

УДК 591.4, 591.5, 579.2

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ ПОМОГАЕТ ПОНЯТЬ ОБРАЗ ЖИЗНИ ЧЕРВЕЙ *TEREBELLIDES* CF. *STROEMII* (ANNELIDA, TEREBELLIFORMIA, TRICHOBRANCHIDAE) В БЕЛОМ МОРЕ

© 2023 г. А. Б. Цетлин^{а, *}, А. А. Клюкина^б, А. Г. Ельченинов^б, П. А. Щербакова^а, Л. А. Гавирова^а, А. И. Шестаков^а, Е. В. Ворцепнева^а, А. Э. Жадан^а, И. В. Кубланов^б

^аБиологический факультет, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 1, Москва, 119234 Россия

^бИнститут микробиологии имени С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, Москва, 119071 Россия

*e-mail: atzetlin@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 13.10.2023 г.

Многощетинковые кольчатые черви являются одним из основных компонентов океанического бентоса, однако мало что известно об их микробных симбионтах. Цель настоящей работы — описание образа жизни представителей *Terebellides* cf. *stroemii* в Белом море посредством изучения их микробиомов. Для этого черви и их трубки были исследованы с помощью световой и электронной микроскопии, а состав микробиомов изучали с помощью секвенирования гипервариабельных V4 участков гена 16S рРНК прокариот. Показано, что трубки *Terebellides* cf. *stroemii* рыхлые и, скорее всего, временные, черви активно роются в грунте, тем не менее, часть времени проводят, собирая пищу с поверхности грунта с помощью щупалец. В клетках покровов и кишечном эпителии с помощью микроскопии бактерии обнаружены не были. Филогенетический и кластерный анализы выявили значительные отличия таксономического состава микробиомов червей *T. cf. stroemii* от микробных сообществ грунта и позволили определить специфические компоненты микробиомов кишечников и щупалец, а микробиомы донных осадков и трубок червей оказались схожими. В микробиомах трубок доминируют *Pseudomonadota*, *Desulfobacterota* и *Bacteroidota*. В кишечниках обитают *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Cyanobacteriota*, *Chloroflexota* и *Planctomycetota*. Микробиом щупалец *T. cf. stroemii* существенно отличается от микробиома окружающего грунта, трубки и кишки, в нем представлены *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Bacteroidota*, кроме того, в двух образцах наблюдалось значительное количество представителей архейного суперфилюма DPANN (*Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Nanohaloarchaeota*). Современные технологии изучения микробиомов продемонстрировали наличие специфических сообществ микроорганизмов, ассоциированных с исследованным видом. Сочетание морфологических и молекулярных методов перспективно для изучения микробиомов, ассоциированных с морскими аннелидами, и их функциональных связей с животными.

Ключевые слова: многощетинковые черви, биология, пищеварительный тракт, микробиом, метабеномные методы, *Proteobacteria*, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota*, DPANN

DOI: 10.31857/S0044513423120127, **EDN:** GRQEGG

Многощетинковые кольчатые черви (Polychaeta, Annelida) являются одним из основных компонентов океанического бентоса, где они могут составлять до половины всей биомассы донных беспозвоночных (Hutchings, Peart, 2000; Capa, Hutchings, 2021). Однако за рядом исключений мало что известно об их микробных симбионтах (Petersen, Osvatic, 2018). При этом с каждым годом проявляется все больше данных о тесных связях массовых донных беспозвоночных и бактериальных сообществ,

как ассоциированных с беспозвоночными, так и характерных для окружающего осадка (Lacoste et al., 2018). При обнаружении гидротермальных выходов, находящихся на больших глубинах океана (Schreier, Lutz, 2019), одним из самых ярких наблюдений ученых было обилие и разнообразие сообществ беспозвоночных животных. Такое изобилие макрофауны существует за счет хемоавтотрофных микробных симбионтов. Наибольшее количество работ по исследованию

ассоциаций червей и микроорганизмов было посвящено именно представителям глубоководных термальных источников, например, *Riftia pachyptila* (Minic, 2009; Hinzke et al., 2019), других вестиментифер (Perez, Juniper, 2016; Reveillaud et al., 2018; Campbell et al., 2003; Bright, Giere, 2005), *Ophelina* sp. (Neave et al., 2012), *Osedax* spp. (Goffredi et al., 2007; Moggioli et al., 2023). В то же время мало что известно про ассоциации микроорганизмов с аннелидами, живущими на огромных пространствах дна мирового океана. Несмотря на то, что большая часть морских аннелид обитает на шельфе (более 15 тысяч видов), было сделано всего несколько попыток определить состав их микробиома. Были получены данные по микробным симбионтам *Neanthes glandicincta* (Li et al., 2009), *Olavius algarvensis* (Woyke et al., 2014; Kleiner et al., 2012; Wippler et al., 2016), *Hydroides elegans* (Nedved, Hadfield, 2008; Vijayan et al., 2019), *Tubificoides benedii* (Dubilier, 1987), *Trochonerilla mobilis* (Tzetzlin, Saphonov, 1995).

Таким образом, микробные сообщества, ассоциированные с подавляющим большинством массовых и широко распространенных видов аннелид в океане, до сих пор не изучены. Это в полной степени относится и к морям Арктического бассейна. При этом разнообразие (таксономическое, физиологическое, поведенческое) самих аннелид огромно, что подразумевает актуальность выявления как особенностей микробиомов и взаимодействия их представителей с хозяином у каждой отдельной группы червей, так и закономерностей, общих для всех организмов этой группы. В настоящее время показано, что ассоциативные микроорганизмы беспозвоночных синтезируют значительное количество биологически активных веществ, в т.ч. тех, синтез которых, как полагали ранее (Fenical, 1993), осуществляли сами животные. Кроме того, известно, что многие симбиотические бактерии являются потенциальными продуцентами биотехнологически значимых соединений, например ферментов, активных в условиях низких температур (Blockley et al., 2017). Например, исследование микробиомов полихет, таких как *Capitella teleta* (Bach et al., 2005), *Sabella spallanzanii* (Bocchetti et al., 2004; Sampaio et al., 2019), являющихся маркерами загрязнений, показало, что симбиотические микробные сообщества этих червей способны достаточно эффективно разрушать углеводороды.

Полихеты группы *Terebellides stroemii* — это массовые формы в донных сообществах шельфа северных морей. Они являются характерными представителями в бентосных сообществах от верхней сублиторали до батимальных глубин в северных частях Атлантического и Тихого океанов, а также арктических морей (Жирков, 2001; Jumars et al., 2015). Полихеты рода *Terebellides* обитают на мягких грунтах от песчаных до илистых и глини-

стых, иногда в зарослях водорослей или морской травы (Holthe, 1986; Hutchings, Peart, 2000), от литорали до батии, в диапазоне солености от 3‰ в эстуариях до полносоленых водоемов (35‰). Плотность поселений достигает 120–610 экз./м² и биомасса 23 г/м² (Henriksson, 1969; Zhang, Hutchings, 2018). Теребеллидесы роют толщу грунта с помощью выроста на брюшной стороне первого сегмента (Holthe, 1986). Показано, что полихеты рода *Terebellides* проявляют широкую экологическую пластичность, выносят большие колебания температуры и солености и хорошо адаптируются к стрессам, связанным с антропогенным воздействием (Ferraris et al., 1994; Stoykov, Uzunova, 2001).

Род *Terebellides* Sars 1835 (Annelida) отличается от всех других представителей отряда Terebelliformia уникальным строением жаберного аппарата, который состоит из стебелька и четырех пластинчатых лопастей, направленных назад. Первым описанным видом был *Terebellides stroemii* Sars 1835 из осадков шельфа юго-западной Норвегии. Из-за характерного облика долгое время всех полихет с подобным строением жаберы, найденных по всему Мировому океану на разных глубинах, относили к этому виду (Ушаков, 1955; Caullery, 1915, 1944; Hartman, 1966; Day, 1967). Таким образом, *T. stroemii* считался видом-космополитом. Позже Williams (1984) обнаружил различные морфотипы внутри *T. stroemii*; в последующие годы количество описаний новых видов рода *Terebellides* по всему миру увеличилось (Imajima, Williams, 1985; Solis-Weiss et al., 1991; Bremec, Elias, 1999; Hutchings, Peart, 2000; Garraffoni, Lana, 2003; Schüller, Hutchings, 2010, 2012, 2013; Zhang, Hutchings, 2018). Недавнее исследование, проведенное с помощью молекулярно-генетических методов (Nygren et al., 2018), показало, что фактическое разнообразие *Terebellides* намного выше, чем ожидалось, и число видов *Terebellides*, обитающих в северо-восточной Атлантике, увеличилось с 5 до 25. Большая часть этих видов еще не описана морфологически. Все виды рода *Terebellides* имеют сходный облик и отличаются микроскопическими деталями в строении жабер, пароподий и щетинок; обычно для различения видов требуется исследование с помощью сканирующей электронной микроскопии (Barroso et al., 2023). В Белом море, так же как и в других регионах, полихет рода *Terebellides* традиционно относят к виду *T. stroemii* (Дерюгин, 1928; Ушаков, 1939; Цетлин, 1980; Жирков, 2001; Жадан, 2010). Так как подробных таксономических и молекулярных исследований беломорских особей не проводили, в настоящей работе мы используем название *Terebellides* cf. *stroemii*. Эти черви обычны на мягких грунтах Белого моря, они встречаются от верхней сублиторали до максимальных глубин, в мелководных лагунах часто это доминирующие формы макробентоса (Stolyarov, 2019).

Цель настоящей работы — изучение микробиома, ассоциированного с представителями *Terebellides cf. stroemii*, как инструмента, который позволит получить более детальные данные об образе жизни этого массового вида в Белом море и его роли в донных сообществах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методика сбора

Материал собран в акватории Кандалакшского залива Белого моря вблизи Беломорской Биологической Станции им. Н.А. Перцова МГУ (Ермолинская губа) (рис. 1А–1С) в сентябре 2019, 2020, 2021 г., а также в июне и сентябре 2022 г. Отбор образцов (червей, трубок, грунта) проводили с помощью тралений, с применением дночерпателя “Haps-corer” 0.1 м² и использованием водолазной техники (рис. 1D–1E). При водолажных работах визуально находили щупальца червей на дне, фотографировали их, затем брали пробы грунта с поверхности, выкапывали трубку вместе с червем и частью грунта и помещали ее в стерильную пробирку объемом 50 мл, наполненную окружающей морской водой, после чего пробирку закрывали крышкой. Полученный тралением грунт промывали морской водой на сите с ячейкой 2 мм, после чего вручную отбирали червей, не прошедших сквозь сито. Десять экземпляров *Terebellides cf. stroemii* содержали в течение двух месяцев в аквариуме с морской водой, илисто-песчаным грунтом толщиной 3 см при температуре +8°C.

Дальнейшее хранение червей и манипуляции с ними проводили в асептических условиях. Червей препарировали в стерильных чашках Петри со стерильной морской водой. Воду стерилизовали автоклавированием (121°C, 30 мин), после чего остужали до температуры +10–12°C. Все инструменты стерилизовали автоклавированием, либо опуская в емкость с 96% этанолом с последующим прожиганием в пламени, либо обработкой 76% этанолом в случае невозможности использования первых двух методов. Препарирование проводили под биноклем при помощи микрохирургических инструментов. Трубки червей *Terebellides cf. stroemii* аккуратно вскрывали, при обнаружении в них червя трубки сохраняли отдельно, а у животного отделяли щупальца и кишечник (также фиксировали несколько образцов целых червей). Перед фиксацией каждый образец дополнительно промывали в стерильной воде. Для последующего выделения ДНК все образцы фиксировали в буфере А (100 мМ EDTA, 100 мМ Tris HCl, 150 мМ NaCl).

Морфологические исследования

Внутренняя и внешняя поверхности трубки, трубки на сломе, а также поверхность щупалец, поверхность покровов тела червей и внутренняя поверхность пищеварительного тракта были изучены с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM — 6380 L (JEOL, Япония). Были изучены 3 трубки, внешняя поверхность тела была изучена у двух экземпляров, внутренняя поверхность всех отделов пищеварительного тракта и содержимое кишечника были изучены у трех экземпляров. Исследованные экземпляры (отдельно щупальца и фрагменты покровов и пищеварительного тракта) фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом в 0.1 М фосфатном буфере в течение 2 ч в холодильнике (4°C). После отмывки от глутарового альдегида три раза по 20 мин образцы проводили по восходящему ряду спиртов до ацетона (70–85–96–96–96%: ацетон (3 : 1)—96%: ацетон (1 : 1)—96% : ацетон (1 : 3)—ацетон (100%)—ацетон (100%)) по 25 мин в каждой жидкости. Далее образцы были высушены методом критической точки, размещены на предметном столике и после напыления золото-медным сплавом изучены с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM — 6380 L (JEOL, США).

