулировал теорию симбиогенеза, согласно которой зеленые фотосинтетические субъединицы, возникшие как *Suaenophyceae*, были поглощены более крупными клетками и смогли сформировать симбиотические отношения, что привело к возникновению хлоропластов и митохондрий.

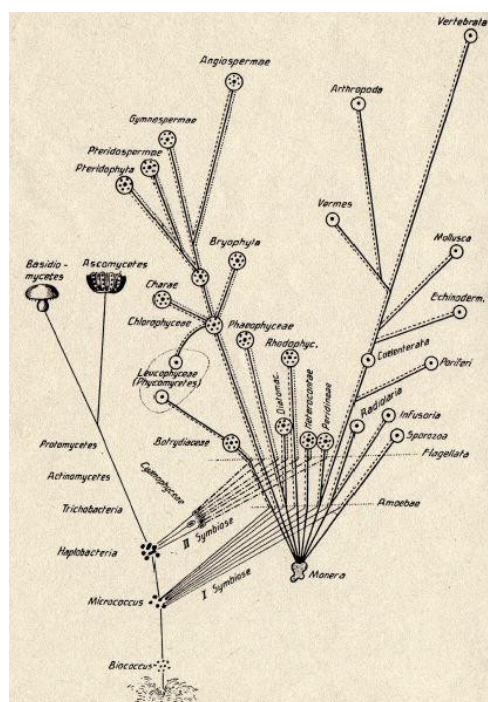


Рис 1. Происхождение эукариот по К.С. Мережковскому (Из: Мережковский, 1909)

Б.М. Козо-Полянский также утверждал, что симбиогенез и эволюция вместе привели к быстрым изменениям в организмах, таким как приобретение пластид, в течение всего

нескольких, а не многих поколений, как предполагают многие эволюционисты (Козо-Полянский, 1924; Fet, 2021).

Идеи симбиогенеза активно развивала американская исследовательница Линн Маргулис (1938-2011). Ее работа была направлена на изучение и систематику известных симбиотических систем, для того чтобы понять причины их возникновения и их роль в эволюции. В своих работах Л. Маргулис подчеркивала, что Биосфера Земли изобилует симбиотическими ассоциациями между различными организмами. В некоторых случаях мы можем утверждать, что сформированная симбиотическая ассоциация будет обладать свойствами, не характерными для ее партнеров по отдельности, как, например, микориза между растениями пустынь и грибами. При этом механизмы, заставляющие организмы сблизиться и начать обмениваться продуктами метаболизма, а также генетическим материалом, остаются неустановленными (Margulis, 1976).

В 1967 году Маргулис (Sagan) предложила симбиогенную теорию происхождения эукариот и органелл. Согласно этой теории, первые эукариоты сформировались в результате фагоцитоза гетеротрофными прокариотами аэробных фототрофов. Важно отметить, что, согласно теории Маргулис, эукариоты возникали многократно. Последующий симбиоз эукариот со спирохетами, по ее представлениям, привел к возникновению эукариотического жгутика, а симбиоз с цианобактериями дал начало растениям (Рис. 2) (Sagan, 1967).

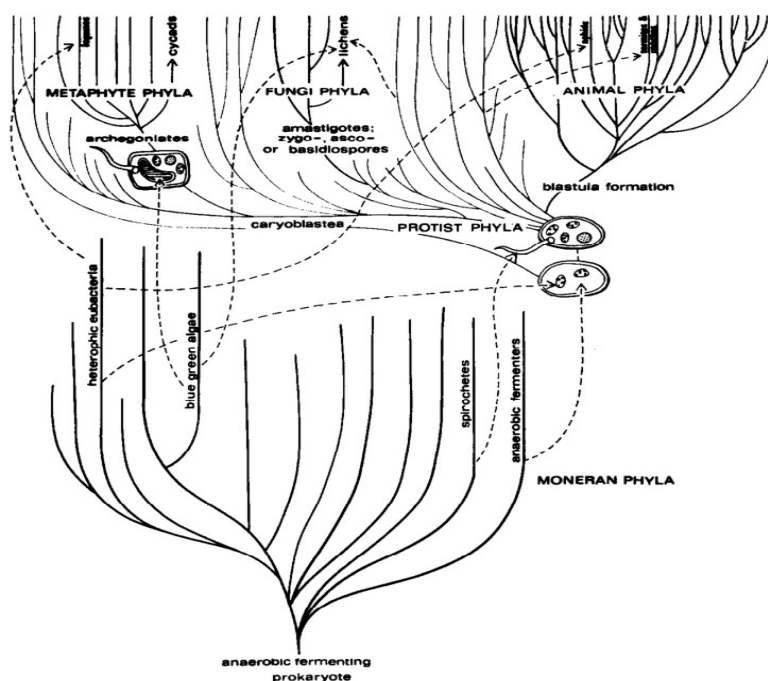


Рис. 2. Происхождение эукариот по Л. Маргулис. (Из: Margulis, 1976)

Следует заметить, что не все гипотезы Линн Маргулис оказались справедливы. Так, с использованием молекулярных методов не удалось подтвердить симбиотическое

происхождение жгутиков протистов из спирохет. Не нашло подтверждения и такое важное утверждение Линн Маргулис, как неоднократное возникновение эукариот в эволюции. Для подтверждения этой гипотезы необходимо было обнаружить организмы с различными промежуточными вариантами симбиоза: эукариоты с бактериальным жгутиком; эукариоты, никогда не имевшие митохондрий, т.е. первично анаэробные. Однако к настоящему времени подобных организмов не удалось обнаружить, что, по мнению самой Линн Маргулис, может быть связано с их труднодоступностью. Тем не менее большинство исследователей все же склоняется к точке зрения, что у современных эукариот был один общий предок, LECA (Last eukaryotic common ancestor) (Lane, 2011). Скорее всего, этот предок возник в результате слияния анаэробной археи и альфа-протеобактерии. Это предположение подтвердилось, когда в глубоководных геотермальных источниках была обнаружена новая крупная филогенетическая группа Асгардархея (Asgardarchaea), которая подразделяется на локиархей, торархей, одинархей и хеймдалльархей. На основании молекулярных данных, полученных в результате анализа последовательности ДНК, Асгардархей была установлена их близость к эукариотам, причем самыми близкими родственниками эукариот являются хеймдалльархеи. Поскольку рибосомы, цитоскелет и транспортные белки этих архей сходны с таковыми у эукариот, было высказано предположение о наличии у них способности к фагоцитозу и везикулярному транспорту (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Однако наблюдения за живыми клетками в лабораторной культуре не подтвердили ни наличия фагоцитоза, ни везикулярного транспорта. При этом было показано, что асгардархеи способны образовывать разнообразные выросты (Imachi et al., 2020). Таким образом, наблюдения за живыми клетками, поставили под сомнение фагоцитарную теорию происхождения эукариот, но при этом свидетельствовали в пользу гипотезы Кунина и его коллег о происхождении эукариот в результате слияния выростов археи вокруг бактерий с последующей изоляцией симбионтов и формирования из них митохондрий (Yutin et al., 2009). Впоследствии эта гипотеза получила дальнейшее развитие в работе Баума и Баума, которые предложили объяснение происхождения других структур эукариотической клетки, ядра, ядерных поровых комплексов, ЭПР и аппарата Гольджи, на основе слияния выростов клетки археи (Рис. 3) (Baum, Baum, 2014).

Интенсивные исследования симбиотических систем и всеобщее признание их важной роли в экологии и эволюции привели к развитию концепции холобионта, которая впервые была выдвинута Линн Маргулис (Margulis, 1991). В исходном значении этого термина, холобионт – это хозяин вместе со своим наследуемым эндосимбионтом. Согласно современной трактовке термина, любой организм вместе с его микробиотой следует рассматривать как единую сущность, обладающую хологеномом, т.е. совокупным геномом хозяина и всех организмов, составляющих его микробиоту (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008; Bordenstein, Theis, 2015;



Theis et al., 2016). Холобионт подвержен естественному отбору и может рассматриваться в качестве эволюционной единицы (Rosenberg, Zilber-Rosenberg, 2018).

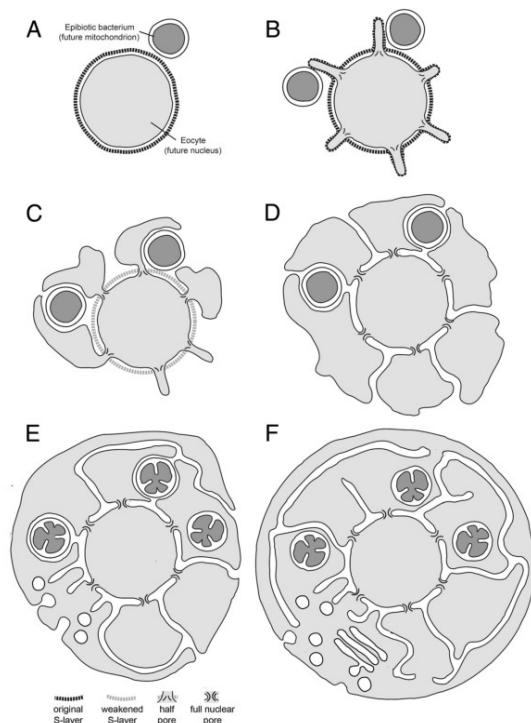


Рисунок 3. Формирование эукариотической клетки в представлении Баум и Баум (Из: Baum, Baum, 2014).

Хотя концепция холобионта была с энтузиазмом воспринята многими исследователями (Bosch, Miller, 2016; O'Malley, 2017; Simon et al., 2019), тем не менее, она вызвала жаркие дебаты (Morris, 2018; Baedke et al., 2021), поскольку ее активно критиковали сторонники экологического подхода к исследованию симбиотических систем, при котором хозяин рассматривается как экологическая ниша для обитающих в нем микроорганизмов (Morgan, Sloan, 2015; Douglas, Werren, 2016; Foster et al., 2017). Основные моменты, вызвавшие критику, касались ограничений концепции холобионта в отношении хозяинной специфичности и способа передачи эндосимбионта другому хозяину, вертикальной (по наследству от родителя к потомству) или горизонтальной (посредством заражения) (Douglas, Werren, 2016). Действительно, создается впечатление, что стабильность симбиотических отношений является самым важным ограничением концепции холобионта, поскольку систему, в которой партнеры часто меняются, трудно рассматривать как единое целое. Несмотря на продолжающиеся дискуссии относительно важности отбора на уровне холобионта, в настоящее время концепция холобионта считается многообещающим подходом в развитии теории эволюции (Morris, 2018;

Baedke et al., 2021). Накапливающиеся данные в области экологии микроорганизмов и, в частности, в отношении симбиотических систем у протистов могут предоставить целый спектр относительно простых моделей холобионтов, которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях.

### 2.3 Симбионты протистов

Гетеротрофный характер питания, присущий многим протистам, повышает вероятность приобретения эндосимбионтов. Поскольку для протистов клеточный уровень организации совпадает с организменным, применительно к протистам эндоцитобионты одновременно являются эндосимбионтами, и в дальнейшем мы будем использовать именно этот термин. Разнообразие микроорганизмов, заселяющих клетки протистов, очень велико и охватывает как про-, так и эукариотические организмы, которые в принципе могут вступать в симбиотические ассоциации (Reisser et al., 1985). Характер взаимоотношений между протистом и симбионтом варьирует в широком диапазоне, от мутуализма до паразитизма. Например, в большинстве случаев симбиоз протиста с зелеными водорослями взаимовыгоден (Foster, Zehr, 2019), тогда как эндосимбионты, относящиеся к порядкам *Rickettsiales* и *Holosporales*, считаются паразитами (Floriano et al., 2018; George et al., 2020; Husnik et al., 2021). Эндосимбионты могут занимать в клетке хозяина самые разные компартменты: цитозоль, кортикальный слой, ядро, перинуклеарное пространство, ЭПР (Осипов и др., 1996). Цитоплазматические эндосимбионты могут находиться непосредственно в цитозоле клетки-хозяина или могут быть окружены мембраной клетки-хозяина и находиться в особой вакуоли, которую называют симбионтофорной (Осипов и др., 1996). Локализованные в цитозоле эндосимбионты защищены от лизосомной атаки со стороны клетки-хозяина, поскольку вокруг них отсутствуют мембраны, которые могли бы слиться с мембраной лизосом (Fok, Allen, 1998). Внутриядерные эндосимбионты тем более не могут подвергаться действию лизосомных ферментов. Что касается эндосимбионтов, находящихся в вакуолях клетки-хозяина, то механизмы, препятствующие слиянию лизосом с мембраной симбионтофорной вакуоли, практически не изучены. На основании анализа большого объема данных было высказано предположение о существовании двух эволюционных стратегий взаимодействия эндосимбионтов и протистов. Первая стратегия состоит в том, что проникшие в протиста микроорганизмы перестают распознаваться как чужеродные объекты и в наиболее эволюционно продвинутых системах становятся дополнительными органеллами клетки-хозяина. Вторая стратегия заключается в том, что эндосимбионты занимают какой-то безопасный компартмент клетки-хозяина, например, ядро (Осипов и др., 1996).

Отсутствие мембран, окружающих эндосимбионтов в цитоплазме клетки-хозяина, может указывать на тесные симбиотические отношения между двумя организмами. Другим свидетельством устоявшихся взаимоотношений между хозяином и его эндосимбионтом является неспособность последнего к росту вне клетки хозяина в культуральной среде (Eschbach et al., 2009).

#### 2.4 Эндосимбионты амёб

Для большинства свободноживущих амёб характерен гетеротрофный способ питания. Основным источником энергии для них служат бактериальные колонии, одноклеточные водоросли и грибы прудов и озер (Leidy, 1878). Амёбы потребляют огромное количество микроорганизмов, снижая их численность в 1000 раз (Habte, Alexandr, 1978), поэтому они по праву считаются эффективными естественными регуляторами численности водных микроорганизмов. Однако некоторые свободно живущие бактерии, грибы и водоросли могут избегать переваривания в фагосомах амёбы и впоследствии колонизировать ее. Внутри протиста эндосимбионты могут сохраняться и размножаться достаточно долгое время. Биологическое разнообразие эндосимбионтов свободноживущих амёб (*Acanthamoeba sp.*, *Hartmannella sp.*) представлено следующими группами: Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria); Actinobacteria; Firmicutes; Chlamydiae; Bacteroidetes; Ascomycota; *Chlorella* (Смирнов и др., 1995; Ossipov et al., 1997; Horn, Wagner, 2004).

В зависимости от принадлежности симбионтов к разным систематическим группам их количество в клетке-хозяине может существенно варьировать (Horn, Wagner, 2004). Так, количество альфа- и бетапротееобактериальных эндосимбионтов, приходящееся на одну клетку протиста, обычно невелико и может составлять от 5 до 100 клеток (Horn et al., 2002; Horn, Wagner, 2004), в то время как бактерии, относящиеся к филе Bacteroidetes, могут полностью заполнять не только трофозоит, но и цисту амёбы (Horn et al., 2001). Интересно, что эндосимбионты занимают разные компартменты клетки *Acanthamoeba sp.*: альфапротееобактерии преимущественно занимают цитозоль клетки-хозяина, а представители филы *Bacteroidetes* присутствуют в основном в вакуолях протиста (Horn et al., 2001; Horn et al., 2002). Этот факт свидетельствует о независимых эволюционных приспособлениях к одному и тому же хозяину в разных филлах бактериальных эндосимбионтов (Horn, Wagner, 2004). Показано, что представители рода *Acanthamoeba*, помимо того, что сами являются оппортунистическими патогенами человека, играют важную роль в распространении бактериальных инфекций человека (Heinz, et al., 2007; Król-Turmińska, Olender, 2017). Поэтому

амебу, переносчика патогенных микроорганизмов человека, нередко образно называют «троянским конем» (Horn, 2004). В отличие от быстро меняющихся условий внешней среды, амеба предоставляет бактериям место обитания с более стабильными условиями. Постоянно поддерживаемые микроаэробные условия среды внутри клетки-хозяина позволяют эндосимбиотической актинобактерии *Mobilincus curtisii* успешно переживать неблагоприятные условия (Tomov, 1999). Внутри амебы эндосимбионт не только сохраняется, но и активно делится. Сама бактерия не способна жить в аэробных условиях, поэтому попадая в неблагоприятные условия без своего хозяина, эндосимбионты теряют способность размножаться и гибнут. Однако если *M. curtisii* проникает в организм человека, патогенные свойства этой бактерии могут проявляться, вызывая дисфункции мочеполовой системы (Onderdonk et al., 2016). Наиболее изучена ассоциация между факультативным бактериальным патогеном человека *L. pneumophila* и ее хозяином *Acanthamoeba sp.* При попадании в организм человека *L. pneumophila* способна вызывать пневмонию, причем пациент, зараженный легионеллой, не заразен. Амебы способны поселяться в сырых общественных помещениях, вентиляционных ходах, трубах коммуникаций, в ваннных комнатах и больничных кухнях (Kwaik et al., 1998, Yoshida et al., 2018). *L. pneumophila* может инфицировать человека разными путями, в том числе используя *Acanthamoeba sp.* в качестве вектора благодаря способности многих представителей этого рода протистов заселять организм человека при ослаблении функции иммунной системы (Marciano-Cabral et al., 2003). Если заражение опосредовано амебой, то пациент, зараженный легионеллой, не заразен. Альтернативный вариант попадания *L. pneumophila* напрямую в дыхательную систему человека связан со способностью бактерий лизировать клетку-хозяина и распространяться воздушно-капельным путем (Schuster, Visvesvara, 2004). Несмотря на то что бактерия способна расти самостоятельно в среде, образуя биопленки, размножение внутри амебы позволяет *L. pneumophila* лучше распространяться (Horn, Wagner, 2004). Тесный и длительный симбиоз амебы с бактерией привел к коэволюции партнеров, о чем, в частности, свидетельствует горизонтальный перенос генов между партнерами, выявленный при анализе ДНК. Во многих исследованных симбиотических ассоциациях в геноме бактерий рода *Legionella* были обнаружены гены эукариот (Gomez-Valero, Buchrieser, 2019). Другой патогенный представитель эндосимбионтов амеб – *Mycobacterium avium*. Эта бактерия способна выживать внутри протиста и даже существовать между слоями клеточной стенки цисты хозяина. Если этот эндосимбионт амебы попадает в организм человека, может произойти инфицирование альвеолярных макрофагов, что приводит к развитию микобактериозов легочной ткани (Steinert et al., 1998; Busatto et al., 2019). Значительно увеличивать свою численность внутри амебы бактерия не может. По-видимому, это связано либо с низкой скоростью деления *M. avium*, свойственной всем представителям

этого рода, либо с низкой специфичностью симбиотических взаимодействий (бактерия способна поддерживать свою популяцию независимо от протиста и, в отличие от *Legionella pneumophila*, способна заражать человека напрямую, без участия протиста) (Yoshida et al., 2018).

Совершенно иную группу облигатных эндосимбионтов амёб представляют бактерии порядка *Chlamydiales*. Эти бактерии известны прежде всего своей патогенностью по отношению к человеку. Например, *Chlamydia pneumoniae* является возбудителем 10% всех пневмоний, а также причиной большого количества хронических заболеваний, таких как астма и сердечно-сосудистые заболевания (Horn, Wagner, 2004). Эта группа эндосимбионтов характеризуется своим особым жизненным циклом, с двумя различными морфологическими формами. Одна из стадий носит название ретикулярные тельца (РТ). В этой стадии бактерии находятся в метаболически активном состоянии и способны делиться. Из РТ могут формироваться неактивные элементарные тельца (ЭТ). Они не способны к делению, но способны выживать долгое время вне протиста, а при попадании в нового хозяина активироваться, становясь РТ, и по сути являются инфекционной формой бактерии (Greub, 2018).

## 2.5 Эндосимбионты жгутиконосцев

Не менее богаты эндосимбионтами и другие представители Protozoa. К концу прошлого века уже было обнаружено и исследовано 69 видов жгутиконосцев, имеющих эндосимбионтов, в том числе 8, содержащих эндонуклеобионтов, а 9 – с эндосимбионтами в перинуклеарном пространстве (Осипов и др., 1996). Жгутиконосцы способны вступать в эндосимбиоз с различными цианобактериями, причем у многих из них образуются особые структуры для своего эндосимбионта. Например, жгутиконосец *Citharexites apsteinii* формирует на своей поверхности специальные камеры с прозрачными стенками и узким наружным отверстием, достаточным для того, чтобы симбионты могли проникать внутрь (Осипов и др., 1996).

Все обнаруженные эндосимбионты жгутиконосцев имеют грамотрицательный морфотип, и большинство из них обитает в цитоплазме клетки-хозяина. Цитоплазматические эндосимбионты могут находиться как в симбионтофорной вакуоли, так и непосредственно в цитозоле протиста. Эндонуклеобионты, напротив, никогда не встречаются в вакуолях. Интересно отметить, что эндосимбионты, обитающие в перинуклеарном пространстве, не выявляются в шероховатой эндоплазматической сети (шЭПС), несмотря на то что эти две органеллы представляют собой единый по происхождению компартмент (Осипов и др., 1996). Исключение из этого правила было найдено только у одной хризомонады *Paraphysomonas*

*vestita*, у которой бактерии заселяли и перинуклеарное пространство, и шЭПС (Таничев, Карпов, 1992; Осипов и др., 1996).

Все представители Glaucophyceae несут в своей цитоплазме недифференцированные цианобактерии. Благодаря наличию клеточной стенки, пигментному составу и низкой степени зависимости от генома клетки-хозяина, эти эндосимбионты легко отличимы от хлоропластов (Осипов и др., 1996).

## 2.6 Эндосимбионты инфузорий

Разнообразие микроорганизмов, заселяющих клетки инфузорий очень велико, и охватывает практически все про- и эукариотические организмы, которые могут быть симбионтами: бактерии (Görtz, 2010; Sabaneyeva et al., 2018; Fokin et al., 2019), археи (Bruggen et al., 1984; Wrede et al., 2012), одноклеточные водоросли (Kodama, Fujishima, 2005; Šimek et al., 2016; Flemming et al., 2020), дрожжи (Görtz, Dieckmann, 1982; Summerer et al., 2007), микроспоридии (Fokin et al., 2008; Yakovleva et al., 2020). Клетка инфузорий как среда обитания для разнообразных симбиотических микроорганизмов характеризуется рядом уникальных морфологических особенностей: стабильностью внутренней среды, высокой репродуктивной активностью, а также наличием различных крупных компартментов, в которых эндосимбионт может существовать (Görtz, 2001). Все представители инфузорий характеризуются наличием гетероморфного ядерного аппарата, то есть одновременным присутствием в цитоплазме клетки двух ядер – соматического макронуклеуса (Ма) и генеративного микронуклеуса (Ми). Для соматического ядра характерен высокий уровень амплиплоидности (амплификации части генома) и низкая степень конденсации хроматина (Осипов, 1981). Размеры Ма обычно очень велики, и он может иметь разнообразную форму. Наблюдается положительная корреляция между размером инфузории и величиной Ма (Осипов, 1981). Диплоидное генеративное ядро (Ми) обладает высокой степенью компактизации хроматина, и число Ми в клетке инфузории может достигать нескольких десятков. Его размеры обычно невелики, и могут варьировать от нескольких десятых микрона до 10 мкм. При делении инфузории ядерная оболочка у обоих ядер всегда сохраняется, и это способствует поддержанию заражения в ядре, однако во время полового процесса (конъюгации и автогамии) часто происходит элиминация эндосимбионтов в случае заражения Ма. Заражение эндосимбионтами Ми делает инфузорию неспособной к половому процессу (Осипов, 1981).

Как правило, эндосимбионты обитают в специфическом компартменте клетки-хозяина, куда крайне редко попадают не приспособленные к симбиозу бактерии. Например, в Ма инфузории *Paramecium caudatum*, при заражении ее бактерией *Holospora obtusa*, могут

проникать пищевые бактерии *Enterobacter sp.*, однако они не могут длительное время поддерживаться в клетке инфузории и вскоре утрачиваются (Фокин, Сковородкин, 1991).

Сродство эндосимбионта к определенному компартменту клетки может свидетельствовать об эволюционной продвинутой симбиотических взаимодействий между инфузorieй и ее обитателем (Görtz, Fokin, 2009). Вариации в локализации бактериального эндосимбионта — очень необычное явление. Попадание эндосимбионта в другой компартмент инфузории, как правило, является случайным и временным, т.е. через несколько поколений эндосимбионт из него исчезает (Фокин, Сковородкин, 1991). Вместе с тем наряду с эндосимбионтами, обладающими строгой специфичностью к определенному компартменту (то или иное ядро или цитоплазма), существуют реже встречающиеся эндосимбионты, не проявляющие подобной специфичности.

Рассмотрим подробно эндосимбионтов, обитающих в цитоплазме и ядре инфузорий.

#### 2.6.1 Цитоплазматические эндосимбионты инфузорий

Одними из наиболее хорошо изученных эндосимбионтов, обитающих в цитоплазме инфузорий, являются представители рода *Caedibacter*, обладающие граммотрицательным морфотипом и относящиеся к классу гаммапротеобактерий (Beier et al., 2002). Размеры эндосимбионтов, в зависимости от вида (*C. taeniospiralis*, *C. pseudomutans*, *C. paraconjugatus*), могут варьировать в пределах 0.4-1.9 мкм в ширину и 2-4 мкм в длину. Бактерии рода *Caedibacter* способны заселять инфузорий комплекса видов *P. aurelia* (Görtz, Fokin, 2009). Следует отметить, что исходно относившийся к тому же роду вид *C. caryophilus*, обитающий в *Ma P. caudatum*, и вид *C. varicaedens* из цитоплазмы *P. biaurelia* на основании молекулярных данных недавно были переименованы и отнесены к роду *Caedimonas* в составе класса альфапротеобактерий (Schrallhammer et al., 2018).

Все бактерии родов *Caedibacter* и *Caedimonas* неподвижны. Характерной чертой этих бактерий является способность продуцировать так называемые R-тельца (refractile body), получившие свое название из-за способности преломлять свет, что делает их хорошо различимыми при использовании фазового контраста оптического микроскопа (Schrallhammer et al., 2018). Оказалось, что эти тельца являются первопричиной так называемого киллер-эффекта, описанного еще Соннеборном в 1943 году (Sonneborn, 1943). Киллер-эффект заключается в том, что зараженные инфузории выделяют в среду R-тельца, которые, попав в клетку инфузории, не несущую эндобионтов, активируются и вызывают гибель клетки-мишени (Pond et al., 1989).

R-тельца представляют собой скрученные белковые ленты шириной от 0.4 до 0.8 мкм и длиной более 20 мкм. На конце этой ленты часто могут встречаться вирусные капсиды. Было установлено, что часть белков R-лент кодируются геномом бактериофага (Pond et al., 1989). Ленты компактно укладываются в бактериальной клетке и сохраняют скрученную форму до момента активации (Kusch, Görtz, 2005). При попадании в клетку, не несущую бактерий из рода *Caedibacter*, эта лента разворачивается (происходит активация R-тельца) в ответ на падение уровня pH ниже, чем 6.5 (Schrallhammer et al., 2012; Koehler et al., 2019). Активация R-тельца приводит к резким изменениям клетки-мишени: образованию большого абсорбального комка, который, по всей видимости, препятствует нормальному питанию инфузории; нарушению подвижности и появлению вращательного движения; формированию гигантских вакуолей в цитоплазме клетки-мишени; снижению реакций клетки, что, в конечном счете приводит к гибели клетки (Pond et al., 1989; Koehler et al., 2019). Эксперименты с рекомбинантной *Escherichia coli*, продуцирующей R-тельца, подтвердили предположение о том, что разворачивающаяся лента R-тельца служит лишь как средство доставки какого-то неизвестного токсина, поскольку несущие R-тельца *E. coli* не вызывали гибель чувствительного клона инфузорий при попадании в фагосому (Schrallhammer et al., 2012).

Далеко не все бактерии, принадлежащие к одной популяции, содержат R-тельца, количество несущих их бактерий может варьировать от 1% до 35%, а в редких случаях нести R-тельца могут более чем 50% эндосимбионтов, в зависимости от вида симбионта и обилия питания протиста (Preer et al., 1974). Вместе с тем среди эндосимбионтов инфузорий не только *Caedibacter* и *Caedimonas* обладают киллер-эффектом. Бактерии рода *Lyticum* могут заселять цитоплазму тех же инфузорий, что и *Caedibacter* (*P. biaurelia*, *P. tetraurelia*, *P. octaurelia*). Согласно наблюдениям Прира, *Lyticum* обладает токсином, способным лизировать незараженную инфузорию при комнатной температуре менее, чем за 30 минут (Preer et al., 1974). Однако механизм действия токсина, летального для чувствительных клеток, совершенно неясен. Род *Lyticum* имеет очень крупные размеры клетки: 0.6-0.8 мкм в толщину и 3-5 мкм в длину. Эндосимбионты имеют большее количество жгутиков на всей поверхности клетки, однако не способны активно двигаться (Preer et al., 1974; Boscaro et al., 2013в).

Другими достаточно хорошо изученными цитоплазматическими эндосимбионтами инфузорий являются археи. Многие из них способны расщеплять органические вещества в бескислородных условиях с выделением метана (Fenchel, Finlay, 1991). К типичным местам обитания метаногенных архей можно отнести кишечник позвоночных животных (Patra et al., 2017), анаэробные болотные ценозы (Boone, 2015) и донные морские отложения (Milkov, 2004). К метаногенным археям, способным заселять клетки морских инфузорий, обитающих в анаэробных условиях, принадлежит *Methanobacterium formicicum*. Размер симбионта



составляют 2-7 мкм в длину, а его диаметр 0.4 мкм, жгутики отсутствуют. Иногда эндосимбионты образуют цепочки длиной до 6 клеток (Bruggen et al., 1984). Интересно отметить, что *M. formicicum* обнаружен в кишечнике большинства сельскохозяйственных животных (Chellapandi et al., 2018). Метаногенные эндосимбионты были найдены и у многих инфузорий: *Metopus striatus* (Bruggen et al., 1984), *Metopus palaeformis* (Embley, Finlay, 1993) и *Plagiopyla frontata* (Fenchel, Finlay, 1991). Метаногены помогают инфузориям выжить в условиях отсутствия кислорода, предоставляя и метаболические преимущества (Fenchel, Finlay, 1991). Анаэробные инфузории не имеют в своей цитоплазме митохондрий, которые, по всей видимости, исчезли в ходе эволюции из-за своей непригодности в анаэробных условиях, а их место заняли гидрогеносомы, в которых происходит преобразование пирувата в углекислый газ, ацетат и водород (Müller, 1972; Bruggen et al., 1984). На одну клетку инфузории *Plagiopyla frontata* приходится около 5000 гидрогеносом и 3500 эндосимбионтов-метаногенов (Fenchel, Finlay, 1991). При исследовании цикла размножения метаногенных эндосимбионтов было выяснено, что их деление непосредственно связано с делением клетки-хозяина. Гидрогеносомы делятся в основном во время инициации деления клетки, в то время как метаногенные бактерии синхронно удваивают свою численность на последней стадии деления инфузории, т.е. деление бактерий находится под контролем клеточного цикла клетки-хозяина (Fenchel, Finlay, 1991).

Непрерывно ведущийся в последнее время поиск новых эндосимбиотических систем у инфузорий привел к выявлению большого числа ранее неизвестных прокариотических эндосимбионтов, обитающих в цитоплазме различных инфузорий. Так, в последнее время были обнаружены *Ca. Fokinia solitarium* у инфузории *Paramecium spp.* (Szokoli et al., 2016), *Ca. Bealeia paramacronuclealis* у *P. biaurelia* (Szokoli et al., 2016), *Ca. Megaira venefica* у *P. bursaria*, *P. nephridiatum*, *P. putrinum* (Lanzoni et al., 2019), *Ca. Mystax nordicus* у *P. nephridiatum* (Korotaev et al., 2020), *Ca. Pinguicoccus supinus* у *Euplotes vanleeuwenhoekii* (Serra et al., 2020).

Другие не менее интересные эндосимбионты инфузорий, обитающие в цитоплазме, относятся к группе фототрофных эукариотических организмов. Наиболее полно исследована симбиотическая ассоциация инфузории *P. bursaria* и зеленой водоросли *Chlorella* (Kodama, Fujishima, 2009; Esteban et al., 2010). Находящаяся в цитоплазме клетки-хозяина водоросль способна к фотосинтезу, если инфузорий культивируют в условиях достаточного освещения. Следует отметить, что необходимый для фотосинтеза углекислый газ поступает хлорелле не только из среды, в которой культивируют инфузорию, но и из самой клетки-хозяина. Образующиеся в результате фотосинтеза сахара и кислород высвобождаются в цитоплазму инфузории. При отсутствии освещения количество эндосимбионтов резко снижается, так как вакуоли, содержащие хлорелл, сливаются с лизосомами, и их содержимое переваривается. *P. bursaria* питается не только за счет своих эндосимбионтов, но, как и все инфузории, способна

поглощать и переваривать бактерий из среды, поэтому в темных условиях инфузория также способна успешно выживать (Kodama, Fujishima, 2009; Esteban et al., 2010).

Во многих клонах *P. bursaria* обнаружены вирусы, способные заселять клетки хлорелл. Вирусы не проникают в клетку инфузории, несущей хлореллы, и располагаются на ее поверхности в ресничных карманах в области буккальной полости (Yamada et al., 2006). Если инфузория по какой-либо причине гибнет, хлореллы высвобождаются во внешнюю среду, где и заражаются вирусами. Через 24-48 часов после заражения хлорелла погибает, высвобождая во внешнюю среду вирусные капсиды, которые вновь ассоциируются с поверхностью *P. bursaria* (Yashchenko et al., 2012). Используя подобную стратегию, вирусы после гибели каждой инфузории высвобождают около 300000 новых вирусных частиц, что позволяет им поддерживать свою высокую концентрацию во внешней среде (Van Etten et al., 1991).

## 2.6.2 Внутрядерные эндосимбионты инфузорий

### Бактерии рода *Holospora*, порядок *Holosporales*

Эндосимбионты из рода *Holospora* – наиболее изученные из всех эндонуклеобионтов парамеций. Они встречаются только в инфузориях рода *Paramecium*, который насчитывает около 20 видов. Сейчас известно уже более 10 видов бактерий рода *Holospora*, все они относятся к классу альфа-протеобактерий и не обладают киллер-эффектом. Холоспора может заселять Ма или Ми инфузории, заполняя его полностью (Fokin, Görtz, 2009). Для этого внутрядерного эндосимбионта характерно наличие двухфазного жизненного цикла. Физиологически активная репродуктивная форма бактерии имеет небольшие размеры (2-3 мкм в длину, менее 1 мкм в толщину) и не способна заражать нового хозяина. Инфекционная форма обладает большими размерами (до 25 мкм в длину, около 1 мкм в ширину) и при попадании в новую клетку-хозяина способна ее инфицировать. Ни одна из форм бактерии не может поддерживаться вне своего хозяина, даже в сбалансированной среде, т.е. для бактерий симбиотические отношения являются облигатными. Однако инфекционные формы многих видов *Holospora* сохраняют свою инфекционность в течение 6 месяцев при криоконсервации при -85° (Fujishima et al., 1991; Millot, Kaltz, 1996; Kawai, Fujishima, 1996, Fujishima, Kodama, 2012). Эндосимбионты рода *Holospora* имеют не только видовую специфичность в отношении хозяина, но и специфичность в отношении ядра, локализуясь либо только в Ма, либо в Ми (Fokin, 1993; Fokin, Görtz, 2009). Так, *H. undulata* и *H. obtusa* встречаются только у *P. caudatum*, первая в Ми, а вторая - в Ма, тогда как *H. acuminata* и *H. curviuscula* являются эндосимбионтами *P. bursaria* и занимают, соответственно, Ми и Ма.

*H. obtusa* является хорошим модельным объектом для изучения взаимоотношений между эндосимбионтом и клеткой-хозяином, поскольку как и все представители рода, обладает высокой инфекционной способностью. Инфекционная форма попадает в клетку хозяина путем фагоцитоза, но ей удается избежать лизосомной атаки со стороны клетки-хозяина благодаря своей способности покинуть пищеварительную вакуоль в ответ на закисление содержимого вакуоли, вызванное слиянием последней с ацидосомами (Fokin, Görtz, 2009). Затем она окружается уплощенными везикулами, несущими рибосомы, которые образуют вторичную транспортную везикулу. Бактерия способна проникать внутрь Ма благодаря слиянию мембран вторичной транспортной везикулы и мембран ядерной оболочки клетки-хозяина, процессу, получившему в отечественной литературе название «шлюзование» (Ossipov et al., 1977; Görtz, 1989). В Ма инфекционная форма начинает делиться, образуются репродуктивные формы, которые впоследствии дифференцируются в инфекционные. После деления зараженной инфузории инфекционные формы симбионта попадают в остаточное тело и позже могут выводиться в среду через порошицу. Репродуктивные формы бактерии *H. obtusa* остаются в соматическом ядре инфузории, делятся и могут дифференцироваться, вновь образуя формы, способные заражать новые клетки (Görtz, 2001).

Филогенетический анализ последовательности 16S рНК эндосимбионтов из рода *Holospira* показал, что филогенетически они близки к риккетсиям, и в настоящее время их выделяют в семейство *Holosporaceae* в порядок *Holosporales* однако в литературе все еще ведется дискуссия относительно их родства с порядком *Rickettsiales* или порядком *Rhodospirillales* (Castelli et al., 2019; Schrallhammer, Potekhin, 2020).

#### Холоспороподобные бактерии

В последнее время принято выделять группу внутриядерных холоспороподобных бактерий (*Holospira*-like bacteria, HLB), к ним относится – *Ca. Gorzia infectiva* (Boscaro et al., 2013a), *Ca. Gorzia schahrazadis* из макронуклеуса *Paramecium multimicronucleatum* (Serra et al., 2016), *Ca. Gorzia yakutika* из макронуклеуса *P. putrinum* (Beliavskaia et al., 2020), *Ca. Hafkinia simulans* из макронуклеуса инфузории *Frontonia salmastra* (Fokin, 2019) и *Ca. Preeria caryophila*, ранее известная как *Holospira caryophila* (Potekhin et al., 2018), которая встречается у нескольких представителей комплекса видов *P. aurelia*. С бактериями рода *Holospira* этих бактерий объединяет наличие двух морфологических форм в жизненном цикле, наличие инвазивного кончика у инфекционной формы и внутриядерная локализация. В то же время они обладают некоторыми чертами, отличающими их от бактерий рода *Holospira*: у них нет строгой видовой хозяйинной специфичности, но они являются исключительно

макронуклеарными эндосимбионтами и никогда не встречаются в Ми. Интересно, что в противоположность холоспорам холоспороподобные бактерии иногда встречаются в цитоплазме клетки-хозяина, что может быть адаптацией эндосимбионта к конъюгации и автогамии клетки-хозяина, которая позволяет ему заселять вновь образовавшийся зачаток макронуклеуса.