Для описания гистологического строения использовали серийные срезы *T. cf. stroemi* из Ермолинской губы. Фиксация образцов проводилась 4% формальдегидом, с последующей проводкой, заливкой в парафин, изготовлением серийных срезов толщиной 7 мкм и последующей окраской железным гематоксилином по Гейденгайну и трехцветной окраской по Маллори. Оцифровка срезов проводилась с помощью слайд сканнера Olympus BS 61 VS (Olympus, Япония).

Изучение ультратонкого строения эпителиев кишки и покровов проводилось с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ). Для изготовления ультратонких срезов (70–80 нм толщиной) образцы после фиксации глутаровым альдегидом заливали в смолу (Epon 812). Для заливки в блоки материал проводили так же, как и для СЭМ, по восходящему ряду спиртов до ацетона, а затем перекладывали в смесь ацетона и смолы в пропорциях 3 : 1—1 : 1—1 : 3—чистая смола. В каждой смеси с ацетоном материал держали около 10–24 ч на орбитальном шейкере при комнатной температуре. В первой чистой смоле в открытой пробирке в термостате — при 37°C в течение 12–24 ч. Полимеризация происходила при температуре 60°C в течение 12–24 ч. Ультратонкие срезы изготавливали с использованием микротомов DUPONT MT-5000 с помощью алмазного ножа (Diatome, Jumbo).

Ультратонкие срезы были окрашены 4% уранилацетатом в течение 40 мин при температуре 37°C. После отмывки дистиллятом дальнейшее

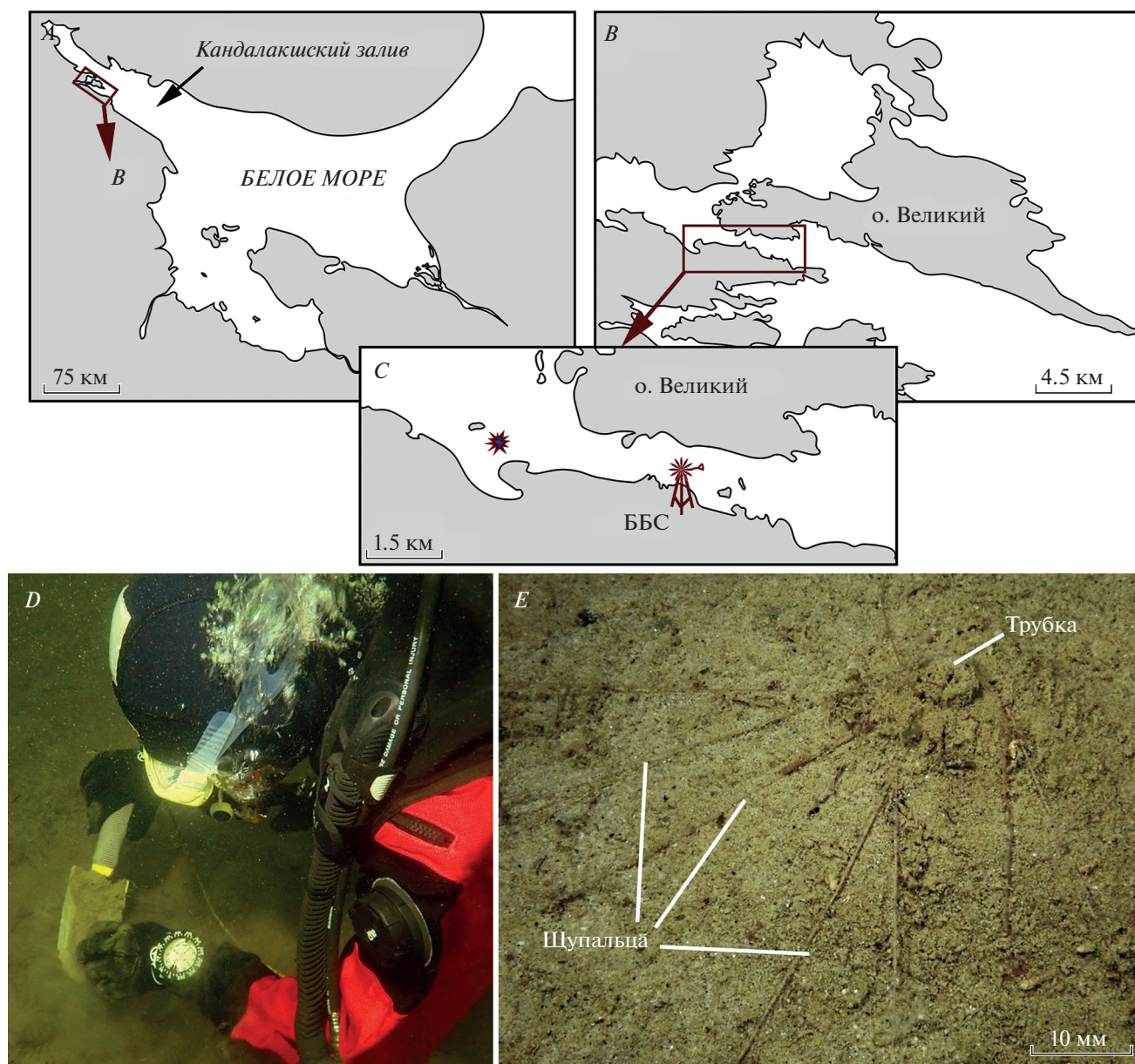


Рис. 1. Локализация и метод сбора образцов *Terebellides cf. stroemii*. А–С – Схема места сбора материала при разных масштабах. Красными прямоугольниками обозначены соответственно увеличенные участки. Расположение биостанции обозначено символом ветряка, звездочка обозначает место траления в Ермолинской губе. D – Водолаз за сбором материала. E – Вид сверху на трубку и выходящие из нее щупальца. D–E – Подводные фотографии (Л. Ванбосталь).

контрастирование 0.4%-м цитратом свинца проходило в темноте в течение 7–9 мин. После контрастирования срезы отмывали и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Ультратонкое строение было изучено с помощью ТЭМ JEM 1011 (JEOL, Япония).

Анализ состава микробных сообществ, ассоциированных с *Terebellides cf. stroemii*

Для определения таксономического состава микробиоты, ассоциированной с *T. cf. stroemii*,

образцы трубок, кишечников и щупалец этого организма использовали для амплификации и секвенирования гипервариабельных V4 участков гена 16S рРНК прокариот с последующим определением таксономии получившихся прочтений. Такой же анализ был проведен с образцами донных осадков, окружающих места отбора *T. cf. stroemii*. Для подтверждения устойчивости ассоциации микробиома и *T. cf. stroemii* отбор образцов и секвенирование проводили в течение четырех лет.

Всего в ходе работы было отсекуено 7 образцов кишечников, 15 образцов трубок, 12 об-

разцов щупалец *T. cf. stroemii*, 7 образцов поверхностного грунта (глубина 0–2 см) и 6 образцов более глубокого грунта (глубина 10–15 см), отобранных совместно с особями *T. cf. stroemii*.

Выделение ДНК и секвенирование

Тотальную ДНК из всех образцов выделяли с помощью набора DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Qiagen, Германия) и гомогенизатора FastPrep-24™ (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкциями производителя. Библиотеки для секвенирования готовили согласно Vortsepneva et al. (2021). Подготовку библиотек ампликонов проводили в соответствии с Gohl et al. (2016). Использовали следующую систему универсальных праймеров на гипервариабельный регион V4 гена 16S рРНК: прямой праймер 515F (5'-GTGBCAGC-MGCCGCGGTAA-3') (Huggerth et al., 2014) и обратный праймер Pro-mod-805R (5'-GACTACN-VGGGTMCTAATCC-3') (Меркель и др., 2019), включающие также технические последовательности для секвенирования (Fadrosh et al., 2014). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. Сырые прочтения, полученные в двух повторностях для каждого образца, анализировали с помощью сервиса SILVAngs и базы данных v.138.1 (<https://ngs.arb-silva.de//silvangs/>).

Оценка бета-разнообразия проводилась с использованием неметрического многомерного шкалирования (NMDS) путем ординации, основанной на представленности различных операционных таксономических единиц (ОТЕ), с использованием пакета vegan v.2.6-3 (<https://github.com/vegandevs/vegan>). Для визуализации данных использовался пакет ggplot2 (<https://ggplot2.tidyverse.org>) языка R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образ жизни и морфология *Terebellides cf. stroemii*

Описание местообитания

Среда обитания *Terebellides cf. stroemii* – мягкие грунты, песчанистый ил и заиленный песок (рис. 1D–1E). Плотность поселения данного вида в Ермолинской губе очень высока и достигает несколько десятков экз./м². В естественных условиях можно наблюдать длинные тонкие щупальца, которые похожи на таковые у других представителей *Terebelliformia* и простираются по поверхности грунта, расходясь радиально от отверстия трубки. Другие части червя на поверхности не видны (рис. 1E).

При содержании в аквариуме особи *Terebellides cf. stroemii* все свое время проводили в толще грунта, щупальца на поверхности не были замечены. После окончания наблюдений оказалось, что в толще грунта черви построили длинные (15–20 см) трубки, по строению идентичные тем, что были собраны во время траления.

Строение трубок

При извлечении трубки из грунта сохраняется лишь ее передняя, видимо более прочная часть (рис. 2A). Длина фрагментов трубок после промывки на сите составляет до 50 мм, внешний диаметр до 6 мм, диаметр отверстия до 5 мм, толщина стенки до 1 мм. Трубки толстостенные рыхлые, илесто-детритные, при промывке часто разрушаются. Внешняя поверхность неровная, рыхлая, с торчащими растительными остатками, местами виден концентрический рельеф (рис. 2B–2C), слоистости в толще трубок на сломе не обнаружено (рис. 2D). Внутренняя поверхность гладкая, без видимых бактериальных пленок, выстлана мембраной толщиной до 5 мкм. Мембрана состоит из широких концентрических волокон, поверх которых лежат более тонкие и редко расположенные продольные и косые волокна (рис. 2C–2E).

Общая морфология

Толщина тела до 4 мм, длина до 30 мм. Покровы тонкие, прозрачные, легко повреждаются при промывке. Цвет тела непостоянный и зависит от наличия и цвета половых продуктов, белый у самцов, от желтого до розового у самок, цвет жабер – красный (рис. 3A). Щупальца отходят от длинной верхней губы, способны сильно вытягиваться, на конце образуют бульбообразное расширение (рис. 3C–3D, 6D). Нижняя поверхность с ресничным желобком, длина ресничек в желобке около 2 мк. Сенсорные клетки, несущие пучки чувствительных ресничек длиной до 5 мк, располагаются преимущественно в один ряд по периферии ресничного желобка, реже – по всей дорсальной поверхности щупальца и на его терминальной части (рис. 3D). На поверхности щупалец бактерии не были обнаружены. Обследование поверхности различных разделов тела (торакальный и абдоминальный отделы, пароподии, жабры) нескольких экземпляров червей с помощью сканирующей электронной микроскопии показало присутствие лишь единичных бактерий на поверхности кутикулы (рис. 4A).