#### Другие внутриядерные эндосимбионты

Особый случай представляет собой *Ca. Paraholospira nucleivisitans*, которая имеет лишь отдаленное родство с бактерией *Holospira obtusa* и существенно отличается от последней по своей биологии. Наиболее важным отличием является отсутствие в жизненном цикле инфекционной формы, которая типична для бактерий рода *Holospira* и, таким образом, *Ca. P. nucleivisitans* не обладает способностью инфицировать новых инфузорий. Поэтому в настоящее время эту бактерию не относят к холоспороподобным бактериям (Schrallhammer, Potekhin, 2020). Обнаружен этот эндосимбионт в тропической инфузории *P. sexaurelia* способен заселять как цитоплазму, так и Ма клетки-хозяина (Eschbach et al., 2009), причем наиболее часто бактерия встречается либо в цитоплазме, либо в Ма. В последнем случае в цитоплазме если и остается, то всего несколько бактерий. Эта бактерия имеет толщину 0.4 - 0.8 мкм, а длину до 25 мкм, и слегка изогнутую форму. Как и большинство эндосимбионтов инфузорий, она имеет грамтрицательный морфотип клетки и чувствительна к антибиотику канамицину (Eschbach et al., 2009). В отличие от бактерий рода *Caedibacter*, *P. nucleivisitans* не обладает киллер-эффектом.

Для *P. sexaurelia* характерна автогамия, в результате которой образуется новый Ма, но эндосимбионту *P. nucleivisitans* этот процесс никак не вредит. В отличие от многих других бактерий, которые иногда элиминируются из Ма при автогамии, симбионт *Paraholospira* перед началом этого процесса мигрирует в Ма, а после формирования нового соматического ядра выходит в цитоплазму (Eschbach et al., 2009).

Другой обитатель Ма инфузорий *P. caudatum* – бактерия *Nonospora macronucleata*. Как и большинство бактериальных эндосимбионтов, она имеет грамтрицательный морфотип клетки. Наиболее часто выявляемая форма этих бактерий – палочковидная, длиной около 1 мкм и толщиной около 0,2 – 0,3 мкм. Кроме этой формы, в Ма встречаются длинные цепочки делящихся клеток до 10 мкм и малочисленные бактерии длиной до 5 мкм. Эндонуклеобионт не имеет жгутиков и инфекционной формы (Фокин и др., 1987). Эти бактерии локализованы в основном в центральной части Ма, при этом около них не обнаруживается компактизированного хроматина. При конъюгации хозяина эндосимбионт сохраняется.

Зараженные клетки не проявляют киллер-эффекта, а приготовленный из них гомогенат обладает слабой инфекционной потенцией (Фокин и др., 1987).

Совершенно уникальный случай представляет собой подвижная бактерия, обитающая в Ма инфузории вида *P. multimicronucleatum*, описанная в клонах, выделенных из природных популяций в США и Молдове (Vishnyakov, Rodionova, 1999). Этот эндосимбионт способен передвигаться внутри Ма благодаря большому количеству жгутиков, длина которых может достигать 10 мкм, а толщина около 20 нм. Эндосимбионт имеет две разные морфологические формы: палочковидную (длина 2 - 2.5 мкм, толщина 0.4 – 0.6 мкм) и овальную (длина 1.3 – 1.8 мкм, толщина 0.4 – 0.6 мкм). Внутри Ма они движутся со скоростью 10 – 15 мкм/сек, а в среде их скорость увеличивается до 20 мкм/сек. Иногда обнаруживаются неподвижные формы этой бактерии, имеющие длину 2-2.5 мкм и толщину 1.5-2 мкм. При добавлении в среду антибиотика ампициллина нередко наблюдается образование септированных форм и потеря подвижности симбионтов, причем в ряде случаев авторы отмечали образование нитчатых форм длиной до 75-80 мкм. Было установлено, что гомогенат, полученный из зараженных инфузорий, не обладает инфекционной способностью, однако экспериментальное заражение можно осуществить путем микроинъекции бактерий в Ма (Vishnyakov, Rodionova, 1999). Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с олигонуклеотидными зондами, специфичными к участкам последовательностей 16S рРНК, было показано, что внутриядерный подвижный эндосимбионт инфузории *P. multimicronucleatum* относится к Eubacteria, но не принадлежит к роду *Holospora* (Vishnyakov, Rodionova, 1999).

## 2.7 Риккетсии и риккетсиоподобные бактерии

Представители порядка *Rickettsiales*, согласно руководству по систематике прокариот Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), относятся к классу альфапротеобактерий, имеют грамтрицательный морфотип, и способны размножаться только в клетках эукариот (Dumler et al., 2015). В связи с внутриклеточным образом жизни риккетсий метаболическая кооперация между этими бактериями и хозяином выражена крайне сильно. Жизненный цикл подавляющего большинства представителей порядка *Rickettsiales* может быть разделен на две стадии. Большую часть времени бактерия проводит внутри клетки хозяина, в ней же происходит и репликация. На внеклеточной стадии бактерии, как считалось ранее, ведут поиск нового хозяина и не способны к делению. Однако недавно был обнаружен эктосимбионт инфузории *Paramecium primaurelia*, который, согласно результатам филогенетического анализа, относится к порядку *Rickettsiales*. Показано, что эта бактерия, получившая название *Ca. Deianiraea vastratrix*, на протяжении всего жизненного цикла остается связанной с наружной

поверхностью кортекса инфузории-хозяина и способна делиться за пределами клетки-хозяина. Внутри клетки-хозяина бактерия никогда не обнаруживалась. Столь удивительные свойства этой бактерии, не наблюдавшиеся ранее у представителей *Rickettsiales*, заставили внести существенные корректировки в описание всего порядка и выделить в его составе семейство *Ca. Deianiraceae* (Castelli et al., 2019).

В порядок *Rickettsiasles* входят бактерии, способные вызывать серьезные заболевания человека, такие как *Rickettsia rickettsii* (возбудитель пятнистой лихорадки Скалистых гор) и *Rickettsia prowazekii* (возбудитель эпидемического тифа) (Walker, Ismail, 2008). Долгое время интерес к риккетсиям сводился к исследованию небольшой группы патогенных представителей, в основном принадлежащих роду *Rickettsia*. Позднее обнаруженное родство митохондрий и риккетсий вызвало всплеск интереса к изучению филогении и эволюции этих бактерий (Anderson et al., 1998). В дальнейшем бактерии, входящие в порядок *Rickettsiasles*, но не относящиеся к роду *Rickettsia*, получили название риккетсиоподобные бактерии (РПБ). Большая часть РПБ не связана с кровососущими членистоногими — паразитами млекопитающих, а заселяет очень широкий спектр водных организмов, в том числе протистов (Schrallhammer et al., 2013; Castelli et al., 2016; Castelli et al., 2019).

В настоящее время в составе порядка *Rickettsiales* выделяют два хорошо изученных семейства *Rickettsiaceae* и *Anaplasmaeae*, и два новых, недавно описанных семейства, *Ca. Midichloriaceae* (Montagna et al., 2013) и *Ca. Deianiraceae* (Castelli et al., 2019). Семейство *Holosporaceae*, еще недавно рассматривавшееся как принадлежащее порядку *Rickettsiales*, в настоящее время из него исключено и отнесено к сестринскому порядку *Holosporales* (Potekhin, Schrallhammer, 2021). Поскольку представители семейства *Anaplasmaeae* инфицируют лишь многоклеточных животных и не обнаружены у протистов (Castelli et al., 2016; Castelli et al., 2019), здесь мы его рассматривать не будем и ограничимся более подробным описанием некоторых представителей двух других семейств, *Ca. Midichloriaceae* и *Rickettsiaceae*.

### 2.7.1 Семейство *Ca. Midichloriaceae*

Семейство *Ca. Midichloriaceae* выделено недавно как отдельное семейство в составе порядка *Rickettsiales*. Представители этого семейства способны заселять очень широкий спектр многоклеточных организмов: пластинчатых (Driscoll et al., 2013), стрекающих (Fraune, Bosch, 2007), клещей (Epis et al., 2008), вшей (Matsuura et al., 2012), клопов (Richard et al., 2009), слепней (Hornok et al., 2008), а также рыб (Cafiso et al., 2015) и млекопитающих (Bazzocchi et al., 2013), в том числе человека (Mediannikov et al., 2004). Представители семейства *Midichloriaceae* обнаружены также в клетках амёб (Fritsche et al., 1999) и инфузорий (Boscaro et al., 2013);

Szokoli et al., 2016). Первым представителем этого семейства, получившим формальное описание, был вид *Ca. Midichloria mitochondrii*, обнаруженный в тканях клеща *Ixodes ricinus*, в слюнных железах и, в большей мере, в ооцитах. Вид получил свое название благодаря своей способности инфицировать митохондрии клеток хозяина (Sassera et al., 2006). Влияние этой бактерии на митохондрии ооцита хозяина пока остается до конца не понятным. Однако по самым новым данным, полученным в результате математического моделирования, бактерия не оказывает негативного влияния на митохондрии (Comandatore et al., 2021). Интересно, что в большинстве случаев деление бактерии происходит за пределами митохондрии, при этом вероятность обнаружения симбионта в митохондрии увеличивается по мере созревания ооцита клеща (Comandatore et al., 2021). Необходимо отметить, что, вопреки долгое время господствовавшему в микробиологии представлению о том, что все представители порядка *Rickettsiales* лишены жгутиков, в геноме этого вида было обнаружено 26 генов, кодирующих различные части жгутикового аппарата бактерий (Sassera et al., 2011).

Поскольку при изучении болезни «красных пятен» радужной форели была обнаружена бактерия, филогенетически близкая *Ca. M. mitochondrii*, а сама болезнь часто сопровождалась одновременным поражением паразитической инфузурией *Ichthyophthirius multifiliis*, было высказано предположение о том, что инфузория может служить вектором для переноса бактерии (Zaila et al., 2017). В ходе проведенных экспериментов было установлено, что инфузория может, по крайней мере, временно заражаться этой бактерией от больных рыб и передавать эту инфекцию своему потомству (Pasqualetti et al., 2021). Изучение этой болезни представляет как научный, так и практический интерес, поскольку поражается значительное количество форели в искусственных водоемах и садках, а высокая плотность содержания рыб существенно ускоряет распространение болезни (Howell et al., 2019).

К представителям семейства *Midichloriaceae*, хозяевами которых могут выступать протисты, относятся *Ca. Bandiella* (Senra et al., 2016), *Ca. Jidaibacter acanthamoebae* (Fritsche et al., 1999), *Ca. Anadelfobacter* (Vannini et al., 2010), *Ca. Cyrtobacter* (Vannini et al., 2010; Boscaro et al., 2013б), род *Lyticum* (Boscaro et al., 2013в), *Ca. Defluviella procrastinata* (Boscaro et al., 2013б), *Ca. Fokinia* (Szokoli et al., 2016). Интересно, что из всех перечисленных выше бактерий род *Ca. Bandiella* занимает особое положение, поскольку помимо инфузурий и эвгленовых, может заражать различных многоклеточных, в том числе губок (Longford et al., 2007), пластинчатых (Driscoll et al., 2013) и книдарий (Fraune, Bosch, 2007). Единственный формально описанный вид из этого рода - *Ca. Bandiella woodruffi*, обнаруженная в цитоплазме инфузории *Euplotes woodruffi* (Senra et al., 2016).

*Ca. Jidaibacter acanthamoebae* является эндосимбионтом амебы *Acanthamoeba keratitis*, вызывающей кератит роговицы глаза у человека (Fritsche et al., 1999). Секвенирование генома

этой бактерии позволило выявить 35 генов, кодирующих белки жгутика, хотя самих жгутиков эта бактерия не имеет. Поскольку геном одного из клонов этой бактерии оказался довольно большим (2,4 Мб) и имел довольно большое число генов общих со свободноживущими альфапротеобактериями, некоторые исследователи предположили, что этот вид может быть промежуточным звеном между свободноживущими и симбиотическими альфапротеобактериями (Schultz et al., 2016). Виды родов *Ca. Anadelfobacter* и *Ca. Cyrtobacter* ассоциированы с видами инфузорий *Euplotes harpa*.

### 2.7.2 Семейство *Rickettsiaceae*

В семейство *Rickettsiaceae* долгое время были включены только роды *Rickettsia* и *Orientia*, а также недавно описанный род *Ca. Megaira* (Schrallhammer et al., 2013). В роды *Rickettsia* и *Orientia* входят в основном патогены млекопитающих, в том числе человека. Попадая в организм хозяина, бактерии заселяют и повреждают клетки, что может приводить к различным патологическим состояниям для хозяина в целом. Горизонтальный перенос патогенных риккетсий осуществляется в результате укуса кровососущими членистоногими: клещами, вшами и блохами. С представителями этих родов связаны такие тяжелые инфекционные болезни человека, как пятнистая лихорадка Скалистых гор (*R. rickettsii*), марсельская лихорадка (*R. conorii*), эпидемический сыпной тиф (*R. prowazekii*), эндемический тиф (*R. typhi*), лихорадка цуцугамуши (*O. tsutsugamushi*) и другие (Gillespie et al., 2007). В настоящее время многое известно о природных резервуарах, векторах и патологиях, вызванных риккетсиями. Однако другие представители семейства *Rickettsiaceae*, не патогенные для человека, к сожалению, весьма плохо изучены. В то же время изучение других родов в пределах семейства *Rickettsiaceae* позволило бы получить более полную информацию о механизмах взаимодействия риккетсий с эукариотическими клетками.

Представители семейства *Rickettsiaceae*, не патогенные для человека, обнаружены в клетках многоклеточных животных, таких как членистоногие (Gottlieb et al., 2012), стрекающие (Fraune, Bosch, 2007), пиявки (Kikuchi Y., et al., 2002), в клетках растений (Davis et al., 1998) и у протистов (Vannini et al., 2004).

Одной из первых риккетсиоподобных бактерий (РПБ), вступающих в симбиотические отношения с инфузориями, был *Ca. Cryptoprodotis polytropus*, обнаруженный в цитоплазме инфузории *Pseudomicrothorax dubius* (Ferrantini et al., 2009). Эта бактерия не окружена мембраной клетки-хозяина, живет и делится в цитоплазме и не обладает жгутиками и способностью к движению. Особенностью данной симбиотической системы является неполное заражение — ей инфицированы только 90% *P. dubius* исследованного клона. По мнению автора,



частичное заражение инфузорий свидетельствует о том, что эта бактерия не является необходимой для протиста и представляет собой высоко инфекционного паразита (Ferrantini et al., 2009).

Род *Ca. Megaira* описан и включен в семейство *Rickettsiaceae* совсем недавно, в 2005 году. Первым описанным у инфузорий представителем этого рода является эндосимбионт инфузории *Diophrys oligothrix* (Vannini et al., 2005). Позднее представители этого рода были обнаружены и у других видов инфузорий, таких как *Euplotes octocarinatus*, *Paramecium caudatum*, *P. primaurelia*, *P. bursaria*, *Spirostomum minus* (Schrallhammer et al., 2013; Lanzoni et al., 2019), а также у вампирелидной амебы *Hyalodiscus flabellus* (Hess, 2017). Бактерии рода *Ca. Megaira* могут вступать в симбиотические ассоциации и с многоклеточными организмами: стрекающими (Fraune, Bosch, 2007), зелеными водорослями (Hollants et al., 2013), асцидиями (Dishaw et al., 2014), рыбами (Miyake et al., 2016) и кольчатыми червями (Murakami et al., 2017). В настоящее время в род *Ca. Megaira* включены два вида эндосимбионтов, *Ca. Megaira polyxenophila* (Schrallhammer et al., 2013) и *Ca. M. venefica* (Lanzoni et al., 2019). Если первый вид обнаруживается в зависимости от вида хозяина как в цитоплазме (*P. primaurelia*), так и в макронуклеусе (*P. caudatum*), то второй вид – исключительно в цитоплазме клетки-хозяина (*P. bursaria*, *P. nephridiatum*, *P. putrinum*). Различия в локализации *Ca. M. polyxenophila* могут быть связаны с наличием аутогамии у *P. aurelia*, что делает невозможным стабильно заселять Ма (Potekhin et al., 2018).

Размер бактерии существенно варьирует даже в пределах одного вида. Так, длина *Ca. M. polyxenophila*, обитающей в цитоплазме одного из клонов инфузории *P. primaurelia*, в три раза превышает длину бактерий этого же вида из других клонов (Lanzoni et al., 2019). Необходимо отметить, что изменчивость размера в пределах вида в целом характерна для риккетсий. Например, длина *R. prowazeki* может варьировать от 4 до 10 мкм (Anderson et al., 1965).

## **2.8 Современные направления исследований симбиозов между протистами и другими микроорганизмами**

Современные исследования симбиотических систем, образованных протистами и другими микроорганизмами, затрагивают три основных аспекта проблемы симбиоза: эволюционный, экологический и цитологический (клеточно-биологический). Иными словами, они направлены на выяснение роли, которую симбиотических системы играют в процессе эволюции, на изучение экологических последствий образования симбиотических ассоциаций или посвящены выявлению тонких механизмов взаимодействия партнеров внутри симбиотической системы.

### 2.8.1 Эволюционный аспект проблемы симбиоза между протистами и другими микроорганизмами

Взаимодействие организмов друг с другом может служить мощным фактором взаимной эволюции хозяина и симбионта, приводящей к образованию новых таксономических групп (López-García et al., 2017). Во многих экосистемах симбиозы являются основой для ее функционирования и протекания эволюционных процессов. Симбиозы позволяют как хозяину, так и симбионту заселять недоступные им порознь ниши. В некоторых случаях взаимосвязь между хозяином и симбионтом становится настолько прочная, что их можно рассматривать как единую эволюционную единицу, например, архею и бактерию, образовавших эукариотическую клетку (Fisher et al., 2017).

Эволюционный процесс связан с глубиной кооперации симбионта и хозяина и зависит от преимуществ, которые они получают от взаимодействия друг с другом. Взаимосвязь симбионта и хозяина происходит на морфологическом, физиологическом и генетическом уровнях. Чем больше метаболических и экологических связей между партнерами в симбиотической ассоциации, тем в большей зависимости друг от друга они будут находиться (Estrela et al., 2016).

В результате симбиоза происходит редукция бактериального генома. Например, бактерии рода *Desulfovibrio* встречаются как в виде свободно живущих, так в симбиотической кооперации с протистом *Trichonympha collaris*. Размер генома эктосимбионтов составляет 1.4-1.6 млн п.н., при этом геном свободно живущих бактерий того же вида составляет 2.9-3.7 млн п.н. (Takeuchi et al., 2020).

Главной сложностью изучения процессов редукции генома является невозможность культивирования многих симбионтов вне клетки-протиста. Одна из немногих симбиотических ассоциаций, позволяющих оценить редукцию генома эндосимбионта в связи с его переходом к симбиотическим отношениям, является ассоциация между инфузорией *Euplotes* и бактерией *Polynucleobacter*. Данная симбиотическая система известна долгое время и привлекала внимание исследователей в первую очередь ввиду облигатного характера взаимоотношений между партнерами (Neckmann, 1975). Утрата эндосимбионта приводит к остановке деления и гибели инфузории. Это связывают с тем, что при потере эндосимбионта у инфузории нарушается углеводный обмен, что проявляется в виде накопления гранул гликогена в цитоплазме (Vannini et al., 2007). Недавно обнаруженная свободноживущая форма бактерии *Polynucleobacter* позволила оценить процесс редукции генома бактерии в ходе облигатного симбиоза. В среднем размер генома свободноживущей формы *Polynucleobacter* составляет более 2000 т.п.н., в то время как размер генома эндосимбиотической формы бактерии в среднем

составляет 1800 т.п.н. Вместе с уменьшением размера генома уменьшается и количество генов, кодирующих белки (Boscaro et al., 2017). Интересно отметить, что скорость редукции генома многих бактериальных симбионтов коррелирует с частотой мутаций (Bourguignon et al., 2020).

Несмотря на то что склонность генома симбионтов протистов к редукции считается установленной, остается малопонятно, какие процессы обуславливают редукцию генома, как редукция сказывается на его структуре, и есть ли различия в редукции генома протистов и многоклеточных организмов. Потеря функции того или иного гена у симбионта достаточно легко объяснима: в процессе симбиотического взаимодействия симбионт теряет необходимость поддерживать часть фенотипических признаков, что приводит к ослаблению давления отбора в отношении этих признаков. В результате мутации, возникающие в генах, отвечающих за эти признаки, сохраняются, что в свою очередь приводит к дисфункции продуктов этого гена (Boscaro et al., 2017). Например, в ходе симбиоза часто происходит утрата жгутикового аппарата у симбиотических бактерий (Husnik et al., 2021). Намного более неожиданна редукция генов, кодирующих компоненты энергетического обмена симбионта, в частности, АТФ/АДФ транслоказы. По мнению ряда исследователей, это связано с получением АТФ напрямую от клетки-хозяина (Moran, Bennett; 2014; Mehari et al., 2016; George et al., 2020).

Нуклеотидная последовательность гена, утратившего свои функции, может сохраняться в геноме симбионта долгое время. В результате в геноме симбионта происходит накопление различных нефункциональных остатков генов, что может привести к вымиранию небольших закрытых популяций. Данный механизм получил название храповик Мюллера, он играет существенную роль в эволюционном процессе. Его возникновению способствуют нарушения функционирования систем рекомбинации и репарации ДНК симбионта (Naito, Pawlowska, 2016).

В ходе длительного симбиоза некоторые прокариоты сформировали группу «профессиональных» симбионтов. Эти организмы адаптированы к симбиотическим отношениям, в большинстве случаев образуют облигатные симбиотические ассоциации и способны заражать широкий спектр хозяев. К «профессиональным» симбионтам относят следующих прокариот: представителей порядков Rickettsiales (Floriano et al., 2018) и Holosporales (George et al., 2020), бактерий из группы Cyanobacteria (Hilton et al., 2013; Nakayama, Inagaki, 2017; Nowack et al., 2018), виды *Polynucleobacter* (Boscaro et al., 2017), *Kinetoplastibacterium* (Harmer et al., 2018), *Arcobacter sp.* (Hamann et al., 2016), *Desulfarcum epimagneticum* (Monteil et al., 2019), *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum* (Lind et al., 2018), *Methanobacterium* (Veinart et al., 2018). Геном «профессиональных» симбионтов компактный, упорядоченный, содержит незначительное количество некодирующих последовательностей и мобильных элементов. Однако в геноме сохраняется большое количество рекомбинантной ДНК

и системы репарации (George et al., 2020). Некоторые «профессиональные» симбионты обладают инфекционной способностью, например, представители семейств *Holospiraceae* (Ossipov, Podlipaev, 1977) и *Chlamydiaceae* (Taylor-Brown et al., 2015). В отличие от животных, протисты обладают более высокой скоростью размножения по причине отсутствия эмбриональной и постэмбриональной стадии, что приводит к более быстрой редукции генома эндосимбионтов (Mira, Moran, 2002).

По мнению исследователей, именно из «профессиональных» симбионтов протистов сформировались постоянные органеллы, такие как митохондрии, пластиды и хроматофоры протиста *Paulinellachromatophora* (Husnik et al., 2021). Пластиды – это органеллы, благодаря которым в растительных клетках осуществляется фотосинтез. Обнаруженные у эукариот пластиды могут быть подразделены на 3 группы: первичные, вторичные, третичные. Первичные пластиды обнаружены у большинства водорослей и у высших растений, а вторичные и третичные, окруженные тремя и более мембранами, встречаются у различных планктонных организмов, таких как диатомовые водоросли или динофлагелляты (Chan, Bhattacharya, 2010).

Возникновение первичных пластид произошло около 1.5 миллиардов лет назад (Hedges et al., 2004). Они произошли в результате поглощения гетеротрофным протистом свободно живущей цианобактерии, которой удалось выжить в пищеварительной вакуоли (Margulis, 1970; Kutschera, Niklas, 2005). Впоследствии окруженный двумя мембранами (мембраной фагосомы и собственной плазматической мембраной) эндосимбионт потерял часть генома и получил возможность передаваться вертикально следующим поколениям клетки-хозяина. В результате подобного процесса могла обособиться предковая ветвь эукариот, давшая начало царству Растения, которое включает в себя водоросли и высшие растения (Rodriguez-Ezpeleta et al., 2005; Chan, Bhattacharya, 2010). Благодаря использованию методов молекулярной филогении удалось установить, что пластиды растений произошли от цианобактерий в результате переноса части генома эндосимбионта в ядро клетки-хозяина (Bhattacharya et al., 2004; Rodriguez-Ezpeleta et al., 2005; Weber et al., 2006).

В то время как симбиоз с участием цианобактерий объясняет происхождение первичных пластид растений, многие фототрофные протисты, как правило, обладают вторичными пластидами, что существенно усложняет их исследование. Исключением из этого правила является амеба *Paulinella chromatophora*, несущая в своей цитоплазме хроматофоры – органеллы, выполняющие функцию пластид, но возникшие в эволюции существенно позже. Молекулярные исследования 18S рРНК *P. chromatophora* позволили датировать появление хроматофора в диапазоне от 90 до 140 млн лет тому назад (Delaye et al., 2016). Хроматофор имеет U-образную форму и произошел от цианобактерии рода *Synechococcus* (Marin et al.,

2005). Интересно отметить, что ближайший родственник *P. chromatophora*, *P. ovalis*, не имеет пластид, обладает гетеротрофным способом питания и ее основным пищевым объектом являются цианобактерии (Lee et al., 2019). Поэтому независимое происхождение первичных пластид у *P. chromatophora* может служить хорошим примером образования органелл вследствие фаготрофного способа питания.

В отличие от растений и *P. chromatophora*, обладающих первичными пластидами, появление вторичных пластид у других фототрофных эукариот происходило в результате вторичного симбиоза. Вторичные пластиды окружены тремя или четырьмя мембранами, сохранившимися в результате поглощения гетеротрофным эукариотом эукариота, содержащего пластиды. Среди исследователей существуют разные точки зрения относительно появления вторичных пластид у эукариот. Данные, полученные в результате генетического анализа, свидетельствуют о том, что в ходе эволюции эукариот вторичный симбиоз с зелеными водорослями возник дважды, в результате чего возникли две группы – эвгленовые и группа *Chlorarachnea* (Archibald, 2015). Относительно поглощения эукариотом красной водоросли мнения исследователей расходятся. Согласно гипотезе о монофилетичности таксона *Chromalveolata*, это событие произошло лишь однажды (Cavalier-Smith, 1999), причем впоследствии часть организмов этой группы (например, инфузории и оомицеты) эти пластиды потеряли. По другой гипотезе возникновение пластид в некоторых группах происходило в результате последующего третичного симбиоза (Archibald, 2015), явления, встречающегося у динофлагеллят.

Отличительной чертой органелл является передача хозяину части генетической информации, вследствие чего органелла теряет самостоятельность и попадает в зависимость от белок синтезирующего аппарата клетки-хозяина. Вместе с тем многие симбионты находятся еще на начальных этапах интеграции с протистом и поэтому сохраняют частичную независимость. Например, бактерии *Ca. Kinetoplastibacterium crithidii*, заселяющие трипаносоматиду *Angomonas deanei*, осуществляют незначительный импорт белка из клетки-хозяина (Morales et al., 2016) и синхронизировали свой цикл деления с клеточным циклом хозяина, что позволяет симбионтам распределяться между дочерними клетками хозяина (Catta-Preta et al., 2015). Это стирает грань между понятиями эндосимбионт и органелла. Многие диатомовые водоросли могут образовывать симбиотические ассоциации с азотфиксирующими цианобактериями. Так, у пресноводных диатомовых водорослей из родов *Rhopalodia* и *Epithemia* описаны так называемые сфероидные тельца, по сути являющиеся эндосимбиотическими цианобактериями, окруженными мембраной клетки-хозяина (Nowack, Weber, 2018). Филогенетический анализ последовательностей 16S и 18S рДНК продемонстрировал монофилетичность как хозяина, так и эндосимбионта, т.е., по всей видимости, все сфероидные

тельца возникли в результате одного события, случившегося около 12 млн лет назад и приведшего к возникновению симбиотической ассоциации (Nakayama et al., 2011). В пользу существенной интеграции сфероидных телец в клетку хозяина свидетельствует их ограниченное количество (2-8 на одну клетку, в зависимости от размера), вертикальная передача и невозможность существования вне клетки-хозяина (Nowack, Weber, 2018). Анализ геномов сфероидных телец *Rhopalodia* и *Epithemia* показал, что геномы сфероидных телец заметно редуцированы по сравнению с геномами близкородственных свободноживущих цианобактерий *Cyanothece* spp. (2.29 против 4.68-5.36 млн.п.о., соответственно) (Nakayama et al., 2017). По мнению ряда исследователей, в ходе эволюции азотфиксирующие эндосимбиотические цианобактерии могут преобразоваться в новую органеллу – нитропласт (Nowack, Weber, 2018).

#### 2.8.2 Экологическое значение симбиотических ассоциаций протистов с другими микроорганизмами

Благодаря симбиозам протист-хозяин приобретает новые свойства, повышает свою экологическую пластичность, что в конечном итоге позволяет ему заселять новые экологические ниши. Таким образом, симбиотические ассоциации напрямую вовлечены в структуру и связи внутри экосистемы. Многие протисты, хотя и способны потреблять в пищу различные микроорганизмы, обладают определенной селективностью в отношении пищевых частиц (Montagnes et al., 2008). Кроме того, для поддержания популяции необходима определенная концентрация пищевых частиц в среде (Weisse, 2002). Отсутствие или недостаточная концентрация предпочитаемых пищевых объектов будет уменьшать скорость деления протистов и тормозить их распространение в экологической системе. Вместе с тем наличие эндосимбиотических микроорганизмов в клетке протиста обеспечивает его дополнительным источником пищевых ресурсов, причем как в виде самих делящихся эндосимбионтов, которых при необходимости можно переварить, так и в виде продуктов их метаболизма (Gast et al., 2009; Kodama, Fujishima, 2014). Классическим примером таких отношений является уже упомянутая выше симбиотическая система *P. bursaria* - эндосимбиотические хлореллы. Кроме трофических преимуществ, протист, вовлеченный в симбиотическую ассоциацию, может получать от симбионта дополнительные преимущества по сравнению с его пищевыми конкурентами или большую жизнеспособность при изменении условий среды обитания. Например, упомянутые выше бактерии рода *Caedibacter*, заселяющие цитоплазму инфузорий рода *Paramecium*, выделяют в среду R-тельца, способные вызывать гибель незараженных инфузорий (Schrallhammer et al., 2018). Пагубное воздействие на

свободных от эндосимбионтов инфузорий дает конкурентные преимущества инфузориям, несущим бактерий. Количество инфицированных особей в популяции растет, а вместе с тем и количество бактериальных эндосимбионтов. В экосистемах, где присутствует большее количество чувствительных к R-тельцам организмов, инфицированные инфузории обладают высоким конкурентным преимуществом (Kusch, Görtz, 2005). И напротив, там, где сосредоточено большое количество нематод, коловраток и других не чувствительных к токсину организмов, инфузории с симбионтами теряют свое преимущество, и даже более того, оказываются в очень невыгодном положении, так как эндосимбионты используют ресурсы клетки хозяина для своих жизненных нужд, становясь для нее обузой (Landis, 1981; Koehler et al., 2019).

Другие эндосимбионты парамеций, бактерии *Holospira obtusa*, могут повышать экологическую пластичность хозяина тем, что способствуют выработке хозяином белков теплового шока, что позволяет клетке-хозяину выживать при повышении температуры до 35 °C и сохранять своих эндосимбионтов (Hori et al., 2008). Наконец, эндосимбионты могут изменять самого хозяина позволяя ему выживать в агрессивных условиях окружающей среды. Наиболее часто заселение неблагоприятной окружающей среды благодаря образованию симбиозов наблюдается в анаэробных или микроаэрофильных условиях.

Многие протисты способны выживать и размножаться в микроаэрофильных и даже анаэробных условиях, таких как донные отложения, стоячие воды, пищеварительная система животных. В подобных ценозах содержится незначительное количество O<sub>2</sub>, однако нередко, ввиду скопления большого количества сероводорода (H<sub>2</sub>S), кислородное дыхание блокируется полностью. Протисты, обитающие в анаэробных условиях, утрачивают ферменты, необходимые для окислительного фосфорилирования. Представители свободно живущих анаэробных инфузорий *Plagiopyla* и *Sonderia* впервые были описаны Фенчелем и коллегами в 1977 году (Fenchel et al., 1977). В настоящее время известно большое количество анаэробных инфузорий, относящихся к разным родам, в том числе *Geleia* (Edgcomb et al., 2011), *Metopus* (Omar et al., 2017), *Caenomorpha* (Li et al., 2017). Представители перечисленных выше родов выделены преимущественно из проб, взятых из морских отложений, богатых сульфидами. У этих инфузорий не обнаружены митохондрии и фермент цитохром оксидаза. Инфузории, лишённые митохондрий, используют гидрогеносомы для окислительно-восстановительных процессов без участия кислорода (Finlay, Fenchel, 1989). Основной способ питания анаэробных инфузорий — фагоцитоз бактерий и архей, заселяющих богатые сульфидами морские отложения. В результате лизиса прокариот, протисты получают органический субстрат, который в дальнейшем окисляется в гидрогеносомах. В этих органеллах происходит синтез

АТФ, а в качестве побочных продуктов выделяются молекулярный водород, углекислый газ и уксусная кислота (Barbera et al., 2010).

Наиболее часто анаэробные инфузории вступают в симбиотические ассоциации с метаногенными археями (Fenchel, Finlay, 1991). Продукты метаболизма инфузорий, выделяемые в ходе функционирования гидрогеносом, могут служить благоприятным фактором для возникновения и поддержания симбиотической системы в анаэробных условиях. Симбиотические метаногены могут использовать водород, производимый гидрогеносомами клетки-хозяина, как восстановитель  $\text{CO}_2$  с последующей генерацией энергии и метана, как побочного продукта (Jones et al., 1987). При этом инфузории определенно получают преимущества от такой симбиотической ассоциации, поскольку при ингибировании метаногенеза скорость их роста существенно замедляется (Finlay, Fenchel, 1992).

Благодаря свойству коэнзима F420, присущего метаногенам, флуоресцировать в УФ излучении, поиск и исследование метаногенов сильно упрощен (Jones et al., 1987). Метаногены обнаружены у многих свободно живущих анаэробных инфузорий: *Metopus contortus*, *M. striatus*, *M. palaeformis*, *Trimyema sp.* Нередко клетку протиста может населять сразу несколько видов метаногенов, относящихся к разным родам. Показано, что подобные эндосимбиозы могли быть сформированы неоднократно, независимо друг от друга и под воздействием различных факторов (Embley, Martin, 2006). Заселять клетку анаэробной инфузории могут не только метаногены, но и представители семейства *Desulfobacteriaceae*. Эти протеобактерии, так же как и метаногены, могут использовать водород, продукт метаболизма гидрогеносом клетки-хозяина, в качестве восстановителя. Однако в случае десульфобактерий, восстанавливать они будут соединения серы до сульфидов (Widdel, Bak, 1992). Интересно отметить, что с одной клеткой инфузории могут взаимодействовать несколько типов симбионтов, не сходных метаболически и филогенетически. У инфузории *Parduzcia orbis*, обитающей в микроаэробных условиях морских отложений, богатых соединениями серы, были обнаружены сразу четыре эктосимбионта, связанных с метаболическими процессами клетки-хозяина. Локализованы эктосимбионты *P. orbis* в полостях недалеко от ротовой полости. Посредством анализа 16S рРНК были обнаружены две популяции бактерий восстанавливающих серу, относящихся к семействам *Desulfobulbaceae* и *Desulfobacteraceae*, метаногенная архея семейства *Methanobacteriales* и метанотроф. В данной симбиотической ассоциации инфузория будет выполнять функцию создания и поддержания экологической ниши для существования симбионтов, вовлеченных как в метаболическую связь с клеткой-хозяином, так и во взаимодействия друг с другом. Инфузория в описанной симбиотической системе, как предполагают исследователи, получает возможность в случае необходимости поглотить и



переварить симбионтов, других привилегий от симбиоза с таким большим разнообразием прокариот для хозяина в настоящее время не установлено (Edgcomb et al., 2011).

### 2.8.3 Тонкие механизмы взаимодействия протистов и их эндосимбионтов

Не менее интересный, но значительно более сложный в исследовании аспект проблемы симбиоза — это вопрос о механизмах взаимодействия клеток-партнеров в симбиотической системе. Трудность подобных исследований связана в первую очередь с необходимостью поиска методических подходов и технических решений не только для каждой конкретной симбиотической системы, но и для различных этапов ее становления и поддержания. Многие симбионты обладают различными системами связи и механизмами взаимодействия с хозяином. К ним относятся, например, IV и VI типы секреции, позволяющие выделять молекулы-эффекторы как в эукариотическую клетку-хозяина, так и в прокариотические клетки бактерий-конкурентов (Castelli et al., 2019; George et al., 2020). В отличие от обширного массива данных, полученных в результате исследований тонких механизмов взаимодействия между патогенными микроорганизмами и клетками многоклеточных организмов (Cossart, Sansonetti, 2004; Shames et al., 2009; Stradal, Schelhaas, 2018), в отношении эндосимбионтов протистов этот аспект остается малоизученным. В большей мере этот вопрос освещен для систем, в которых клетка протиста (*Dictyostelium discoideum* или *Acanthamoeba castellanii*), зараженная патогенной для человека или животных бактерией (*Mycobacterium* или *Legionella*), используется как модель для выявления ключевых элементов сигнальных путей, вовлеченных в процесс заражения или поддержания инфекции (Solomon et al., 2003; Fajardo et al., 2004; Williams et al., 2013; Steinert, 2010). Так, именно в экспериментах, проведенных на слизевом грибке *Dictyostelium*, было показано, что мутация по белку коронину, регулируемому динамику актинового цитоскелета, приводит к интенсивному росту в клетке бактерии *Mycobacterium marinum* (Solomon et al., 2003). Использование различных мутантных линий *Dictyostelium*, зараженных бактерией *Legionella pneumophila*, позволило продемонстрировать, что эта бактерия активно модулирует фосфоинозитиды мембраны клетки-хозяина для формирования пригодного для своей жизни компартмента (Swart, Hilbi, 2020). Установлено, что заражение амебы *Acanthamoeba castellanii* легионеллой приводит к повышению экспрессии генов хозяина, кодирующих малые ГТФазы Rab и Arf на всем протяжении инфекции, тогда как повышенная экспрессия гена ГТФазы Rho регистрировалась лишь в первые сутки после заражения, а экспрессия генов хозяина, связанных с метаболизмом углерода, выработкой энергии и клеточным циклом, заметно снизилась (Li et al., 2020).