Организация покровов, гистологическое строение

Покровный эпителий тонкий, высота клеток эпидермального эпителия в целом не превышает 10–15 мк и только в зоне железистых полей на

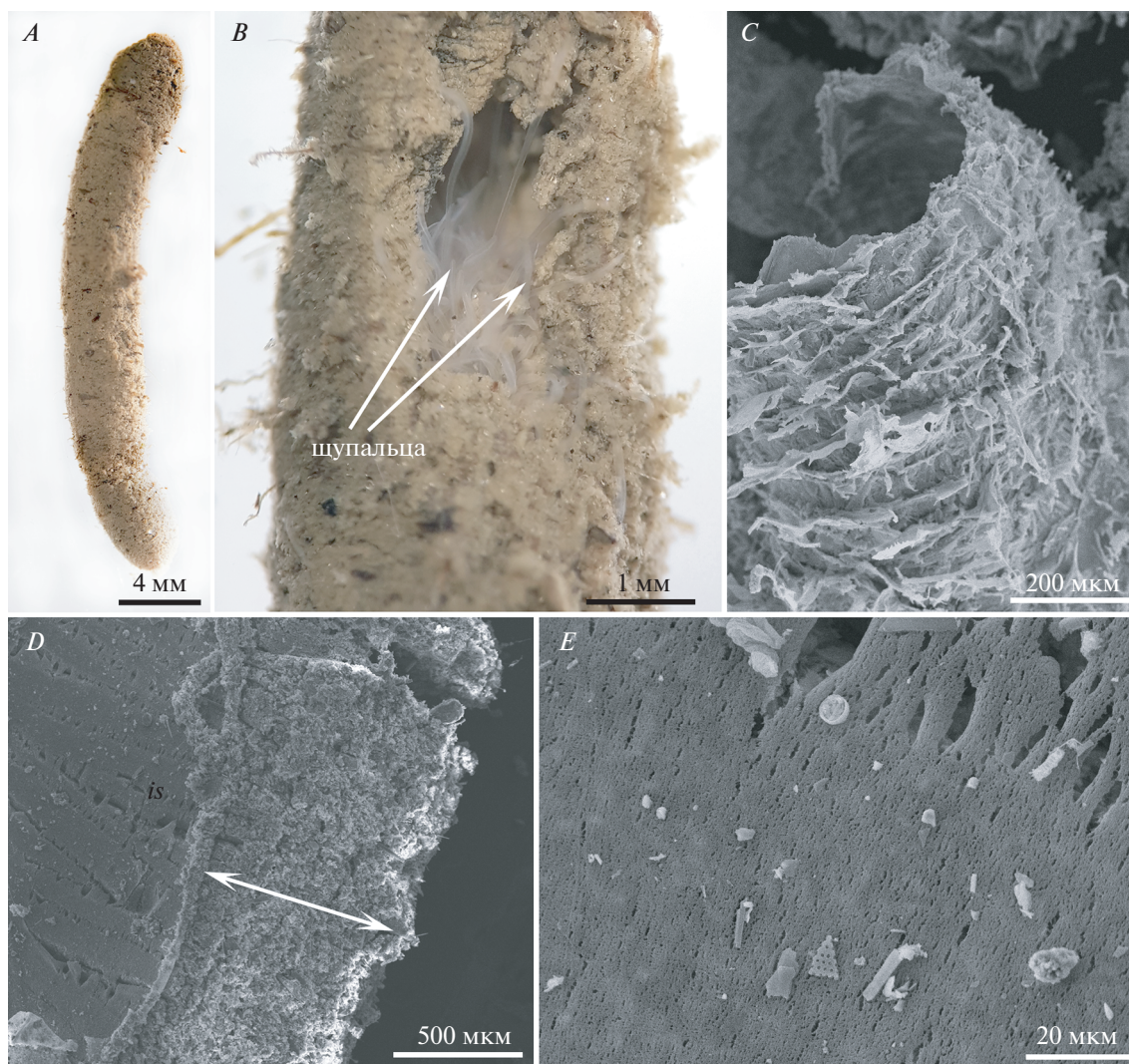


Рис. 2. Морфология трубки *Terebellides* cf. *stroemii*: *A* — общий вид участка трубки; *B* — трубка с выпавшим участком, внутри трубки располагаются щупальца (*A*, *B* — световая микроскопия); *C* — внешняя поверхность трубки; *D* — вид на внутреннюю поверхность трубки (*is*), обоюдоострой стрелкой обозначена толщина трубки; *E* — внутренняя поверхность трубки (*C–E* — сканирующая электронная микроскопия).

вентральной стороне в передней части тела имеются валики железистых клеток высотой до 60–70 мк (рис. 5*A–5D*, 6*A–6C*, 7*A*). Мы не обнаружили бактерий ни в толще кутикулы, ни в цитоплазме клеток покровного эпителия (рис. 4*A*, 7*A*).

Строение пищеварительной системы

Ротовое отверстие ведет в ротовую полость с вентральным фарингеальным органом, она постепенно переходит в пищевод, открывающийся в энтодермальный желудок (рис. 3*B*). Пищевод можно условно разделить на две части — переднюю и заднюю. Передняя свободно лежит в преддиафрагмальной полости и отличается складчатыми стенками с высоким железистым (высота клеток до 25–30 мк) эпителием. Задняя часть пи-

щевода окружена пищеварительной железой, более узкая и имеет мощную мышечную обкладку. В передней части желудка имеется мощный железистый орган — складчатая пищеварительная железа, являющаяся характерной особенностью представителей рода *Terebellides* (рис. 3*B*, 5*A*, 5*C*). У живых экземпляров эта железа ярко желтого цвета, охватывает снизу и с боков заднюю часть пищевода, образуя многочисленные (концентрические на поперечном срезе) эпителиальные складки (рис. 5*A*, 5*C*). Полость железы открывается в переднюю часть желудка. Желудок относительно мускулистый, ярко-красного цвета (рис. 3*B*). За желудком следует кишечник, который занимает значительную часть полости тела и заканчивается короткой ректальной зоной (рис. 3*B*, 5*A*, 6*E*). По данным СЭМ и ТЭМ нам не удалось обнару-



Рис. 3. Морфология *Terebellides cf. stroemii*: *A* – Внешний вид сбоку, *B* – препарированная пищеварительная система (*A–B* – световая микроскопия), *C* – общий вид шупалец, *D* – апикальная часть шупалец (*C–D* – сканирующая электронная микроскопия); *br* – жабры, *ci* – реснички, *dg* – пищеварительная железа, *fi* – передняя кишка, *h* – сердце, *hi* – задняя кишка, *hs* – желудок, *m* – рот, *oe* – пищевод, *t* – шупальца.

жить бактерий на поверхности различных отделов пищеварительного тракта (пищевод, пищеварительная железа, желудок, кишка (рис. 4*B–4I*, 7*B*). В целомической обкладке кишечника проходят многочисленные лакуны околкишечного кровеносного плексуса, которые объединяются на дорсальной стороне желудка в дорсальный сосуд. Этот сосуд переходит в трубчатое сердце, направляющее кровь вперед к жаберному комплексу (рис. 3*B*, 5*A*, 5*D*). Внутри сердца располагается характерное для представителей отряда *Terebelliformia* веретенообразное сердечное тело.

Анализ состава микробных сообществ, ассоциированных с *Terebellides cf. stroemii*

NMDS кластеризация

Общая оценка различий микробиомов внутри одного типа образцов и между группами была проведена с использованием NMDS кластеризации образцов, основанной на представленности различных ОТЕ (рис. 8). Было определено, что составы микробных сообществ внутри всех типов образцов достаточно однородны, за исключением шупалец *T. cf. stroemii*, для которых наблюдалась высокая вариативность состава микробио-

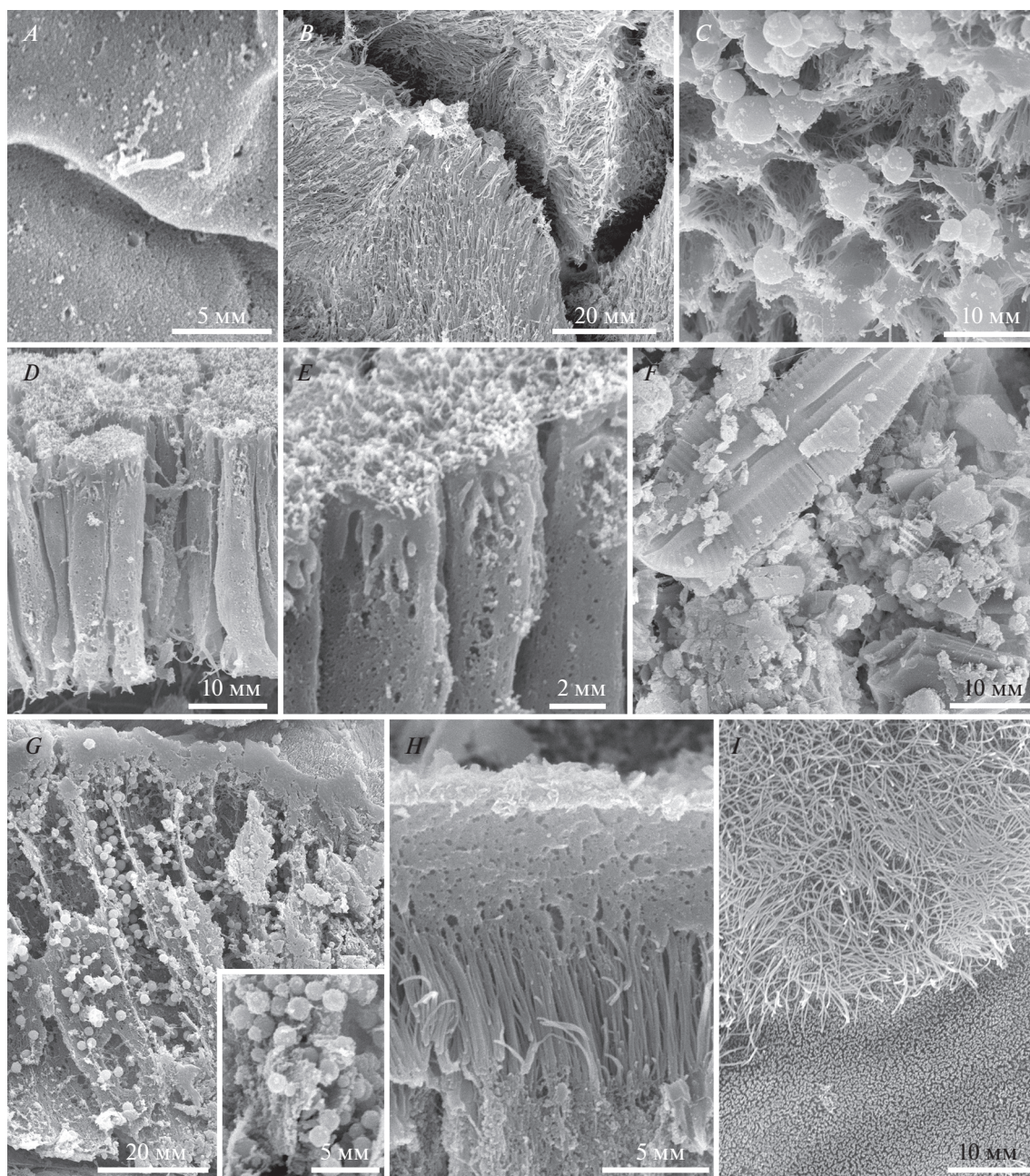


Рис. 4. Морфология покровов и выстилки пищеварительной системы *Terebellides* cf. *stroemii*: *A* — общий вид поверхности *T. cf. stroemii*, видна одиночная бактерия; *B* — поверхность пищевода, выстланная ресничками; *C* — увеличенный участок поверхности пищевода с везикулами пищеварительной железы на поверхности; *D* — скол через выстилку кишки; *E* — увеличенный участок выстилки кишки; *F* — пищевой комок, содержащийся в кишке; *G* — скол пищеварительной железы; клетки содержат многочисленные везикулы, которые показаны на вклейке при большем увеличении; *H* — скол через выстилку мышечного желудка; *I* — поверхность кишки. Фото СЭМ.

мов. При этом микробиомы донных осадков как поверхностного (0–2 см) горизонта, так и на глубине 10–15 см, а также трубок червя *T. cf. stroemii* оказались схожими. С другой стороны, образцы щупалец и кишечников составляли отдельные кластеры. Детальный анализ таксономического разнообразия микробиомов *T. cf. stroemii*, представленный ниже, подтверждает результаты NMDS.

Таксономическое профилирование

Микробиомы трубок Terebellides cf. stroemii

Таксономический анализ микробных сообществ трубок *T. cf. stroemii* на уровне филума выявил массовость представителей *Pseudomonadota*, *Desulfobacterota* и *Bacteroidota*, которые составили 19.1–73, 6.3–22.5 и 1.3–19.2% от всех прокариот,

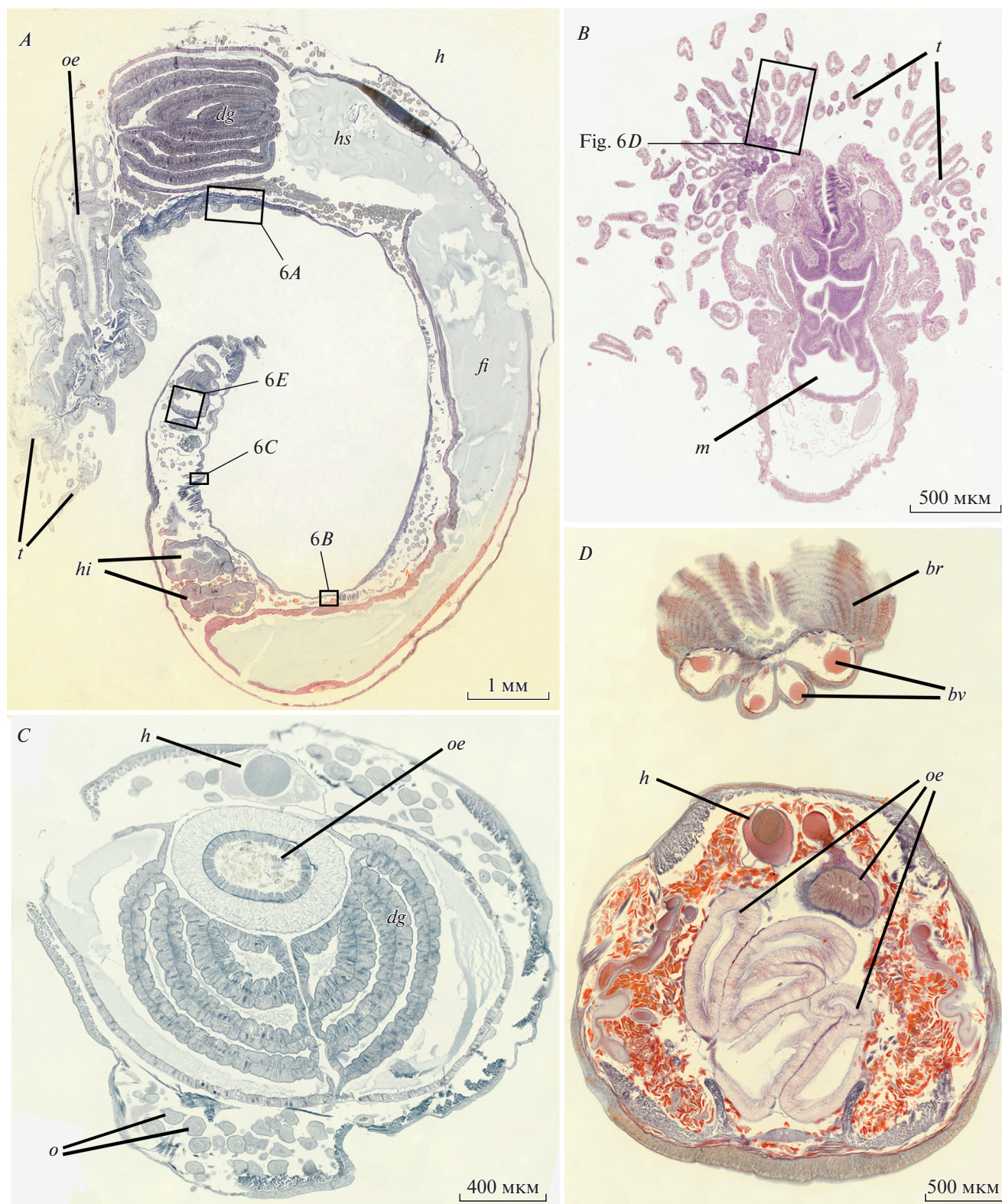


Рис. 5. Гистологическое строение *Terebellides cf. stroemii*. *A* – продольный срез через всего червя. Прямоугольниками обозначены увеличенные участки, представленные на рис. 6. *B* – поперечный срез через ротовое отверстие и щупальца. *C* – поперечный срез через пищеварительную железу. *D* – поперечный срез через переднюю кишку, срез также прошел через жабры. *br* – жабры, *bv* – кровеносный сосуд, *dg* – пищеварительная железа, *fi* – передняя кишка, *h* – сердце, *hi* – задняя кишка, *hs* – желудок, *m* – рот, *o* – ооциты, *oe* – пищевод, *t* – щупальца.

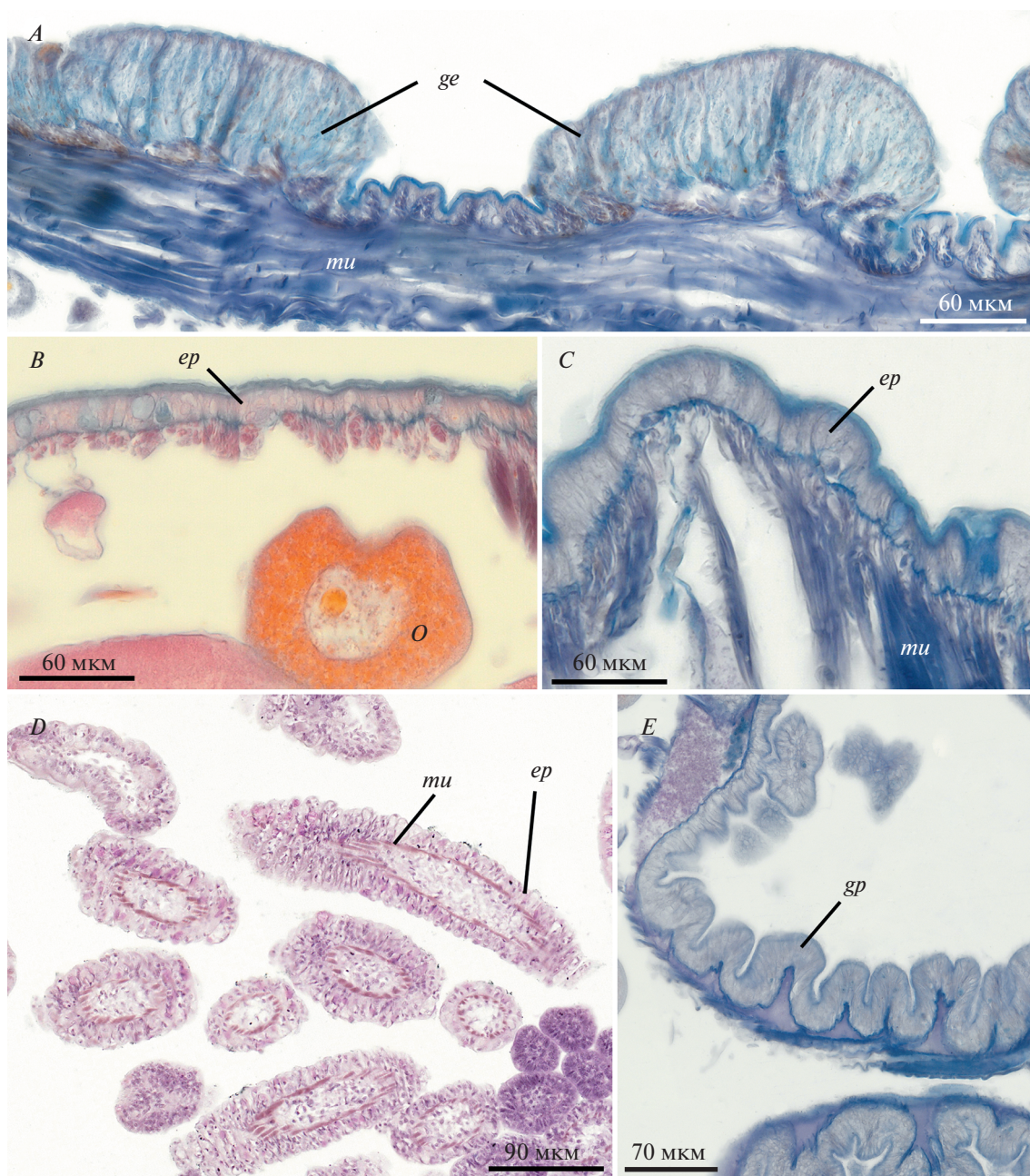


Рис. 6. Гистологическое строение различных эпителиев *Terebellides* cf. *stroemii*. *A* – продольный срез через железистый покровный эпителий передней части тела. *B–C* – покровный эпителий из разных участков тела: середины тела (*B*) и заднего отдела тела (*C*). *D* – увеличенный участок шупалец. *E* – увеличенный участок задней кишки. Обозначения: *ep* – покровный эпителий, *ge* – железистый эпителий, *gp* – эпителий кишки, *mu* – мускулатура, *o* – ооцит.

соответственно (рис. 9). Менее многочисленными были представители филумов *Planctomycetota* (0.7–11%), *Actinomycetota* (2.4–9.5%), *Cyanobacteriota* (1.6–13.3%), *Acidobacteriota* (0.7–4.2%), *Мухоскокоты* (0.3–5.7%), *Verucomicrobiota* (0.4–2.3%), *Spirochaetota* и группе NB1-j (0.1–2.7%). В образцах трубок, отобранных в 2019 г., также присутствовала значительная доля архей из филума *Thermoproteota* (3.5 и 8.7%).

Доминирующими классами в филуме *Pseudomonadota* являлись *Alphaproteobacteria*, которые составляли от 0.8–10.8% от всех прокариот, и *Gammaproteobacteria*, составляющие 15.9–71.3% (рис. 10). Большинство представителей филумов *Bacteroidota*, *Planctomycetota* и *Мухоскокоты* относились к классам *Bacteroidia* (1.1–18.2%), *Planctomycetia* (0.4–7.3%) и *Polyangia* (0.3–5.4%) соответственно. С другой стороны, для филумов *Desulfo-*

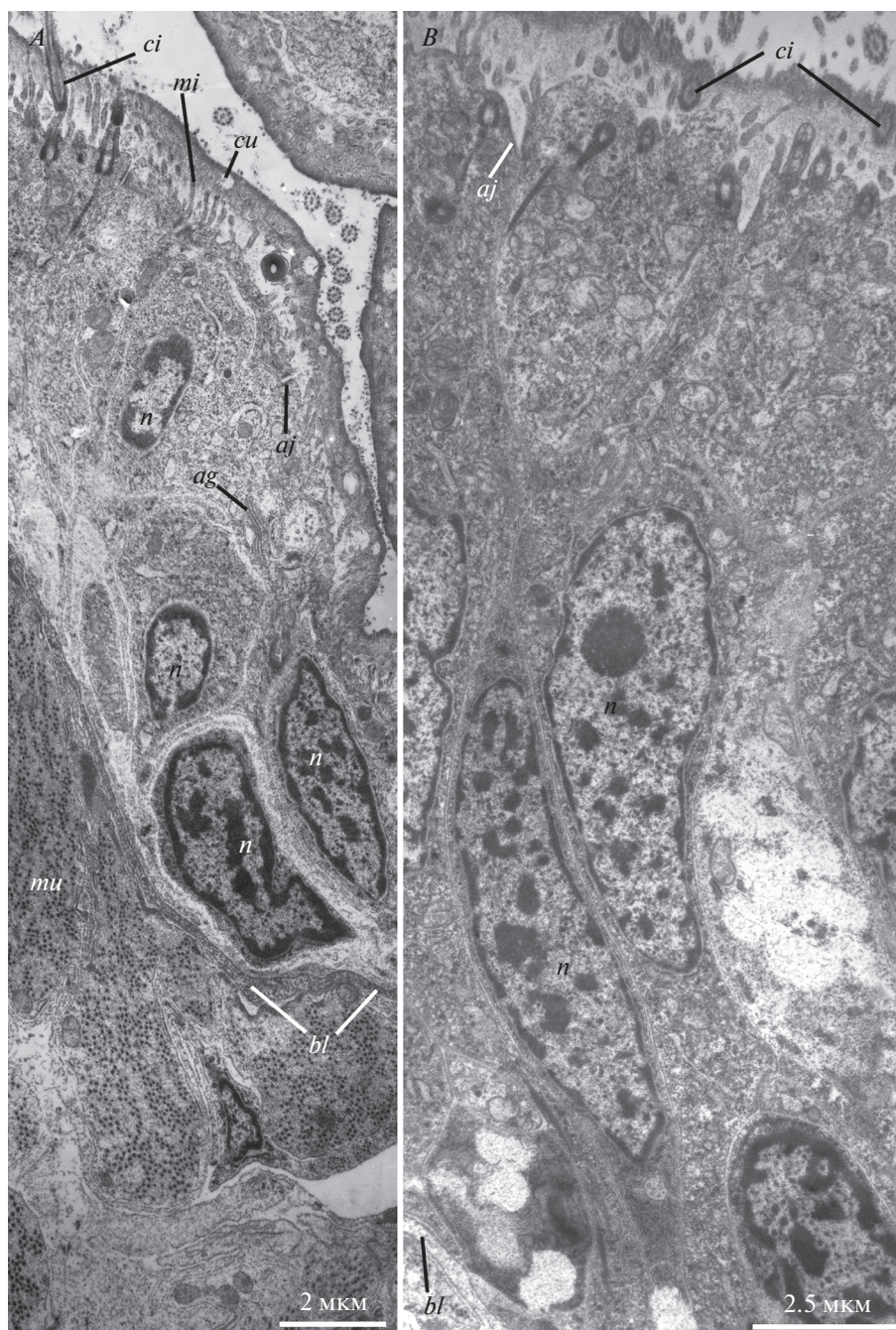


Рис. 7. Ультратонкое строение покровного эпителия (A) и эпителия передней кишки (B) *Terebellides* cf. *stroemii*. Трансмиссионная электронная микроскопия. *ag* — аппарат Гольджи, *aj* — адгезивный контакт, *bl* — базальная пластинка, *ci* — реснички, *cu* — кутикула, *mu* — мускулатура, *n* — ядра.

bacterota и *Actinomycetota* можно отметить сразу несколько распространенных классов: среди первых — *Deltaproteobacteria* и *Desulfobulbia*, а среди актиномицетов — *Actinomycetes*, *Acidimicrobiia* и *Thermoleophilia*. Наблюдалось высокое сходство микробиомов трубок *T. cf. stroemii* и грунтов обоих типов как на уровне филумов, так и на уровне классов, что говорит о значительном влиянии

окружающей среды на состав микробных сообществ, обитающих на трубках.