Что же касается симбиотических систем, образованных протистами и микроорганизмами, не рассматриваемыми в качестве патогенных, информация весьма скудна. Наиболее хорошо изучены тонкие механизмы взаимодействия инфузории *P. caudatum* и ее макронуклеарного эндосимбионта *H. obtusa* (Iwatani et al., 2005; Fujishima, 2009, Sabaneyeva et al., 2005; Sabaneyeva et al., 2009; Fujishima, Kodama, 2012). Установлено, что активация инфекционной формы холоспоры осуществляется через минуты после ее попадания в фагосому в результате незначительного закисления содержимого вновь образовавшейся фагосомы при слиянии с ацидосомами, несущими в своих мембранах вакуолярную АТФазу. При этом активированная инфекционная форма выходит из пищеварительной вакуоли инфекционным концом вперед (Iwatani et al., 2005). Ингибирование V-АТФ-азы канамицином А приводит к тому, что содержимое фагосомы не закисляется, и холоспора не попадает в ядро (Fujishima, Kawai, 1997).

Группе японских исследователей удалось установить, что в процессе выхода инфекционной формы холоспоры из фагосомы важную роль играет белок с молекулярным весом 89 кДа, характерный для инфекционных форм и отсутствующий у вегетативных (Iwatani et al., 2005). С помощью моноклональных антител к этому белку они продемонстрировали, что слияние фагосомы, содержащей инфекционную форму холоспоры с ацидосомами, приводит к изменению локализации белка 89 кДа (он перемещается из инфекционного кончика на поверхность бактерии, причем остается связанным с этим концом бактерии). По-видимому, этот белок соответствует тонко фибриллярному материалу, опосредующему связь между инфекционным концом и выпячивающейся мембраной фагосомы, который неоднократно описывали на электронограммах (Iwatani et al., 2005; Fokin, Görtz, 2009; Fujishima, Kodama, 2012). Ряд исследователей, основываясь на данных трансмиссионной электронной микроскопии, считает, что инфекционная форма холоспоры выходит из фагосомы парамеции, будучи окруженной мембраной - производной исходной мембраны фагосомы клетки-хозяина (Fokin, Görtz, 2009; Sabaneyeva et al., 2009), тогда как другие утверждают, что бактерия разрывает мембрану пищеварительной вакуоли и попадает в цитозоль клетки-хозяина (Iwatani et al., 2005; Fujishima, Kodama, 2012).

Несмотря на данное разногласие, участие актина клетки-хозяина в процессе инфицирования бактериями *Holospira obtusa* признается обеими группами исследователей. Участие актина клетки-хозяина в выходе инфекционной формы из фагосомы было продемонстрировано двумя методами: с использованием специфических антител к актину парамеций и с применением плазмиды, содержащей ген актина и ген зеленого флуоресцентного белка (Sabaneyeva et al., 2009). Поскольку у белка 89 кДа обнаружены два актин связывающих домена (Iwatani et al., 2005), предполагается, что этот белок способствует взаимодействию

инфекционной формы с микрофиламентами клетки-хозяина, за счет которых осуществляется транспортировка бактерий к Ма. Белок 89 кДа остается ассоциирован с инфекционной формой все то время, пока бактерия находится в цитоплазме инфузории, но когда холоспора проникает в ядро клетки-хозяина, актин и белок 89 кДа остаются за его пределами (Iwatani et al., 2005; Fujishima et al., 2009). Интересно, что микротрубочки клетки-хозяина тоже играют определенную роль в процессе заражения, по-видимому, обеспечивая правильную ориентацию бактерии по отношению к ядерной оболочке в момент ее проникновения в ядро (Sabaneyeva et al., 2005). Во всяком случае, разборка микротрубочек в присутствии нокодазола предотвращает попадание инфекционных форм в ядро, но не влияет на попадание бактерий в фагосому в ходе фагоцитоза и их выход из пищеварительных вакуолей в цитоплазму.

Остается неразрешенным ряд ключевых вопросов: сохраняется ли мембрана вокруг бактерии после ее выхода из фагосомы; как бактерия находит нужное ядро и добирается до него; как бактерия преодолевает ядерную оболочку и проникает в ядро (Iwatani et al., 2005; Fujishima et al., 2009). По предположению авторов, за осуществление этих процессов могли бы отвечать специализированные липополисахариды на поверхности инфекционной формы холоспоры и соответствующие рецепторы к ним на ядерной оболочке инфузории. Этим, по мнению авторов, и объясняется специфичность к тому или иному типу ядра (Ма или Ми), видоспецифичность и клоноспецифичность холоспор (Fujishima, Kodama, 2012). Другой белок, обнаруженный в инфекционной форме холоспоры и, очевидно, играющий существенную, но пока не вполне понятную роль на последних этапах процесса заражения или в поддержании холоспор в макронуклеусе хозяина, имеет молекулярный вес 63 кДа (Abamo et al., 2008). После попадания инфекционной формы в Ма, бактерия секретирует этот белок в ядро, причем содержание этого белка в ядре хозяина возрастает в первые сутки после заражения (Abamo et al., 2008). Эксперименты с использованием специфических ингибиторов белкового синтеза прокариот продемонстрировали, что наряду с некоторым количеством белка 63 кДа, предсуществующего в инфекционной форме, часть белка синтезируется заново через некоторое время после попадания бактерии в ядро, за счет чего концентрация его в ядре возрастает до момента начала появления репродуктивных форм. При начале дифференцировки репродуктивных форм в инфекционные вновь регистрировался синтез этого белка бактериями. Роль белка 63 кДа остается не определена, однако, поскольку он имеет ДНК-связывающие мотивы в своей аминокислотной последовательности, авторы предполагают, что, связываясь с ДНК клетки-хозяина, белок 63 кДа может препятствовать ДНКазной активности и создает необходимые условия для того, чтобы инфекционная форма могла начать делиться и производить репродуктивные формы (Abamo et al., 2008). Этот белок может также блокировать какие-то сигнальные пути ядра, приводя к изменению экспрессии генов, способствующих

поддержанию эндосимбионта в ядре. Кроме того, существуют предположения, что белок 63 кДа обладает противоапоптотической активностью, что позволяет холоспоре размножиться внутри ядра (Fujishima, Kodama, 2012). Подобная стратегия, характеризующаяся наличием механизма блокировки апоптоза, была отмечена у филогенетически близкой к холоспорам бактерии *Rickettsia rickettsii* (Clifton et al., 1998). Однако необходимо заметить, что апоптоз, как таковой, присущ исключительно многоклеточным организмам, а у протистов наблюдается запрограммированная гибель клетки, подобная апоптозу, но имеющая лишь ряд общих черт с классическим апоптозом (Kaczanowski et al., 2011). Поэтому, по-видимому, можно говорить лишь о возможной блокировке холоспорой запрограммированной гибели клетки, подобной апоптозу.

Относительно хорошо изучены взаимоотношения между инфузорией *Paramecium bursaria* и фототрофом *Chlorella spp.* Данная симбиотическая ассоциация также может быть использована в качестве модели для изучения тонких механизмов взаимодействия клеток-партнеров. Цитоплазма многих клонов инфузорий *P. bursaria* заполнена множеством хлорелл, причем каждая водоросль окружена своей собственной периальгальной вакуолью, отличающейся от пищеварительной. Процесс выхода хлореллы из пищеварительной вакуоли и превращения ее в стабильного эндосимбионта довольно хорошо изучен.

Как и в случае с бактериями рода *Holospora*, водоросли *Chlorella*, попав в фагосому, способны избегать переваривания лизосомными ферментами и поодиночке выходить из фагосомы (Kodama, Fujishima, 2005). Однако в отличие от бактерий *Holospora*, которые покидают фагосому немедленно после ее слияния с ацидосомами, хлореллы это делают существенно позже, когда лизосомные ферменты уже начинают работать. При этом часть водорослей повреждается ферментами, и они в конечном счете перевариваются, а часть хлорелл остается неповрежденной и успевает избежать переваривания (Kodama, Fujishima, 2010).

Живые зеленые хлореллы окружаются периальгальной вакуолью и размещаются в районе кортекса, между трихоцистами (Kodama, Fujishima, 2005; Kodama, Fujishima, 2010; Kodama et al., 2011). Интересно отметить, что в случае замены хлорелл в ходе эксперимента на дрожжи или шарики из полистирола соответствующего размера (3 мкм и более), они также оказывались способны выходить из пищеварительных вакуолей (Kodama, Fujishima, 2012). В то же время полистирольные шарики диаметром 0.81 мкм, частички туши и пищевые бактерии сохранялись в пищеварительных вакуолях (Kodama, Fujishima, 2005). Локализация хлореллы в области кортекса парамеции обеспечивает хлорелле минимальный контакт с лизосомными ферментами, однако основную роль в защите от лизосом клетки-хозяина играет периальгальная вакуоль (Kodama, Fujishima, 2009). Интересно, однако, что во время попадания хлорелл в субкортикальный слой активность кислой фосфатазы регистрируется в трихоцистах, что не

типично для не несущих хлорелл парамеций. Когда окруженная периальгальной вакуолью хлорелла оказывалась вблизи кортекса инфузории, часть трихоцист разрушалась благодаря работе ферментов клетки-хозяина, освобождая пространство для периальгальной вакуоли с хлореллой. При делении хлорелл и реинфекции также наблюдали разрушение трихоцист и освобождение пространства для новых симбионтов (Kodama, Fujishima, 2011). Молекулярный механизм, вызывающий слияние лизосом клетки-хозяина с некоторыми трихоцистами при становлении симбиотической системы *P. bursaria/Chlorella*, остается пока неизвестным.

Для выявления характера взаимоотношений хлореллы и инфузории японские исследователи использовали ингибитор трансляции белка циклогексимид, антибиотик хлорамфеникол и блокатор фотосинтеза дихлорфенилдиметилмочевину. Им удалось показать, что хлорелла во время фотосинтеза вырабатывает белки, необходимые для поддержания структуры ядра и хлоропластов водоросли. Нарушение трансляции приводило к быстрому лизису органелл, нарушению структуры периальгальной вакуоли и перевариванию симбионта с помощью лизосомных ферментов клетки-хозяина (Kodama, Fujishima, 2011). Несмотря на обилие полученных данных, многие аспекты взаимоотношений между партнерами остаются неизвестными, в частности, механизм устойчивости части хлорелл к лизосомной деградации.

Тонкие механизмы взаимодействия между протистами и их эндосимбионтами в других системах еще менее исследованы. Так, абсолютно непонятны механизмы проникновения в клетку-хозяина бактерий, не обладающих специализированными инфекционными формами (например, таких как виды рода *Lyticum*, *Ca. Megaira*, *Ca. Fokinia*), причем широкая распространенность в природе некоторых из этих видов (*Ca. Megaira venefica*) и тот факт, что они могут обнаруживаться у разных видов хозяев, заставляет подозревать наличие у них инфекционного начала и способности к горизонтальной передаче, хотя они и не были до сих пор обнаружены. Кроме того, неясно, почему располагающиеся непосредственно в цитозоле эндосимбионты не подвергаются аутофагии со стороны клетки-хозяина и каковы механизмы регуляции численности эндосимбионтов. Ответы на многие подобные вопросы могут дать современные, относительно недавно разработанные методические подходы к исследованию симбиотических систем протистов.

#### 2.8.4 Методические подходы к исследованию симбиотических систем инфузорий

Долгие годы описание симбиотических систем, в которых инфузории выступают в качестве хозяина, базировалось исключительно на морфологической характеристике партнеров, полученной на основе светооптических и электронно-микроскопических данных. В тех случаях, когда симбиотическая система поддавалась культивированию в лабораторных условиях,

подобную характеристику удавалось дополнить информацией о биологических особенностях системы (наличие или отсутствие киллер-эффекта, инфекционная способность эндосимбионта, характер передачи эндосимбионта при половом процессе) (Serra et al., 2016).

В настоящее время, с развитием молекулярных методов исследования, широкое распространение получил подход с применением полного цикла анализа последовательности гена, кодирующего рРНК малой субъединицы рибосом (Amann et al., 1995). Алгоритм исследования заключается в том, что после выделения тотальной ДНК проводят амплификацию и секвенирование последовательности гена 18S рРНК хозяина и гена 16S рРНК эндосимбионта (если это прокариотический организм). В случае затруднений, возникающих при идентификации хозяина по последовательности гена 18S рРНК, прибегают к анализу последовательностей фрагмента кластера рибосомных генов, содержащего внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, и гена цитохром с оксидазы COXI (Strüder-Kypke, Lynn, 2010). Затем на основе анализа гена 16S рРНК эндосимбионта разрабатывают специфические зонды, которые метят флуорохромом, для доказательства методом флуоресцентной гибридизации *in situ* принадлежности этой последовательности эндосимбионту, а не контаминирующему микроорганизму. В случае положительного результата на основании полученной последовательности гена 16S рРНК определяют положение эндосимбионта на филогенетическом древе.

Широкие перспективы перед исследователями открывают недавно возникшие и активно развивающиеся новые подходы в исследовании симбиотических ассоциаций, основанные на анализе геномов и транскриптомов клетки-хозяина и бактерии. Геном некоторых представителей инфузорий рода *Paramecium* и холоспор уже полностью секвенирован, что позволяет в дальнейшем проведение сравнительного анализа различных хозяев и эндосимбионтов (Garushyants et al., 2018). Вместе с тем исследованные нуклеотидные последовательности ДНК инфузории и ее эндосимбионта могут стать основой для более углубленного анализа транскриптомов. Сравнение транскриптомов и нуклеотидных последовательностей ДНК участников симбиотической системы позволит выявлять гены как инфузории, так и эндосимбионта, отвечающие за возникновение и поддержание симбиотических связей. Открытие функций подобных генов позволит установить молекулярные механизмы, обеспечивающие взаимосвязь между хозяином и симбионтом (Schrallhammer, Potekhin, 2020).

Значительные трудности представляет собой исследование вклада эндосимбионта в метаболизм симбиотической системы, оценка его роли в жизнедеятельности хозяина и, как следствие, значения этой симбиотической системы для конкретной экосистемы. Продуктивным подходом к исследованию влияния, которое оказывает эндосимбионт на хозяина-протиста,

является сравнение жизнеспособности несущих симбионтов клеточных линий и экспериментально полученных из этих клеток апосимбиотических клеточных линий (Kusch et al., 2002; Dusi et al., 2014; Bella et al., 2016; Grosser et al., 2018; Pasqualetti et al., 2020). Апосимбиотические клеточные линии получают путем обработки несущих эндосимбионтов клеток антибактериальными агентами. В качестве последних традиционно используют антибиотики, вызывающие гибель бактерий, например, такие как стрептомицин (Kusch et al., 2002; Dusi et al., 2014; Bella et al., 2016; Grosser et al., 2018) и ампициллин (Vishnyakov, Rodionova, 1999). Сравнение темпов размножения апосимбиотических и несущих эндосимбионтов клеточных линий позволяет оценить характер воздействия эндосимбионта на хозяина и степень зависимости последнего от симбиотических отношений.

Однако большую проблему при такого рода исследованиях может представлять резистентность некоторых эндосимбионтов к антибиотикам. В настоящее время открыто несколько механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам, которые можно подразделить на первичные и приобретенные. Первичная устойчивость связана с физико-химическими особенностями в строении бактерии и не подвержена генетическим модификациям. Так, первичная устойчивость обусловлена наличием наружной мембраны у грамотрицательных бактерий, липополисахаридов и способностью образовывать биопленки для защиты от зоопланктона и лекарств (Monroe, 2007; Mah, 2012). Приобретенная устойчивость связана с появлением ранее отсутствовавших защитных путей, например, мутаций, приводящих к нечувствительности к антибиотику, получение извне гена устойчивости из плазмиды или бактериофага. Также к приобретенным механизмам защиты можно отнести мутации в регуляторных элементах, приводящие к запуску синтеза молекул, повышающих устойчивость бактерии (Rhodes et al., 2016). К механизмам защиты бактерий от антибиотиков относятся: инактивация антибиотиков с помощью ферментов; уменьшение проницаемости мембраны путем регуляции каналов; активация системы эффлюкс насосов; модификация мишени, на которую действует антибиотик (Schweizer, 2012); образование L-форм (Mercier et al., 2013). Кроме того, бактерии способны комбинировать эти способы защиты для повышения устойчивости. Например, *Pseudomonas aerogenes* под действием антибиотиков как уменьшает проницаемость наружной мембраны, так и увеличивает количество эффлюкс насосов (Blair et al., 2015).

Известно, что представители семейства *Rickettsiaceae*, являющиеся возбудителями опасных заболеваний человека, резистентны по отношению ко многим антибиотикам, что связано как с наличием эффлюкс-системы (Rolain, Raoult, 2005), так и способностью к синтезу разрушающих антибиотики ферментов. Риккетсиозы не поддаются лечению с помощью  $\beta$ -лактамных антибиотиков, в первую очередь благодаря способности синтезировать  $\beta$ -лактамазы.

Также у *R. Felis* был обнаружен гомолог пенициллиназы (Ogata et al., 2005). Устойчивость риккетсий к действию антибиотиков, подавляющих белок-синтетический аппарат, таких как эритромицин, обеспечивается благодаря модификации их 23S рРНК. В настоящее время фермента emr (erythromycin resistance) в геноме риккетсий не обнаружено, однако установлено, что частые мутации в 23S рРНК могут приводить к появлению нечувствительного к антибиотику штамма (Vester, Douthwaite, 2001). Устойчивость к аминогликозидам, таким как гентамицин и стрептомицин, предположительно, обеспечивается благодаря ферменту аминогликозидацетилтрансферазе (Rolain, Raoult, 2005). Однако, несмотря на документированную устойчивость риккетсий к аминогликозидам, механизм резистентности остается до конца не установленным.

Принимая во внимание проблему устойчивости ряда микроорганизмов к стандартно используемым антибиотикам, для исследования стабильности симбиотических отношений в системе и в целях получения апосимбиотических клеточных линий необходим поиск альтернативных антибактериальных агентов. Особый интерес в этом отношении представляет антимикробный комплекс FLIP7 (Fly Larvae Immune Peptides), разработанный в лаборатории биофармакологии и иммунологии насекомых СПбГУ (Chernysh et al., 2015; Chernysh et al., 2018). В его состав входит смесь антибактериальных пептидов, выделенных из личинки синей мясной мухи *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). Антибактериальные вещества, входящие в состав FLIP7, представлены дефензинами, цекропинами, диптерицинами, а также пролин-богатыми белками и неизвестными антибактериальными веществами (Chernysh et al., 2015; Chernysh et al., 2018). Этот коктейль обладает активностью против широкого спектра как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, в том числе *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Acinetobacter baumannii* (Chernysh et al., 2015). Ввиду широкого спектра действия и состава, FLIP7 может быть рассмотрен как новое средство для получения апосимбиотических клеточных линий.



### 3. Материал и методы

#### 3.1 Получение клеточных культур

В своих экспериментах мы использовали 4 клона инфузорий *Paramecium multimicronucleatum*, содержащих в своем Ма подвижных эндобионтов (LSA11-2, Busnau, AB9-4 Кр154-4), и три незараженных клона того же вида (MSA, СуP5-3, Esa 3-2) в качестве контроля (Табл. 1). Проба, из которой был выделен клон LSA11-2, была взята в г. Лукка (Италия) летом 2011 года. Отобранные клетки инфузорий клонировали в многолуночковом пластиковом планшете во влажной камере при комнатной температуре на отваре листьев салата, зараженном бактерией *Klebsiella (Enterobacter) aerogens*. Клон Busnau был любезно предоставлен доктором М. Швайкертом (Технический Университет Штутгарта, Германия), остальные клоны – Н.А. Лебедевой (РЦ СПбГУ «Культивирование микроорганизмов»). Все полученные клоны содержали в пробирках в темноте при комнатной температуре и кормили 1-2 раза в неделю, свежим отваром салата, инкубированным с бактериями *Klebsiella aerogens*.

Таблица 1. Клоны инфузорий *P. multimicronucleatum*, использованные в экспериментах.

Название клона	Место сбора	Внутриядерный подвижный эндобионт	Год получения	Коллектор
LSA 11-2	Лукка, Италия	есть	2011	Е.В. Сабанеева
Busnau	Штутгарт, Германия	есть	1988	Н.-D. Görtz
AB9-4	Бостон, США	есть	1994	И.И. Скобло
Кр154-4	Красноярск, Россия	есть	2012	А.А. Потехин
MSA	о.Кипр, Кипр	нет	2016	Лебедева Н. А.
СуP5-3	о.Кипр, Кипр	нет	2016	Лебедева Н. А.
ESa3-2	Saarema, Estonia	нет	2017	Лебедева Н. А.

#### 3.2 Прижизненные наблюдения

Прижизненные наблюдения за клетками, помещенными в устройство для обездвиживания клеток (Сковородкин, 1990), проводили с помощью микроскопа Leica DM6000 (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany), оснащенного цифровой камерой DFC500, с использованием контраста Номарского.

### **3.3 Экспериментальное заражение**

Содержимое трех пробирок культуры клеток LSA11-2 центрифугировали со скоростью 800 об/мин в течение 10 минут. Затем удаляли супернатант, а осадок объемом 1 мл гомогенизировали с помощью стеклянного инсулинового шприца, периодически проверяя под биноклем наличие в гомогенате целых клеток. Затем гомогенат добавляли в солонку, содержащую 1 мл незараженных клеток клона MSA, чтобы соотношение объемов гомогената и суспензии незараженных клеток было 1:1. Клетки проверяли на наличие заражения через 20 минут, 2 часа, день, 3 дня и неделю.

### **3.4 Проверка наличия киллер-эффекта**

Эксперименты проводили в пластиковых чашках Петри. Зараженные живые клетки инфузорий клона LSA 11-2 в количестве 10 штук, отсаживали в отдельную каплю культуральной среды. Затем в эту же каплю добавляли 10 свободных от эндонуклеобионтов клеток инфузорий клона MSA. Через 30, 90, 120 минут клетки просматривали под биноклем для того, чтобы оценить число погибших клеток.

### **3.5 Окрашивание тотальных препаратов инфузорий по Фельгену**

Инфузорий фиксировали в растворе Буэна в стеклянных солонках, после чего переносили на предметные стекла и удаляли фиксатор. Далее препараты проводили по спиртам восходящей концентрации (70°-96°) и покрывали целлоидином. Затем препараты доводили до воды для последующего гидролиза в 6N соляной кислоте (20 мин). Для последующей окраски фуксином клетки отмывали от кислоты в дистиллированной воде. Окраску фуксином проводили в течение 20 минут. Дифференцировку окраски проводили с помощью подкисленного спирта. С целью обеспечить контрастность, цитоплазму инфузорий окрашивали красителем Лихтгрюн, растворенном в 70% этаноле, после чего препараты обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в канадский бальзам.

### **3.6 Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)**

Клетки фиксировали в смеси 1,6% параформальдегида и 2,5% глутарового альдегида, приготовленной на фосфатном буфере (0.1 М, рН 7.4) в течение 1,5 ч при комнатной температуре, либо 2,5% глутаровым альдегидом на какодилатном буфере. Соотношение объема

фиксатора к объему клеточной суспензии составляло 2:1. Затем клетки осаждали с помощью центрифугирования при 4000 об/мин в течение 5 мин и аккуратно удаляли супернатант. Получившийся клеточный осадок переносили в пробирки типа Эппендорф, отмывали в том же буфере, на котором был приготовлен фиксатор, но содержащем 12.5% сахарозы. Далее клетки постфиксировали 1.25-1.6%-ным тетроксидом осмия ( $OsO_4$ ), приготовленным на какодилатном буфере с сахарозой, в течение 1 ч при 4°C. Отмывку клеточного материала от осмия производили в том же буфере. Далее материал проводили по спиртам восходящей концентрации (50°-70°-80°-90°-100°-100°-100°), центрифугируя после каждой стадии. После этого осадок выдерживали в спирт-ацетоне (1:1) и в чистом ацетоне. Перед тем как выдерживать материал в смоле, его проводили по смесям ацетона и смолы, смешанным в соотношении 3:1, 1:1, 1:3. Смолу для заливки фирмы Fluka (Швейцария) готовили согласно рекомендациям производителя. На заключительных этапах клетки выдерживали 2 раза по 2 ч в смоле при комнатной температуре, после чего помещали в твердотельный термостат BioSan (Латвия) на 52 ч при 37 С°, затем поднимали температуру до 45 С° на 24 ч. Окончательную полимеризацию смолы проводили при 60 С° в течение 24 ч. Блоки резали на ультратоме Leica EM UC6. Полученные ультратонкие срезы контрастировали 1%-ным водным уранил ацетатом и 1%-ным водным цитратом свинца. Сетки просматривали с помощью трансмиссионных электронных микроскопов Jeol 1400 и Jeol 2100, установленных в Ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», при ускоряющем напряжении 90 кВ.

### **3.7 Негативное контрастирование**

Клетки инфузорий отмывали в дистиллированной воде. Разрушение клеток производили в маленькой капле жидкости, после чего разрушенные клетки наносили на медные сетки для электронной микроскопии, покрытые пиелоформом. Далее их контрастировали 1%-ным водным уранил ацетатом. Контрастирование длилось около 40 секунд, после чего ацетат урана удаляли с помощью фильтровальной бумаги, и сетки окончательно высушивали в течение 24 часов. Сетки просматривали с использованием трансмиссионных электронных микроскопов Jeol 1400 и Jeol 2100 в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (СПбГУ).

### 3.8 Атомно-силовая микроскопия

Клетки инфузорий отмывали в стерильной среде. Разрушение клеток производили в маленькой капле жидкости на покровном стекле и высушивали каплю. Препарат анализировали с помощью зондового микроскопа NTEGRA-Aura в Ресурсном центре микроскопии и микроанализа (СПбГУ).

### 3.9 Выделение ДНК и характеристика генов 18S рРНК хозяина и 16S рРНК эндосимбионта

Выделение ДНК проводили с помощью набора для выделения ДНК из растений (NucleoSpin™ Plant DNA Extraction Kit, Macherey-Nagel GmbH and Co., Düren NRW, Germany), используя протокол для мицелия. Амплификацию гена 18S рРНК хозяина проводили, используя выделенную тотальную ДНК в качестве матрицы и прямого 18S\_F9 (Medlin et al., 1988) и обратного 18S R1513Нуро (Petroni et al., 2002) праймеров. Продукты ПЦР были непосредственно секвенированы с использованием тех же праймеров. Ген 16S рРНК эндосимбионта был амплифицирован путем ПЦР с использованием универсальных эубактериальных праймеров: прямого 16S\_αF19a (Vannini et al., 2004) и обратного 16S\_R1522a (Vannini,...,Mironov et al., 2014) или с помощью ступенчатой ПЦР с использованием специально разработанных нашими итальянскими коллегами праймеров RickFla\_F69 5'-GTТААСТТАGGGCTTGCTC-3', RickFla\_F87 5'-CTCTAGGTТААТCAGTAGCAA-3', RickBas\_F166 5'-ATGCTAATGCCGTATATTCTC-3', Rick\_R1270 5'-TTTTAGGGATTTGCTCCACG-3', Rick\_R1455 5'-CCGTGGTTGGCTGCCT-3' (Vannini,..., Mironov et al., 2014). Продукты ПЦР непосредственно секвенировали с использованием тех же праймеров и TaKaRa ExTaq полимеразы.

### 3.10 Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Для того чтобы подтвердить, что секвенированная последовательность действительно принадлежит макронуклеарному симбионту парамеции, а не является случайной контаминацией, мы проводили гибридизацию *in situ* с использованием специально разработанных олигонуклеотидных зондов: TrichoRick\_142 (5'-GTTTCCAAATGTTATTCACATAC-3'), RickFla\_430 (5'-TCTTCCCTGCTAAAAGAACTTT-3; Vannini,..., Mironov et al., 2014), конъюгированного с флуорохромом Cy3. Гибридизацию *in situ* с использованием этого зонда проводили также для идентификации подвижных эндосимбионтов в клонах Busnau, AB9-4 и Kr154-4, а также для специфичного выявления

подвижных эндосимбионтов в клетках после применения антибиотиков и антимикробного пептидного комплекса FLIP7. Наряду с видоспецифичным зондом мы также использовали универсальный эубактериальный зонд Eub\_338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT 3'; Amann et al., 1990), меченный FITC. В некоторых экспериментах мы использовали зонд, выявляющий альфапротеобактерии Alf\_1b (5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'; Manz et al., 1992) меченный Cy3.

Клетки фиксировали в стеклянных солонках в 4%-ном параформальдегиде, приготовленном на 0,2М фосфатно-солевом буфере (PBS) при температуре 4°C в течение 2-х часов, а затем переносили на стекла Super Frost (Menzel-Gläser, Германия) для лучшей адгезии клеток и уменьшения их потерь при дальнейших манипуляциях. По завершении фиксации фиксатор удаляли с помощью тонкого капилляра и фильтровальной бумаги, а клетки отмывали в 0,2М PBS 5 мин и помещали в 70° метанол на срок до 1 ч. Смену фиксатора и отмывку контролировали под биноклем. Препараты отмывали в буфере PBS. Далее препараты обрабатывали буфером для гибридизации в течение 30 мин. Гибридизацию проводили согласно протоколу Манца (Manz, 2000), состав гибридизационного буфера был следующим: 5М NaCl (18%), 1 М TrisHCl (2%), дистиллированная вода (50%), формамида (30%) и 10%-ный SDS (0.001%). На препарат наносили гибридизационный буфер, зонд в концентрации 10нг/мкл. Гибридизацию проводили во влажной камере в термоблоке фирмы BioSan (Латвия) при температуре 46°C в течение 1.5 ч. Отмывку непрореагировавшего зонда производили в отмывочном буфере 2 раза по 30 мин, при температуре 48°C. После этого клетки заключали в раствор поливинилового спирта Mowiol 4-88 в 40%-ном глицерине, приготовленный по рекомендации производителя и содержащий стабилизатор флуоресценции PPD и DAPI для окраски ядер. Препараты просматривали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS SPE5, установленном в «Ресурсном центре микроскопии и микроанализа» (СПбГУ). Для возбуждения излучения флуорохромов использовали 3 лазера с длинами волн: 365, 488, 555 нм. Обработку и анализ полученного изображения осуществляли с помощью программы ImageJ.

### 3.11 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ был проведен совместно с коллегами из Университета г. Пиза (Италия) с использованием 32 последовательностей. Длина последовательностей была сокращена до наиболее короткой, при этом длинные вставки, присутствовавшие только у подвижного симбионта макронуклеуса инфузорий клона LSA 11-2 были удалены, в результате чего была получена матрица размером 1338 позиций. При построении филогении применяли метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) и Байесовский метод (Bayesian

Inference, BI) с использованием программ PHYML (Guindon, Gascuel, 2003) и MrBayes (Huelsenbeck, Ronquist, 2001), соответственно. Выбор лучшей модели замен (GTR+I+G) осуществляли на основании информационного критерия Акаике (AIC), вычисленного с помощью программы jModelTest (Posada, 2008). При построении дерева методом максимального правдоподобия использовали бутстрэп-анализ (1000 псевдореплик). Значения меры сходства вычисляли на основе немодифицированной матрицы. Другие представители порядка *Rickettsiales* (сем. *Anaplasmatacea*, *Midichloriaceae*) были взяты в качестве внешней группы.

### 3.12 Обработка антибиотиками

Для оценки устойчивости симбиотической системы и в целях получения апосимбиотических клеточных линий, клетки зараженных клонов подвергали действию антибиотиков (Табл. 2). Стоковые растворы стрептомицина (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States), ампициллина (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) и тетрациклина (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) готовили на дистиллированной воде, стоковый раствор хлорамфеникола (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) — на этиловом спирте. 50 инфузорий каждого клона помещали в лунку 24-х лункового планшета, содержавшего 0,5 мл салатного отвара с незначительным содержанием пищевых бактерий. В первой серии экспериментов, проводившейся со всеми антибиотиками, за исключением тетрациклина, антибиотик добавляли в конечной концентрации 100, 250, 500 и 1000 мкг/мл. Клетки содержали при комнатной температуре в темноте.

Таблица 2. Антибиотики, использованные в работе.

Антибиотик	Класс	Механизм действия	Токсичность для эукариот	Ссылка
Стрептомицин	аминогликозиды	ингибирует синтез белка бактерий	низкая	Pagkalis et al., 2011
Ампициллин	$\beta$ -лактамы	ингибирует синтез клеточной стенки	очень низкая	Rafailidis et al., 2007
Хлорамфеникол	амфениколы	ингибирует синтез белка бактерий	высокая	Barnhill et al, 2012
Тетрациклин	Тетрациклины	ингибирует синтез белка бактерий	высокая в отношении некоторых протистов	Connell et al., 2003

Для оценки жизнеспособности инфузорий и наличия в них эндосимбиотических бактерий клетки просматривали на 3-й, 10-й и 15-й день после добавления антибиотика. После первой проверки клетки кормили дважды в неделю, добавляя в лунки 3-4 капли среды, содержащей пищевые бактерии. Поскольку предварительные эксперименты показали, что тетрациклин губителен для инфузорий, этот антибиотик использовали в концентрации, которая была на порядок меньше (10, 25, 50 и 100 мкг/мл), и клетки просматривали на 3-й день. Кроме того, в экспериментах с тетрациклином мы использовали дополнительный контрольный не зараженный подвижными эндосимбионтами клон (СуР5-3). Каждый эксперимент (действие каждой концентрации каждого антибиотика на каждый из клонов) повторяли трижды. В другой серии экспериментов в лунку, содержащую 50 клеток клона Кг154-4 и 0,5 мл культуральной среды неоднократно (на 1-й и каждый 3-й последующий день) вместе с салатным отваром, содержащим пищевые бактерии, добавляли ампициллин (1000 мкг/мл). Эксперимент продолжали в течение 21 дня. Клетки периодически просматривали под биноклем, чтобы оценить их выживаемость, и с помощью оптики Номарского, чтобы проверить наличие в них эндосимбионтов. Поскольку иногда было сложно получить четкие изображения быстро передвигающихся бактерий, клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом и фотографировали в режиме дифференциально-интерференционного контраста (ДИК). На 5-й (после повторного добавления ампициллина) и на 15-й день эксперимента часть клеток фиксировали для ТЭМ, а часть – для гибридизации *in situ*.

### 3.13 Экстракция и фракционирование антимикробного пептидного комплекса FLIP7

Пептидный комплекс FLIP7 (иммунные пептиды личинки мухи) экстрагировали из личинок мухи *Callifora vicina* во время диапаузы. Личинки иммунизировали бактериями *Escherichia coli* (клон М 17) (Microgen, Россия), чтобы индуцировать иммунный ответ согласно протоколу С.И. Черныша (Chernysh et al., 2015; Gordya et al., 2017). На следующий день гемолимфу собирали, центрифугировали для того, чтобы удалить клеточную фракцию и жиры, очищали и лиофилизировали. Перед употреблением лиофилизированный образец растворяли в деионизированной воде и стерилизовали, фильтруя через мембранный фильтр с диаметром поры 0,22 мкм (Milliex-GS; Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Фракции FLIP7 получали из 10 мг лиофилизированного FLIP7 с помощью системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu LC20 Prominence HPLC, оснащенной колонной Vydac C18 (250 x 10 мм, 5 мкм, Grace, USA), предварительно стабилизированной 0,05%-ной трифторуксусной кислотой. Вещества элюировали, используя

линейный градиент ацетонитрила от 2 до 60% в течение 60 мин со скоростью 2,5 мл/мин. Хроматографические фракции собирали автоматически через интервалы 1 мин. Оптическую плотность фракций регистрировали с помощью ультрафиолетового детектора при длине волны 214 нм. Фракции лиофилизировали для хранения и растворяли в деионизированной воде непосредственно перед употреблением.

FLIP7 и его фракции были любезно представлены А. Яковлевым (Лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых, биологический факультет СПбГУ).

### 3.14 Обработка инфузорий пептидным комплексом FLIP7

Предварительные эксперименты для приблизительной оценки диапазона концентраций FLIP7 для последующих экспериментов проводили только на одном из несущих эндосимбионтов клоне, Kp154-4, и свободном от эндосимбионтов клоне СуР2-3, который служил в качестве контроля. Клетки отмывали в стерильном салатном отваре, чтобы избавиться от пищевых бактерий и помещали в лунки 24-х луночного планшета по 50 клеток в лунку, с добавлением 500 мкл свежей неинкубированной среды. Стоковый раствор FLIP7 добавляли в лунки так, чтобы конечная концентрация составляла 0,2, 2, 10 и 20 мг/мл. Оценку эффективности FLIP7 проводили сразу после его добавления и наблюдения продолжали непрерывно в течение 1 ч с помощью бинокля МСП-1 (ЛОМО, Россия). В предварительных экспериментах с более низкими концентрациями FLIP7 (20 и 100 мкг/мл) жизнеспособность инфузорий проверяли через 1ч, 2ч и на 3-й день после добавления FLIP7. Наличие подвижных эндосимбионтов в Ма определяли, просматривая обездвиженные живые клетки инфузорий с помощью микроскопа Leica B6000 в режиме контраста Номарского. Культура считалась сохранившей заражение, если пять подряд случайно выбранных инфузорий имели в своем Ма подвижных эндосимбионтов. Как и в случае с обработкой антибиотиками, иногда клетки предварительно фиксировали 4%-ным параформальдегидом для получения четких фотографий.

Вторую серию экспериментов проводили с помощью более низких концентраций FLIP7: 20, 100, 200, 400 мкг/мл. Клетки инфузорий клона Kp154-4, LSA11-2 и контрольного клона ESa3-2 подготавливали, как описано выше. Оценку эффективности FLIP проводили через 1 час и через 7 дней после начала эксперимента. Каждый эксперимент повторяли трижды. Дополнительно для установления локализации эндосимбионтов проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* с использованием видоспецифичного зонда RickFla\_430 (Vannini, ..., Mironov et al., 2014).



### 3.15 Проверка активности отдельных фракций FLIP

В эксперименте были использованы 47 фракций (с 4-й по 50-ю) смеси антибактериальных пептидов FLIP. Для проведения эксперимента 50 инфузорий клона Кр154-4 отмывали от культуральной среды, содержащей пищевые бактерии, и помещали в лунку 24-х лункового планшета, добавив 500 мкл свежей неинкубированной среды. Затем в лунки вносили фракции FLIP с 4 по 50, до получения конечной концентрации 1.2 мг/мл в пересчете на исходное сухое вещество. Оценку жизнеспособности инфузорий производили с помощью бинокюляра МСП-1 фирмы «Ломо» через 5 минут после начала эксперимента. Выжившие клетки просматривали с использованием дифференциально-интерференционного контраста для проверки наличия в них эндосимбионтов. Для следующего эксперимента было отобрано 10 активных по отношению к инфузориям фракций FLIP7 (7, 12, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 36), которые тестировали в меньших концентрациях (120, 240 и 360 мкг FLIP7 экв/мл). Жизнеспособность клеток оценивали через 1 ч после начала эксперимента, выжившие клетки просматривали на предмет наличия в них эндосимбионтов, как описано выше. В другом эксперименте жизнеспособность зараженного клона Кр154-4 и незараженного клона СуР2-3 оценивали на 7-й день после добавления самых активных фракций FLIP7 в концентрации 120 мкг FLIP7 экв/мл.