Микробиомы кишечника *Terebellides* cf. *stroemii*

Как и в других образцах, *Pseudomonadota* были определены как один из доминирующих филумов в микробиомах кишечника *Terebellides* cf. *stroemii* (8.4–62.5% от всех прокариот), однако их относи-

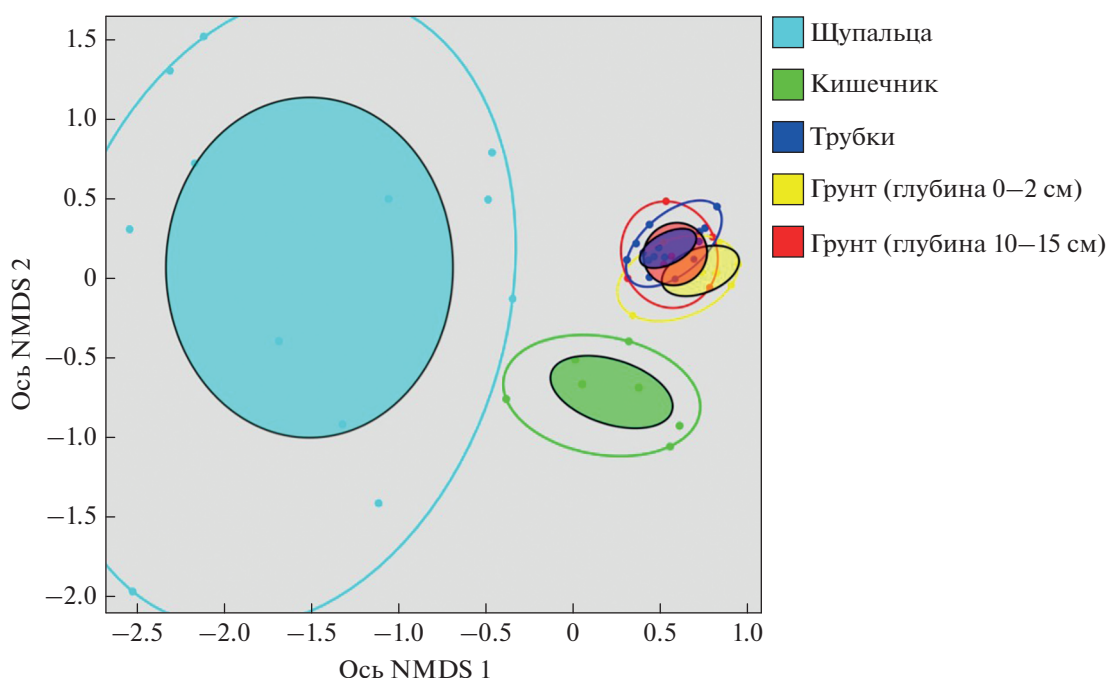


Рис. 8. NMDS кластеризация микробиомов *Terebellides* cf. *stroemii* и окружающего грунта, основанная на представленности различных ОТЕ (Bray-Curtis, $k = 2$, уровень стресса 0.1055).

тельная представленность была в среднем ниже, чем в микробиомах трубок и грунтов (рис. 9). Кроме того, массовыми формами являлись представители филумов *Actinomycetota* (5.9–43.9%), *Bacillota* (3–49.4%), *Cyanobacteriota* (6.2–26.1%), *Chloroflexota* (1.5–9.4%) и *Planctomycetota* (1.1–8.9%), при этом доля первых трех была значительно выше по сравнению с трубками. Также в микробиомах кишечника в умеренных количествах были обнаружены *Bacteroidota* (0.1–11%), *Desulfobacterota* (0.2–4.8%), а минорными компонентами были *Acidobacteriota*, *Dependentiae*, *Мухомококкота* и *Verucomicrobiota*.

Филум *Pseudomonadota* был представлен классами *Alphaproteobacteria* (3.2–8%) и *Gammaproteobacteria* (3.9–56.9%). В части образцов преобладали последние, однако в других образцах доли этих классов были примерно равными (рис. 11). Классы *Bacilli* и *Clostridia* доминировали среди *Bacillota*, при этом численность *Bacilli* в образцах сильно варьировала, от 0.9 до 47.4%, в то время как доли *Clostridia* в разных образцах были примерно равными (1.8–6.1%). Среди *Chloroflexota* было обнаружено значительное количество представителей группы некультивируемых бактерий KD4-96 и класса *Anaerolineae* – 0.8–6.1% и 0.7–4.1%, соответственно. Классы *Acidimicrobiia* (2.9–21.4%), *Actinomycetes* (1.2–7.8%) и *Thermoleophilum* (1.6–14.1%) представляли филум *Actinomycetota*.

Микробиомы щупалец *Terebellides* cf. *stroemii*

Как и во всех исследуемых микробиомах, представители филума *Pseudomonadota* доминировали в микробиомах щупалец *T. cf. stroemii* (28.1–88% от всех прокариот, рис. 9). Кроме того, в некоторых образцах в значительном количестве присутствуют *Bacillota* (0.7–45.6%) и *Bacteroidota* (1.2–19.9%). В двух образцах щупалец *T. cf. stroemii* наблюдалось значительное количество представителей архейного суперфилума DPANN (*Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Nanohaloarchaeota*), которые составляли 10.7 и 13.7% от всех прокариот. Также были обнаружены представители *Cyanobacteriota* (0.7–4.3%), *Desulfobacterota* (0.1–7.9%), *Actinomycetota* (0.5–9.6%). В качестве минорных компонент сообщества присутствовали *Acidobacteriota*, *Chloroflexota*, *Мухомококкота*, *Planctomycetota*, *Campylobacterota*.

Анализ микробного разнообразия щупалец *T. cf. stroemii* на уровне классов (рис. 12) выявил, что филум *Pseudomonadota* был представлен классами *Alphaproteobacteria* (2.5–80.6%) и *Gammaproteobacteria* (7.4–47.3%), причем в большей части образцов щупалец первый класс преобладал в отличие от образцов других типов. Преобладание *Alphaproteobacteria* во всех случаях, особенно в образцах тканей животного, может быть связано с достаточно большой долей митохондриальной ДНК. Подавляющая часть *Bacillota* относилась к

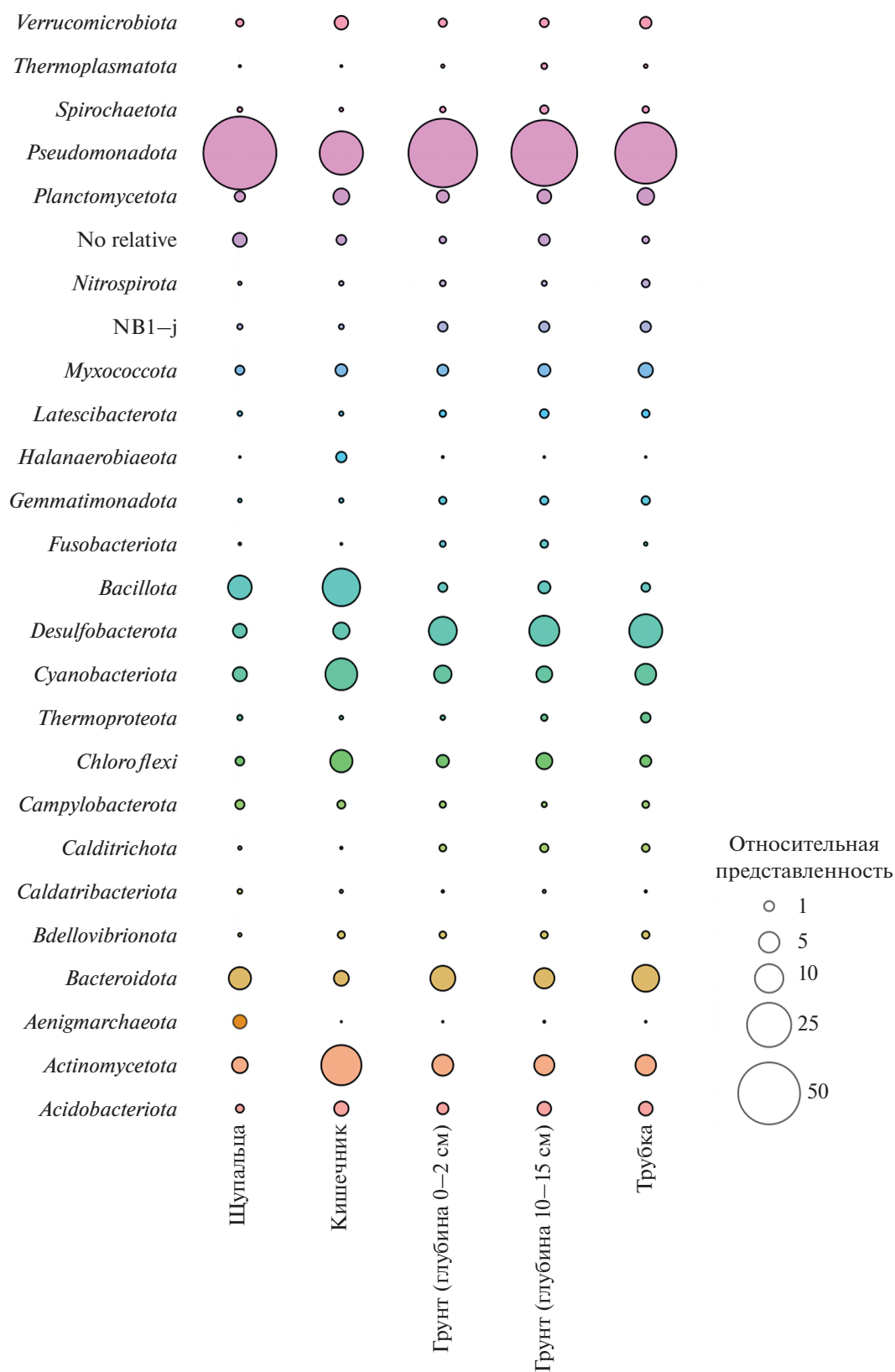


Рис. 9. Таксономический состав микробиомов различных частей *Terebellides stroemii*, его трубок и окружающих донных осадков на уровне филумов ($\geq 1\%$ от всех прокариот в одном из образцов). Представлены усредненные данные по одному типу образца.

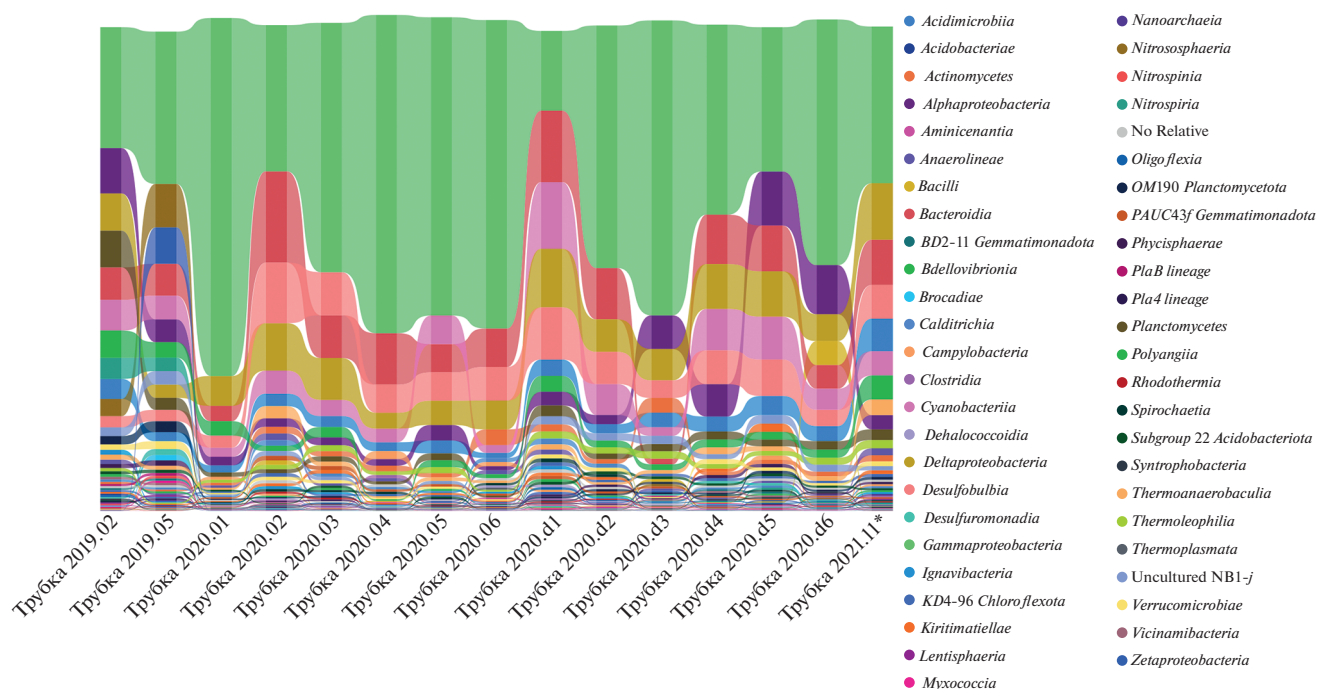


Рис. 10. Таксономический состав микробиомов образцов трубок *Terebellides cf. stroemii* на уровне классов ($\geq 0.3\%$ от всех прокариот). * — внутренняя трубка.

классам *Bacilli* (0.4–4.8%) или *Clostridia* (0.2–40.2%). В филуме *Bacteroidota* доминирующим классом являлся *Bacteroidia*, представители которого составляли 1.2–19.9% от всех прокариот. Класс *Cyanobacteriia* (0.3–3.9%) был единственным доминирующим таксоном внутри филума *Cyanobacteriota*. Актиномицеты, относящиеся к классам *Acidimicrobiia*, *Actinomycetes* и *Thermoleophilum*, составляли значимые доли в микробиомах щупалец: 0–4.9, 0.3–3.8 и 0–2.5% соответственно.

Микробиомы окружающих грунтов

Был исследован таксономический состав микробиомов грунтов двух типов, которые были отобраны возле мест обитания *T. cf. stroemii*: 1) поверхностный грунт (глубина 0–2 см), и 2) более глубокий грунт (глубина 10–15 см). В грунтах обоих типов бактерии доминировали над археями, составляя от 91 до 99.9% от всего микробного сообщества, при этом доминирующими филумами являются *Pseudomonadota*, которые представляли 13.5–78% от всех прокариот, *Desulfobacterota* (4.5–26.9%) и *Bacteroidota* (2.5–15.9%) (рис. 9). Также было обнаружено значительное количество представителей *Actinomycetota* (2.4–12.8%) и *Cyanobacteriota* (1.4–6.3%). В качестве минорных компонент сообщества присутствовали *Acidobacteriota*, *Chloroflexota*, *Bacillota*, *Myxococcota*, *Planctomycetota*,

Verrucomicrobiota, *Calditrichota*, *Gemmatimonadota*, *Latestibacterota*, *Spirochaetota* и группа некультивируемых бактерий NB1-j.

Более детальный анализ микробного разнообразия на уровне классов показал, что *Pseudomonadota* были представлены в основном классами *Alpha-* и *Gammaproteobacteria*, причем последних было больше во всех исследованных образцах, от 10.8 до 70.6% (рис. 13). Филум *Bacteroidota* в основном был представлен классом *Bacteroidia* (2.1–15%). Два класса, входящих в филум *Desulfobacterota*, *Deltaproteobacteria* и *Desulfobulbia*, были представлены в равных пропорциях (2.9–15.2 и 1.5–10.8% соответственно). Актиномицеты были представлены тремя классами, *Acidimicrobiia* (1.5–5.1%), *Actinomycetes* (0.5–6%) и *Thermoleophilum* (0.5–1.9%). Самыми массовыми планктомицетами являлись бактерии класса *Planctomycetes* (0.7–1.9%). Филум *Myxococcota* в основном был представлен одним классом *Polyangiia* (0.5–2%). Стоит отметить, что явных различий в составах микробиомов образцов поверхностного и глубокого грунтов не было выявлено.

Таким образом, филогенетический и кластерный анализы выявили значительные отличия таксономического состава микробиомов червей *T. cf. stroemii* от состава микробиома грунта и позволили определить специфические компоненты микробиомов кишечника и щупалец.

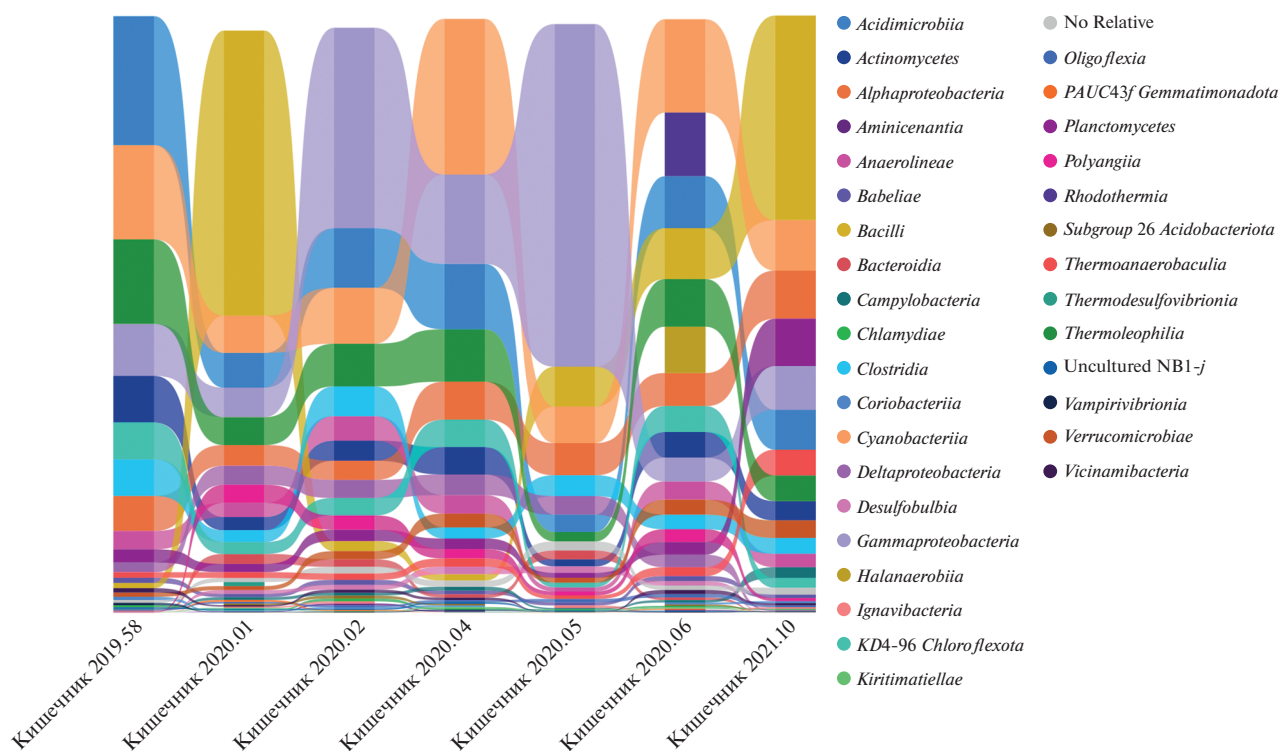


Рис. 11. Таксономический состав микробиомов образцов кишечника *Terebellides cf. stroemii* на уровне классов ($\geq 0.3\%$ от всех прокариот).

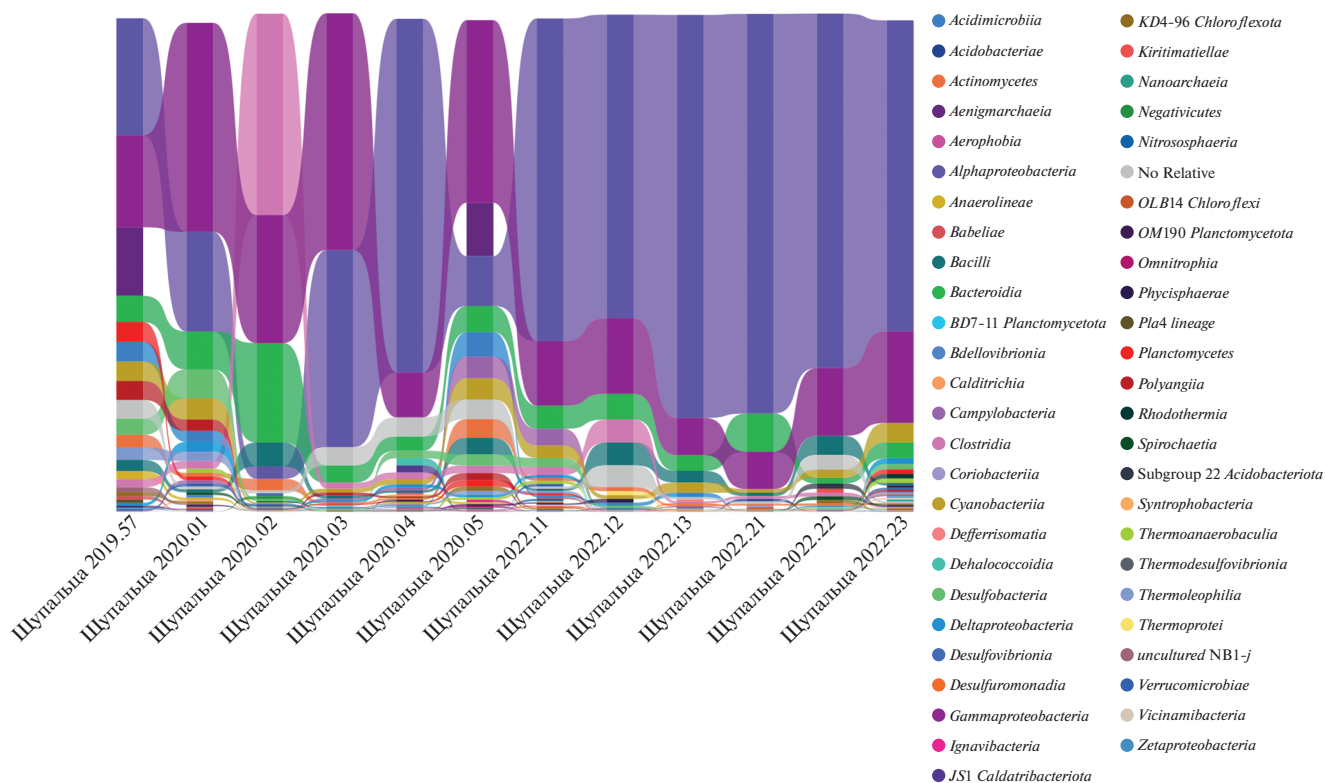


Рис. 12. Таксономический состав микробиомов образцов шупалец *Terebellides cf. stroemii* на уровне классов ($\geq 0.3\%$ от всех прокариот).

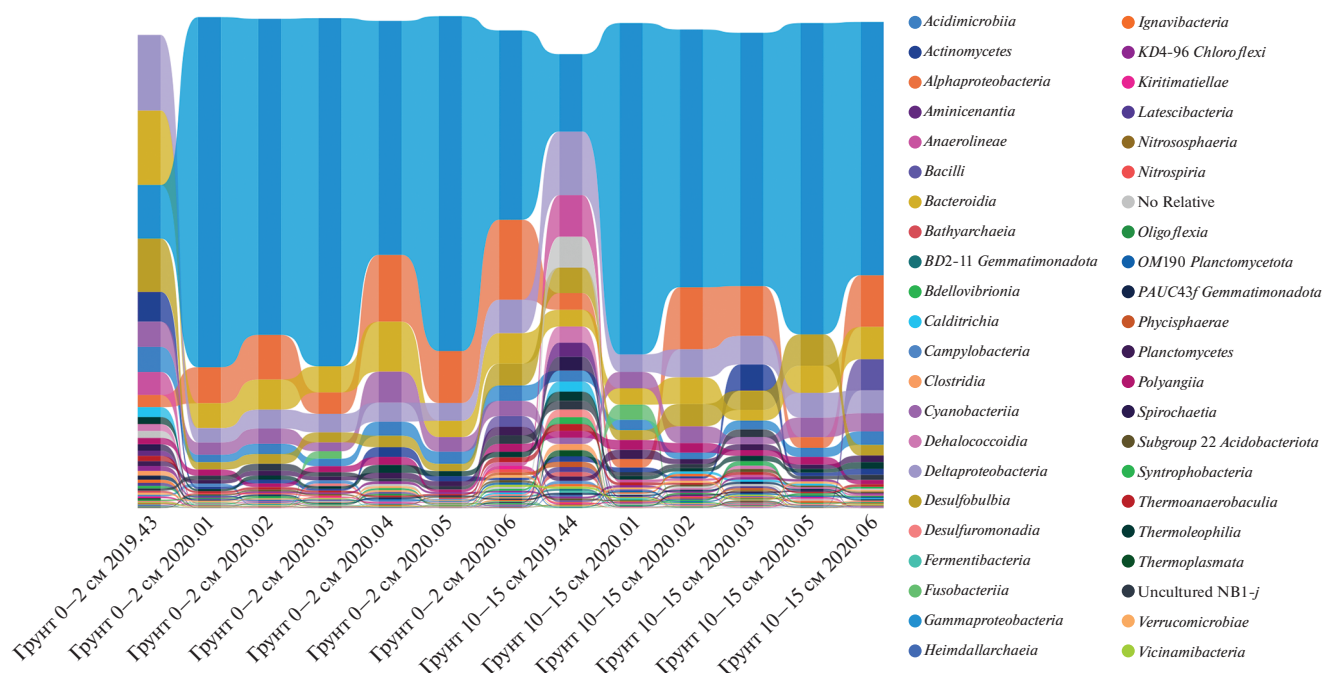


Рис. 13. Таксономический состав микробиомов образцов грунтов на уровне классов ($\geq 0.3\%$ от всех прокариот).