## 4. Результаты

### 4.1 Общая характеристика симбиотической системы *Paramecium multimicronucleatum*/Ca. *Trichorickettsia mobilis*

#### 4.1.1 Идентификация вида инфузорий клона LSA11-2

Видовая принадлежность инфузории-хозяина была установлена на основании морфологических и молекулярно-биологических данных. С помощью анализа препаратов, окрашенных по Фельгену в модификации де Ламатера и прижизненных наблюдений с использованием дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) было установлено, что, согласно критериям, предложенным Фокиным (Fokin, 2010), по своему морфотипу (в частности, форме и размеру клеток, размеру и числу микронуклеусов) инфузории клона LSA 11-2 относятся к виду *Paramecium multimicronucleatum* (Рис. 4). Морфологические данные полностью согласуются с молекулярными данными, полученными при анализе нуклеотидной последовательности фрагмента гена 18S рРНК (Vannini, ..., Mironov et al., 2014). Полученный в результате амплификации фрагмент длиной 1710 п.о. продемонстрировал более 98% сходства с ранее опубликованными последовательностями гена 18S рРНК *P. multimicronucleatum*, имеющимися в базе данных NCBI Blastn (Vannini, ..., Mironov et al., 2014).

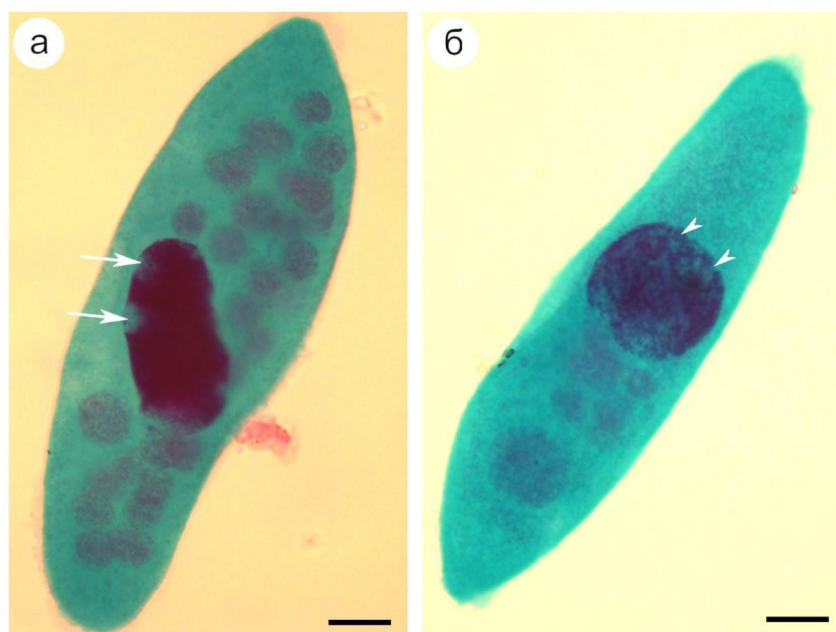


Рис. 4. Инфузория *Paramecium multimicronucleatum* (клон LSA11-2). Окраска по Фельгену в модификации Де Ламатера. а – белые стрелки указывают на лакуны в Ма инфузории; б – белыми указателями отмечены области с низкой конденсацией хроматина в Ма. Масштабная линейка 10 мкм.

#### 4.1.2 Локализация подвижного эндосимбионта в инфузориях *P. multimicronucleatum* клона LSA11-2

В отличие от обычного интенсивного равномерного окрашивания макронуклеуса не зараженных внутриядерными эндосимбионтами парамеций, на окрашенных по Фельгену препаратах было отчетливо видно, что Ма инфузорий клона LSA11-2 либо имеет полости (лакуны), практически не окрашивающиеся по Фельгену, либо демонстрирует неравномерное окрашивание с более яркими фокусами и менее интенсивно окрашенным фоном (Рис. 4). Полости в Ма наблюдались и на препаратах клеток, окрашенных DAPI (Рис.5).

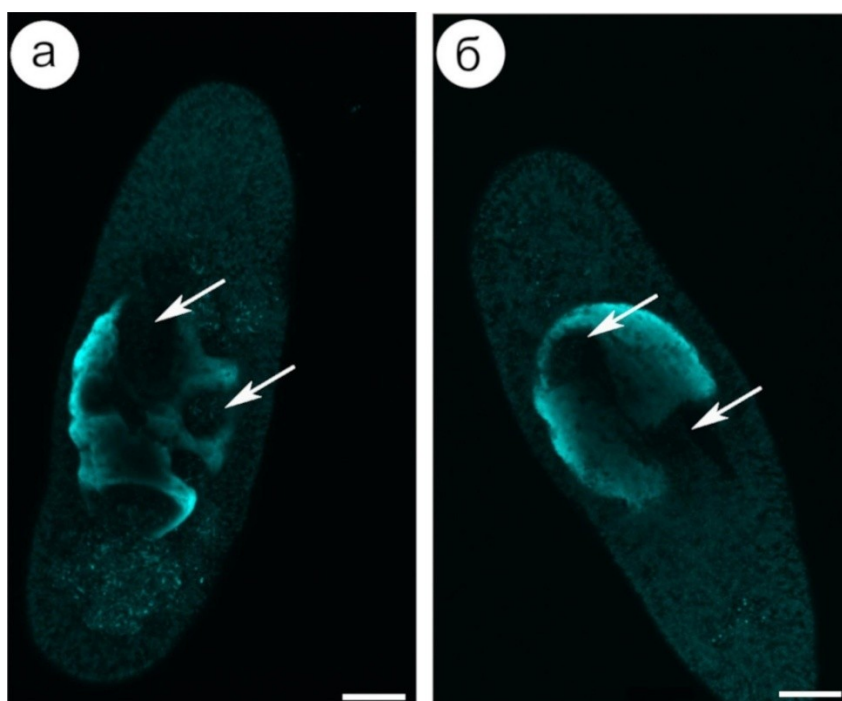


Рис. 5. Инфузория *P. multimicronucleatum* (клон LSA11-2), окрашивание флуоресцентным красителем DAPI. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Белые стрелки указывают на лакуны в Ма. Масштабная линейка 10 мкм.

Во время прижизненных наблюдений за клетками клона LSA11-2 с помощью контраста Номарского внутри Ма инфузорий также были хорошо заметны полости или лакуны, в которых активно двигались эндосимбионты (Рис. 6). Большинство бактерий передвигалось непосредственно под ядерной оболочкой Ма. Для эндосимбионтов было характерно вращение вокруг своей оси во время поступательного движения. При столкновении с преградой (границей лакуны) эндосимбионты резко меняли направление движения. Количество бактерий в пределах одной лакуны варьировало; из-за высокой подвижности клеток определить их число не

представлялось возможным, однако в ряде случаев удавалось зарегистрировать достаточно многочисленные группы эндосимбионтов в одной лакуне.

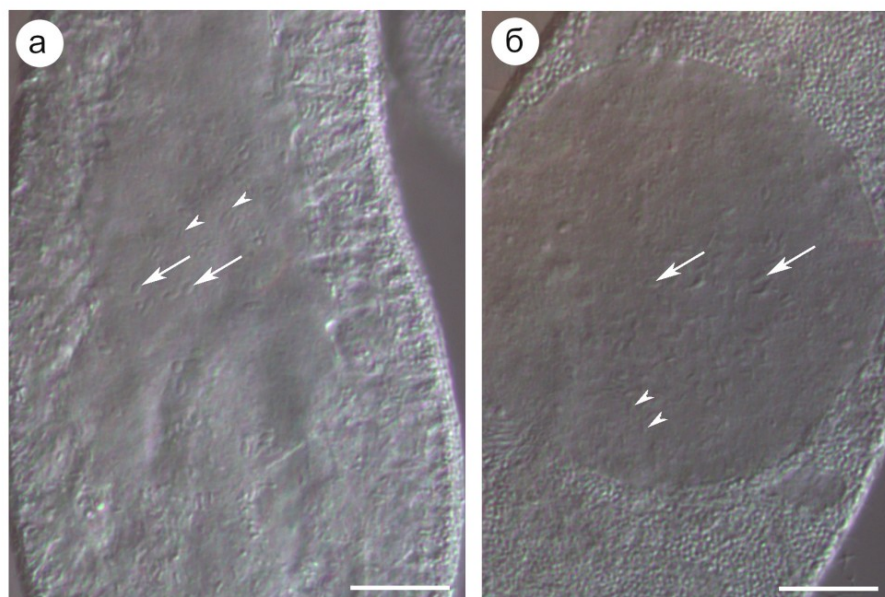


Рис. 6. Подвижные эндосимбионты в макронулеусе инфузории *P. multimicronucleatum* (клон LSA11-2), контраст Номарского. Белыми указателями отмечены бактерии палочковидной формы, белые стрелки указывают на овальные формы эндосимбионта. Масштабная линейка 10 мкм.

На давленных препаратах живых инфузорий было хорошо видно, что бактерии сохраняли свою подвижность в пузырьках, содержавших фрагменты разрушенного Ма в течение нескольких минут. После растворения фрагментов Ма в среде бактерии вскоре теряли подвижность и, вероятно, погибали (Vannini, ..., Mironov et al., 2014).

На электронограммах Ма зараженных подвижными эндосимбионтами клеток клона LSA11-2 также были отчетливо видны области, свободные от хроматина (Рис. 7а). В ряде случаев эти области были неоднородны по своей электронной плотности. Электронная микроскопия показала, что эндосимбионты в Ма не окружены какими-либо дополнительными мембранами, которые могли бы играть роль симбионтофорной вакуоли, а сами бактерии могут находиться не только в свободных от хроматина лакунах на периферии ядра, но и в толще ядра в непосредственной близости от хроматиновых телец и ядрышек (Рис. 7б, в, г).

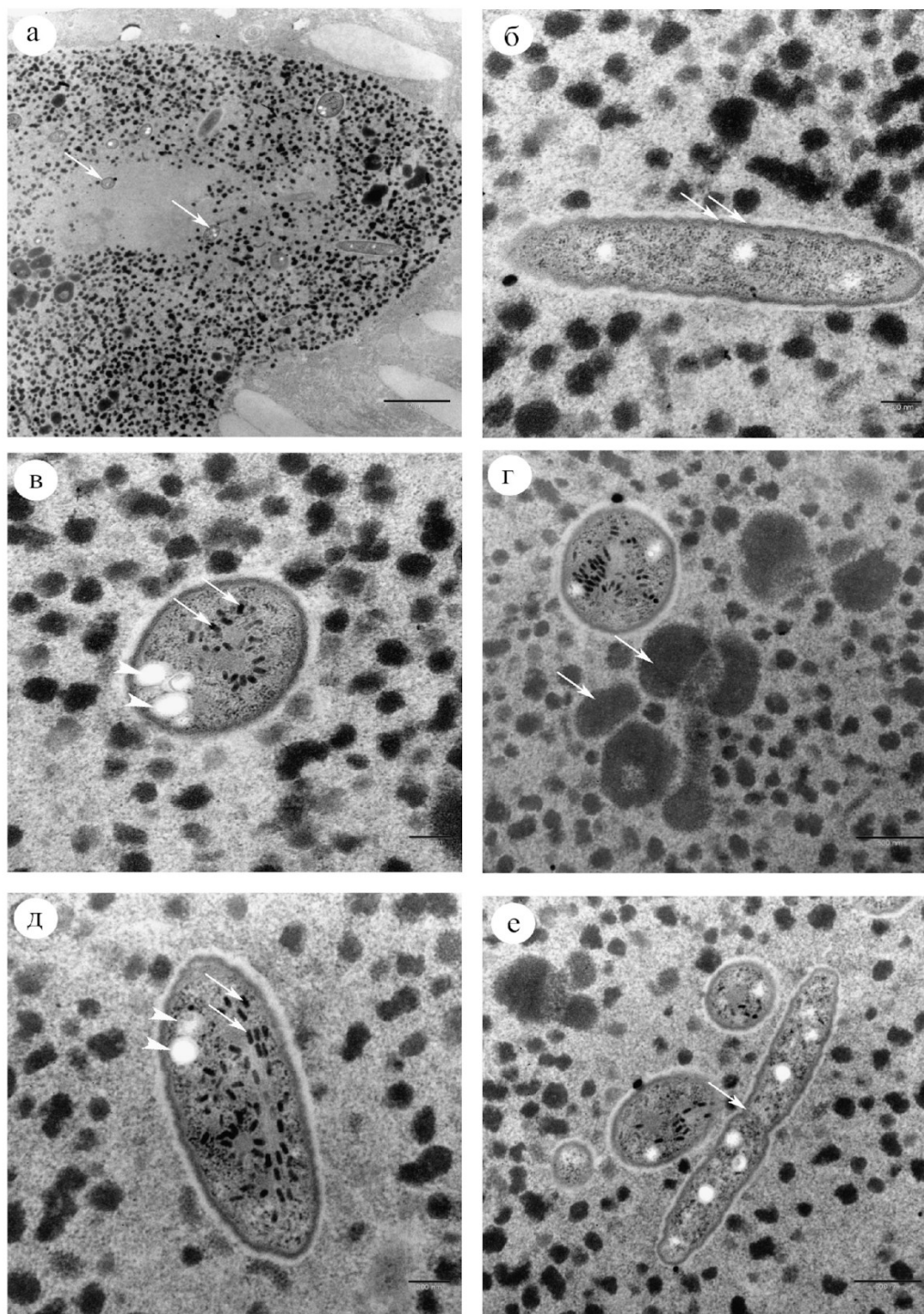


Рис. 7. Подвижный эндосимбионт в макронуклеусе инфузории *P. multimicronucleatum* клона LSA11-2. Трансмиссионная электронная микроскопия. а – белые стрелки указывают на эндонуклеобионтов; б – белые стрелки указывают на наружную мембрану бактерии; в и д – белыми указателями отмечены ПГА гранулы в цитоплазме эндосимбионта; белые стрелки указывают на вирусоподобные частицы; г – белыми стрелками отмечены элементы ядрышка; е – белая стрелка указывает на делящегося эндосимбионта в Ма клетки-хозяина. Масштабная линейка а – 2 мкм, б, в, д – 200 мкм, г и е – 500 мкм.

#### 4.1.3 Морфология и ультраструктура эндосимбионта инфузорий клона *P. multimicronucleatum* LSA11-2

На живом материале и на клетках, зафиксированных с помощью параформальдегида, было хорошо заметно, что популяция бактерий полиморфна. Некоторые бактерии имели палочковидную форму и очень активно перемещались, тогда как другие, напротив, имели овальную форму и были малоподвижны. Однако в популяции присутствовали и различные промежуточные по морфологии бактерии (Рис. 6).

Анализ ультратонких срезов показал, что строение клеточной стенки бактерии соответствует грамтрицательному морфотипу (Рис. 7б). На электронограммах, как и на живом материале, можно было легко различить палочковидные и овальные формы бактерий. В цитоплазме обеих форм бактерий были видны мелкие электронно-плотные гранулы, очевидно, рибосомы, и округлые электронно-светлые включения. Кроме того, в цитоплазме большинства эндосимбионтов были обнаружены электронно-плотные вирусоподобные частицы. На наших срезах вирусоподобные частицы, как правило, были расположены вокруг тонкофибриллярного материала, напомиавшего вироплазму, причем довольно часто их расположение носило регулярный характер (Рис. 7в, д). Элементов нуклеоида наблюдать не удалось. Несмотря на то, что прижизненные наблюдения за активно двигающимися бактериями позволяли ожидать наличия у бактерий хорошо развитого локомоторного аппарата, на ультратонких срезах жгутики были практически незаметны (Vannini,...,Mironov et al., 2014). Среди эндосимбиотических бактерий иногда встречались делящиеся клетки, что говорит о способности бактерий активно пролиферировать внутри ядра инфузории (Рис. 7е). Поскольку анализ ультратонких срезов не позволил достоверно показать на поверхности эндосимбионтов наличие жгутиков, которые могли бы обеспечивать высокую подвижность этих бактерий в ядре клетки-хозяина, мы применили два разных подхода, позволяющих выявлять придатки на поверхности бактериальной клетки: метод негативного контрастирования с помощью ацетата уранила и атомно-силовую микроскопию. Негативное контрастирование эндосимбионтов Ма инфузории *P. multimicronucleatum* с помощью ацетата уранила выявило наличие большого количества жгутиков по всей поверхности бактерий палочковидной формы, что характерно для политрих (Рис. 8). Длина каждого жгутика могла достигать 10 мкм, а толщина 20 нм. Размер бактерий палочковидной формы, определенный с помощью электронной микроскопии, составил 2 - 2.5 мкм в длину и 0.6 - 0.8 мкм в ширину (Vannini,..., Mironov et al., 2014).



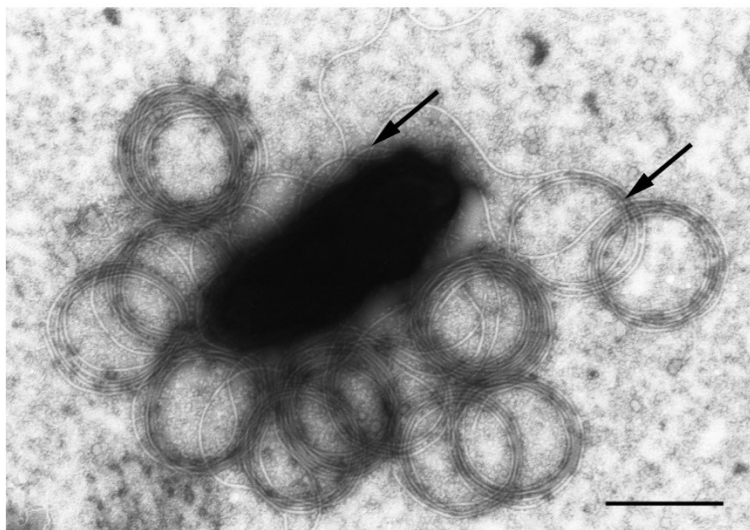


Рис. 8. Эндосимбиотическая бактерия, выделенная из клетки инфузории *P. multimicronucleatum* клона LSA11-2. Метод негативного контрастирования, трансмиссионная электронная микроскопия. Стрелками отмечены жгутики. Масштабная линейка 1 мкм. Из: Vannini,..., Mironov et al., 2014, с изменениями.

Анализ препаратов с помощью атомно-силовой микроскопии также выявил 2 морфологически различные формы симбионтов, однако из-за большей толщины овальных форм бактерий получить удовлетворительные изображения этих форм не удалось. Размеры бактерий палочковидной формы совпадали с размерами, установленными ранее с помощью негативного контрастирования, и составляли 2-2.5 мкм в длину и 0.6-0.8 мкм в ширину. Исследование поверхности бактерий палочковидной формы с помощью атомно-силового микроскопа также позволило обнаружить многочисленные жгутики, располагавшиеся по всей поверхности клетки (Рис. 9), что подтвердило наши данные, полученные методом негативного контрастирования.

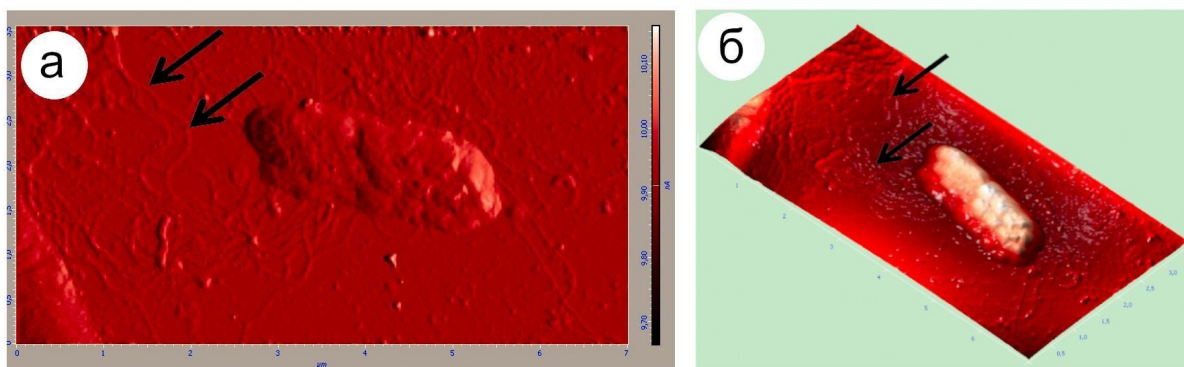


Рис. 9. Эндосимбиотическая бактерия, выделенная из клетки клона *P. multimicronucleatum* LSA11-2. Атомно-силовая микроскопия; а – tag изображение; б – 3D модель. Черными стрелками отмечены бактериальные жгутики.

#### 4.1.4 Филогенетическое положение и таксономическая принадлежность подвижных внутриядерных эндосимбионтов инфузорий *P. multimicronucleatum* клона LSA11-2

Филогенетическое положение подвижных внутриядерных бактерий клона LSA11-2 было установлено путем анализа последовательности фрагмента гена 16S рPHK (Vannini,...Mironov et al., 2014). В результате ПЦР с использованием праймеров RickFla\_F69 (5'-GTТААСТТАGGGCTTGCTC-3'), RickFla\_F87 (5'-CTCTAGGTTAATCAGTAGCAA-3'), RickBas\_F166(5'-ATGCTAATGCCGTATATTCTC-3'), Rick\_R1270 (5'-TTTTAGGGATTTGCTCCACG-3'), Rick\_R1455 (5'-CCGTGGTTGGCTGCCT-3') и последующего секвенирования с теми же праймерами был получен фрагмент гена длиной 1433 п.о., который был зарегистрирован в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI (HG315611) (Vannini,...Mironov, et al., 2014). Поиск в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI BLASTn показал, что полученная последовательность имеет 97,3% гомологии с последовательностями представителей сем. *Rickettsiaceae* (порядок *Rickettsiales*).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) со специально разработанными олигонуклеотидными зондами TrichoRick\_142 и RickFla\_430, специфичными к фрагменту полученной последовательности (Vannini,...Mironov et al., 2014), подтвердила принадлежность этой последовательности внутриядерной эндосимбиотической бактерии, а не пищевым бактериям или контаминациям (Рис. 10, 11). В Ма исследованного клона наблюдалась интенсивная флуоресценция как в красном (зонды TrichoRick\_142-Cy3 и RickFla\_430-Cy3), так и зеленом (зонд Eub\_338-Fluo3) каналах. При совмещении изображений, полученных в двух каналах, в Ма наблюдалась колокализация сигналов, поскольку внутриядерные эндосимбионты распознавались двумя зондами одновременно. В то же время в фагосомах присутствовал только зеленый сигнал – результат гибридизации эубактериального зонда с пищевыми бактериями, которые выступали в качестве отрицательного контроля. Окрашивание ядер DAPI позволило точно определить внутриядерную локализацию эндосимбионтов (Рис. 10г, 11г). После подтверждения того, что полученная нами последовательность действительно принадлежит эндосимбионту, а не является результатом контаминации, совместно с итальянскими коллегами был проведен филогенетический анализ, в который были включены 32 последовательности. В качестве внешней группы были взяты последовательности представителей других семейств порядка *Rickettsiales*.



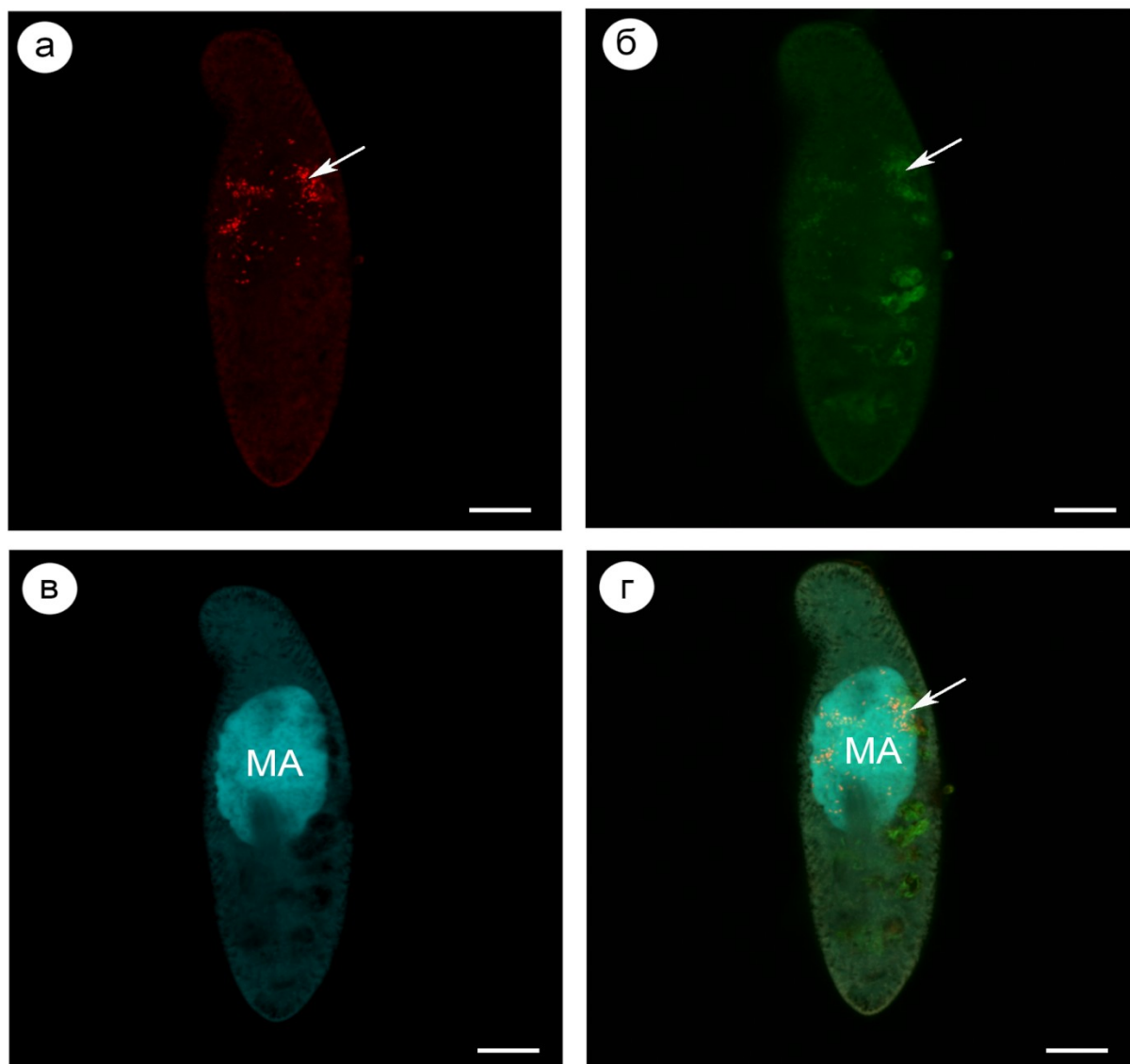


Рис. 10 Инфузория *Paramecium multimicronucleatum* (клон LSA11-2). Флуоресцентная гибридизация *in situ*, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. а – зонд TrichoRick\_142 (Cy3, красный сигнал); б – эубактериальный зонд Eub\_338 (FITC, зеленый сигнал); в – макронуклеус инфузории выявлен ДНК красителем DAPI (бирюзовый сигнал); г – совмещенное изображение (объединены изображения, полученные в трех каналах). Эндосимбиотическая бактерия в макронуклеусе инфузории выявляется как видоспецифичным, так и эубактериальным зондом, что при совмещении изображений дает желтый сигнал. Масштабная линейка 10 мкм.

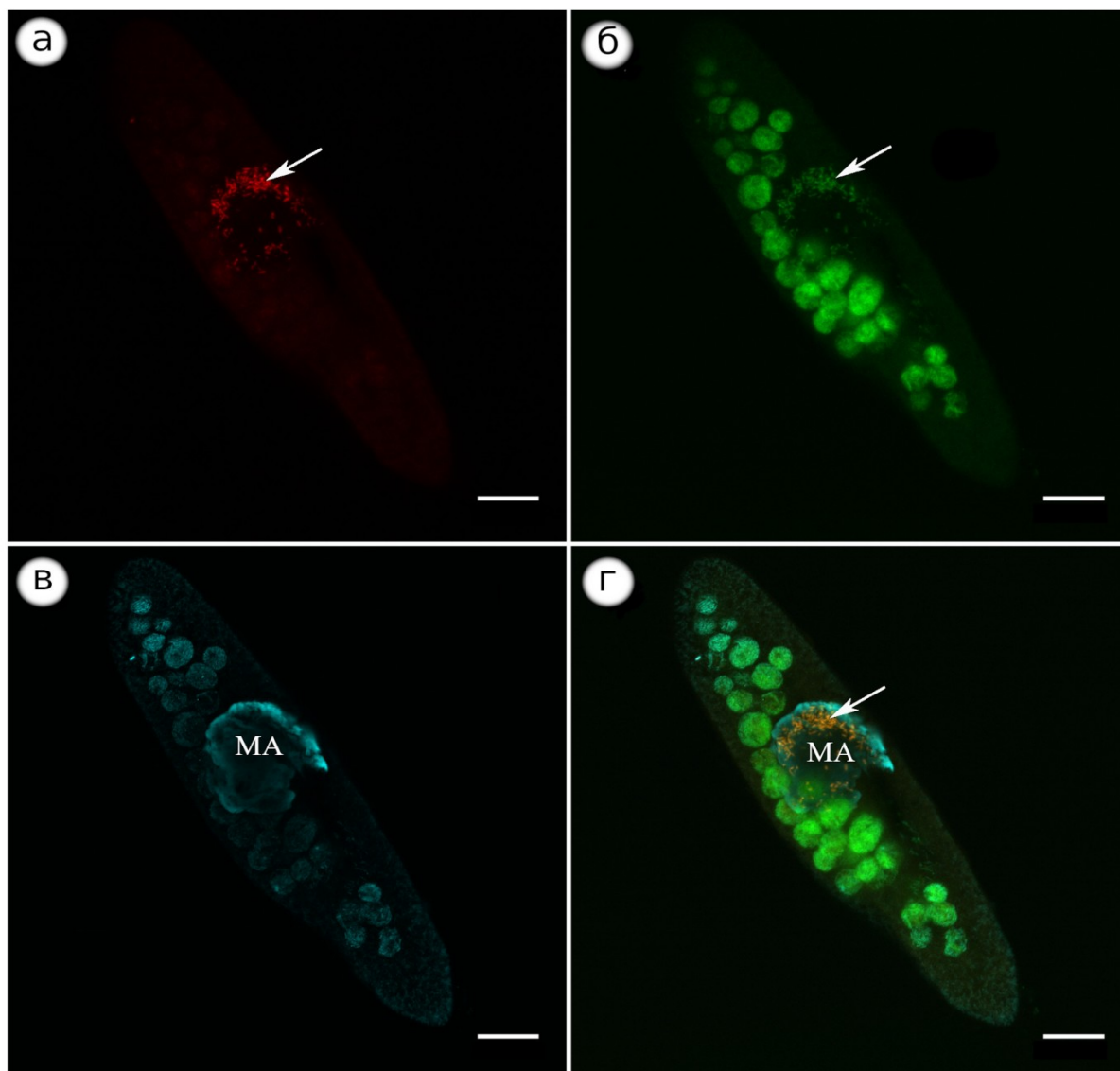


Рис. 11. Инфузория *Paramecium multimicronucleatum* (клон LSA11-2). Флуоресцентная гибридизация *in situ*, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. а – видоспецифичный зонд RickFla\_430 (СуЗ, красный сигнал); б – эубактериальный зонд Eub\_338 (FITC, зеленый сигнал); в – макронуклеус инфузории выявлен ДНК красителем DAPI (бирюзовый сигнал); г – совмещенное изображение (объединены изображения, полученные в трех каналах). Эндосимбиотическая бактерия в макронуклеусе инфузории выявляется как видоспецифичным, так и эубактериальным зондом, что при совмещении изображений дает желтый сигнал. Масштабная линейка 10 мкм.

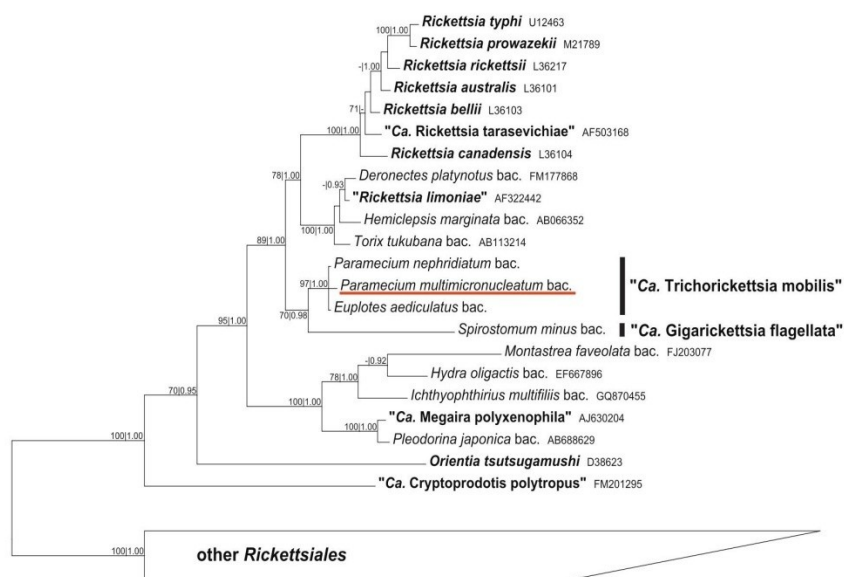


Рис. 12. Филогенетическое дерево бактерий сем. Rickettsiaceae, построенное по методу Байеса. Дерево построено с применением GTR+I+G модели. В узлах приведены поддержки, полученные методом бутстреп-анализа для метода максимального правдоподобия, и апостериорные вероятности. Значения ниже 70|0.85 опущены. Таксоны, получившие название по правилам номенклатуры микроорганизмов или условное название, выделены жирным шрифтом. Bac – бактерия, ассоциированная с . Из: Vannini,...Mironov, et al., 2014, с изменениями.

Анализ этих последовательностей показал, что подвижный эндосимбионт макронуклеуса инфузории *P. multimicronucleatum* является сестринским по отношению как к видам риккетсий членистоногих, в том числе возбудителям серьезных заболеваний человека, получившим валидное описание (*Rickettsia rickettsia*, *R. prowazekii*, *R. typhi*), так и организмов, родственных *Rickettsia limonia*, имеющих более широкий круг хозяев, но не получивших формальное описание (Рис. 12). Согласно современным представлениям, вид может быть отнесен к роду *Rickettsia* лишь в том случае, если его последовательность гена 16S рРНК имеет не менее 98,1% сходства с этой последовательностью других представителей этого рода (Fournier, Raoult, 2009). Поэтому подвижный внутриядерный эндосимбионт инфузории *P. multimicronucleatum* представляет собой новый род в семействе Rickettsiaceae. По правилам микробиологической номенклатуры, бактерии, не культивируемые в лаборатории и охарактеризованные на основе анализа ДНК получают статус кандидатного вида. В связи с наличием у данной риккетсии большого количества жгутиков, обеспечивающих их подвижность внутри ядра хозяина, для нее было предложено название *Ca. Trichorickettsia mobilis* (Vannini,...Mironov et al., 2014). Следует

отметить, что другой вид риккетсиоподобных эндосимбионтов, имеющих широкий круг хозяев, включающий инфузорий, *Ca. Megaira polyxenophila*, находится в другой кладе (Рис. 12).

#### 4.1.5 Биологические свойства парameций клона LSA11-2 и их эндосимбионтов *Ca. Trichorickettsia mobilis*

Ни в одном из экспериментов, направленных на выявление киллер-эффекта, мы не зарегистрировали гибели клеток ни на одном из сроков. Таким образом, зараженные подвижными эндосимбионтами парameции не обладают киллер-эффектом по отношению к незараженным инфузориям.

Ни в одном из проведенных экспериментов по заражению свободных от эндосимбионтов инфузорий того же вида суспензией из гомогенизированных парameций клона LSA 11-2, нам не удалось получить заражения. Это свидетельствует о том, что бактерии *Ca. Trichorickettsia mobilis* не обладают инфекционной способностью в условиях искусственного выделения эндосимбионтов из клеток.

#### 4.2 Принадлежность макронуклеарных эндосимбионтов из клонов *P. multimicronucleatum* Busnau, Kp154-4 и AB9-4 к виду *Ca. Trichorickettsia mobilis*

В коллекции культур инфузорий RC ССМ Ресурсного Центра СПбГУ «Культивирование микроорганизмов» поддерживалось еще два клона *P. multimicronucleatum* (Kp154-4 и AB9-4), в Ма которых при анализе с помощью оптики Номарского выявлялись подвижные эндосимбионты. Клон *P. multimicronucleatum* Busnau из коллекции Технического Университета Штутгарта также содержал в Ма подвижные бактерии. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с видоспецифичным олигонуклеотидным зондом RickFla\_430, разработанным для клона LSA11-2, подтвердила принадлежность эндосимбионтов этих трех клонов к вновь описанному виду *Ca. Trichorickettsia mobilis* (Рис. 13), что позволило нам в дальнейшем исследовать стабильность данной симбиотической системы на четырех клонах.