ОБСУЖДЕНИЕ

Образ жизни и морфология *Terebellides cf. stroemii* в Белом море

Данных об образе жизни и способе питания трихобранхид немного. Представители рода *Terebellides* строят трубки из частиц осадка, склеенных секретом эпидермальных желез. Эти трубки чаще всего рыхлые, временные, но у некоторых видов более прочные, инкрустированные спикулами губок (Holthe, 1986; Hutchings, Peart, 2000). Отверстие трубки не приподнято над дном, из него высовываются тонкие щупальца, которыми, как предполагается, червь собирает пищевые частицы с поверхности грунта (Жадан, 2010). Наши данные о строении трубок подтверждают, что они, скорее всего, непостоянные.

Вопрос о подвижности представителей семейства Trichobranchidae, в целом, и *Terebellides cf. stroemii*, в частности, остается открытым. Их образ жизни описывается иногда как роющий (Holthe, 1986), а иногда как сидячий (Hutchings, Peart, 2000). Мишель с соавторами считают *T. cf. stroemii* сидячим животным, демонстрирующим малую подвижность (Michel et al., 1984). Жадан (2010) приводит фотографии, сделанные в Белом море, на которых изображены щупальца *Terebellides cf. stroemii* на поверхности грунта, типичные для представителей отряда Terebelliformia, но пишет, что черви роются в грунте. Jumars et al. (2015) считают Trichobranchidae, в т.ч. *Terebellides cf. stroemii*, активно роющими животными, чьи щупальца

слишком коротки для обеспечения пищи при сидячем образе жизни.

Наши наблюдения показывают, что, по крайней мере, часть времени *T. cf. stroemii* в Белом море проводят с щупальцами, распростертыми по поверхности грунта. Это соответствует фотографии щупалец беломорских *T. cf. stroemii* на дне моря, приведенной Жадан (2010). Вероятно, они собирают пищевые частицы с поверхности осадка, подобно многим представителям отряда Terebelliformia. Это не исключает способности этих червей рыться в толще грунта и питаться под поверхностью этого грунта, как это указывают в своем обзоре Jumars et al. (2015). Интересно, что при содержании в аквариуме с небольшой толщиной грунта беломорские *T. cf. stroemii* также проводили все свое время в толще грунта, не показываясь на поверхности. Однако на основании наблюдений за поведением червей в аквариуме невозможно однозначно судить об их реальной жизни в море.

Данные исследования состава жирных кислот и стабильных изотопов у *Terebellides cf. stroemii* из сублиторали нескольких фиордов Шпицбергена (Legeżyńska et al., 2014) свидетельствуют, что у Шпицбергена представители этого же или близкого к беломорской форме вида питаются не только органическими частицами, осевшими на дно или находящимися на поверхности осадка, но и продуктами переработки этого органического материала за счет бактерий и, возможно, мейобентоса. Однако прямые сравнения с животными

из других районов в таких случаях малоинформативны (Jumars et al., 2015; Kokarev et al., 2023).

Наши данные об общей и тонкой морфологии пищеводобывательного аппарата и пищеварительного тракта *T. cf. stroemii* до деталей соответствуют данным о морфологии и гистологии пищеварительной системы других видов, принадлежащих к комплексу *T. cf. stroemii* (Michel et al., 1984; Barroso et al., 2023). В целом особи, принадлежащие к комплексу видов *Terebellides cf. stroemii*, обитающему в широком диапазоне условий, демонстрируют удивительное морфологическое единообразие, хотя и различаются некоторыми деталями (Barroso et al., 2023).

Анализ данных по морфологии пищеварительной системы и стенки тела не выявил наличия бактерий в покровном эпителии тела и эпителии кишечного тракта, также нам не удалось выявить структур, которые можно было бы интерпретировать как бактерии, на гистологических срезах разных частей тела *T. cf. stroemii*. Тем более интересными являются данные, полученные современными микробиологическими методами, о микробиомах, ассоциированных с *T. cf. stroemii*.

Микробные ассоциации *Terebellides cf. stroemii*

В микробиомах трубок доминируют *Gammaproteobacteria* и *Desulfobacterota*, относительная доля которых в других типах образцов была заметно ниже. *Gammaproteobacteria* относятся к одному из пяти классов филума *Pseudomonadota*, представители которого являются преобладающей группой микроорганизмов в структуре донных сообществ (Amaral-Zettler et al., 2010). Кроме того, представители классов *Bacteroidia*, *Deltaproteobacteria*, *Desulfobulbia*, *Cyanobacteriota*, *Alphaproteobacteria*, обнаруженные в трубках в количестве до 5% от общего числа микроорганизмов, также являются широко распространенными микроорганизмами и часто встречаются в составе микробных сообществ морских донных осадков. Поскольку трубка червя состоит из частиц донных осадков, окружающих особей *Terebellides* sp., сходство составов микробных сообществ для этих типов образцов вполне объяснимо. Помимо этого, сходство микробиомов трубок червей и окружающих грунтов указывает на то, что, по всей видимости, секрет брюшных желез беломорских *Terebellides stroemi* не обладает антибактериальным действием.

Микробиомы кишечника отдельных экземпляров *Terebellides cf. stroemii* отличались друг от друга (рис. 10). При этом значимой зависимости степени отличия от года отбора образца не было выявлено. Проведенные нами сравнения показали принципиальное сходство микробиомов образцов трубок и кишечника *Terebellides cf. stroemii*, отобранных в 2020 и 2021 годах. Это свиде-

тельствует о стабильности микробных сообществ *Terebellides cf. stroemii*, что в свою очередь может указывать на глубокое взаимодействие макро- и микроорганизмов. При этом микробиомы индивидуальных животных могут различаться на невысоких таксономических уровнях, что подразумевает наличие индивидуальных особенностей у каждой особи.

Представители DPANN, обнаруженные в некоторых образцах шупалец, являются микроархеями (Rinke et al., 2013), живущими за счет симбиотических/паразитических взаимоотношений с различными экстремофильными археями: термофильными, галофильными или ацидофильными (например, Golyshina et al., 2017, 2019; Dombrowski et al., 2019). В исследуемых образцах шупалец, где были обнаружены представители данного суперфилума (в количестве от 4 до 17% в разных образцах шупалец), по данным филогенетического анализа, других архей, которые могли бы быть хозяевами для обнаруженной группы, выявлено не было. Полученные результаты позволяют предположить существование неизвестных ранее хозяев или новых функций архей DPANN в микробных сообществах.

На основании полученных данных о характере микробиома трубок, кишечника и шупальцевого аппарата *T. cf. stroemii*, можно сделать ряд предположений, касающихся образа жизни особей этого вида в Белом море.

1. Сходство микробиомов трубок червей и окружающего их грунта — это, с одной стороны, свидетельство отсутствия антибактериальной активности слизи, цементирующей трубку. Эти данные существенно контрастируют с данными о микробиомах червей, обитающих в постоянных трубках (Phillips, Lovell, 1999; Rincón-Tomás et al., 2020), а с другой стороны, ставят вопрос о том, насколько постоянными для *T. cf. stroemi* в Белом море являются трубки. Возможно, животные регулярно двигаются в толще грунта и часто строят новые трубки. Наши данные об очень рыхлой механической структуре трубок, без явных колец нарастания, подтверждают, что трубки непостоянные. В то же время, наши наблюдения показали, что, по крайней мере, часть времени в природе *T. cf. stroemii* проводят в типичной позиции для *Terebelliformia*, собирая пищевые частицы с поверхности осадка с помощью шупалец. Существующие представления об образе жизни представителей семейства Trichobranchidae (Jumars et al., 2015), по всей видимости, не полностью отражают реальную картину вариативности поведения червей в природе. Можно предположить, что питание и образ жизни *T. cf. stroemii* могут быть не менее разнообразны и адаптивны, как и пищевое поведение других седентарных аннелид, например Spionidae (Dauer et al., 2003).

2. Тот факт, что микробиом щупалец теребеллиды существенно отличается от микробиома окружающего грунта, трубки и кишки можно объяснить следующим образом: во время пробоотбора большая часть бактерий может оказаться смытой и остается незначительная часть микробов, которые хорошо прикреплены к щупальцам или которые являются специфической биотой для щупалец. Это подтверждается тем, что микробиом щупалец существенно различается у разных особей, а при микроскопировании на поверхности щупалец не было обнаружено микроорганизмов. Выращивание червей специальной микробиоты с последующим ее поглощением видится крайне маловероятным.

3. Бактериальное сообщество, найденное в кишечниках, сильно отличается от микробиомов окружающего осадка и щупалец. Поэтому, возможно, у *T. cf. stroemii*, помимо микробиома щупалец, имеется еще и специфический микробиом пищеварительного тракта.

4. Исследование особенностей пищеварительного тракта *T. cf. stroemii* из Белого моря классическими морфологическими методами, хотя и позволило получить подробную информацию о гистологическом и ультратонком уровнях, не выявило присутствия бактерий. При этом современные технологии изучения микробиомов животных продемонстрировали наличие ассоциированных с исследованным видом микроорганизмов.

5. Сочетание использованных нами инструментов, на наш взгляд, дает интересные результаты и перспективно для изучения микроорганизмов, ассоциированных с морскими аннелидами, и их функциональных связей с животными. Методы анализа микробиомов, использованные в настоящей работе, на данный момент достаточно трудоемки и имеют ряд ограничений. Их преимущество — в получении конкретных данных по микробиомам животных и среды, в которой они обитают, и в возможности исследования биологии и биотических связей одного конкретного вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы выражаем благодарность Лорану Ванбосталу за помощь в сборе материала и предоставленные фотографии, А.А. Прудковскому за помощь в аквариальных наблюдениях, Е.А. Бонч-Осмоловской и рецензентам за ценные советы и плодотворное обсуждение результатов работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящее исследование было поддержано грантом ФНТП развития генетических технологий № 075-15-2021-1396.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дерюгин К.М., 1928. Фауна Белого моря и условия ее существования. Л.: Гидрологический институт. 511 с.
- Жадан А.Э., 2010. Тип Annelida, класс Polychaeta (Многощетинковые черви) // Флора и фауна Белого моря: иллюстрированный атлас. Ред. А.Б. Цетлин, А.Э. Жадан, Н.Н. Марфенин. М.: Товарищество научных изданий КМК. С. 108–145.
- Жирков И.А., 2001. Полихеты Северного Ледовитого океана. М.: Янус-К. 632 с.
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тоцаков С.В., 2019. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. Т. 88. С. 671–680.
- Ушаков П.В., 1939. Некоторые новые данные по Фауне полихет Белого моря // Труды Государственного гидрологического института. № 8. С. 81–84.
- Ушаков П.В., 1955. Многощетинковые черви дальневосточных морей СССР (Polychaeta). М.—Л.: Изд-во АН СССР. 445 с.
- Цетлин А.Б., 1980. Практический определитель многощетинковых червей Белого моря. М.: Изд-во Моск. ун-та. 113 с.
- Amaral-Zettler L., Artigas L.F., Baross J., Bharathi L., Boettius A., et al., 2010. A global census of marine microbes // Life in the world's Oceans: Diversity, Distribution and Abundance. P. 223–245.
- Bach L., Palmqvist A., Rasmussen L.J., Forbes V.E., 2005. Differences in PAH tolerance between *Capitella* species: underlying biochemical mechanisms // Aquatic toxicology. V. 74. № 4. P. 307–319.
- Barroso M., Candás M., Moreira J., Parapar J., 2023. Interspecific variability in internal anatomy in *Terebellides* Sars, 1835 (Annelida, Trichobranchidae) revealed with micro-CT, Zoologischer Anzeiger. V. 306. P. 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2023.06.007>
- Blockley A., Elliott D.R., Roberts A.P., Sweet M., 2017. Symbiotic microbes from marine invertebrates: driving a new era of natural product drug discovery // Diversity. V. 9. № 4. P. 1–13.
- Bocchetti R., Fattorini D., Gambi M. C., Regoli F., 2004. Trace metal concentrations and susceptibility to oxidative stress in the polychaete *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Sabellidae): potential role of antioxidants in revealing stressful environmental conditions in the Mediterranean // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. V. 46. P. 353–361.
- Bremec C.S., Elias R., 1999. Species of *Terebellides* from South Atlantic waters off Argentina and Brazil (Polychaeta: Trichobranchidae) // Ophelia. V. 51. № 3. P. 177–186. <https://doi.org/10.1080/00785326.1999.10409407>
- Bright M., Giere O., 2005. Microbial symbiosis in Annelida // Symbiosis. V. 38. № 1. P. 1–45.
- Campbell B.J., Stein J.L., Cary C., 2003. Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete // Applied and environmental microbiology. V. 69. № 9. P. 5070–5078.