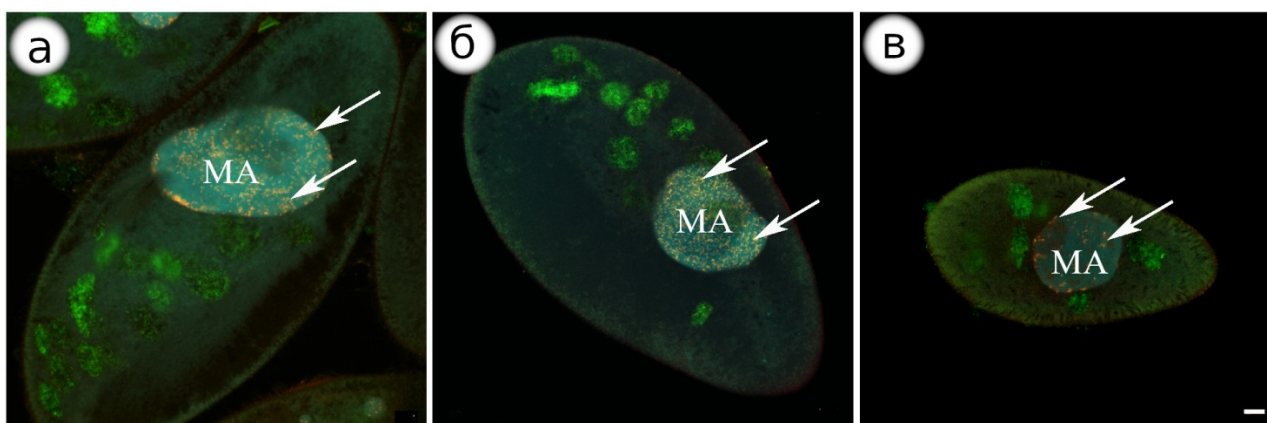


Рис. 13. Бактерии *Ca. T. mobilis* в разных клонах *P. multimicronucleatum*. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с применением зонда Rickfla\_430, меченного флуорохромом Cy3 (красный сигнал), и зонда Eub\_338, меченного Fluo3 (зеленый сигнал), ядра подкрашены DAPI (голубой сигнал). Для каждого клона представлено совмещенное изображение (объединены изображения, полученные в трех каналах). Белые стрелки указывают на симбиотические бактерии в Ма. а – клон Кр154-4; б – клон АВ9-4; в – клон Bűsnau. Масштабная линейка 10 мкм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020, с изменениями.

### 4.3 Влияние различных antimicrobных препаратов на симбиотическую систему

#### *Paramecium multimicronucleatum*/*Ca. Trichorickettsia mobilis*

##### 4.3.1 Влияние антибиотиков на жизнеспособность партнеров симбиотической системы *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis*

Перед началом экспериментов по оценке влияния антибиотиков на жизнеспособность эндосимбионта и инфузории-хозяина присутствие эндосимбионтов в каждом клоне проверяли с использованием контраста Номарского или флуоресцентной гибридизации *in situ* с видоспецифичным олигонуклеотидным зондом RickFla\_430. Все клоны парамеций (LSA 11-2, Busnau, Кр154-4 и АВ9-4), за исключением контрольных (MSA и СуР5-3) демонстрировали 100%-ную зараженность трихориккетсиями, при этом бактерии находились в Ма, обладали заметной подвижностью и не обнаруживались в цитоплазме. Результаты экспериментов по обработке стрептомицином, ампициллином и хлорамфениколом четырех клонов инфузორий *P. multimicronucleatum*, зараженных бактерией *Ca. T. mobilis*, и контрольного клона MSA, свободного от эндосимбионтов, приведены в таблице (Табл. 3).

Таблица 3. Влияние стрептомицина, ампициллина и хлорамфеникола на симбиотическую систему *P. multimicronucleatum*/Ca. *Trichorickettsia mobilis*.

Антибиотик	Концентрация	100 мкг/мл			250 мкг/мл			500 мкг/мл			1000 мкг/мл			
		День	3	10	15	3	10	15	3	10	15	3	10	15
Стрептомицин	LSA11-2	День												
	Клон													
	LSA11-2	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	-	-	-
	Büsnau	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	-	-	-
	Кр154-4	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б
Ампициллин	AB9-4	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б
	MSA (контр)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LSA11-2	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б
	Клон	ф	ф	ф	ф	фо	ф	ф	фо	ф	фо	фо	фо	фо
	Büsnau	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б
Хлорамфеникол	Клон	ф	ф	ф	ф	фо	ф	ф	фо	ф	фо	фо	фо	
	Кр154-4	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	
	AB9-4	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	
	MSA (контр)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	LSA11-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хлорамфеникол	Клон	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Büsnau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Кр154-4	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	-	-	-	
	AB9-4	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	+б	-	-	-	
	MSA (контр)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

«+» – инфузории живы, «-» – 100% инфузорий погибли, «б» – присутствуют подвижные бактерии в Ма инфузории, «о» – присутствие овальных форм бактерии, «ф» – присутствие филаментозных форм бактерии.

Как видно из таблицы, стрептомицин не оказывал влияния ни на жизнеспособность хозяина, ни на подвижность и внутриядерную локализацию эндосимбионта во всех клонах при всех использованных концентрациях, за исключением максимальной (1000 мкг/мл). Обработка клеток клонов LSA11-2 и Büsnau стрептомицином в концентрации 1000 мкг/мл приводила к гибели инфузорий уже на 3-й день после начала эксперимента. Воздействие ампициллином никак не сказывалось на жизнеспособности хозяина и эндосимбиотической бактерии во всех клонах, однако под влиянием ампициллина часто происходило изменение морфотипа



эндобионта. Наряду с палочковидными подвижными бактериями, в макронуклеусах инфузорий можно было обнаружить неподвижные или малоподвижные бактерии овальной формы и/или филаментозную (нитевидную) форму трихориккетсий (Рис. 14а, б). Филаментозные формы могли достигать 50 мкм и встречались в Ма инфузорий клонов LSA11-2 и Bünsau во всех концентрациях ампициллина. В клонах АВ9-4 и Кр154-4 филаментозные формы бактерий наблюдали в концентрациях 250 мкг/мл и выше, а овальные формы бактерии — только в наивысшей концентрации 1000 мкг/мл (Рис. 14а, б).

Интересно отметить, что обработка ампициллином приводила к выходу трихориккетсий за пределы Ма в цитоплазму инфузории. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зонда Alf1b, специфичного к группе Альфапротеобактерий (Рис. 15), и видоспецифичного зонда RickFla\_430 (Рис. 16) мы наблюдали сигнал как в Ма, так и за его пределами.

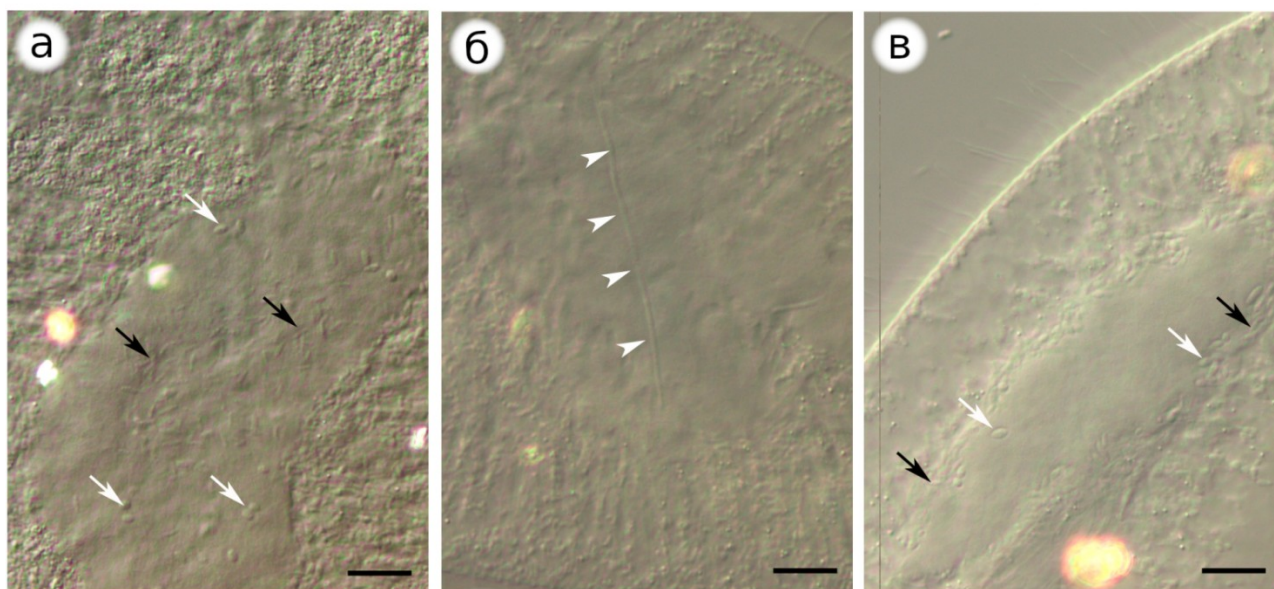


Рис. 14. *Ca. T. mobilis* в макронуклеусе инфузории *P. multimicronucleatum* после обработки антибиотиками. Клетки зафиксированы параформальдегидом, контраст Номарского. а – клон LSA 11-2, 10-й день после обработки ампициллином (1000 мкг/мл); б – клон LSA 11-2, 3-й день после обработки ампициллином (500 мкг/мл); в – клон Кр154-4 10-й день после обработки хлорамфениколом (500 мкг/мл). Короткие палочковидные бактерии отмечены черными стрелками, овальные формы эндосимбионта – белыми стрелками. Указателями отмечены нитевидные формы бактерий. Масштабная линейка 10 мкм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020, с изменениями.

При этом наблюдавшиеся в цитоплазме трихориккетсии находились за пределами пищеварительных вакуолей, поскольку содержимое последних связывалось только с практически универсальным зондом Eub\_338, специфичным по отношению ко всем

зубактериям, и не связывалось с видоспецифичным зондом RickFla\_430 (Рис. 16). Образование овальных и филаментозных форм трихориккетсий также наблюдали при обработке инфузорий клонов АВ9-4 и Кр154-4 хлорамфениколом в концентрации 500 мкг/мл (Табл. 3, Рис. 14в). Следует отметить, что эффект, производимый хлорамфениколом, существенно различался для разных клонов, зараженных трихориккетсиями. Так, в отличие от действия ампициллина, обработка парамеций клонов LSA11-2 и Būsnau хлорамфениколом в любой концентрации приводила к их гибели. Вместе с тем инфузории клонов АВ9-4 и Кр154-4 выживали и сохраняли подвижных эндонуклеобионтов во всех концентрациях хлорамфеникола, за исключением наивысшей (1000 мкг/мл), которая была летальна как для всех зараженных инфузорий, так и для контрольного незараженного клона MSA. При этом наивысшая концентрация хлорамфеникола вызывала гибель всех клонов в течение всего нескольких часов после начала эксперимента (Табл. 3).

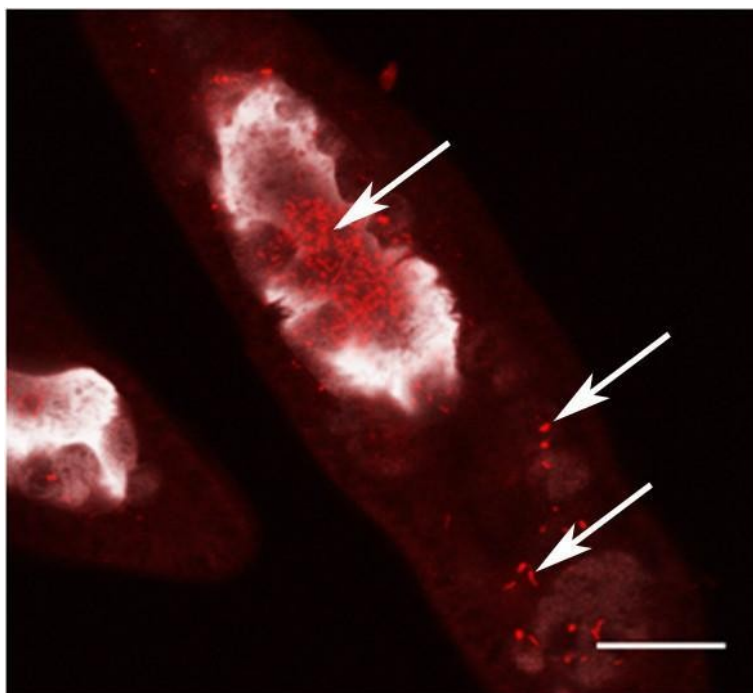


Рис. 15. Клетка *P. multimicronucleatum* (клон LSA11-2), 3-й день после обработки ампициллином. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием зонда, специфичного к Альфапротеобактериям Alf1b (Cy3, красный сигнал). Стрелки указывают на трихориккетсий, расположенных в макронуклеусе (подкрашен DAPI, белый цвет) и в цитоплазме. Масштабная линейка 20 мкм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020, с изменениями.

Ввиду гибели клона Būsnau, эксперименты по исследованию воздействия тетрациклина на симбиотическую систему проводили на трех оставшихся зараженных клонов, АВ9-4, LSA11-2, Кр154-4. Эти три клон, а также незараженные MSA и СуР5-3 проявили крайне высокую чувствительность к тетрациклину, который пришлось использовать в концентрациях, на



порядок меньших, чем концентрации трех других антибиотиков. В результате выживали клетки только в самой низкой концентрации антибиотика, 10мкг/мл (Табл. 4).

Таблица 4. Результат воздействия тетрациклина на зараженные трихориккетсиями и незараженные клоны инфузории *P. multimicronucleatum*

Клон/концентрация	10 мкг/мл	25 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл
LSA11-2	+б	-	-	-
Кр154-4	+б	-	-	-
АВ9-4	+б	-	-	-
MSA (контроль)	+	-	-	-
СУР5-3 (контроль)	+	-	-	-

«+» – инфузории живы, «-» – 100% инфузорий погибли, «б» – присутствуют подвижные бактерии в Ма инфузории.

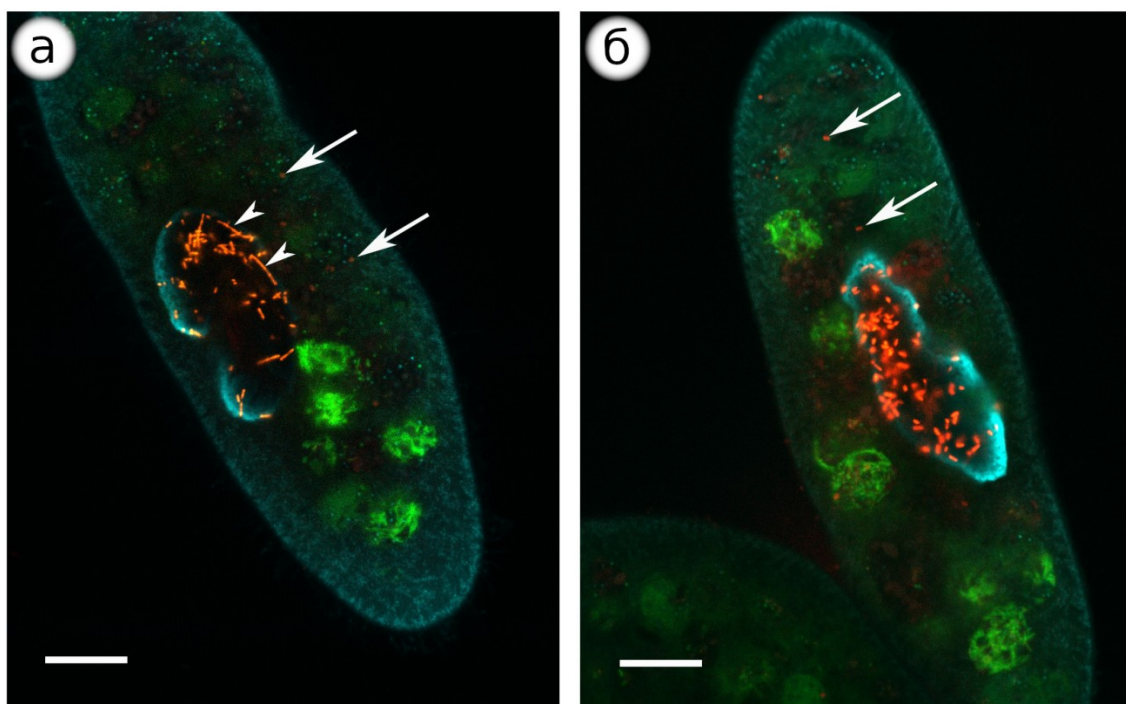


Рис. 16. Инфузория *P. multimicronucleatum* (клон Кр154-4), зараженная бактерией *Ca. T. mobilis*, 15-й день эксперимента с неоднократной обработкой ампициллином (1000 мкг/мл). Флуоресцентная гибридизация *in situ*, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Видоспецифичный зонд RickFla\_430 (Cy3, красный сигнал) и эубактериальный зонд Eub\_338 (Fluo3, зеленый сигнал), контуры макронуклеуса инфузории выявлены с помощью красителя DAPI. а – наряду с палочковидными формами бактерий в ядре присутствуют нитевидные формы (белые указатели); б – некоторые трихориккетсии выявляются за пределами макронуклеуса клетки-хозяина; бактерия, отмеченная двойной стрелкой, находится в вакуоли,

не содержащей пищевых бактерий. Масштабная линейка 10 мкм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020, с изменениями.

У всех выживших зараженных инфузорий сохранялись подвижные эндобионты в Ма. Ни в одном из экспериментов нам не удалось получить апосимбиотические (освободившиеся от симбионтов) клеточные линии.

#### 4.3.2 Ультраструктура и локализация трихориккетсий после воздействия ампициллином

В интактных зараженных инфузориях наружная и внутренняя мембраны симбионта *Ca. T. mobilis* обычно тесно прилежат друг к другу, так что периплазматическое пространство (пространство между наружной и внутренней мембранами) плохо заметно независимо от метода фиксации материала (Рис. 17).

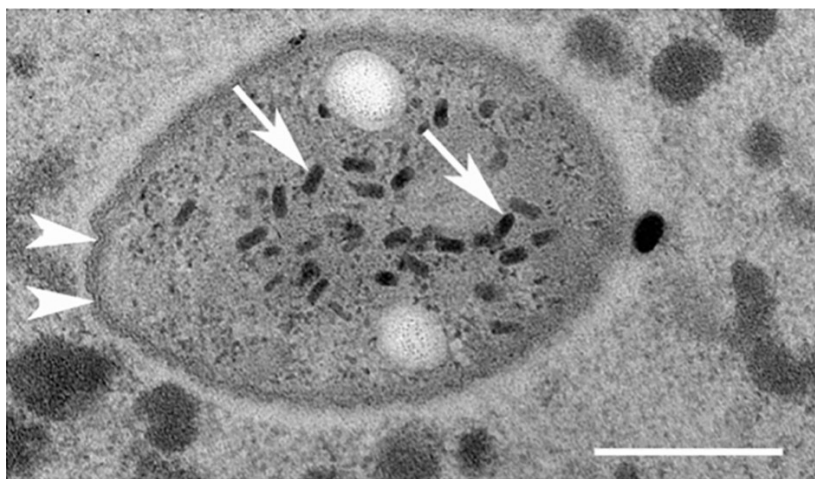


Рис. 17. Эндосимбионты *Ca. T. mobilis* в макронуклеусе инфузории *P. multimicronucleatum* (клон Кр154-4) в отсутствие обработки антибиотиками. Трансмиссионная электронная микроскопия. Белыми указателями отмечена наружная мембрана, плотно прилегающая к внутренней мембране. Белые стрелки указывают на вирусоподобные частицы в цитоплазме бактерии. Масштабная линейка 200 нм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020, с изменениями.

В Ма инфузорий, подвергшихся воздействию ампициллина, на одних и тех же срезах наряду с бактериями, имеющими близко расположенные наружную и внутреннюю (плазматическую) мембраны, присутствовали трихориккетсии с расширенным электронно-светлым периплазматическим пространством, что, возможно, связано с нарушением клеточной стенки бактерии (Рис. 18а-д). Независимо от концентрации и длительности воздействия ампициллина заражение в Ма сохранялось, при этом бактерии с расширенным периплазматическим пространством присутствовали как на 5-й, так и на 15-й день после начала

эксперимента. Некоторые эндосимбионты, локализованные в Ма, были окружены тонкофибрилярным материалом, по своей электронной плотности заметно не отличавшимся от интерхроматинового компартмента, но обладавшим хорошо выраженной упорядоченностью (Рис. 18е). Интересно отметить, что в трихориккетсиях, окруженных тонкофибрилярным материалом, структура вирусоподобных частиц, присутствовавших в их цитозоле, нарушалась, контуры вирусоподобных частиц становились менее четкими, при этом заметного отслоения наружной мембраны бактерии, которое свидетельствовало бы о нарушении ее клеточной стенки, не было выявлено. Поскольку на наших ультратонких срезах все бактерии в Ма оказывались перерезанными поперек или тангентально, достоверно различить палочковидную и филаментозную форму *Ca. T. mobilis* внутри Ма оказалось невозможно.

С помощью электронной микроскопии нам удалось подтвердить выход трихориккетский за пределы Ма под действием ампициллина, ранее показанный нами методом FISH. Вышедшие из Ма инфузории бактерии лишь изредка лежали свободно в цитоплазме, причем иногда вблизи свободно лежащей трихориккетсии наблюдали изогнутую цистерну, напоминавшую формирующийся подкововидный фагофор (Рис. 19а). Однако большинство симбионтов, вышедших в цитоплазму после обработки ампициллином, находились в вакуолях, окруженных одной мембраной (Рис. 19 б-д). В некоторых случаях в непосредственной близости от вакуолей, содержащих симбионтов, находились лизосомы (Рис. 19б). Иногда нам удавалось наблюдать сайты слияния лизосом с вакуолью, содержащей трихориккетсию. Бактерии *Ca. T. mobilis*, располагавшиеся как свободно в цитоплазме, так и в вакуолях, по своей структуре практически не отличались от бактерий в Ма, однако нам нередко встречались картины, свидетельствовавшие о выходе вирусоподобных частиц за пределы бактерии при ее попадании в вакуоль (Рис. 19в, г, д). Содержимое таких вакуолей по электронной плотности сходно с содержимым лизосом. Примечательно, что эндосимбионты в вакуолях всегда были окружены электронно-светлой областью, по-видимому, оставшейся от плохо сохранившихся бактериальных жгутиков и хорошо заметной на фоне более электронно-плотного содержимого вакуоли. В редких случаях мы наблюдали разрушение вирусоподобных частиц внутри вакуоли, при этом на поверхности эндосимбионта иногда образовывались пузыри (Рис. 19д). Вакуоли, содержавшие эндосимбионтов (Рис. 19а-д), существенно отличались от только что сформированных пищеварительных вакуолей (Рис 19е). Первые содержали только *Ca. T. mobilis*, которые были легко отличимы от пищевых бактерий благодаря наличию вирусоподобных частиц, и никогда не включали пищевых бактерий. Во вновь образованных фагосомах же, напротив, обнаруживались только пищевые бактерии, все пространство между которыми всегда было электронно-светлым, что существенно отличало их от вакуолей, занятых эндосимбионтами (Рис. 19е).

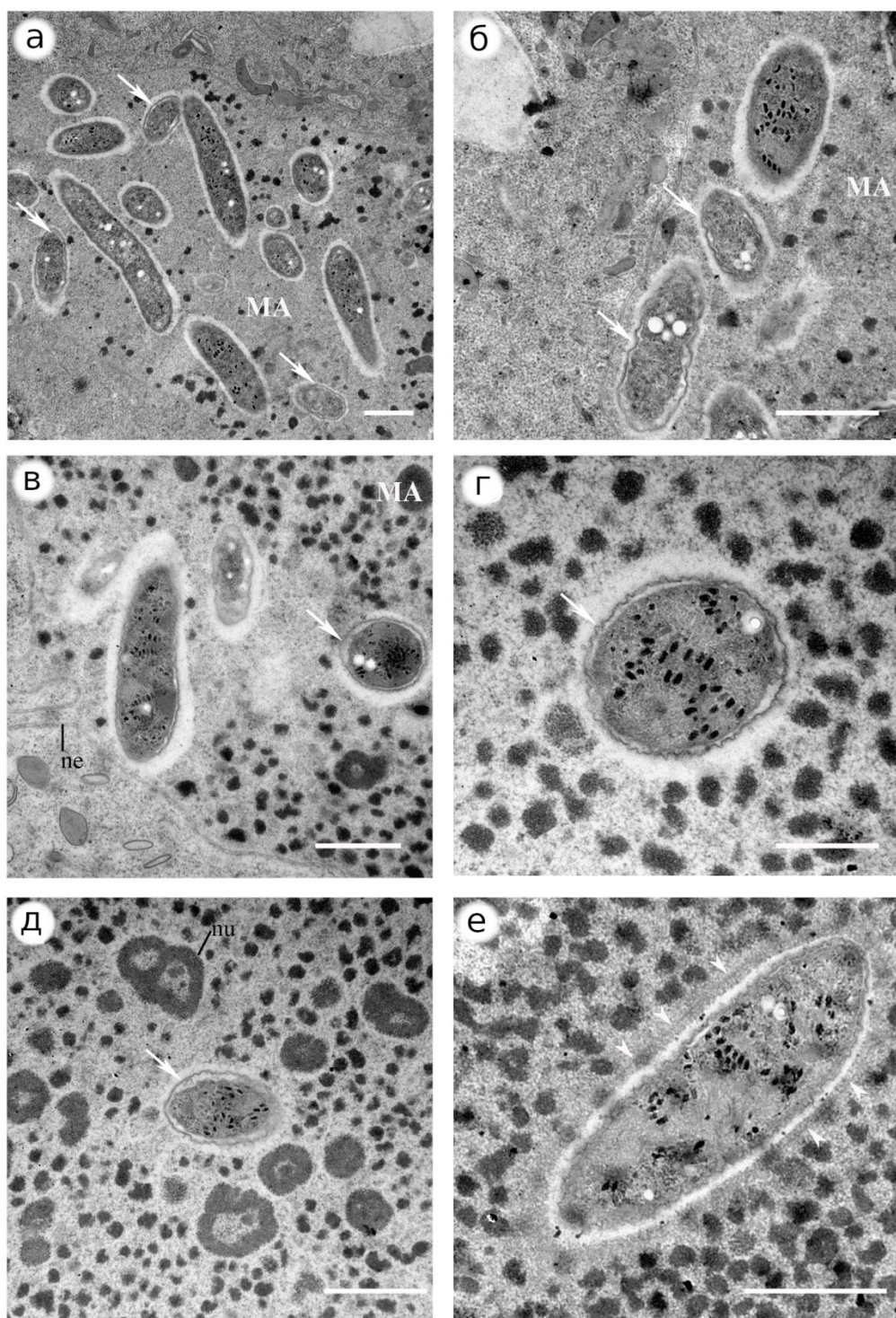


Рис. 18. *Ca. T. mobilis* в макронуклеусе инфузории *P. multimicronucleatum* клона Кр154-4 после повторных обработок ампициллином. Трансмиссионная электронная микроскопия. а, б, е – 5-й день; в, г, д, – 15-й день после начала эксперимента, стрелкой отмечены бактерии с отслоившейся наружной мембраной; е – бактерия, окруженная слоем тонкофибриллярного материала (белые указатели). Ма – макронуклеус, пе – ядерная оболочка, пу – ядрышко. Масштабная линейка а-д – 1 мкм, е – 500 нм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020, с изменениями.



#### 4.3.3 Влияние комплекса антибактериальных пептидов FLIP7 на симбиотическую систему *P. multimicronucleatum*/Ca. T. mobilis

Для определения диапазона концентраций смеси антибактериальных пептидов FLIP7, которые должны были быть использованы в следующих экспериментах, были проведены предварительные эксперименты с высокими (0.2, 2, 10 и 20 мг/мл) и низкими (20 и 100 мкг/мл) концентрациями FLIP7; эксперимент повторяли один раз для каждой концентрации. Клетки инфузорий зараженного клона Кр154-4 и контрольного клона СуР5-3 сначала были подвергнуты действию высоких концентраций FLIP.

Применение FLIP7 в высоких концентрациях приводило к гибели как зараженных, так и свободных от трихориккетсий инфузорий, причем в наивысшей концентрации FLIP7 (20 мг/мл) инфузории погибали в течение 1 мин после начала эксперимента, а в самой низкой концентрации (0.2 мг/мл) гибель инфузорий наступала через 20 мин. Сроки гибели клеток не отличались для зараженного трихориккетсиями и контрольного клона. В эксперименте с использованием низких концентраций FLIP7 (20 и 100 мкг/мл) инфузории обоих клонов выживали при кратковременном воздействии (1 ч), и гибель инфузорий была зарегистрирована лишь в контрольном клоне СуР5-3 на последнем сроке (3-й день) при концентрации FLIP7 100 мкг/мл. Зараженные *Ca. T. mobilis* инфузории, подвергшиеся воздействию низких концентраций FLIP7, выживали во всех сроках, в том числе и на 3-й день эксперимента. Выжившие инфузории зараженного трихориккетсиями клона сохраняли подвижных эндосимбионтов в Ма.

В последующих опытах использовали FLIP7 в концентрациях 20, 100, 200 и 400 мкг/мл. Оценку выживаемости зараженных трихориккетсией клонов инфузорий Кр154-4 и LSA11-2, и контрольного клона ESa2-3 проводили в трех независимых экспериментах, выполненных в разные дни. Результаты экспериментов кратковременного (1ч) и долгосрочного (7 дней) воздействия FLIP7 на жизнеспособность инфузорий и их способность поддерживать трихориккетсий в Ма представлены в Таблице 5 (Табл. 5). В концентрации 20мкг/мл FLIP7 не оказывал влияния ни на зараженные трихориккетсиями клетки, ни на контрольный клон ESa2-3. Аналогичный результат был получен при обработке инфузорий FLIP7 в концентрации 100 мкг/мл через 1 ч после начала эксперимента, однако через 7 дней происходила гибель контрольного клона, в то время как зараженные трихориккетсиями клоны выживали.

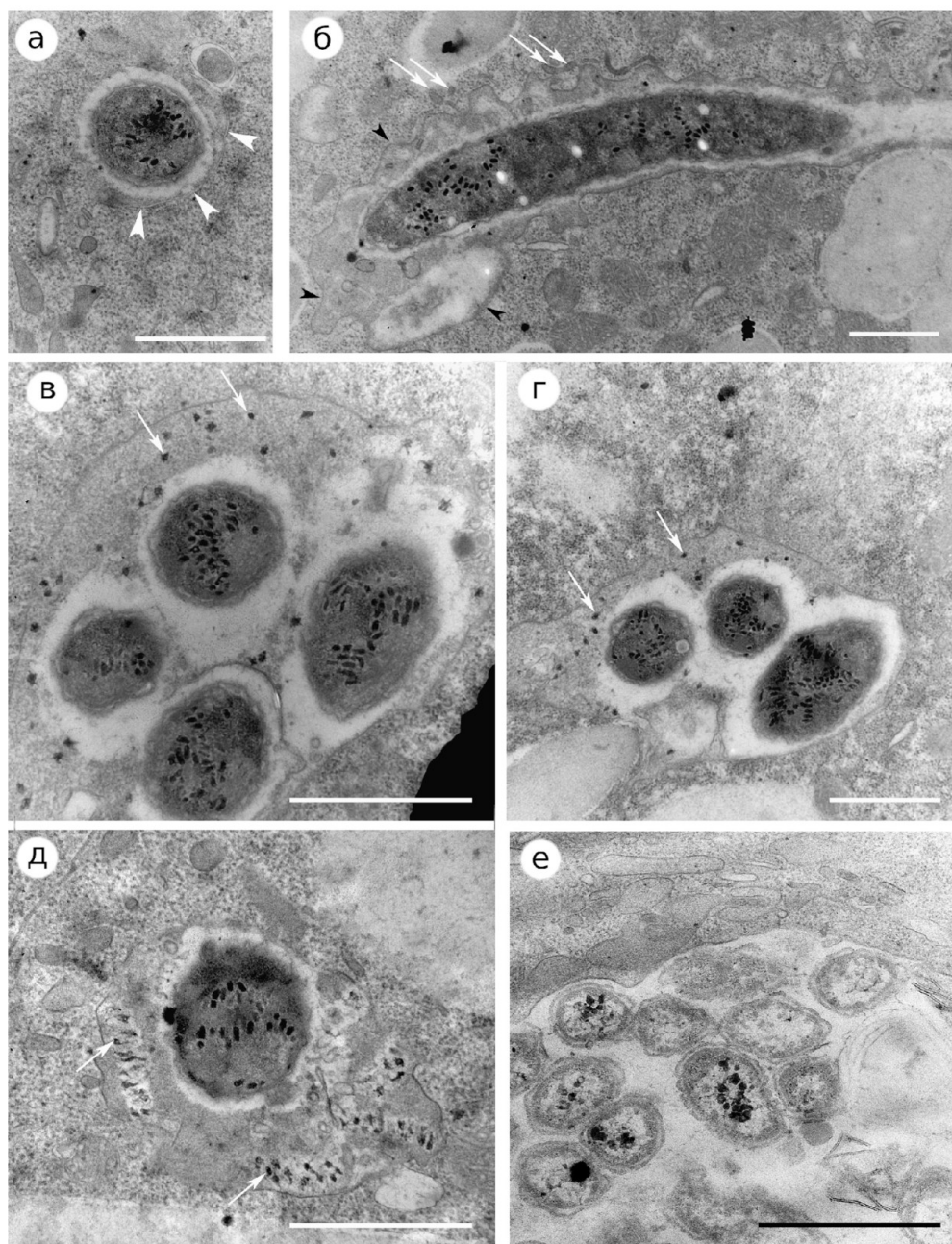


Рис. 19. Зараженная трихориккетсиями инфузория *P. multimicronucleatum* (клон Кр154-4), 5-й день после обработки ампициллином. Трансмиссионная электронная микроскопия. а, б, в, г, д – *Sa. T. mobilis* в цитоплазме клетки-хозяина; а – свободно лежащая в цитозоле бактерия (поперечный срез), белыми указателями отмечена подкововидная цистерна, напоминающая формирующийся фагофор; б – тангентальный срез филаментозной формы трихориккетсии, заключенной в вакуоль (мембрана вакуоли обозначена черными указателями, белые стрелки указывают на места, где лизосомы сливаются с мембраной вакуоли); в, г, д – поперечный срез бактерий в вакуолях (стрелки указывают на вирусоподобные частицы за пределами бактерий); е – пищевые бактерии *Klebsiella aerogenes* в фагосоме. Масштабная линейка 1 мкм. Из: Mironov, Sabaneyeva, 2020 с изменениями.

Контрольный и один из зараженных клонов (Кр154-4) оказались более чувствительны к FLIP7 в концентрации 200 мкг/мл и погибали уже через 1 ч после начала эксперимента. Инфузории клона LSA11-2 проявляли большую устойчивость к FLIP7 и оставались живы на 7 день после начала эксперимента, поэтому в последующих экспериментах с использованием фракций FLIP7 мы использовали только более чувствительный клон Кр154-4. В наивысшей концентрации FLIP7 (400 мкг/мл) через час после начала эксперимента погибали как инфузории зараженных трихориккетсиями клонов, так и контрольного клона. Все выжившие инфузории клонов LSA11-2 и Кр154-4 несли в своем Ма подвижных эндонуклеобионтов.

Таблица 5. Влияние смеси антибактериальных пептидов FLIP7 на симбиотическую систему инфузория *P. multimicronucleatum*/ *Ca. T. mobilis* на 1-й и 7-й день после начала эксперимента.

Клон	Концентрация FLIP7								
	20 мкг/мл		100 мкг/мл		200 мкг/мл		400 мкг/мл		
	1 час	7-й день	1 час	7-й день	1 час	7-й день	1 час	7-й день	
ESa3-2 (контр.)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Кр155-4	+б	+б	+б	+б	-	-	-	-	-
LSA11-2	+б	+б	+б	+б	+б	+б	-	-	-

«+» – инфузории живы, «-» – инфузории погибли, «б» – в Ма инфузории присутствуют подвижные бактерии. Из: Mironov et al., 2022, с изменениями.

#### 4.3.4 Локализация и ультраструктура бактерий *Ca. T. mobilis* после обработки инфузори-хозяев смесью антимикробных пептидов FLIP7

Как при прижизненных наблюдениях с использованием ДИК, так и на препаратах, полученных методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с применением видоспецифичного зонда RickFla\_430, в Ма всех выживших инфузорий клонов LSA11-2 и Кр154-4 отчетливо выявлялись бактерии *Ca. T. mobilis* (Рис. 20, 21). Интересно отметить, что на 7-й день после воздействия FLIP в концентрации 100 мкг/мл в Ма клетки-хозяина преимущественно наблюдались трихориккетсии овальной формы (Рис. 20 а).

На препаратах, приготовленных методом FISH с использованием видоспецифичного зонда RickFla\_430, видно, что хотя большинство трихориккетсий по-прежнему локализованы в Ма клетки-хозяина, в цитоплазме инфузории присутствуют отдельные трихориккетсии, окруженные хроматином, выявляющимся DAPI (Рис. 21).

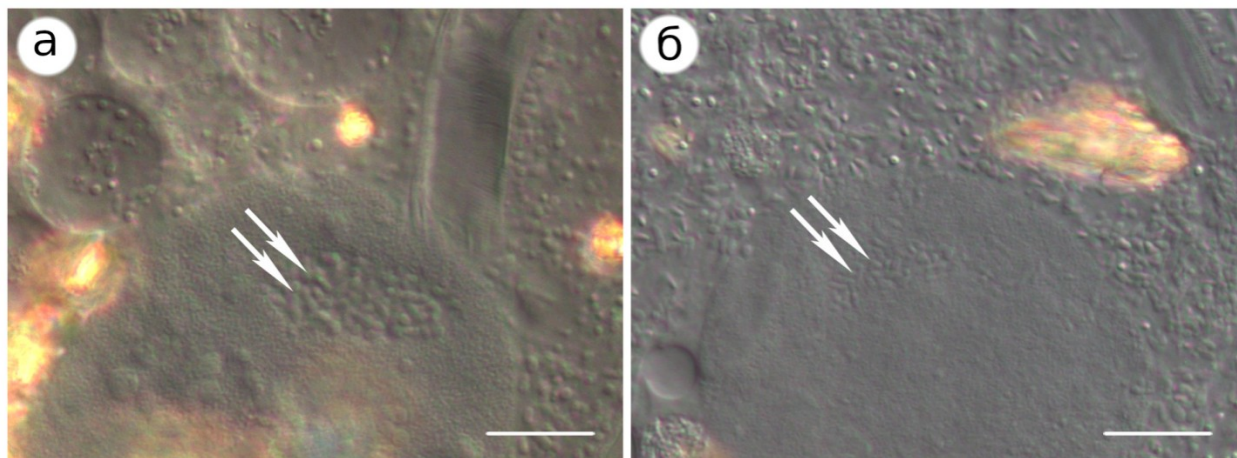


Рис. 20. Живая инфузория *P. multimicronucleatum* (клон Кр154-4), зараженная бактерией *Ca. T. mobilis*. а – 7 дней после обработки FLIP7 в концентрации 100 мкг/мл, б – инфузория без обработки. Стрелки указывают на эндосимбионтов в макронуклеусе клетки-хозяина. Масштабная линейка 10 мкм. Из: Mironov et al., 2022, с изменениями.

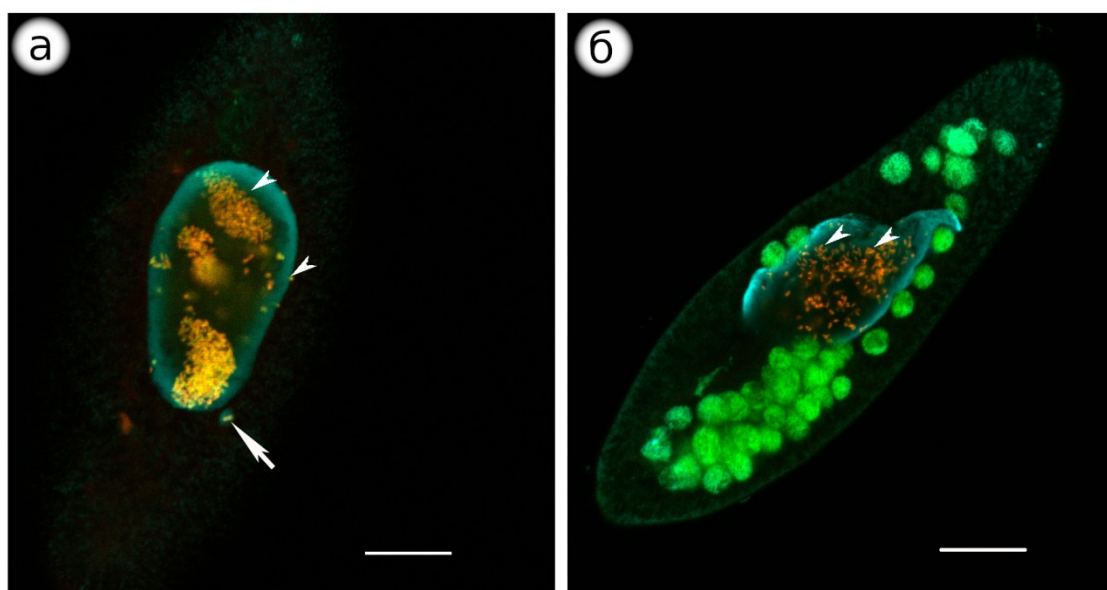


Рис. 21. Инфузория *P. multimicronucleatum*, зараженная *Ca. T. mobilis*. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием видоспецифичного зонда RickFla\_430 (красный сигнал) и эубактериального зонда Eub338 (зеленый сигнал), макронуклеус выявлен с помощью DAPI. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, совмещенные изображения, полученные в трех каналах. а – 7 дней после обработки FLIP7, б – клетки без обработки. Трихориккетсии окрашены в желто-оранжевый цвет в результате совмещения двух каналов (белые указатели). Стрелка указывает на бактерию, находящуюся за пределами макронуклеуса клетки-хозяина. Масштабная линейка 20 мкм. Из: Mironov et al., 2022, с изменениями.



С помощью ТЭМ в Ма зараженных трихориккетсиями инфузорий, подвергшихся воздействию FLIP7 в концентрации 100 мкг/мл, были обнаружены овальные формы трихориккетсий (Рис. 22 а, б). Подобные формы эндосимбионта встречались и в инфузориях, не подвергавшихся воздействию FLIP7 (Рис. 22в); для таких форм характерно наличие электронно-плотных вирусоподобных частиц и электронно-светлых областей, по-видимому, представляющих собой полигидроксиалканоатные (ПГА) гранулы. В цитоплазме зараженных инфузорий, подвергшихся воздействию FLIP7, были обнаружены большие вакуоли, плотно заполненные удлиненными бактериями *Ca. T. mobilis*, которые были сильно нагружены ПГА гранулами (Рис. 22а, б). Важно отметить, что нам не удалось обнаружить вирусоподобные частицы в трихориккетсиях, локализованных в вакуолях цитоплазмы инфузории. Интересно, что несколько более мелких форм с ПГА гранулами были отмечены вне клетки-хозяина вблизи кортекса инфузорий, что, возможно, говорит о том, что эти формы могут выводиться из клетки-хозяина в окружающую среду (Рис. 22г).

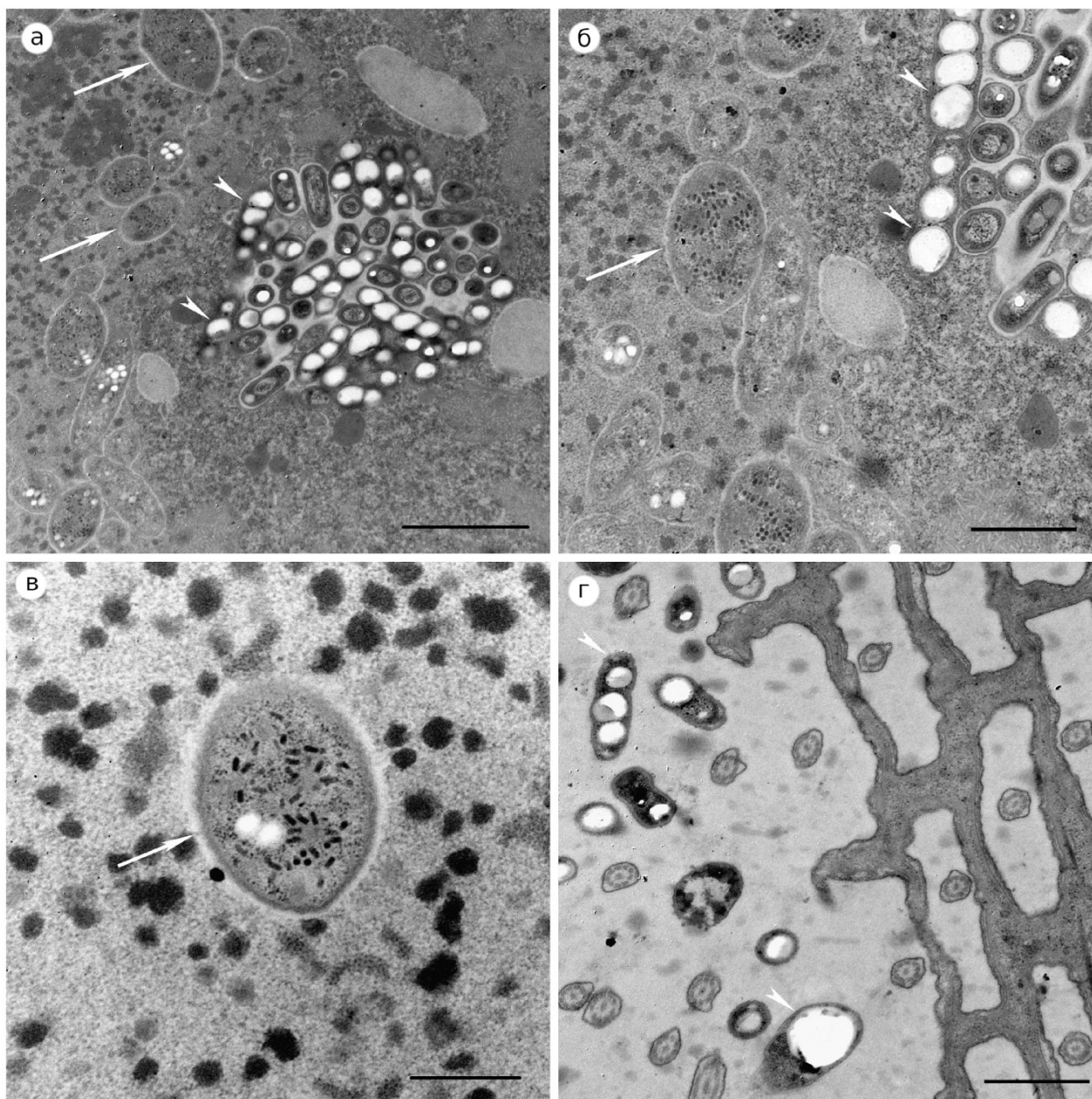


Рис. 22. Ультраструктура двух форм трихориккетсий в инфузории *P. multimicronucleatum*, трансмиссионная электронная микроскопия. а, б, г – после обработки FLIP7, в – контроль. Стрелки указывают на бактерии, содержащие вирусоподобные частицы, треугольные указатели – на формы трихориккетсий, содержащие полигидроксиалканонатные гранулы. Масштабная линейка а – 2 мкм, б и г – 1 мкм, в – 0.5 мкм. Из: Mironov et al., 2022, с изменениями.

#### 4.3.5 Влияние отдельных фракций FLIP7 на жизнеспособность инфузорий и их способность поддерживать заражение бактерией *Ca. T. mobilis*

Для оценки эффективности 47 отдельных фракций FLIP7 мы выбрали наиболее чувствительный к смеси антибактериальных пептидов FLIP7 клон Кр154-4, зараженный *Ca. T.*

*mobilis*. Конечная концентрация каждой испытанной фракции была 1.2 мг/мл из расчета на чистый FLIP7. Эффективность воздействия фракций на инфузорий показана на рис. 23. Через 5 минут после начала эксперимента инфузории погибали в присутствии фракций 12, 16-19, 23, 26-39. В случае трех фракций (7, 15, 20) инфузории теряли подвижность и вздувались через 20 мин после начала эксперимента, а примерно через полчаса погибали, эти фракции мы определили как «сублетальные». У инфузорий, подвергшихся воздействию 6, 14, 24 и 25 фракций FLIP7, мы не наблюдали каких-либо внешних изменений, однако они также погибали через 30 мин после начала эксперимента, и данные фракции также были отнесены к разряду «сублетальных». В остальных испытанных фракциях инфузории выживали, причем в Ма клетки-хозяина сохранялись подвижные эндонуклеобионты.

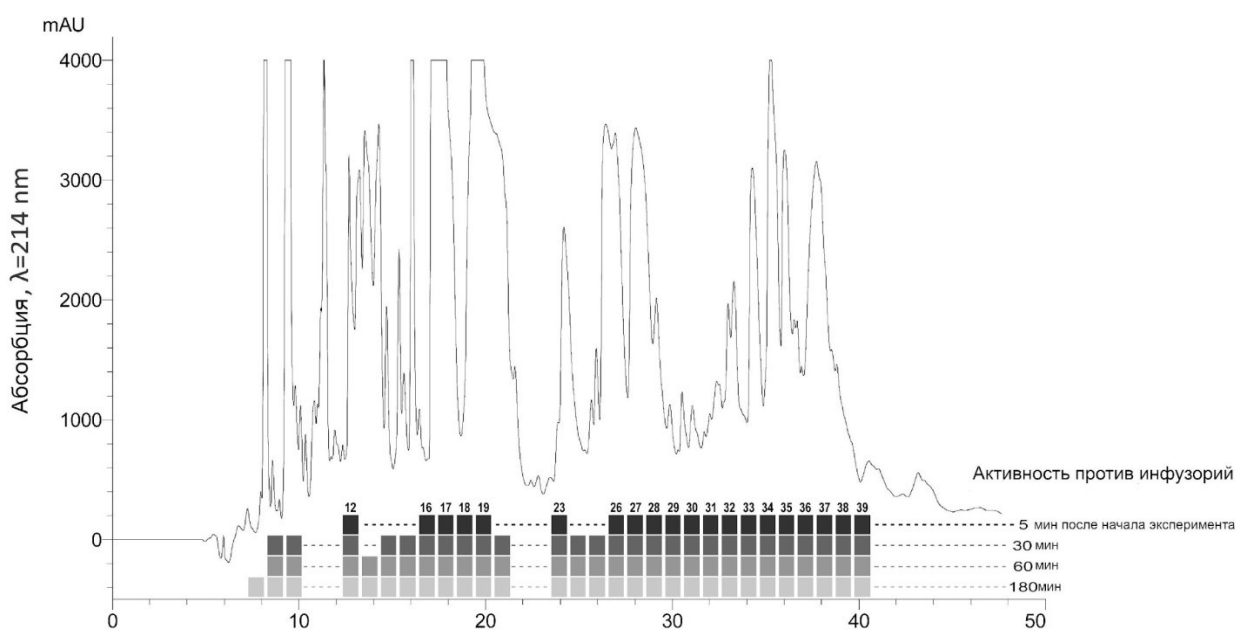


Рис. 23. Активность отдельных хроматографических фракций FLIP7 (1.2 мг/мл из расчета на чистый FLIP7) в отношении инфузорий *P. multimicronucleatum*, зараженных трихориккетсиями. Активность каждой фракции (время гибели инфузорий после добавления фракции) представлена в виде гистограммы на хроматографическом профиле. Из: Mironov et al., 2022, с изменениями.

Поскольку целью последующих экспериментов было не только сравнение выживаемости зараженных и свободных от трихориккетсий инфузорий, но и поиск фракции, с помощью которой можно будет получить апосимбиотические клеточные линии, далее мы использовали "летальные" (12,17, 23, 26, 30, 31, 33 и 36) и "сублетальные" (7, 15 и 20) фракции FLIP7 в более низких концентрациях (120, 240 и 360 мкг/мл в расчете на чистый FLIP7). Результаты воздействия этих фракций показаны в таблице 6 (Табл. 6). В концентрации 120 мкг/мл фракции

FLIP7 через час после начала эксперимента не оказали существенного влияния ни на зараженных, ни на свободных от трихориккетсий инфузорий. Увеличение концентрации вдвое (240 мкг/мл из расчета на чистый FLIP7) также не оказывало действия на зараженный трихориккетсиями клон Кр154-4, однако инфузории контрольного клона, подвергшиеся воздействию 20 и 33 фракции, погибали в течение 1 ч. В наивысшей концентрации (360 мкг/мл из расчета на чистый FLIP7) через 1 ч погибали свободные от трихориккетсий инфузории, подвергшиеся воздействию 20, 26, 33 и 36 фракций, при этом только наличие в среде фракции 33 приводило к гибели инфузорий зараженного клона Кр154-4. Во всех выживавших инфузорий клона Кр154-4, независимо от примененной фракции и ее концентрации, сохранялись подвижные бактерии *Ca. T. mobilis*.

Таблица 6. Выживаемость под действием фракций FLIP7 зараженного и свободного от *Ca. T. mobilis* клонов инфузорий.

Номер фракции	Клон инфузорий	Концентрация фракции из расчета на чистый FLIP7		
		120 мкг/мл	240 мкг/мл	360 мкг/мл
7	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
12	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
15	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
17	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
20	СуР5-3 (контр.)	+	-	-
	<i>T. - bearing</i>	+	+	+
23	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
26	СуР5-3 (контр.)	+	+	-
	Кр154-4	+	+	+
30	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
31	СуР5-3 (контр.)	+	+	+
	Кр154-4	+	+	+
33	СуР5-3 (контр.)	+	-	-
	Кр154-4	+	+	-
36	СуР5-3 (контр.)	+	+	-
	Кр154-4	+	+	+

«+» – инфузории живы через 1 ч после добавления фракции FLIP7, «-» – инфузории погибли через 1 час. Из: Mironov et al., 2022, с изменениями.

В длительном эксперименте зараженный трихориккетсией клон Кр154-4 и контрольный клон СуР5-3 были обработаны теми же фракциями FLIP7 в наименьшей концентрации (120

мкг/мл), а оценку выживаемости клеток производили через 7 дней. Через неделю после начала эксперимента выживаемость зараженных и свободных от трихориккетсий инфузорий существенно отличалась: под действием всех фракций произошла гибель контрольного клона СуР5-3, при этом инфузории клона Кр154-4, несущие *Ca. T. mobilis*, погибли лишь в присутствии 7, 17 и 33 фракций. Удивительно, что в присутствии 12-й и 30-й фракций произошло видимое увеличение количества инфузорий (68-70 клеток по сравнению с 50 клетками в начале эксперимента), соответственно, как минимум треть клеток поделилась во время эксперимента хотя бы один раз, и можно предположить, что эти фракции не оказывают влияния на деление инфузорий. Как и в предыдущих экспериментах, все выжившие инфузории клона Кр154-4 содержали в Ма *Ca. T. mobilis*.

## 5. Обсуждение

### 5.1 Внутриядерная локализация подвижных эндосимбионтов инфузории *P.*

#### *multimicronucleatum*

Анализ последовательности, кодирующей 16S рРНК симбионта, продемонстрировал высокую степень гомологии (97,3% сходства) с последовательностями других представителей семейства *Rickettsiaceae* (порядок Rickettsiales). Бактерии из порядка Rickettsiales имеют очень широкий спектр хозяев (Merhej, Raoul, 2011). Некоторые из них патогенны для человека, другие представлены эндобионтами членистоногих, а в последнее время обнаруживают все больше представителей этой группы, обитающих в клетках протистов (Vannini, 2010; Castelli et al., 2019). Локализация в ядре характерна для ряда представителей семейства *Rickettsiaceae*, например, риккетсии из группы возбудителей пятнистых лихорадок поселяются исключительно в ядре эукариотической клетки (Walker, Yu, 2005). Более того, Огата с коллегами (Ogata et al., 2006) обнаружили, что *Rickettsia bellii*, принадлежащая к базальной группе риккетсий, отделившейся до расхождения групп возбудителей пятнистой лихорадки (SFG) и возбудителей тифа (TG), также способна заселять ядро клетки-хозяина и делиться внутри него. Очевидно, ядро представляет собой клеточный компартмент, надежно защищенный от атаки лизосомных гидролаз, который предоставляет эндонуклеобионтам богатую питательными веществами среду; кроме того, внутриядерное расположение оптимально для эндосимбионта с точки зрения возможности контроля над экспрессией генов хозяина (Осипов, 1981; Bierne, Cossart, 2012).

Других эндонуклеобионтов парамеций, представителей родов *Holospora* и *Caedimonas*, в настоящее время относят к порядку Holo Sporales, родственному порядку Rickettsiales. Филогенетическое положение внутриядерного эндосимбионта *Nonospora macronucleata*, описанного у *Paramecium caudatum* (Фокин и др., 1987), до сих пор остается неизвестным.

### 5.2 Жгутики у бактерий порядка *Rickettsiales*

Данные, полученные с помощью методов атомно-силовой микроскопии и негативного контрастирования, однозначно продемонстрировали наличие на поверхности внутриядерного эндобионта *P. multimicronucleatum* большого количества жгутиков. Этот факт не удивителен, поскольку интенсивное перемещение бактерий в ядре, хорошо заметное при прижизненных наблюдениях, проводившихся с помощью контраста Номарского, позволяла *a priori* предполагать их наличие. Вместе с тем согласно определению порядка *Rickettsiales*, приведенному в определителе бактерий Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Volume 2: The Proteobacteria), все представители этого порядка не имеют жгутиков. Однако при исследовании генома симбионта, обитающего в митохондриях клеща *Ixodes ricinus*, *Midichloria mitochondrii*, было обнаружено 26 генов, кодирующих белки жгутиков, хотя самих жгутиков при анализе срезов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано не было (Mariconti, 2012). Кроме того, был переописан род симбионтов *Lyticum* из цитоплазмы парамеций, представители которого несут нефункциональные жгутики (Boscaro et al., 2013). На основании анализа 16S рРНК род *Lyticum* был отнесен к новому семейству *Midichloriaceae* порядка Rickettsiales. Эти данные легли в основу предположения о том, что предки бактерий из порядка Rickettsiales когда-то могли нести функционировавшие жгутики, которые позже были утрачены в ходе эволюции (Sassera et al., 2011, Mariconti et al., 2012; Boscaro et al., 2013, Castelli et al., 2019). Тот факт, что нам удалось обнаружить бактерию из порядка Rickettsiales, имеющую активно функционирующие жгутики, с большой долей вероятности подтверждает высказанное ранее предположение и свидетельствует о том, что у отдельных представителей этого порядка сохранились не только гены, кодирующие жгутик, но и сами жгутики.

В то же время нельзя исключать и возможность того, что жгутики и подвижность у внутриядерных симбионтов *P. multimicronucleatum* появились вторично в результате горизонтального переноса генов, например, от какой-то другой бактерии, способной образовывать симбиозы с инфузориями. Случаи горизонтального переноса генов между бактериями разных видов, заселяющих одного протиста, были зарегистрированы в литературе (Ogata et al., 2006). В цитоплазме бактерии *Ca. T. mobilis* обнаружены электронно-плотные частицы, напоминающие вирусные капсиды, которые могут участвовать в обмене генами. В принципе независимое возникновение жгутиков у представителей одного отряда вполне возможно, но в настоящее время эта гипотеза основывается лишь на допущениях (Vannini, ... Mironov, et al., 2014). Выбор в пользу той или иной гипотезы будет возможен при условии полной характеристики генома эндосимбионтов. Однако полученные нами данные опровергают представление об отсутствии жгутиков во всем порядке Rickettsiales и требуют внесения изменений в описание порядка Rickettsiales.

### **5.3 Филогенетическое положение и таксономическая принадлежность подвижных внутриядерных эндосимбионтов**

Полученная последовательность гена 16S рРНК подвижного внутриядерного симбионта имела всего 97,3% сходства с последовательностями представителей семейства *Rickettsiaceae* (порядок Rickettsiales) (Vannini, ..., Mironov et al., 2014). Руководствуясь положениями, сформулированными ведущими специалистами в области исследования риккетсий (Fournier,

Raoult, 2009), согласно которым к роду *Rickettsia* следует относить лишь те бактерии, у которых данная последовательность имеет не менее 98,1% сходства, подвижный внутриядерный эндосимбионт инфузории *P. multimicronucleatum* принадлежит к новому роду семейства *Rickettsiaceae*. В ходе исследований, проведенных нашими итальянскими коллегами, бактерии, обладающие практически идентичными нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК, были обнаружены в макронуклеусе у другого клона *P. multimicronucleatum*, а также в цитоплазме инфузорий *P. nephridiatum* и *Euplotes aediculatus* (Vannini, ..., Mironov et al., 2014). В связи с тем, что данная бактерия не поддается культивированию вне клетки-хозяина, вид может получить лишь статус кандидатного ("Candidatus"). Чтобы подчеркнуть филогенетическое родство эндосимбионта с риккетсиями и его отличительную особенность – наличие многочисленных жгутиков, было предложено название "*Candidatus Trichorickettsia mobilis*" (Vannini, ..., Mironov et al., 2014).

Диагноз "*Candidatus Trichorickettsia mobilis*". *Trichorickettsia mobilis* (Tric.ho.ric.ket'tsi.a mo'bi.lis; греч. муж. сущ. thrix, волос, нов. лат. жен. сущ. *Rickettsia*, по имени родственного рода, нов. лат. жен. сущ. *Trichorickettsia*, волосатая *Rickettsia*; лат. прилаг. *mobilis*, подвижный). Бактерия палочковидной формы, размером до 2.6 мкм в длину и 1.3 мкм в толщину. Является симбионтом инфузорий родов *Paramecium* и *Euplotes*, заселяет Ма или цитоплазму. Обладает жгутиками и способна к движению внутри клетки-хозяина *P. multimicronucleatum*. Цитоплазма бактерии электронно-плотная, содержит правильно уложенные вирусные капсиды. Бактерия принадлежит к семейству *Rickettsiaceae*, порядок *Rickettsiales*. Вид выделен на основании анализа последовательности гена 16S рРНК (присвоенный номер: HG315612) и результатов флуоресцентной гибридизации *in situ* со специфическим зондом TrichoRick\_142 (Vannini, ..., Mironov et al., 2014). Не может культивироваться вне клетки-хозяина.

#### 5.4 Встречаемость вида *Ca. Trichorickettsia mobilis*

Анализ клонов *P. multimicronucleatum* из коллекции культур RC ССМ Ресурсного центра СПбГУ «Культивирование микроорганизмов» с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* с видоспецифичным зондом позволил выявить еще два клона (АВ9-4 и Кр154-4) этого вида инфузорий, несущих в макронуклеусе бактерий *Ca. Trichorickettsia mobilis*. Морфология и ультраструктура бактериального эндонуклеобионта клона АВ9-4 были описаны еще в 1999 г. Вишняковым и Родионовой (Vishnyakov, Rodionova, 1999), однако его филогенетическое положение оставалось не определено. Этот клон был выделен из природы в Бостоне (США) еще в 1994 г. и не потерял своих эндосимбионтов за более чем 25 лет существования в лабораторной культуре, что свидетельствует о высокой стабильности симбиотической системы. Клон Кр154-4



происходит из популяции, выделенной из природы в Красноярске, тогда как клон Busnau, любезно предоставленный доктором Швайкертом, происходит из водоема в Германии. *Ca. Trichorickettsia mobilis*, обнаруженные в цитоплазме инфузорий *P. nephridiatum* и *Euplotes aediculatus*, были выделены, соответственно, в Италии и в Индии, а позднее обнаруженная трихориккетсия из цитоплазмы *P. calkinsi* – из сточного ручья на Кипре (Sabaneyeva et al., 2018). Таким образом, эндосимбиотическая бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis* достаточно широко распространена среди инфузорий северного полушария, встречается у разных инфузорий-хозяев и может обитать как внутри ядра, так и в цитоплазме. Отсутствие специфичности к виду хозяина наводит на мысль о существовании горизонтальной передачи эндосимбионта между разными видами хозяев.

### 5.5 Значение исследований группы «немодельных Rickettsiales»

Симбиотические системы, включающие простейших в качестве хозяев, могут стать ценным источником информации о разнообразии и эволюции бактерий, принадлежащих к порядку Rickettsiales. Наши результаты говорят о том, что какие-то особенности организации бактерии, давшей начало порядку Rickettsiales (например, наличие жгутиков), могли сохраниться у симбионтов протистов (Blanc et al., 2007), которые, возможно, и были исходными хозяевами представителей порядка Rickettsiales. Кроме того, необходимо отметить, что все наиболее известные бактерии семейства *Rickettsiaceae* были обнаружены у наземных организмов, тогда как *Ca. T. mobilis* обитает в пресноводных и морских организмах, т.е. в совершенно других условиях. В последнее время обнаруживается все больше и больше представителей порядка Rickettsiales, часто относимых к группе так называемых «немодельных Rickettsiales» и заселяющих как морских (Sunagawa et al., 2009; Vannini et al., 2005) так и пресноводных (Ferrantini et al., 2009; Schrallhammer et al., 2013; Fraune, Bosch, 2007; Kawafune et al., 2012; Castelli, 2016) организмов. Исследования представителей этой группы могут пролить свет на пути эволюции бактерий порядка Rickettsiales. Поскольку бактерия *Ca. T. mobilis* близко родственна патогенным риккетсиям, вызывающим серьезные заболевания человека, симбиотическая система *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* может служить моделью для изучения тонких механизмов взаимодействия между риккетсиями и клеткой-хозяином.

## 5.6 Чувствительность симбиотической системы *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis* к действию антибиотиков

Исследуемая симбиотическая система продемонстрировала высокую степень устойчивости к действию антибиотиков. Антибиотик широкого спектра действия стрептомицин (класс аминогликозиды), обычно используемый для получения апосимбиотических клеточных линий (Grosser et al., 2018), оказался абсолютно не эффективен. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными при лечении риккетсиозов человека аминогликозидными антибиотиками (Rolain, Raoult, 2005). Эндосимбиот *Ca. T. mobilis* оказался также устойчив к действию ампициллина, антибиотика из группы пенициллинов. Полученные результаты не удивительны, поскольку близкородственные *Ca. T. mobilis* патогенные риккетсии обладают устойчивостью к большинству  $\beta$ -лактамных антибиотиков (Rolain et al., 1998). Вопреки нашим ожиданиям, нам также не удалось получить апосимбиотические клеточные линии с помощью высоких концентраций антибиотиков, используемых в клинической практике для борьбы с риккетсиозами (хлорамфеникол, тетрациклин). Воздействие хлорамфеникола в высокой концентрации оказалось губительным для самой инфузории, что согласуется с данными о его высокой токсичности (Shukla et al., 2011). Предположительно, токсический эффект хлорамфеникола связан с нарушением синтеза белка в митохондриях клетки-хозяина (Barnhill et al., 2012). Наша попытка получить апосимбиотические клеточные линии с помощью другого противориккетсиозного антибиотика, тетрациклина, потерпела неудачу ввиду высокой чувствительности клетки-хозяина к этому антибиотику. Известно, что спектр действия тетрациклинов включает в себя и ряд паразитических протистов, таких как *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* и некоторых других (Chopra, Roberts, 2001). Хотя молекулярный механизм противопаразитарного действия тетрациклинов на протистов неизвестен, полагают, что он может быть вызван ингибированием синтеза белка в их митохондриях (Chopra, Roberts, 2001). Учитывая полученные нами результаты применения тетрациклина, можно предположить, что инфузория *P. multimicronucleatum*, как и ряд других протистов, чувствительна к действию этого антибиотика. Возможно, тетрациклин, как и хлорамфеникол, угнетает синтез белка в митохондриях клетки-хозяина. Удивительно что инфузории того же рода *P. primaurelia* и *P. pentaurelia* не проявляли чувствительности к тетрациклину, и с помощью высоких концентраций этого антибиотика удавалось получить апосимбиотические линии, свободные от *Ca. Megaira polyxenophila* (Pasqualetti et al., 2020).

В целом, проверка чувствительности к антимикробным агентам в случае облигатных внутриклеточных бактерий в силу ограниченности методик, которые могут быть к ним применены, представляет сложную задачу (Vanrompay et al., 2018). Один из немногих

параметров, который можно оценить для некультивируемых бактерий, - это минимальная ингибирующая концентрация (МИС). Более того, расчет конечной действующей концентрации антибиотика затруднен ввиду разницы концентрации антибиотика в среде и клетке-хозяине (Wisseman et al., 1982). Кроме того, период полураспада антибиотика зависит от особенностей метаболизма клетки-хозяина. Поэтому для внутриклеточных бактерий одного и того же вида, например, *Chlamydia*, параметр МИС в разных клеточных линиях может отличаться (Suchland et al., 2003). В нашей работе мы наблюдали различия линий инфузорий (LSA 11-2 и Bünsau против Kp154-4 и AB9-4) в своей чувствительности к хлорамфениколу и стрептомицину, примененному в наивысшей концентрации. Причина, по которой инфузории клона LSA 11-2 и Bünsau более чувствительны к антибиотикам, остается непонятной. Мы предполагаем, что разница в чувствительности клонов к антибиотикам может быть связана как с различным уровнем транскрипции генов и модификации белков, так и являться еще одним примером внутривидовой изменчивости на уровне генома, что было показано у *Paramecium calkinsi*, зараженной *Ca. T. mobilis* (Sabaneyeva et al., 2018).

В целом устойчивость к действию антибиотиков *Ca. T. mobilis* очень схожа с таковой у патогенных риккетсий, однако применение антибиотиков, используемых в клинической практике для лечения риккетсиозов, не позволило нам получить апосимбиотические клеточные линии ввиду гибели клетки-хозяина. Все проведенные нами эксперименты давали два возможных результата: либо хозяин выживал вместе со своим эндосимбионтом, либо погибал сам хозяин. По-видимому, в последнем случае смерть хозяина сопровождалась смертью симбионта. С одной стороны, можно предположить, что инфузория становится зависимой от своих эндосимбионтов, и клетка-хозяин погибает вследствие гибели всех эндосимбионтов при применении тетрациклина или высоких концентраций хлорамфеникола. Однако, с другой стороны, нельзя исключить и возможность того, что гибель инфузории наступает в результате действия тетрациклина или высоких концентраций хлорамфеникола на нее саму. Так или иначе, создается впечатление, что разделить участников симбиотической системы *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* невозможно. В связи с этим данную симбиотическую систему можно рассматривать как идеальную модель холобионта, в исходном и современном значениях этого понятия, поскольку она не только представляет собой хозяина с наследуемым эндосимбионтом, но и представляет собой единое целое, проявляющее заметную стабильность при воздействии антибиотиками.

### 5.7 Выход внутриядерных бактерий в цитоплазму клетки-хозяина

Тонкий слой фибриллярного материала, окружающий некоторые бактериальные клетки в Ма клетки-хозяина, очень напоминает структуру, наблюдавшуюся вокруг бактерии *Holospira obtusa*, попавшую в Ма неспецифичного хозяина *P. multimicronucleatum* во время экспериментального заражения в присутствии нокодазола, перед тем как бактерия будет удалена из Ма (Fokin et al., 2005). Авторами данного исследования было высказано предположение, что этот тонкий слой фибриллярного материала может играть роль в экстрюзии бактерии из Ма, однако непонятно, является ли он особенностью только *P. multimicronucleatum*, или это широко распространенный клеточный механизм удаления постороннего материала из ядра. Интересно, что подобный фибриллярный слой был зарегистрирован вокруг инфекционных форм двух других эндонуклеобионтов, заселяющих Ма парамеций 2 видов: *Holospira curvata* из *P. calkinsi* и *Holospira bacillata* из *P. woodruffi* (Fokin, Sabaneyeva, 1997). В этих случаях также считали, что фибриллярный слой связан с выходом эндосимбионта из Ма клетки-хозяина. Таким образом, образование тонкого фибриллярного слоя характерно, по крайней мере, для парамеций, при этом его состав остается неизвестным.

### 5.8 Образование персистирующих клеток в результате обработки ампициллином и хлорамфениколом

После обработки ампициллином всех исследованных зараженных *Ca. Trichorickettsia* клонов *P. multimicronucleatum* мы наблюдали трансформацию подвижных внутриядерных укороченных палочковидных бактерий в филаментозные и овальные формы. Полученные нами результаты согласуются с данными Вишнякова и Родионовой (Vishnyakov, Rodionova, 1999) о том, что подвижные эндонуклеобионты инфузории *P. multimicronucleatum* способны изменять форму под действием ампициллина.

Поскольку применение бета-лактамов приводит к ингибированию синтеза бактериальной клеточной стенки, образование филаментозных (или септированных, как их называли Вишняков и Родионова) и овальных бактериальных клеток, должно быть, было вызвано нарушением клеточной стенки бактерий. Расширение периплазматического пространства после обработки антибиотиком, наблюдаемое у части бактерий при использовании ТЭМ, подтверждает это предположение и наводит на мысль о том, что обработка ампициллином запускает развитие форм *Ca. T. mobilis*, лишенных клеточной стенки. Примечательно, что формирование сферопластов (бактерий, частично лишенных клеточной стенки) под действием G-пенициллина было показано у *R. Prowazekii* (Wissemann et al., 1982),

патогенной риккетсии, которая может поддерживаться в человеческом организме длительное время и вызывать рецидив заболевания (Raoult, Roux, 1999; Weissmann, 2005; Sekeyová et al., 2019).

Считается, что рецидивы инфекционных болезней связаны не столько с реинфекцией, сколько с существованием популяции персистирующих клеток, то есть покоящихся форм бактерий (Fauvart et al., 2011; Brauner et al., 2016; Van den Bergh et al., 2016; Levin-Reisman et al., 2017; Trastoy et al., 2018; Mickiewicz et al., 2019). Наиболее часто персистенция обусловлена бактериями, лишенными клеточной стенки (L-формами), которые, как полагают, способны вызывать рецидив заболевания через длительный срок после прохождения терапии антибиотиками (Onwuamaegbu et al., 2005; Mickiewicz et al., 2019). Применение антибиотиков, влияющих на синтез клеточной стенки бактерий, может запускать их трансформацию в L-формы (Mercier et al., 2013; Errington et al., 2016). L-формы, или так называемые сферопласты, обнаружены у широкого круга бактерий от *Mycobacterium tuberculosis* (Slavchev et al., 2016) до уропатогенной *Escherichia coli* (Mickiewicz et al., 2019).

Несмотря на то, что механизм перехода *R. prowazekii* в покоящуюся форму до конца не установлен (Sekeyová et al., 2019), вероятно, причиной рецидива являются персистирующие сферопласты. Интересно отметить, что рецидивы других риккетсиозов, таких как Марсельская лихорадка и мышинный тиф, регистрировали даже после терапии хлорамфениколом (Shaked et al., 1989). Рецидивы японской речной лихорадки и персистенцию близкородственной риккетсии бактерии *Orientia tsutsugamushi* наблюдали в тканях выздоровевших пациентов после терапии с использованием хлорамфеникола и доксициклина (Kelly et al., 2017). Полученные нами данные, свидетельствующие о способности эндосимбионтов парамеций клонов Kp154-4 и AB9-4 образовывать овальные формы после обработки сублетальными дозами хлорамфеникола, по-видимому, соответствуют клиническим наблюдениям за течением риккетсиозов у человека. Вероятно, овальные формы *Ca. T. mobilis* представляют собой аналоги сферопластов *R. prowazekii*, и их следует рассматривать как персистирующие формы, которые, как мы полагаем, отвечают за стабильность симбиотической системы *P. mutimicronucleatum/Ca. T. mobilis*. Слабый сигнал зонда при проведении флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) от эндосимбионтов, вышедших в цитоплазму клетки-хозяина после обработки антибиотиками (Рис. 16), может быть связан с низким уровнем синтеза рибосом у покоящихся персистирующих клетках.

Интересно отметить, что кандидатный вид *Ca. T. mobilis*, по-видимому, сочетает характерные черты двух групп *Rickettsia*: внутриядерную локализацию, которая свойственна для риккетсий из группы возбудителей клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), и формирование

сферопластов, обнаруженное пока только у *R. prowazekii*, принадлежащей к группе возбудителей сыпного тифа (СТ).

### 5.9 Природа содержащих эндосимбионтов вакуолей в инфузориях, обработанных ампициллином

Воздействие ампициллина на симбиотическую систему приводит к выходу некоторых эндосимбионтов в цитоплазму клетки-хозяина. Обнаруженные нами подкововидный фагофор, окружающий "голового" (не окруженного мембраной клетки-хозяина) эндосимбионта в цитоплазме инфузории, и лизосомы, сливающиеся с мембраной вакуоли (Рис. 19), наводят на мысль о возможном процессе аутофагии. Вакуоли в клетке-хозяине, содержащие эндосимбионта, могут представлять собой аутофаголизосомы, поскольку они обладают одной мембраной и по своей электронной плотности их содержимое напоминает содержимое лизосом. Непонятно, выживают ли при этом покинувшие ядро эндосимбионты. Присутствие вирусоподобных частиц за пределами бактериальной клетки можно считать признаком, свидетельствующим о деградации бактерий, однако, только в редких случаях мы наблюдали блеббинг (образование пузырей) мембраны бактерии (Рис. 19д). Подобные картины напоминают изображения, которые были интерпретированы как пролиферация L-форм бактерий (Errington, 2012). Однако большинство бактерий, по всей видимости, остаются неповрежденными, что хорошо согласуется с недавно полученными данными, свидетельствующими о способности *Ca. T. mobilis* выживать в течение 7 дней в энтероцитах планарии (Modeo et al., 2020).

Мы полагаем, что выход бактерий *Ca. T. mobilis* из макронуклеуса в цитоплазму хозяина может запускать аутофагию, процесс, используемый клеткой для освобождения от чужеродных микроорганизмов. Несмотря на то что аутофагия, в частности, ксенофагия, - это механизм, используемый клеткой для борьбы с патогенными микроорганизмами, многие внутриклеточные патогены нашли способы покидать аутофагосомы клетки-хозяина или выживать в этом опасном компартменте, используя ее в собственных целях - для размножения и распространения (Siqueira et al., 2018; Khandia et al., 2019). Некоторые бактерии, такие как *Shigella flexneri* и *Salmonella typhimurium* ингибируют механизм аутофагии для предотвращения ксенофагии, в то же время другие патогены, например, *Ehrlichia chaffeensis* стимулируют аутофагию, для того чтобы получить дополнительные питательные вещества из цитоплазмы, избегая при этом риска деградации в аутофагосоме (Jiao, Sun, 2019). Так, *Anaplasma phagocytophilum*, представитель семейства *Anaplasmataceae*, сестринского семейству *Rickettsiaceae* индуцирует образование ранних аутофагосом в клетке-хозяине и их слияние с вакуолью, содержащей анаплазму, что

способствует пролиферации бактерий (Niu et al., 2012). Другие бактерии, такие как *Porphyromonas gingivalis* и *Brucella*, приспособляются к выживанию в аутофагосоме путем блокировки ее слияния с лизосомами (Khandia et al., 2019). Эксплуатацию аутофагии клетки-хозяина осуществляет и *Coxiella brunetti*, которая рекрутирует белки, участвующие в аутофагии, к вакуоли, в которой она размножается, причем при блокировании механизмов аутофагии происходит снижение интенсивности пролиферации *C. brunetti* (Pareja et al., 2017). Ввиду вышеизложенного мы не можем исключить возможности того, что *Ca. T. mobilis* способна использовать механизм аутофагии клетки-хозяина для обеспечения собственного выживания. В то же время *Ca. T. mobilis* может использовать аутофагию как запасной путь для выхода из клетки-хозяина, не вызывающий у последней особых повреждений, как это делают *Brucella*, *Mycobacterium marinum* и, возможно, *Francisella* (Friedrich et al., 2012).

#### **5.10 Действие комплекса антимикробных пептидов FLIP7 на стабильность симбиотической системы *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis***

В настоящее время антимикробные пептиды предлагают рассматривать как очень перспективные агенты, действующие против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая штаммы, устойчивые к антибиотикам (Chernysh et al., 2015). Активность антимикробных пептидов показана также в отношении грибов, протистов и вирусов (Boulanger et al., 2006; Huan et al., 2020; El-Dirany et al., 2021). Бактерии порядка *Rickettsiales* характеризуются широким спектром хозяев, причем *Wolbachia*, представитель семейства *Anaplasmataceae*, паразитирует на насекомых (Dumler, Walker, 2005). В этой связи можно было бы ожидать, что антимикробные пептиды насекомых могут проявлять определенную активность в отношении риккетсий, которые, как известно, устойчивы ко многим антибиотикам (Rolain et al., 1998; Rolain, 2007). Тем не менее, в наших экспериментах нам не удалось получить апосимбиотические (освобожденные от эндосимбионтов) клеточные линии *P. multimicronucleatum* с помощью комплекса антимикробных пептидов FLIP7 или его отдельных хроматографических фракций. Результаты обработки клонов *P. multimicronucleatum*, несущих в своем Ма бактерий *Ca. T. mobilis*, антимикробным пептидным комплексом FLIP7 и его фракциями согласуются с нашими результатами, полученными при использовании антибиотиков (Mironov, Sabaneyeva 2020), и напоминают принцип физиологии "все или ничего". Либо эффект отсутствовал, при этом клетка-хозяин выглядела здоровой, а эндосимбионт сохранялся в Ма и продолжал делиться, либо инфузория погибала, по-видимому, вместе со своими эндосимбионтами. Эта особенность трихориккетсий согласуется с полученными нами данными об их устойчивости к антибиотикам и хорошо известным фактом

устойчивости к антибиотикам представителей *Rickettsiaceae*, вызывающих заболевания человека (Rolain et al., 1998; Rolain, 2007).

Высокая концентрация FLIP7 оказалась губительной для инфузорий, что свидетельствует в пользу активности этого антимикробного комплекса в отношении протистов (Mironov, Sabaneyeva, 2022). Удивительно, что клоны инфузорий, несущих трихориккетсий, демонстрировали большую жизнеспособность при воздействии на них антимикробным комплексом FLIP7 и его хроматографическими фракциями (в особенности фракциями 20, 26 и 36) по сравнению с контролем (Mironov, Sabaneyeva, 2022). Все контрольные свободные от трихориккетсий клоны проявляли заметно большую чувствительность к этому препарату и его фракциям. Хотя в настоящее время слишком рано утверждать, что именно наличие эндосимбиотических бактерий в макронуклеусе инфузории *P. multimicronucleatum* способствует их устойчивости к действию противомикробных пептидов, однако подобную возможность следует принять во внимание. Поскольку нам не удалось получить апосимбиотические клеточные линии, невозможно однозначно ответить на вопрос, придают ли трихориккетсии своему хозяину особые свойства, или же устойчивость к антибиотикам и антибактериальным пептидам является лишь свойством, присущим отдельным клонам инфузорий, не зависящим от присутствия эндосимбионтов.

В наших экспериментах мы использовали хроматографические фракции пептидного комплекса FLIP7, разделенные в зависимости от гидрофобности его компонентов. Отдельные фракции FLIP7 показали высокий уровень цитотоксичности в отношении исследованных нами клонов инфузорий. Ранее было показано, что эти фракции содержат антимикробные пептиды *Calliphora vicina* (Chernysh et al., 2018; Gordya et al., 2017), что говорит о том, что действие FLIP7 на инфузорий обеспечивается за счет антимикробных пептидов. Однако некоторые фракции (с 7 по 20), в которых не описано наличие антимикробных пептидов, также показали свою эффективность в отношении инфузорий, что может свидетельствовать о содержании в них компонентов, обладающих специфическим действием против протистов.

В краткосрочных экспериментах только 33-я фракция показала свою эффективность в отношении клонов инфузорий, несущих трихориккетсий. Известно, что эта фракция содержит цекропин с MB 4156 Да (Gordya et al., 2017). Цекропины насекомых — это линейные пептиды, имеющие структуру амфипатической альфа-спирали; они особенно эффективны в отношении грамотрицательных бактерий (Chernysh et al., 2018) и некоторых протистов (Boulanger et al., 2006; El-Dirany et al., 2021). Возможно, именно с наличием цекропина связана токсичность 33-ей фракции FLIP7 в отношении инфузорий.

После обработки FLIP7 инфузорий, несущих трихориккетсий, мы наблюдали появление двух четко отличающихся популяций эндобионтов: бактерии овальной формы, содержащие



вирусоподобные частицы, в Ма и более мелкие цитоплазматические формы, богатые ПГА гранулами (Mironov, Sabaneyeva, 2022). Таким образом, стресс, вызванный действием антимикробного комплекса FLIP7, приводит к выходу бактерий из Ма в цитоплазму. Аналогичный эффект был получен нами и при обработке некоторыми антибиотиками (Mironov, Sabaneyeva, 2020). Несмотря на то что мелкие формы эндосимбионта обнаружены внутри вакуолей клетки-хозяина, они очень напоминают "голых" трихориккетсий, обитающих в цитозоле инфузории *P. calkinsi* (Sabaneyeva et al., 2018). Основным отличием является наличие у последних жгутиков. Локализованные в вакуолях и за пределами клетки-хозяина трихориккетсии содержали большое количество ПГА гранул, присутствие которых было показано также и у трихориккетсий, заселяющих *P. calkinsi* (Sabaneyeva et al. 2018). Известно, что ПГА гранулы синтезируются у бактерий при нарушении условий баланса роста, они служат источником энергии и углерода и способствуют выживанию бактерий в условиях стресса (Kadouri et al., 2005; Tian et al., 2005; Pötter, Steinbüchel, 2006). Интересно отметить, что модификация липидов играет важную роль в устойчивости грамтрицательных бактерий к действию антимикробных пептидов (Moravej et al., 2018). ПГА в основном характерны для свободноживущих бактерий, однако существуют примеры их наличия и у видов, ведущих симбиотический образ жизни, например, у *Rhizobia* и *Burkholderia* (Lakshman, Shamala, 2003; Kim et al., 2013). Способность *Burkholderia* синтезировать ПГА играет важную роль в поддержании уровня инфекции, и, более того, влияет на хозяина (Kim et al., 2013). Наконец, было высказано предположение о том, что эндосимбионты, способные к горизонтальной передаче путем высвобождения во внешнюю среду, синтезируют ПГА гранулы, тогда как у вертикально передающихся бактерий ПГА гранулы не образуются (Kim et al., 2013). Создается впечатление, что трихориккетсии используют такую же стратегию. С одной стороны, синтез ПГА гранул трихориккетсиями может сопутствовать формированию мелких форм, которые в дальнейшем могут выходить из клетки-хозяина во внешнюю среду для того, чтобы обеспечить выживание бактерий во внешней среде и, возможно, для осуществления горизонтального переноса. Следует отметить, что поскольку бактерия *Ca. T. mobilis* была выявлена нами в клонах парамеций, имеющих заведомо независимое происхождение в силу разной географии мест сбора (Европа, Соединенные Штаты Америки, Сибирь), теоретически она может обладать высокой инфекционной способностью. Вместе с тем путь передачи *Ca. T. mobilis* пока остается неопределенным (Modeo et al. 2020). С другой стороны, именно синтез ПГА гранул симбиотическими *Trichorickettsia* может объяснить более высокую приспособленность штаммов инфузорий, несущих *Trichorickettsia*, по сравнению со штаммами, не содержащими *Trichorickettsia*. Механизм антипротистного действия смеси антибактериальных пептидов, как полагают, основан, в первую очередь, на пермеабиллизации мембраны (Torrent et al., 2012), и

наличие дополнительного запаса липидов может быть важным фактором, обеспечивающим устойчивость инфузорий к мембранотропным химическим веществам.

Таким образом, мы показали, что симбиотическая система *Paramecium multimicronucleatum*/*Ca. Trichorickettsia* является очень стабильной, и ее партнеров не удастся разделить ни при воздействии традиционно используемыми антибиотиками, ни при обработке комплексом антимикробных пептидов FLIP7. Это особенность делает исследуемую симбиотическую систему хорошим кандидатом на модель холобионта, и в будущем она может быть использована для дальнейшей разработки концепции холобионта. Стабильность этой системы, по-видимому, обеспечивается способностью эндосимбионта продуцировать покоящуюся персистирующую форму в присутствии ампициллина и хлорамфеникола, что является схожей чертой с патогенной *R. prowazekii*. Овальная и нитевидная формы *Ca. T. mobilis* могут в дальнейшем быть использованы для исследования персистенции бактерий. Более того, мы полагаем, что аутофагия играет роль в выживании *Ca. T. mobilis* благодаря выходу бактерий из Ма в цитоплазму. Анализ молекулярных механизмов клетки-хозяина, на которые воздействует эндосимбионт после обработки симбиотической системы определенными антибиотиками и антимикробными пептидами, позволит обогатить наши знания о взаимодействии между хозяином и эндосимбионтом при дестабилизации симбиотической системы.

## Выводы

1. Подвижный эндонуклеарный симбионт инфузории *Paramecium multimicronucleatum* обладает жгутиками и несет вирусоподобные частицы.
2. Подвижный эндосимбионт макронуклеуса инфузории *P. multimicronucleatum* принадлежит к семейству *Rickettsiaceae* (порядок *Rickettsiales*) и представляет собой новый вид *Ca. Trichorickettsia mobilis*.
3. Симбиотическая система *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* устойчива к действию антибиотиков, имеющих разный механизм действия, в том числе используемых для лечения риккетсиозов.
4. Симбиотическая система *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis* устойчива к действию смеси антимикробных пептидов FLIP7 и ее отдельных хроматографических фракций.
5. Под воздействием некоторых антибиотиков и антимикробных пептидов внутриядерный эндосимбионт *Ca. T. mobilis* способен образовывать выходящие в цитоплазму клетки-хозяина персистирующие формы.

## Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю – Елене Валентиновне Сабанеевой за неоценимую помощь в написании данной работы, обучение методам исследования и организацию научной деятельности лаборатории.

Также автор выражает благодарность сотрудникам кафедры цитологии и гистологии оказавших большую помощь в освоении инструментальных методов и методов работы с живыми культурами протистов и микроскопической техники.

В ходе выполнения работы было использовано оборудование ресурсных центров «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Ресурсный центр микроскопии и микроанализа», Ресурсный центр "Культивирование микроорганизмов".

Особую благодарность за помощь в выполнении работы автор выражает Бенкену К.А. (Санкт-Петербургский Государственный Университет, РЦ Микроскопии и Микроанализа СПбГУ); Лебедевой Н.А. (Санкт-Петербургский Государственный Университет, РЦ «Культивирование микроорганизмов»); Джулио Петрони (университет Пизы, Италия); Майку Швайкерту (университет Штуттгарта, Германия); Андрею Яковлеву (Санкт-Петербургский Государственный Университет, лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых).

Работа была поддержана проектами:

РНФ № 22-24-00335 «Характер гликозилирования поверхности клетки-хозяина как фактор устойчивости к заражению эндосимбиотическими микроорганизмами».

РФФИ № 18-04-00562а «Эндосимбиотические системы у инфузорий: механизмы взаимодействия партнеров, их жизненные стратегии и цена вопроса».

РФФИ № 15-04-06410а «Эндосимбиотические системы у инфузорий: биоразнообразие и экология».

IRSES CINAR-PATHOBACTER, проект 7-й рамочной программы Евросоюза, № 247658.

## Список используемой литературы

1. Козо-Полянский, Б.М., 1924. Новый принцип биологии. Очерк теории симбиогенеза.
2. Мережковский, К.С., 1909. Теория двух плазм как основа симбиогенеза, нового учения о происхождении организмов. Уч. зап. Казанского ун-та. 76, 1 – 102.
3. Осипов, Д.В., 1981. Проблемы гетероморфизма ядер у одноклеточных организмов. Наука. Ленингр. отд-ние.
4. Осипов, Д.В., Карпов, С.А., Раутиан, М.С., 1996. Прокариотические экто- и эндоцитобионты жгутиконосцев. Цитология. 38, 411-426.
5. Сковородкин И.Н., 1990. Приспособление для обездвиживания мелких биологических объектов при их светооптическом изучении. Цитология. 32 (3), 301—302.
6. Смирнов, А.В., Осипов Д.В, Раутиан М.С., 1995. Эндоцитобионты у представителей двух отрядов амёб - *Eutamoebida* и *Teptomuxida*. Цитология. 37, 403-414.
7. Смуров, А.О., Подлипаева, Ю.И., Скарлато, С.О., Гудков, А.В., 2010. Связь между степенью солеустойчивости инфузорий и конститутивным уровнем содержания Hsp70 в клетках. Цитология. 52, 1041-1044.
8. Таничев, А.И., Карпов, С.А., 1992. Ультраструктура бесцветной хризомонады *Paraphysomonas vestita* из Байкала. Цитология. 34, 102-105.
9. Фет, В, 2012. Непрямые истины Линн Маргулис. Природа. 8, 67-71.
10. Фокин, С.И., 1993. Бактериальные симбионты инфузорий и их использование в экспериментальной протозоологии. Цитология. 35, 59-91.
11. Фокин, С.И., Осипов, Д.В., Скобло И.И., Раутиан М.С, Сабанеева Е.В., 1987. *Nonospora macronucleata* gn sp-n-a – симбионт вегетативного ядра инфузории *Paramecium caudatum*. Цитология. 29, 963.
12. Фокин, С.И., Сковородкин И.Н., 1991. *Holospora undulata* – эндонуклеобионт инфузории *Paramecium caudatum* в поисках микронуклеуса. Цитология. 33, 64-75.
13. Abamo, F., Dohra, H., Fujishima, M., 2008. Fate of the 63-kDa periplasmic protein of the infectious form of the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* during the infection process. FEMS Microbiology Letters. 280, 21-27.
14. Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews. 59(1), 143-169.

15. Anderson, D. R., Hopps, H. E., Barile, M. F., Bernheim, B. C., 1965. Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and *Mycoplasma* in tissue culture. *Journal of Bacteriology*.90, 1387-1404.
16. Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Kurland, C. G., 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 396(6707), 133-140
17. Archibald, J. M., 2015. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, 25(19), 911-921.
18. Baedke, J., 2021. What's wrong with evolutionary causation? *Acta Biotheoretica*. 69(1), 79-89.
19. Barbera, M. J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J. Y., Bery, A., Silberman, J. D., Roger, A. J., 2010. *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell*.9(12), 1913-1924.
20. Barnhill, A. E., Brewer, M. T., Carlson, S. A., 2012. Adverse effects of antimicrobials via predictable or idiosyncratic inhibition of host mitochondrial components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(8), 4046-4051.
21. Baum, D. A., Baum, B., 2014. An inside-out origin for the eukaryotic cell. *BMC Biology*. 12(1), 1-22.
22. Bazzocchi, C., Mariconti, M., Sassera, D., Rinaldi, L., Martin, E., Cringoli, G., Epis, S., 2013. Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont *Midichloria* (Rickettsiales: Midichloriaceae) in different mammalian species. *Parasites & Vectors*. 6, 1-7.
23. Beier C., Horn M., Michel, Schweikert M., Görtz H.-D., Wagner M., 2002. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the *Rickettsiales* (Alphaproteobacteria) and to *Francisella tularensis* (Gammaproteobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12), 6043-6050.
24. Beinart, R. A., Beaudoin, D. J., Bernhard, J. M., Edgcomb, V. P., 2018. Insights into the metabolic functioning of a multipartner ciliate symbiosis from oxygen-depleted sediments. *Molecular Ecology*. 27(8), 1794-1807.
25. Beliavskaia, A. Y., Predeus, A. V., Garushyants, S. K., Logacheva, M. D., Gong, J., Zou, S., Rautian, M. S., 2020. New intranuclear symbiotic bacteria from macronucleus of *Paramecium putrinum* — “Candidatus Gortzia yakutica”. *Diversity*. 12(5), 198.
26. Bella, C., Koehler, L., Grosser, K., Berendonk, T., Petroni, H., Schrällhammer M., 2016. Fitness impact of obligate intranuclear bacterial symbionts depends on host growth phase. *Frontiers in Microbiology*. 7, 2084.
27. Bhattacharya, D., Yoon, H. S., Hackett, J. D., 2004. Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays*. 26(1), 50-60.

28. Bierre, H., Cossart, P., 2012. When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cellular microbiology*. 14(5), 622-633.
29. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13(1), 42-51.
30. Blanc, G., Ogata, H., Robert, C., Audic, S., Claverie, J. M., Raoult, D., 2007. Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsia massiliae* genome. *Genome Research*. 17(11), 1657-1664.
31. Boone, D. R., 2015. Methanobacterium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1-8.
32. Bordenstein, S. R., Theis, K. R., 2015. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology*. 13(8), e1002226
33. Boscaro, V., Fokin, S. I., Schrällhammer, M., Schweikert, M., Petroni, G., 2013a. Revised systematics of Holospora-like bacteria and characterization of “Candidatus Gortzia infectiva”, a novel macronuclear symbiont of *Paramecium jenningsi*. *Microbial Ecology*, 65, 255-267.
34. Boscaro, V., Petroni, G., Ristori, A., Verni, F., Vannini, C., 2013b. Candidatus Defluviella procrastinata” and “Candidatus Cyrtobacter zanobii”, two novel ciliate endosymbionts belonging to the “Midichloria clade”. *Microbial Ecology*, 65, 302-310.
35. Boscaro, V., Schrällhammer, M., Benken, K., Krenek, S., Szokoli, F., Berendonk, T., Schweikert, M., Verni, F., Sabaneyeva, E., Petroni, G., 2013b. Rediscovering the genus *Lyticum*, multiflagellated symbionts of the order *Rickettsiales*. *Scientific Reports*. 3(1) 1-6.
36. Boscaro, V., Kolisko, M., Felletti, M., Vannini, C., Lynn, D. H., Keeling, P. J., 2017. Parallel genome reduction in symbionts descended from closely related free-living bacteria. *Nature Ecology & Evolution*. 1(8), 1160-1167.
37. Bosch, T. C., Miller, D. J., 2016. The holobiont imperative. Vienna: Springer, doi. 10, 978-3.
38. Boulanger, N., Bulet, P., Lowenberger, C., 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology*. 22(6), 262-268.
39. Bourguignon, T., Kinjo, Y., Villa-Martin, P., Coleman, N. V., Tang, Q., Arab, D. A., Lo, N., 2020. Increased mutation rate is linked to genome reduction in prokaryotes. *Current Biology*. 30(19), 3848-3855.
40. Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A. W., Kambhampati, S., Stern, D. L., 2003. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid–Buchnera symbiosis. *PLoS Biology*. 1(1), e21.
41. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N. Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*. 14(5), 320-330.

42. Bright, M., Bulgheresi, S., 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 8(3), 218-230.
43. Bruggen, J. J., Zwart, K. B., van Assema, R. M., Stumm, C. K., Vogels, G. G., 1984. *Methanobacterium formicicum*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus*. *Archives of Microbiology*. 139(1), 1-7.
44. Busatto, C., Vianna, J., Vieira, L., Ramis, I., Almeida, P., 2019. *Mycobacterium avium*: an overview. *Tuberculosis*. 114, 127-134.
45. Cafiso, A., Bazzocchi, C., De Marco, L., Opara, M. N., Sassera, D., Plantard, O., 2016. Molecular screening for *Midichloria* in hard and soft ticks reveals variable prevalence levels and bacterial loads in different tick species. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7(6), 1186-1192.
46. Castelli, M., Sabaneyeva, E., Lanzoni, O., Lebedeva, N., Floriano, A., Gairasa, S., Benken, K., Modeo, L., Bandi, C., Potechin, A., Sasera, D., Petroni, G., 2019. *Deianiraea*, an extracellular bacterium associated with the ciliate *Paramecium*, suggests an alternative scenario for the evolution of *Rickettsiales*. *The ISME Journal*. 13(9) 2280-2294.
47. Castelli, M., Sassera, D., Petroni, G., 2016. Biodiversity of “non-model” *Rickettsiales* and their association with aquatic organisms. In: *Rickettsiales: Biology, Molecular Biology, Epidemiology, and Vaccine Development*. 59-91.
48. Catta-Preta, C. M., Brum, F. L., da Silva, C. C., Zuma, A. A., Elias, M. C., de Souza, W., Motta, M. C. M., 2015. Endosymbiosis in trypanosomatid protozoa: the bacterium division is controlled during the host cell cycle. *Frontiers in Microbiology*. 6, 520.
49. Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews*. 57(4), 953-994.
50. Chan, C. X., Bhattacharya, D., 2010. The origin of plastids. *Nature Education*. 3(9), 84-1.
51. Chellapandi, P., Bharathi, M., Sangavai, C., Prathiviraj, R., 2018. *Methanobacterium formicicum* as a target rumen methanogen for the development of new methane mitigation interventions: A review. *Veterinary and Animal Science*. 6, 86-94.
52. Chernysh, S., Gordya, N., Suborova, T., 2015. Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria. *PLoS One*. 10(7), e0130788.
53. Chernysh, S., Gordya, N., Tulin, D., Yakovlev, A., 2018. Biofilm infections between *Scylla* and *Charybdis*: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. *Infection and Drug Resistance*. 11, 501.
54. Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2), 232-260.



55. Clifton, D., Goss, R., Sahni, S., van Antwerp, D., Baggs, R., Marder, V., Silverman, D., Sporn, L.A., 1998. NF- $\kappa$ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(8), 4646-4651.
56. Comandatore, F., Radaelli, G., Montante, S., Sacchi, L., Clementi, E., Epis, S., Sassera, D., 2021. Modeling the Life Cycle of the Intramitochondrial Bacterium “*Candidatus Midichloria mitochondrii*” Using Electron Microscopy Data. *Mbio*. 12(3), e00574-21.
57. Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H., Taylor, D. E., 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(12), 3675-3681.
58. Cossart, P., Sansonetti, P. J., 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. 304(5668), 242-248.
59. Cox, E. C., White, J. R., Flaks, J. G., 1964. Streptomycin action and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 51(4), 703-709.
60. Davis, M. J., Ying, Z., Brunner, B. R., Pantoja, A., Ferwerda, F. H., 1998. Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. *Current Microbiology*. 36(2), 80-84.
61. De Bary, A. Die erscheinung der symbiose: Vortrag gehalten auf der versammlung deutscher naturforscher und aerzte zu cassel. Trübner. 1879.
62. Delaye, L., Valadez-Cano, C., Pérez-Zamorano, B., 2016. How really ancient is *Paulinella chromatophora*? *PLoS Currents*. 8.
63. Donaldson, G. P., Lee S. M., Mazmanian S. K., 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 14(1), 20-32.
64. Dorrell, R. G., Howe C. J., 2012. What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses. *Journal of Cell Science*. 125(8), 1865-1875.
65. Douglas, A. E., 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*. 64(4), 409-434.
66. Douglas, A. E., Werren, J. H., 2016. Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio*. 7(2), e02099-15.
67. Driscoll, T., Gillespie, J. J., Nordberg, E. K., Azad, A. F., Sobral, B. W., 2013. Bacterial DNA sifted from the *Trichoplax adhaerens* (Animalia: Placozoa) genome project reveals a putative rickettsial endosymbiont. *Genome Biology and Evolution*. 5(4), 621-645.
68. Dumler, J. S., Walker, D. H., 2015. *Rickettsiales*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1.
69. Duncan, A. B., Fellous, S., Accot, R., Alart, M., Chantung Sobandi, K., Cosiaux, A., Kaltz, O., 2010. Parasite-mediated protection against osmotic stress for *Paramecium caudatum* infected by *Holospora undulata* is host genotype specific. *FEMS Microbiology Ecology*. 74(2), 353-360.

70. Dusi, E., Krenek, S., Schrällhammer, M., Sachse, R., Rauch, G., Kaltz, O., Berendonk, T. U., 2014. Vertically transmitted symbiont reduces host fitness along temperature gradient. *Journal of Evolutionary Biology*. 27(4), 796-800.
71. Edgcomb, V. P., Leadbetter, E. R., Bourland, W., Beaudoin, D., Bernhard, J. M., 2011. Structured multiple endosymbiosis of bacteria and archaea in a ciliate from marine sulfidic sediments: a survival mechanism in low oxygen, sulfidic sediments? *Frontiers in Microbiology*. 2, 55.
72. El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-Sater, F., Gonzalez-Gaitano, G., Brandenburg, K., Nguewa, P. A., 2021. Activity of anti-microbial peptides (AMPs) against *Leishmania* and other parasites: an overview. *Biomolecules*. 11(7), 984.
73. Elkhoully, A. E., Führer, C., 1978. Kinetic studies of ampicillin action on *Escherichia coli* and their spheroplasts. *The Journal of Antibiotics*. 31(3), 229-236.
74. Embley, T. M., Finlay, B. J., 1993. Systematic and morphological diversity of endosymbiotic methanogens in anaerobic ciliates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 64(3), 261-271.
75. Embley, T. M., Finlay, B. J., Thomas, R. H., Dyal, P. L., 1992. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. *Microbiology*. 138(7), 1479-1487.
76. Embley, T. M., Martin, W., 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*. 440(7084), 623-630.
77. Epis, S., Sasser, D., Beninati, T., Lo, N., Beati, L., Piesman, J., Bandi, C., 2008. *Mitochondria* is widespread in hard ticks (*Ixodidae*) and resides in the mitochondria of phylogenetically diverse species. *Parasitology*. 135(4), 485-494.
78. Errington, J., 2013. L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open biology*. 3(1), 120143.
79. Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., Wu, L. J., 2016. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 371(1707), 20150494.
80. Eschbach, E., Pfannkuchen, M., Schweikert, M., Drutschmann, D., Brümmer, F., Fokin, S., Görtz, H. D., 2009. "Candidatus Paraholospora nucleivisitans", an intracellular bacterium in *Paramecium sexaurelia* shuttles between the cytoplasm and the nucleus of its host. *Systematic and Applied Microbiology*. 32(7), 490-500.
81. Esteban, G. F., Fenchel, T., Finlay, B. J., 2010. Mixotrophy in ciliates. *Protist*. 161(5), 621-641.
82. Estrela, S., Kerr, B., Morris, J. J., 2016. Transitions in individuality through symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*. 31, 191-198.

83. Fajardo, M., Schleicher, M., Noegel, A., Bozzaro, S., Killinger, S., Heuner, K., Steinert, M., 2004. Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology*. 150(9), 2825-2835.
84. Famincyn, A.S., 1912. Die Symbiose als Mittel der Synthese von Organismen. Berlin. 435-442.
85. Fauvart, M., De Groote, V. N., Michiels, J., 2011. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Journal of Medical Microbiology*. 60(6), 699-709.
86. Fenchel, T., Finlay, B. J., 1991. The biology of free-living anaerobic ciliates. *European Journal of Protistology*. 26(3-4), 201-215.
87. Fenchel, T., Perry, T., Thane, A., 1977. Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free living ciliates. *The Journal of Protozoology*. 24(1), 154-163.
88. Ferrantini, F., Fokin, S., Modeo, L., Anderioli I., Dini F., Görtz H., Verni F., Petroni G., 2009. "Candidatus Cryptoprodotis polytropus," A novel rickettsia-like organism in the ciliated protist *Pseudomicrothorax dubius* (Ciliophora, Nassophorea). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56(2), 119-129.
89. Fet, V., 2021. Lynn Margulis and Boris Kozo-Polyansky: How the Symbiogenesis was translated from Russian. *Biosystems*, 199, 104316.
90. Finlay, B. J., Fenchel, T., 1989. Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *FEMS Microbiology Letters*. 65(3), 311-314.
91. Finlay, B. J., Fenchel, T., 1992. An anaerobic ciliate as a natural chemostat for the growth of endosymbiotic methanogens. *European Journal of Protistology*. 28(2), 127-137.
92. Fisher, R. A., Gollan, B., Helaine, S., 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*. 15(8), 453-464.
93. Flemming, F. E., Potekhin, A., Pröschold, T., Schrällhammer, M., 2020. Algal diversity in *Paramecium bursaria*: species identification, detection of *Choricystis parasitica*, and assessment of the interaction specificity. *Diversity*. 12(8), 287.
94. Floriano, A. M., Castelli, M., Krenek, S., Berendonk, T. U., Bazzocchi, C., Petroni, G., Sassera, D., 2018. The genome sequence of "Candidatus Fokinia solitaria": insights on reductive evolution in *Rickettsiales*. *Genome Biology and Evolution*. 10(4), 1120-1126.
95. Fok, A. K., Allen, R. D., 1998. The lysosome system. *Paramecium* – Springer, Berlin, Heidelberg. 301-324.
96. Fokin, S. I., 2010. *Paramecium* genus: biodiversity, some morphological features and the key to the main morphospecies discrimination. *Protistology*. 6(4), 227-235.

97. Fokin, S. I., 2019. On the importance of attentive reading of research articles: the case study of *Frontonia* (Peniculia, Oligohymenophora, Ciliophora) species descriptions and redescriptions. *Protistology*. 13(1), 36-41.
98. Fokin, S. I., Brigge, T., Brenner, J., Görtz, H. D., 1996. Holospora species infecting the nuclei of *Paramecium* appear to belong into two groups of bacteria. *European Journal of Protistology*. 32, 19-24.
99. Fokin, S. I., Di Giuseppe, G., Erra, F., Dini, F., 2008. *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in *Ciliophora*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 55(3), 214-228.
100. Fokin, S. I., Görtz, H. D., 2009. Diversity of Holospora bacteria in *Paramecium* and their characterization. *Endosymbionts in Paramecium – Springer, Berlin, Heidelberg*. 161-199.
101. Fokin, S. I., Sabaneyeva, E. V., 1993. Bacterial endocytobionts of the ciliate *Paramecium calkinsi*. *European Journal of Protistology*. 29(4), 390-395.
102. Fokin, S. I., Schweikert, M., Fujishima, M., 2005. Recovery of the ciliate *Paramecium multimicronucleatum* following bacterial infection with *Holospora obtusa*. *European Journal of Protistology*. 41(2), 129-138.
103. Fokin, S. I., Sera, V., 2014. The hidden biodiversity of ciliate-endosymbionts systems. *JSM Microbiol*. 2, 1015.
104. Foster, K. R., Schluter, J., Coyte, K. Z., Rakoff-Nahoum, S., 2017. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature*. 548(7665), 43-51.
105. Foster, R. A., Zehr, J. P., 2019. Diversity, genomics, and distribution of phytoplankton-cyanobacterium single-cell symbiotic associations. *Annual Review of Microbiology*. 73, 435-456.
106. Fournier, P. E., Raoult, D., 2009. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1166(1), 1-11.
107. Fraune, S., Bosch, T. C., 2007. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(32), 13146-13151.
108. Friedrich, N., Hagedorn, M., Soldati-Favre, D., Soldati, T., 2012. Prison break: pathogens' strategies to egress from host cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(4), 707-720.
109. Fritsche, T. R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R. K., Schleifer, K. H., Wagner, M., 1999. In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order *Rickettsiales*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1), 206-212.

110. Fujishima, M., 2009. Infection and maintenance of *Holospora* species in *Paramecium caudatum*. *Endosymbionts in Paramecium*, 201-225.
111. Fujishima, M., Kawai, M., 1997. Acidification in digestive vacuoles is an early event required for *Holospora* infection of *Paramecium* nucleus. In *Eukaryotism and Symbiosis: Intertaxonic Combination versus Symbiotic Adaptation*. Springer Berlin Heidelberg. 367-370.
112. Fujishima, M., Kawai, M., Yamamoto, R., 2005. *Paramecium caudatum* acquires heat-shock resistance in ciliary movement by infection with the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa*. *FEMS Microbiology Letters*. 243(1), 101-105.
113. Fujishima, M., Kodama, Y., 2012. Endosymbionts in *paramecium*. *European Journal of Protistology*. 48(2), 124-137.
114. Fujishima, M., Nagahara, K., Kojima, Y., 1990. Changes in morphology, buoyant density and protein composition in differentiation from the reproductive short form to the infectious long form of *Holospora obtusa*, a macronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Zoological Science*. 7(5), 849-860.
115. Fujishima, M., Nagahara, K., Kojima, Y., Sayama, Y., 1991. Sensitivity of the infectious long form of the macronuclear endosymbiont *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum* against chemical and physical factors. *European Journal of Protistology*. 27(2), 119-126.
116. Garushyants, S. K., Beliavskaia, A. Y., Malko, D. B., Logacheva, M. D., Rautian, M. S., Gelfand, M. S., 2018. Comparative genomic analysis of *Holospora* spp., intranuclear symbionts of paramecia. *Frontiers in Microbiology*. 9, 738.
117. Gast, R. J., Sanders, R. W., Caron, D. A., 2009. Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends in Microbiology*. 17(12), 563-569.
118. George, E. E., Husnik, F., Tashyreva, D., Prokopchuk, G., Horák, A., Kwong, W. K., Keeling, P. J., 2020. Highly reduced genomes of protist endosymbionts show evolutionary convergence. *Current Biology*. 30(5), 925-933.
119. Gibson, I., Bedingfield G., Dobbs H., Shackleton J., 1987. Effects of various agents on the R bodies of certain bacteria. *Micron and Microscopica Acta*. 18(2), 71-75.
120. Gillespie, J. J., Beier, M. S., Rahman, M. S., Ammerman, N. C., Shallom, J. M., Purkayastha, A., Azad, A. F., 2007. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PloS One*. 2(3), e266.
121. Gordya, N., Yakovlev, A., Kruglikova, A., Tulin, D., Potolitsina, E., Suborova, T., Chernysh, S., 2017. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. *PLoS One*, 12(3), e0173559.
122. Görtz, H. D., 2001. Intracellular bacteria in ciliates. *International Microbiology*. 4(3), 143-150.

123. Görtz, H. D., 2010. Microbial infections in free-living protozoa. *Critical Reviews in Immunology*. 30(1).
124. Görtz, H. D., 2021. Nucleus-specific symbionts in *Paramecium caudatum*. *Endosymbiosis and cell biology – De Gruyter*. 381-392.
125. Görtz, H. D., Ahlers N., Robenek H., 1989. Ultrastructure of the infectious and reproductive forms of *Holospora obtusa*, a bacterium infecting the macronucleus of *Paramecium caudatum*. *Microbiology*. 135(11), 3079-3085.
126. Görtz, H., Dieckmann, J., 1982. Symbiotic yeast and bacteria in a strain of *Paramecium bursaria* originally bearing *Chlorellae*. *Journal of Protozoology*. 29(3), 532-532.
127. Görtz, H. D., Fokin S. I., 2009. Diversity of Endosymbiotic Bacteria in *Paramecium*. *Endosymbionts in Paramecium*. Springer, Berlin, Heidelberg. 131-160.
128. Görtz, H. D., Schmidt, H., 2005. *Holospora* (ex Hafkine 1890) Gromov and Ossipov 1981, 351 VP. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 149-151.
129. Görtz, H. D., Wiemann M., 1989. Route of infection of the bacteria *Holospora elegans* and *Holospora obtusa* into the nuclei of *Paramecium caudatum*. *European Journal of Protistology*. 24(2), 101-109.
130. Gomez-Valero, L., Buchrieser C., 2019. Intracellular parasitism, the driving force of evolution of *Legionella pneumophila* and the genus *Legionella*. *Genes & Immunity*. 20(5), 394-402.
131. Gottlieb, Y., Perlman, S. J., Chiel, E., Zchori-Fein, E., 2012. 10 Rickettsia Get Around. *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*. 191.
132. Greub, G., 2018. Chlamydia, rickettsia and other intracellular bacteria. *Microbes and Infection*. 20(7-8), 391.
133. Gromov, B. V., Ossipov, D. V., 1981. *Holospora* (ex Hafkine 1890) nom. rev., a genus of bacteria inhabiting the nuclei of paramecia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 31(3), 348-352.
134. Grosser, K., Ramasamy, P., Amirabad, A. D., Schulz, M. H., Gasparoni, G., Simon, M., Schrällhammer, M., 2018. More than the “killer trait”: infection with the bacterial endosymbiont *Caedibacter taeniospiralis* causes transcriptomic modulation in *Paramecium* host. *Genome Biology and Evolution*. 10(2), 646-656.
135. Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 59(3), 307-321.
136. Habte, M., Alexander, M., 1978. Protozoan density and the coexistence of protozoan predators and bacterial prey. *Ecology*. 59(1), 140-146.

137. Hamann, E., Gruber-Vodicka, H., Kleiner, M., Tegetmeyer, H. E., Riedel, D., Littmann, S., Strous, M., 2016. Environmental *Breviatea* harbour mutualistic *Arcobacter* epibionts. *Nature*. 534(7606), 254-258.
138. Harmer, J., Yurchenko, V., Nenarokova, A., Lukeš, J., Ginger, M. L., 2018. Farming, slaving and enslavement: histories of endosymbioses during kinetoplastid evolution. *Parasitology*. 145(10), 1311-1323.
139. Hauser, A. R., 2007. Antibiotic basics for clinicians: Choosing the right antibacterial agent. Lippincott Williams & Wilkins.
140. Heckmann, K., 1975. Omikron, ein essentieller Endosymbiont von *Euplotes aediculatus*. *The Journal of Protozoology*. 22(1), 97-104.
141. Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L., Shoe, J. L., 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology*. 4(1), 1-9.
142. Heinz, E., Kolarov, I., Kästner, C., Toenshoff, E., Wagner, M., Horn, M., 2007. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. *Environmental Microbiology*. 9(6), 1604-1609.
143. Hess, S., 2017. Description of *Hyalodiscus flabellus* sp. nov. (Vampyrellida, Rhizaria) and identification of its bacterial endosymbiont, "Candidatus Megaira polyxenophila" (Rickettsiales, Alphaproteobacteria). *Protist*. 168(1), 109-133.
144. Hilton, J. A., Foster, R. A., James Tripp, H., Carter, B. J., Zehr, J. P., Villareal, T. A., 2013. Genomic deletions disrupt nitrogen metabolism pathways of a cyanobacterial diatom symbiont. *Nature Communications*. 4(1), 1767.
145. Hollants, J., Leliaert, F., Verbruggen, H., Willems, A., De Clerck, O., 2013. Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 280(1754), 20122659.
146. Hongoh, Y., Sharma, V., Prakash, T., 2008. Genome of an endosymbiont coupling N<sub>2</sub> fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*. 322(5904), 1108-1109.
147. Hori, M., Fujishima, M., 2003. The endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* enhances heat shock gene expression of the host *Paramecium caudatum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 50(4), 293-298.
148. Hori, M., Fujii, K., Fujishima, A., 2008. Micronucleus-specific bacterium *Holospora elegans* irreversibly enhances stress gene expression of the host *Paramecium caudatum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 55(6), 515-521.

149. Horn, M., Fritsche, T., Linner, T., Gautom, T., Harzenetter R., Wagner, M., 2002. Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the beta-Proteobacteria: proposal of 'Candidatus Procabacter acanthamoebae' gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52(2), 599-605.
150. Horn, M, Harzenetter M., Linner, T., Schmid, E., Muller, D., Michel, R., Wagner, M., 2001. Members of the Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of 'Candidatus Amoebophilus asiaticus'. *Environmental Microbiology*. 3(7), 440-449.
151. Horn, M., Wagner M., 2004. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51(5), 509-514.
152. Hornok, S., Foeldvári, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., de la Fuente, J., 2008. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 154(3-4), 354-359.
153. Howell, C. K., Atkinson, S. D., Bartholomew, J. L., Hallett, S. L., 2019. Development and application of a qPCR assay targeting *Ichthyophthirius multifiliis* in environmental water samples. *Diseases of Aquatic Organisms*. 134(1), 43-55.
154. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*. 2559.
155. Huang, J., 2013. Horizontal gene transfer in eukaryotes: the weak-link model. *Bioessays*. 35(10), 868-875.
156. Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17(8), 754-755.
157. Husnik, F., Tashyreva, D., Boscaro, V., George, E. E., Lukeš, J., Keeling, P. J., 2021. Bacterial and archaeal symbioses with protists. *Current Biology*. 31(13), 862-877.
158. Imachi, H., Nobu, M. K., Nakahara, N., Morono, Y., Ogawara, M., Takaki, Y., Takai, K., 2020. Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface. *Nature*. 577(7791), 519-525.
159. Iwatani, K., Dohra, H., Lang, H., Burger, B., Hori M., Fujishima, M., 2005. Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospora* infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 337(4), 1198-1205.
160. Jiao, Y., Sun, J., 2019. Bacterial manipulation of autophagic responses in infection and inflammation. *Frontiers in Immunology*. 10, 2821.
161. Jones, W. J., Nagle, Jr D. P., Whitman, W. B., 1987. Methanogens and the diversity of archaebacteria. *Microbiological Reviews*. 51(1), 135-177.



162. Kaczanowski, S., Sajid, M., Reece, S. E., 2011. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & Vectors*. 4, 1-8.
163. Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., Castro-Sowinski, S., 2005. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 31(2), 55-67.
164. Kawafune, K., Hongoh, Y., Hamaji, T., Nozaki, H., 2012. Molecular identification of rickettsial endosymbionts in the non-phagotrophic volvocalean green algae. *PLoS One*, 7(2), e31749.
165. Kawai, M., Fujishima, M., 1996. Partial characterization and cryopreservation of the isolated symbiotic bacterium *Holospora recta* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Zoological Science*. 13(5), 679-684.
166. Kelly, D. J., Fuerst, P. A., Richards, A. L., 2017. The historical case for and the future study of antibiotic-resistant scrub typhus. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2(4), 63.
167. Khandia, R., Dadar, M., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Chaicumpa, W., 2019. A comprehensive review of autophagy and its various roles in infectious, non-infectious, and lifestyle diseases: current knowledge and prospects for disease prevention, novel drug design, and therapy. *Cells*, 8(7), 674.
168. Kiers, E. T., West, S. A., 2015. Evolving new organisms via symbiosis. *Science*. 348(6233), 392-394.
169. Kikuchi, Y., Fukatsu, T., 2002. Endosymbiotic bacteria in the esophageal organ of glossiphoniid leeches. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(9), 4637-4641.
170. Kim, J. K., Won, Y. J., Nikoh, N., Nakayama, H., Han, S. H., Kikuchi, Y., Lee, B. L., 2013. Polyester synthesis genes associated with stress resistance are involved in an insect-bacterium symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(26), 2381-2389.
171. Kodama, Y., Fujishima, M., 2005. Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* do not prevent acidification and lysosomal fusion of host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma*. 225(3-4), 191.
172. Kodama, Y., Fujishima, M., 2009. Timing of perialgal vacuole membrane differentiation from digestive vacuole membrane in infection of symbiotic algae *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, 160(1), 65-74.
173. Kodama, Y., Fujishima, M., 2010. Secondary symbiosis between *Paramecium* and *Chlorella* cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 279, 33-77.
174. Kodama, Y., Fujishima, M., 2011. Endosymbiosis of *Chlorella* species to the ciliate *Paramecium bursaria* alters the distribution of the host's trichocysts beneath the host cell cortex. *Protoplasma*. 248, 325-337.

175. Kodama, Y., Fujishima, M., 2012. Cell division and density of symbiotic *Chlorella variabilis* of the ciliate *Paramecium bursaria* is controlled by the host's nutritional conditions during early infection process. *Environmental Microbiology*. 14(10), 2800-2811.
176. Kodama, Y., Fujishima, M., 2014. Symbiotic *Chlorella variabilis* incubated under constant dark conditions for 24 hours loses the ability to avoid digestion by host lysosomal enzymes in digestive vacuoles of host ciliate *Paramecium bursaria*. *FEMS Microbiology Ecology*. 90(3), 946-955.
177. Kodama, Y., Inouye, I., Fujishima, M., 2011. Symbiotic *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* plays an important role in maintaining perialgal vacuole membrane functions. *Protist*. 162(2), 288-303.
178. Koehler, L., Flemming, F. E., Schrällhammer, M., 2019. Towards an ecological understanding of the killer trait—a reproducible protocol for testing its impact on freshwater ciliates. *European Journal of Protistology*. 68, 108-120.
179. Korotaev, A., Benken, K., Sabaneyeva, E., 2020. “Candidatus *Mystax nordicus*” aggregates with mitochondria of its host, the ciliate *Paramecium nephridiatum*. *Diversity*. 12(6), 251.
180. Kowallik, K. V., Martin, W. F., 2021. The origin of symbiogenesis: An annotated English translation of Mereschkowsky's 1910 paper on the theory of two plasma lineages. *Biosystems*. 199, 104281.
181. Król-Turmińska, K., Olender, A., 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 24(2), 254.
182. Kusch, J., Czubatinski, L., Nachname, S., Hübner, M., Alter, M., Albrecht, P., 2002. Competitive advantages of *Caedibacter*-infected paramecia. *Protist*. 153(1), 47-58.
183. Kusch, J., Görtz, H. D., 2005. Towards an understanding of the killer trait: *Caedibacter* endocytobionts in *Paramecium*. *Molecular Basis of Symbiosis*. 61-76.
184. Kutschera, U., Niklas, K. J., 2005. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory in Biosciences*. 124, 1-24.
185. Kvitko, K., Migunova, A., Karelov, D., Prokosheva, M., 2001. Molecular taxonomy of virus-sensitive *Chlorella* sp.. Symbionts of *Paramecium bursaria*. *Protistology*. 2(2), 96-104.
186. Kwaik, Y., Gao, L., Stone, B., Venkataraman, C., Harb O., 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9), 3127-3133.
187. Lakshman, K., Shamala R. T., 2003. Enhanced biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in a mutant strain of *Rhizobium meliloti*. *Biotechnology Letters*. 25, 115-119.

188. Landis, W. G., 1981. The ecology, role of the killer trait, and interactions of five species of the *Paramecium aurelia* complex inhabiting the littoral zone. *Canadian Journal of Zoology*. 59(9), 1734-1743.
189. Lane, N., 2011. Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide. *Biology Direct*. 6(1), 1-31.
190. Lanzoni, O., 2019. Diversity and environmental distribution of the cosmopolitan endosymbiont “Candidatus Megaira”. *Scientific Reports*. 9(1), 1-13.
191. Lee, Y. K., Lee, J. H., Lee, H. K., 2011. Microbial symbiosis in marine sponges. *Journal of Microbiology*. 39(4), 254-264.
192. Leidy, J., 1878. Amoeba proteus. *The American Naturalist*. 12(4), 235-238.
193. Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoshani, N., Balaban, N. Q., 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*. 355(6327), 826-830.
194. Lhee, D., Ha, J. S., Kim, S., Park, M. G., Bhattacharya, D., Yoon, H. S., 2019. Evolutionary dynamics of the chromatophore genome in three photosynthetic *Paulinella* species. *Scientific Reports*. 9(1), 2560.
195. Li, S., Bourland, W. A., Al-Farraj, S. A., Li, L., Hu, X., 2017. Description of two species of caenomorphid ciliates (Ciliophora, Armophorea): Morphology and molecular phylogeny. *European Journal of Protistology*. 61, 29-40.
196. Li, P., Vassiliadis, D., Ong, S. Y., Bennett-Wood, V., Sugimoto, C., Yamagishi, J., Pasricha, S., 2020. *Legionella pneumophila* infection rewires the *Acanthamoeba castellanii* transcriptome, highlighting a class of sirtuin genes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10, 428.
197. Lind, A. E., Lewis, W. H., Spang, A., Guy, L., Embley, T. M., Ettema, T. J., 2018. Genomes of two archaeal endosymbionts show convergent adaptations to an intracellular lifestyle. *The ISME Journal*. 12(11), 2655-2667.
198. Liu, X. J., Xie, L., Liu, N., Zhan, S., Zhou, X. G., Wang, Q., 2017. RNA interference unveils the importance of *Pseudotriconympha grassii* cellobiohydrolase, a protozoan exoglucanase, in termite cellulose degradation. *Insect Molecular Biology*. 26(2), 233-242.
199. Longford, S. R., Tujula, N. A., Crocetti, G. R., Holmes, A. J., Holmström, C., Kjelleberg, S., Taylor, M. W., 2007. Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquatic Microbial Ecology*. 48(3), 217-229.
200. López-García, P., Eme, L., Moreira, D., 2017. Symbiosis in eukaryotic evolution. *Journal of Theoretical Biology*. 434, 20-33.
201. Mah, T. F., 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 7(9), 1061-1072.
202. Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2), 273-307.

203. Margulis, L., 1970. Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth. Yale University Press.
204. Margulis, L., 1976. Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Experimental Parasitology*. 39(2), 277-349.
205. Margulis, L., 1991. Symbiogenesis and symbiogenesis. Symbiosis as a source of evolutionary innovation. 1-14.
206. Mariconti M, Epis S, Sacchi L, Biggiogera M, Sassera D et al. (2012) A study on the presence of flagella in the order Rickettsiales: the case of ‘Candidatus Midichloria mitochondrii’. *Microbiology-SGM* 158: 1677–1683.
207. Marin, B., Nowack, E. C., Melkonian, M., 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*. 156(4), 425-432.
208. Matsuura, Y., Kikuchi, Y., Hosokawa, T., Koga, R., Meng, X. Y., Kamagata, Y., Fukatsu, T., 2012. Evolution of symbiotic organs and endosymbionts in lygaeid stinkbugs. *The ISME Journal*. 6(2), 397-409.
209. Mediannikov, O. Y., Sidelnikov, Y., Ivanov, L., Mokretsova, E., Fournier, P. E., Tarasevich, I., Raoult, D., 2004. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica* in the Russian Far East. *Emerging Infectious Diseases*. 10(5), 810.
210. Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., Sogin, M. L., 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71. 491–499.
211. Meenaghan, H, Reilly, K, Wells, B, Gibson, I., 1984. Comparison of the refractile bodies (R-bodies) of certain bacteria—II. Effects of pH on the structure. *Micron and Microscopica Acta*. 15(4), 247-252.
212. Mehari, Y. T., Jason Hayes, B., Redding, K. S., Mariappan, P. V., Gunderson, J. H., Farone, A. L., Farone, M. B., 2016. Description of ‘Candidatus Berkiella aquae’ and ‘Candidatus Berkiella cookevillensis’, two intranuclear bacteria of freshwater amoebae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66(2), 536-541.
213. Mercier, R., Kawai, Y., Errington, J., 2013. Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell*. 152(5), 997-1007.
214. Mereschowsky, C., 1910. Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biologisches Centralblatt*. 30, 278-288.
215. Merhej, V., Raoult, D., 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biological Reviews*. 86(2), 379-405.

216. Mickiewicz, K. M., Kawai, Y., Drage, L., Gomes, M. C., Davison, F., Pickard, R., Errington, J., 2019. Possible role of L-form switching in recurrent urinary tract infection. *Nature Communications*. 10(1), 4379.
217. Milkov, A. V., 2004. Global estimates of hydrate-bound gas in marine sediments: how much is really out there? *Earth-science Reviews*. 66(3-4), 183-197.
218. Millot, L., Kaltz, O., 2006. Cryopreservation of *Holospora undulata*, a bacterial parasite of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Cryobiology*. 52(1), 161-165.
219. Mira, A., Moran, N. A., 2002. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology*. 44, 137-143.
220. Mironov T., Sabaneyeva E., 2020. A robust symbiotic relationship between the ciliate *Paramecium multimicronucleatum* and the bacterium *Ca. Trichorickettsia mobilis*. *Frontiers in Microbiology*. 11, 603335.
221. Mironov T., Yakovlev A., Sabaneyeva E., 2022. Together forever: Inseparable partners of the symbiotic system *Paramecium multimicronucleatum*/*Ca. Trichorickettsia mobilis*. *Symbiosis*. 1-12.
222. Miyake, S., Ngugi, D. K., Stingl, U., 2016. Phylogenetic diversity, distribution, and cophylogeny of giant bacteria (*Epulopiscium*) with their surgeonfish hosts in the Red Sea. *Frontiers in Microbiology*. 7, 285.
223. Modeo, L., Salvetti, A., Rossi, L., Castelli, M., Szokoli, F., Krenek, S., Petroni, G., 2020. “Candidatus *Trichorickettsia mobilis*”, a *Rickettsiales* bacterium, can be transiently transferred from the unicellular eukaryote *Paramecium* to the planarian *Dugesia japonica*. *PeerJ*. 8, e8977.
224. Moliner, C., Fournier, P. E., Raoult, D., 2010. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(3), 281-294.
225. Monroe, D., 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biology*. 5(11), e307.
226. Montagna, M., Sasser, D., Epis, S., Bazzocchi, C., Vannini, C., Lo, N., Bandi, C., 2013. “Candidatus *Midichloriaceae*” fam. nov. (Rickettsiales), an ecologically widespread clade of intracellular alphaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(10), 3241-3248.
227. Montagnes, D. J., Barbosa, A. B., Boenigk, J., Davidson, K., Jürgens, K., Macek, M., Simek, K., 2008. Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquatic Microbial Ecology*. 53(1), 83-98.
228. Monteil, C. L., Vallenet, D., Menguy, N., Benzerara, K., Barbe, V., Fouteau, S., Lefevre, C. T., 2019. A symbiotic origin of magnetoreception in unicellular eukaryotes. *Nature Microbiology*. 4(7), 1088.

229. Morales, J., Kokkori, S., Weidauer, D., Chapman, J., Goltsman, E., Rokhsar, D., Nowack, E. C., 2016. Development of a toolbox to dissect host-endosymbiont interactions and protein trafficking in the trypanosomatid *Angomonas deanei*. *BMC Evolutionary Biology*. 16, 1-12.
230. Moran, N. A., Bennett, G. M., 2014. The tiniest tiny genomes. *Annual Review of Microbiology*. 68, 195-215.
231. Moran, N. A., Sloan, D. B., 2015. The hologenome concept: helpful or hollow? *PLoS Biology*. 13(12), e1002311.
232. Morris, J. J., 2018. What is the hologenome concept of evolution? *F1000Research*. 7.
233. Müller, M., 1972. Secretion of acid hydrolases and its intracellular source in *Tetrahymena pyriformis*. *The Journal of Cell Biology*. 52(2), 478-487.
234. Naito, M., Pawlowska, T. E., 2016. Defying Muller's ratchet: ancient heritable endobacteria escape extinction through retention of recombination and genome plasticity. *MBio*. 7(3), e02057-15.
235. Nakamura, Y., Aki, M., Aikawa, T., Hori, M., Fujishima, M., 2004. Differences in gene expression of the ciliate *Paramecium caudatum* caused by endonuclear symbiosis with *Holospora obtusa*, revealed using differential display reverse transcribed PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 240(2), 209-213.
236. Nakayama, T., Ikegami, Y., Nakayama, T., Ishida, K. I., Inagaki, Y., Inouye, I., 2011. Spheroid bodies in rhopalodiacean diatoms were derived from a single endosymbiotic cyanobacterium. *Journal of Plant Research*. 124, 93-97.
237. Nakayama, T., Inagaki, Y., 2017. Genomic divergence within non-photosynthetic cyanobacterial endosymbionts in rhopalodiacean diatoms. *Scientific reports*. 7(1), 1-8.
238. Nardon, P., Charles H., 2001. Morphological aspects of symbiosis. *Symbiosis – Springer, Dordrecht*. 13-44.
239. Niu, H., Xiong, Q., Yamamoto, A., Hayashi-Nishino, M., Rikihisa, Y., 2012. Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(51), 20800-20807.
- 240.
241. Nowack, E. C., Weber, A. P., 2018. Genomics-informed insights into endosymbiotic organelle evolution in photosynthetic eukaryotes. *Annual Review of Plant Biology*. 69, 51-84.
242. Ogata, H., Renesto, P., Audic, S., Robert, C., Blanc, G., Fournier, P. E., Raoult, D., 2005. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *PLoS Biology*. 3(8), e248.

243. Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G et al. (2006) Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet* 2: e76. doi: 10.1371/journal.pg
244. O'Malley, M. A., 2017. From endosymbiosis to holobionts: evaluating a conceptual legacy. *Journal of Theoretical Biology*. 434, 34-41.
245. Omar, A., Zhang, Q., Zou, S., Gong, J., 2017. Morphology and phylogeny of the soil ciliate *Metopus yantaiensis* n. sp. (Ciliophora, Metopida), with identification of the intracellular bacteria. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 64(6), 792-805.
246. Onderdonk, A. B., Delaney M. L., Fichorova R. N., 2016. The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 29(2), 223-238.
247. Onwuamaegbu, M. E., Belcher, R. A., Soare, C., 2005. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. *Journal of International Medical Research*. 33(1), 1-20.
248. Osipov, D. B., Podlipaev, S. A., 1977. Elektronmikroskopiceskoe issledoanie rannich stadnij zarazhenija *Paramecium caudatum* simbiontami makronukleusa (jota-bakterijami). *Acta Protozoologica*. 16(3/4).
249. Ossipov, D. V., Karpov, S. A., Smirnov, A. V., Rautian, M. S., 1997. Peculiarities of the symbiotic systems of protists with diverse patterns of cellular organisation. *Acta Protozoologica*. 36(1), 3-21.
250. Oulhen, N., Schulz, B. J., Carrier, T. J., 2016. English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, 'Die Erscheinung der Symbiose' ('De la symbiose'). *Symbiosis*. 69(3), 131-139.
251. Pagkalis, S., Mantadakis, E., Mavros, M. N., Ammari, C., Falagas, M. E., 2011. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. *Drugs*. 71, 2277-2294.
252. Pareja, M. E., Bongiovanni, A., Lafont, F., Colombo, M. I., 2017. Alterations of the *Coxiella burnetii* replicative vacuole membrane integrity and interplay with the autophagy pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7, 112.
253. Pasqualetti, C., Szokoli, F., Rindi, L., Petroni, G., Schrollhammer, M., 2020. The obligate symbiont "Candidatus Megaira polyxenophila" has variable effects on the growth of different host species. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1425.
254. Pasqualetti, C., Schmidt, J. G., Cafiso, A., Gammuto, L., Lanzoni, O., Sepulveda, D., Petroni, G., 2021. Double trouble: could *Ichthyophthirius multifiliis* be a vehicle for the bacterium associated with red mark syndrome in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*? *Aquaculture*. 533, 736230.

255. Patra, A., Park, T., Kim, M., Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8(1), 1-18.
256. Petroni, G., Dini, F., Verni, F., Rosati, G., 2002. A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in Euplotes (Ciliophora, Spirotrichea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22(1), 118-130.
257. Pond F., Gibson I., Lalucat J., Quackenbush R., 1989. R-body-producing bacteria. *Microbiological Reviews*. 53(1), 25-67.
258. Potekhin, A., Schweikert, M., Nekrasova, I., Vitali, V., Schwarzer, S., Anikina, A., Schrällhammer, M., 2018. Complex life cycle, broad host range and adaptation strategy of the intranuclear *Paramecium* symbiont *Preeria caryophila* comb. nov. *FEMS Microbiology Ecology*. 94(7), 76.
259. Preer, J. R., Preer, L. B., Jurand, A., 1974. Kappa and other endosymbionts in *Paramecium aurelia*. *Bacteriological Reviews*. 38(2), 113-163.
260. Rafailidis, P. I., Ioannidou, E. N., Falagas, M. E., 2007. Ampicillin/sulbactam: current status in severe bacterial infections. *Drugs*. 67, 1829-1849.
261. Raoult, D., Roux, V., 1999. The body louse as a vector of reemerging human diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 29(4), 888-911.
262. Reisser, W., Meier, R., Görtz, H. D., Jeon, K., 1985. Establishment, maintenance, and integration mechanisms of endosymbionts in protozoa. *The Journal of Protozoology*. 32(3), 383-390.
263. Rhodes, K. A., Schweizer, H. P., 2016. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resistance Updates*. 28, 82-90.
264. Richard, S., Seng, P., Parola, P., Raoult, D., Davoust, B., Brouqui, P., 2009. Detection of a new bacterium related to 'Candidatus Midichloria mitochondrii' in bed bugs. *Clinical Microbiology and Infection*. 15, 84-85.
265. Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Lang, B. F., 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Current Biology*. 15(14), 1325-1330.
266. Rolain, J. M., 2007. Antimicrobial susceptibility of rickettsial agents. In *Rickettsial Diseases* (pp. 373-382). CRC Press.
267. Rolain, J. M., Maurin, M., Vestris, G., Raoult, D., 1998. In vitro susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(7), 1537-1541.



268. Rolain, J. M., Raoult, D., 2005. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in the *Rickettsia* genus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1063(1), 222-230.
269. Rolinson, G. N., Macdonald, A. C., Wilson, D. A., 1977. Bactericidal action of  $\beta$ -lactam antibiotics on *Escherichia coli* with particular reference to ampicillin and amoxycillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 3(6), 541-553.
270. Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25(7), 1253-1256.
271. Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*. 6(1), 1-14.
272. Pötter, M., Steinbüchel, A., 2006. Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. Inclusions in prokaryotes. 109-136.
273. Sabaneyeva, E., Castelli, M., Szokoli, F., Benken, K., Lebedeva, N., Salvetti, A., Petroni, G., 2018. Host and symbiont intraspecific variability: The case of *Paramecium calkinsi* and “Candidatus Trichorickettsia mobilis”. *European Journal of Protistology*. 62, 79-94.
274. Sabaneyeva, E., Derkacheva, M., Benken, K., Fokin, S., Vainio, S., Skovorodkin, I., 2009. Actin-based mechanism of *Holospora obtusa* trafficking in *Paramecium caudatum*. *Protist*. 160(2), 205-219.
275. Sabaneyeva, E. V., Fokin, S. I., Gavrilova, E. V., Kornilova, E. S., 2005. Nocodazole inhibits macronuclear infection with *Holospora obtusa* in *Paramecium caudatum*. *Protoplasma*. 226, 147-153.
276. Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. 14(3), 225.
277. Sasser, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A., Sacchi, L., Fabbri, M., Lo, N., 2006. ‘Candidatus Midichloria mitochondrii’, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(11), 2535-2540.
278. Sasser, D., Lo, N., Epis, S., D'Auria, G., Montagna, M., Comandatore, F., Bandi, C., 2011. Phylogenomic evidence for the presence of a flagellum and cbb 3 oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. *Molecular Biology and Evolution*. 28(12), 3285-3296.
279. Schrollhammer, M., Castelli, M., Petroni, G., 2018. Phylogenetic relationships among endosymbiotic R-body producer: Bacteria providing their host the killer trait. *Systematic and Applied Microbiology*. 41(3), 213-220.
280. Schrollhammer, M., Ferrantini, F., Vannini, C., Galati, S., Schweikert, M., Görtz, H. D., Petroni, G., 2013. ‘Candidatus Megaira polyxenophila’ gen. nov., sp. nov.: considerations on evolutionary history, host range and shift of early divergent rickettsiae. *PLoS One*. 8(8), e72581.

281. Schrallhammer, M., Galati, S., Altenbuchner, J., Schweikert, M., Görtz, H. D., Petroni, G., 2012. Tracing the role of R-bodies in the killer trait: absence of toxicity of R-body producing recombinant *E. coli* on paramecia. *European Journal of Protistology*. 48(4), 290-296.
282. Schrallhammer, M., Potekhin, A., 2020. Epidemiology of nucleus-dwelling *Holospora*: infection, transmission, adaptation, and interaction with *Paramecium*. *Symbiosis: Cellular, Molecular, Medical and Evolutionary Aspects*. 105-135.
283. Schultz, M. B., Thanh, D. P., Do Hoan, N. T., Wick, R. R., Ingle, D. J., Hawkey, J., Holt, K. E., 2016. Repeated local emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single hospital ward. *Microbial Genomics*. 2(3).
284. Schuster, F. L., Visvesvara, G. S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34(9), 1001-1027.
285. Schweikert, M., Fujishima, M., Görtz, H. D., 2013. Symbiotic associations between ciliates and prokaryotes. *The prokaryotes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 427-463.
286. Schweizer, H. P., 2012. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiology*. 7(12), 1389-1399.
287. Sekeyova, Z., Danchenko, M., Filipcik, P., Fournier, P. E., 2019. Rickettsial infections of the central nervous system. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 13(8), e0007469.
288. Senra, M. V., Dias, R. J., Castelli, M., Silva-Neto, I. D., Verni, F., Soares, C. A., Petroni, G., 2016. A house for two – double bacterial infection in *Euplotes woodruffi* Sq1 (Ciliophora, Euplotia) sampled in Southeastern Brazil. *Microbial Ecology*. 71, 505-517.
289. Serra, V., Fokin, S. I., Castelli, M., Basuri, C. K., Nitla, V., Verni, F., Petroni, G., 2016. “Candidatus Gortzia shahrazadis”, a novel endosymbiont of *Paramecium multimicronucleatum* and a revision of the biogeographical distribution of Holospora-like bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1704.
290. Serra, V., Gammuto, L., Nitla, V., Castelli, M., Lanzoni, O., Sassera, D., Petroni, G., 2020. Morphology, ultrastructure, genomics, and phylogeny of *Euplotes vanleeuwenhoekii* sp. nov. and its ultra-reduced endosymbiont “Candidatus Pinguicoccus supinus” sp. nov. *Scientific Reports*. 10(1), 1-27.
291. Shaked, Y., Samra, Y., Maier, M. K., Rubinstein, E., 1989. Relapse of rickettsial Mediterranean spotted fever and murine typhus after treatment with chloramphenicol. *Journal of Infection*, 18(1), 35-37.
292. Shames, S. R., Auweter, S. D., Finlay, B. B., 2009. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41(2), 380-389.

293. Shukla, P., Bansode, F. W., Singh, R. K., 2011. Chloramphenicol toxicity: A review. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2(13), 1313-1316.
294. Šimek, K., Pitsch, G., Salcher, M. M., Sirová, D., Shabarova, T., Adamec, L., Posch, T., 2017. Ecological traits of the algae-bearing *Tetrahymena utriculariae* (Ciliophora) from traps of the aquatic carnivorous plant *Utricularia reflexa*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(3), 336-348.
295. Simon, J. C., Marchesi, J. R., Mougel, C., Selosse, M. A., 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*. 7(1), 1-5.
296. Siqueira, M. D. S., Ribeiro, R. D. M., Travassos, L. H., 2018. Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens. *Frontiers in Immunology*. 9, 935.
297. Slavchev, G., Michailova, L., Markova, N., 2016. L-form transformation phenomenon in *Mycobacterium tuberculosis* associated with drug tolerance to ethambutol. *International Journal of Mycobacteriology*. 5(4), 454-459.
298. Smurov, A. O., Fokin, S. I., 1998. Resistance of *Paramecium caudatum* infected with endonuclear bacteria *Holospora* against salinity impact. *Proc Zool Ins RAS*. 276, 175-178.
299. Solomon, J. M., Leung, G. S., Isberg, R. R., 2003. Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin. *Infection and Immunity*. 71(6), 3578-3586.
300. Sonneborn, T. M., 1943. Gene and Cytoplasm: I. The determination and inheritance of the killer character in variety 4 of *Paramecium aurelia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 29(11), 329-338.
301. Steinert, M., 2011. Pathogen–host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press. 22(1), 70-76.
302. Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F., 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(6), 2256-2261.
303. Stingl, U., Radek, R., Yang, H., Brune, A., 2005. “Endomicrobia”: cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3), 1473-1479.
304. Stradal, T. E., Schelhaas, M., 2018. Actin dynamics in host–pathogen interaction. *FEBS Letters*. 592(22), 3658-3669.
305. Strüeder-Kypke, M. C., Lynn, D. H., 2010. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Systematics and Biodiversity*. 8(1), 131-148.

306. Suchland, R. J., Geisler, W. M., Stamm, W. E., 2003. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(2), 636-642.
307. Summerer, M., Sonntag, B., Sommaruga, R., 2007. An experimental test of the symbiosis specificity between the ciliate *Paramecium bursaria* and strains of the unicellular green alga *Chlorella*. *Environmental Microbiology*. 9(8), 2117-2122.
308. Sunagawa, S., Acinas, S. G., Bork, P., Bowler, C., Eveillard, D., Gorsky, G., de Vargas, C., 2020. Tara Oceans: towards global ocean ecosystems biology. *Nature Reviews Microbiology*. 18(8), 428-445.
309. Swart, A. L., Hilbi, H., 2020. Phosphoinositides and the fate of *Legionella* in phagocytes. *Frontiers in Immunology*. 11, 25.
310. Szklarzewicz, T., Michalik, A., 2017. Transovarial transmission of symbionts in insects. *Oocyte*. 43-67.
311. Szokoli, F., Castelli, M., Sabaneyeva, E., Schrollhammer, M., Krenek, S., Doak, T. G., Petroni, G., 2016. Disentangling the taxonomy of *Rickettsiales* and description of two novel symbionts (“*Candidatus Bealeia paramacronuclearis*” and “*Candidatus Fokinia cryptica*”) sharing the cytoplasm of the ciliate protist *Paramecium biaurelia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(24), 7236-7247.
312. Takeuchi, M., Kuwahara, H., Murakami, T., Takahashi, K., Kajitani, R., Toyoda, A., Hongoh, Y., 2020. Parallel reductive genome evolution in *Desulfovibrio* ectosymbionts independently acquired by *Trichonympha* protists in the termite gut. *The ISME Journal*. 14(9), 2288-2301.
313. Tarmadi, D., Yoshimura, T., Tobimatsu, Y., Yamamura, M., Umezawa, T., 2017. Effects of lignins as diet components on the physiological activities of a lower termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Insect Physiology*. 103, 57-63.
314. 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.
315. Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., Polkinghorne, A., 2015. Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *FEMS Pathogens and Disease*. 73(1), 1-15.
316. Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C., Bordenstein, S. R., 2016. Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *Msystems*. 1(2), e00028-16.

317. Tian, J., Sinskey, A. J., Stubbe, J., 2005. Detection of intermediates from the polymerization reaction catalyzed by a D302A mutant of class III polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase. *Biochemistry*. 44(5), 1495-1503.
318. Tomov, A. T., Tsvetkova, E. D., Tomova, I. A., Michailova, L. I., Kassovski, V. K., 1999. Persistence and multiplication of obligate anaerobe bacteria in amoebae under aerobic conditions. *Anaerobe*. 5(1), 19-23.
319. Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L., Andreu, D., 2012. Antimicrobial peptide action on parasites. *Current Drug Targets*. 13(9), 1138-1147.
320. Trastoy, R., Manso, T., Fernández-García, L., Blasco, L., Ambroa, A., Perez Del Molino, M. L., Tomás, M., 2018. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00023-18.
321. Van den Bergh, B., Michiels, J. E., Wenseleers, T., Windels, E. M., Boer, P. V., Kestemont, D., Michiels, J., 2016. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nature Microbiology*. 1(5), 1-7.
322. Van Etten, J. L., Lane, L. C., Meints, R. H., 1991. Viruses and virus-like particles of eukaryotic algae. *Microbiological Reviews*. 55(4), 586-620.
323. Vannini, C., Boscaro, V., Ferrantini, F., Benken, K., Mironov, T., Schweikert, M., Görtz, H., Fokin, S., Sabaneyeva, E., Petroni, G., 2014. Flagellar movement in two bacteria of the family *Rickettsiaceae*: a re-evaluation of motility in an evolutionary perspective. *PLoS One*. 9(2), e87718.
324. Vannini, C., Ferrantini, F., Schleifer, K. H., Ludwig, W., Verni, F., Petroni, G., 2010. "Candidatus Anadelfobacter veles" and "Candidatus Cyrtobacter comes," two new *Rickettsiales* species hosted by the protist ciliate *Euplotes harpa* (Ciliophora, Spirotrichea). *Applied and Environmental Microbiology*. 76(12), 4047-4054.
325. Vannini, C., Lucchesi, S., Rosati, G., 2007. *Polynucleobacter*: symbiotic bacteria in ciliates compensate for a genetic disorder in glycogenolysis. *Symbiosis*. 44(1), 85-91
326. Vannini, C., Petroni, G., Verni, F., Rosati, G., 2005. A bacterium belonging to the *Rickettsiaceae* family inhabits the cytoplasm of the marine ciliate *Diophrys appendiculata* (Ciliophora, Hypotrichia). *Microbial Ecology*. 49, 434-442.
327. Vannini, C., Rosati, G., Verni, F., Petroni, G., 2004. Identification of the bacterial endosymbionts of the marine ciliate *Euplotes magnicirratu*s (Ciliophora, Hypotrichia) and proposal of 'Candidatus Devosia euplotis'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(4), 1151-1156.
328. Vanrompay, D., Anh Nguyen, T. L., Cutler, S. J., Butaye, P., 2018. Antimicrobial resistance in *Chlamydiales*, *Rickettsia*, *Coxiella*, and other intracellular pathogens. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*. 485-500.

329. Vester, B., Douthwaite, S., 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(1), 1-12.
330. Vishnyakov, A., Rodionova G., 1999. Motile intranuclear symbionts of ciliate *Paramecium multimicronucleatum*. *Symbiosis to Eukaryotism-endocytobiology VII Geneva University Press*. 169-177.
331. Walker, D. H., Ismail, N., 2008. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nature Reviews Microbiology*. 6(5), 375-386.
332. Walker, D. H., Yu, X. J., 2005. Progress in rickettsial genome analysis from pioneering of *Rickettsia prowazekii* to the recent *Rickettsia typhi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1063(1), 13-25.
333. Weber, K. A., Achenbach, L. A., Coates, J. D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*. 4(10), 752-764.
334. Webster, N. S., Thomas, T., 2016. The sponge hologenome. *MBio*. 7(2), e00135-16.
335. Weinert, L. A., Werren, J. H., Aebi, A., Stone, G. N., Jiggins, F. M., 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biology*. 7(1), 1-15.
336. Weisse T., 2002. The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81(1), 327-341.
337. Weissmann, G., 2005. Rats, lice, and Zinsser. *Emerging Infectious Diseases*. 11(3), 492.
338. Widdel, F., Bak, F., 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 3352-3378.
339. Williamson, G. M., 1957. The mode of action of streptomycin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 9(7), 433-45.
340. Wisseman, Jr C. L., Waddell, A. D., Walsh, W. T., 1982. In vitro studies of the action of antibiotics on *Rickettsia prowazeki* by two basic methods of cell culture. *Journal of Infectious Diseases*. 130(6), 564-574.
341. Wrede, C., Dreier, A., Kokoschka, S., Hoppert, M., 2012. Archaea in Symbioses. *Archaea*.
342. Yakovleva, Y., Nassonova, E., Lebedeva, N., Lanzoni, O., Petroni, G., Potekhin, A., Sabaneyeva, E., 2020. The first case of microsporidiosis in *Paramecium*. *Parasitology*. 147(9), 957-971.
343. Yamada, T., Onimatsu, H., Van Etten, J. L., 2006. Chlorella viruses. *Advances in Virus Research*. 66, 293-336.

344. Yashchenko, V. V., Gavrilova, O. V., Rautian, M. S., Jakobsen, K. S., 2012. Association of *Paramecium bursaria* *Chlorella* viruses with *Paramecium bursaria* cells: Ultrastructural studies. *European Journal of Protistology*. 48(2), 149-159.
345. Yoshida, M., Furuya, N., Hosokawa, N., Kanamori, H., Kaku, M., Koide, M., Fujita, J., 2018. *Legionella pneumophila* contamination of hospital dishwashers. *American Journal of Infection Control*. 46(8), 943-945.
346. Yutin, N., Wolf, M. Y., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., 2009. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biology Direct*. 4(1), 1-26.
347. Zaila, K. E., Doak, T. G., Ellerbrock, H., Tung, C. H., Martins, M. L., Kolbin, D., Chang, W. J., 2017. Diversity and universality of endosymbiotic rickettsia in the fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Frontiers in Microbiology*. 8, 189.
348. Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Ettema, T. J., 2017. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*. 541(7637), 353-358.
349. Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(5), 723-735.