- Capa M., Hutchings P., 2021. Annelid diversity: historical overview and future perspectives // *Diversity*. V. 13. № 3. P. 129.
- Caullery M., 1915. Sur les *Terebellides* Malmgren du Siboga et les Térébelliens voisins. Bulletin de la Société Zoologique de France V. 40. P. 111–116.
- Caullery M., 1944. Polychètes Sédentaires de l'Expédition du Siboga: Ariciidae, Spionidae, Chaetopteridae, Chlorhaemidae, Opheliidae, Oweniidae, Sabelliidae, Sternaspidae, Amphictenidae, Ampharetidae, Terebellidae. Siboga-Expeditie Uitkomsten op Zoologisch, Botanisch, Oceanographisch en Geologisch gebied verzameld in Nederlandsch Oost-Indië 1899–1900. V. XX–IV 2 bis. P. 1–204.
- Day J.H., 1967. A monograph on the Polychaeta of Southern Africa. Part 2. Sedentaria // Trustees of the British Museum (Natural History). London. 878 p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.8596>
- Dauer D.M., Mahon H.K., Sardà R., 2003. Functional morphology and feeding behavior of *Streblospio benedicti* and *S. shrubsolei* (Polychaeta: Spionidae) // *Hydrobiologia*. V. 496. P. 207–213
- Dombrowski N., Lee J.H., Williams T.A., Offre P., Spang A., 2019. Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea // *FEMS microbiology letters*. V. 366(2). fnz008.
- Dubilier N., 1987. Some aspects of the ecophysiology of *Tubificoides benedicti* and ultrastructural observations on endocuticular bacteria // *Hydrobiologia*. V. 155. P. 161. <https://doi.org/10.1007/BF00025644>
- Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalai N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J., 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. V. 2. P. 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
- Fenical W., 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource // *Chemical Reviews*. V. 93. № 5. P. 1673–1683.
- Ferraris J.D., Fauchald K., Kensley B., 1994. Physiological responses to fluctuation in temperature of salinity in invertebrates. Adaptations of *Alpheus viridari* (Decapoda, Crustacea), *Terebellides parva* (Polychaeta) and *Golfingia cylindrata* (Sipunculida) to the mangrove habitat // *Marine Biology*. V. 120. P. 397–406.
- Garraffoni A.R.S., Lana P.C., 2003. Species of *Terebellides* (Polychaeta, Terebellidae, Trichobranchinae) from the Brazilian coast // *Iheringia*. V. 93. № 4. P. 355–363.
- Goffredi S.K., Johnson S., Vrijenhoek R.C., 2007. Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax* polychaete worms // *Applied and environmental microbiology*. V. 73. № 7. P. 2314–2323.
- Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B., 2016. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Protoc. Exch.* <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- Golyshina O.V., Bargiela R., Toshchakov S.V., Chernyh N.A., Ramayah S., et al., 2019. Diversity of “Ca. Micrarchaeota” in two distinct types of acidic environments and their associations with Thermoplasmatales // *Genes*. V. 10. № 6. P. 461.
- Golyshina O.V., Toshchakov S.V., Makarova K.S., Gavrilov S.N., Korzhenkov A.A., La Cono V., Arcadi E., Nechitaylo T.Y., Ferrer M., Kublanov I.V., Wolf Y.I., Yakimov M.M., Golyshin P.N., 2017. ‘ARMAN’ archaea depend on association with euryarchaeal host in culture and *in situ* // *Nature Communication*. V. 5. № 8. P. 1–12.
- Hartman O., 1966. Polychaetous annelids of the Hawaiian Islands // *Occasional Papers of the Bernice P. Bishop Museum*. V. 23. № 11. P. 163–252.
- Henriksson R., 1969. Influence of pollution on the bottom fauna of the Sound (Öresund) // *Oikos*. V. 20. № 2. P. 507–523.
- Hinzke T., Kleiner M., Breusing C., Felbeck H., Häslér R., 2019. Host-microbe interactions in the chemosynthetic *Riftia pachyptila* symbiosis // *mBio*. V. 10. № 6. P. 1–20.
- Holthe T., 1986. Evolution, systematics and distribution of the Polychaeta Terebellomorpha, with a catalogue of the taxa and a bibliography // *Gunneria, Trondheim*. V. 55. P. 1–236.
- Hugert L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F., 2014. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // *Applied and Environmental Microbiology*. V. 80. № 16. P. 5116–5123.
- Hutchings P., Peart R., 2000. A revision of the Australian Trichobranchidae (Polychaeta) // *Invertebrate Taxonomy*. V. 14. P. 225–272.
- Hutchings P., 1998. Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments // *Biodiversity & Conservation*. V. 7. P. 1133–1145.
- Imajima M., Williams S.J., 1985. Trichobranchidae (Polychaeta) chiefly from the Sagami and Saruga Bays, collected by R/V Tansei-Maru // *Bulletin of the National Science Museum of Tokyo*. V. 11. № 1. P. 7–18.
- Jumars P.A., Dorgan K.M., Lindsay S.M., 2015. Diet of worms emended: An update of polychaete feeding guilds // *Annual review of marine science*. V. 7. P. 497–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-020007>
- Kleiner M., Wentrup C., Lott C., Teeling H., Wetzel S. et al., 2012. Metaproteomics of a gutless marine worm and its symbiotic microbial community reveal unusual pathways for carbon and energy use // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 109. № 19. P. 1173–1182.
- Kokarev V., Zalota A.K., Zuev A., Tiunov A., Kuznetsov P., Kononova O., Rimskaya-Korsakova N., 2023. Opportunistic consumption of marine pelagic, terrestrial, and chemosynthetic organic matter by macrofauna on the Arctic shelf: a stable isotope approach // *PeerJ*. 11:e15595. <https://doi.org/10.7717/peerj.15595>
- Lacoste É., Piot A., Archambault P., McKindsey C.W., Nozais C., 2018. Bioturbation activity of three macrofaunal species and the presence of meiofauna affect the abundance and composition of benthic bacterial communities // *Marine Environmental Research*. V. 136. P. 62–70.
- Legeżyńska J., Kędra M., Walkusz W., 2014. Identifying trophic relationships within the high Arctic benthic community: how much can fatty acids tell? // *Marine biology*. V. 161. P. 821–836. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2380-8>
- Li M., Yang H., Gu J.D., 2009. Phylogenetic diversity and axial distribution of microbes in the intestinal tract of

- the polychaete *Neanthes glandicincta* // Microbial ecology. V. 58. № 4. P. 892–902.
- Michel C., Bhaud M., Boumati P., Halpern S., 1984. Physiology of the digestive tract of the sedentary polychaete *Terebellides stroemi* // Marine Biology. V. 83. № 1. P. 17–31.
- Minic Z., 2009. Organisms of deep-sea hydrothermal vents as a source for studying adaptation and evolution // Symbiosis. V. 47. P. 121–132.
- Moggioli G., Panossian B., Sun Y., Thiel D., Martín-Zamora F.M. et al., 2023. Distinct genomic routes underlie transitions to specialised symbiotic lifestyles in deep-sea annelid worms // Nature communications. V. 14. № 1. P. 2814. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38521-6>
- Neave M.J., Streten-Joyce C., Glasby C.J., McGuinness K.A., Parry D.L., Gibb K.S., 2012. The bacterial community associated with the marine polychaete sp. 1 (Annelida: Opheliidae) is altered by copper and zinc contamination in sediments // Microbial ecology. V. 63. № 3. P. 639–650.
- Nedved B.T., Hadfield M.G., 2008. *Hydroides elegans* (Annelida: Polychaeta): a model for biofouling research // Springer Series on Biofilms. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/7142_2008_15
- Nygren A., Parapar J., Pons J., Meißner K., Bakken T. et al., 2018. A mega-cryptic species complex hidden among one of the most common annelids in the north east Atlantic // PLoS ONE. V. 13. № 6. P. 1–37.
- Perez M., Juniper S.K., 2016. Insights into symbiont population structure among three vestimentiferan tubeworm host species at eastern Pacific spreading centers // Applied and Environmental Microbiology. V. 82. № 17. P. 5197–5205.
- Petersen J.M., Osvatic J., 2018. Microbiomes in natura: importance of invertebrates in understanding the natural variety of animal-microbe interactions // mSystems. V. 3. № 2. P. 1–7.
- Phillips T.M., Lovell C.R., 1999. Distributions of total and active bacteria in biofilms lining tubes of the onuphid polychaete *Diopatra cuprea* // Marine Ecology Progress Series. V. 183. P. 169–178.
- Reveillaud J., Anderson R., Reves-Sohn S., Cavanaugh C., Huber J.A., 2018. Metagenomic investigation of vestimentiferan tubeworm endosymbionts from Mid-Cayman Rise reveals new insights into metabolism and diversity // Microbiome. V. 6. № 1. P. 1–15.
- Rincón-Tomás B., González F.J., Somoza L., Sauter K., Madureira P., Medialdea T., Carlsson J., et al., 2020. Siboglinidae tubes as an additional niche for microbial communities in the Gulf of Cádiz—A microscopical appraisal // Microorganisms. V. 8. № 3. P. 367.
- Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A., Ivanova N.N., Anderson I.J. et al., 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter // Nature. V. 499. № 7459. P. 431–437.
- Sampaio C.J.S., de Souza J.R.B., de Carvalho G.C., Quintella C.M., de Abreu Roque M.R., 2019. Analysis of petroleum biodegradation by a bacterial consortium isolated from worms of the polychaeta class (Annelida): Implications for NPK fertilizer supplementation // Journal of environmental management. V. 246. P. 617–624.
- Schreier J.E., Lutz R.A., 2019. Hydrothermal Vent Biota // Encyclopedia of Ocean Sciences. Elsevier. V. 3. P. 308–319.
- Schüller M., Hutchings P.A., 2010. New insights in the taxonomy of Trichobranchidae (Polychaeta) with description of a new *Terebellides* species from Australia // Zootaxa. V. 2395. № 1. P. 1–16.
- Schüller M., Hutchings P.A., 2012. New species of *Terebellides* (Polychaeta: Trichobranchidae) indicate long-distance dispersal between western South Atlantic deep-sea basins // Zootaxa. V. 3254. № 1. P. 1–31.
- Schüller M., Hutchings P.A., 2013. New species of *Terebellides* (Polychaeta: Trichobranchidae) from the deep Southern Ocean, with a key to all described species // Zootaxa. V. 3619. № 1. P. 1–45. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3619.1.1>
- Solis-Weiss V., Fauchald K., Blankensteyn A., 1991. Trichobranchidae (Polychaeta) from shallow warm water areas in the Western Atlantic Ocean // Proceedings of the Biological Society of Washington. V. 104. № 1. P. 147–158.
- Stolyarov A.P., 2019. Some Features of the species, spatial, and trophic structure of macrobenthos in the lagoon systems of the Ermolinskaya and Nikol'skaya inlets (Kandalaksha Bay, the White Sea) // Moscow University Biological Sciences Bulletin. V. 74. P. 176–182. <https://doi.org/10.3103/S0096392519030106>
- Stoykov S., Uzunova S., 2001. Dynamics of macrozoobenthos in the Southern Bulgarian Black Sea coastal and open-sea areas // Mediterranean Marine Science. V. 2. № 1. P. 27–36.
- Tzvetlin A.B., Saphonov M.V., 1995. A new finding of intracellular bacterial symbionts in the Nerillidae (Annelida: Polychaeta) // Russian Journal of Aquatic Ecology. V. 4. № 1. P. 55–60.
- Vijayan N., Lema K.A., Nedved B. T., Hadfield M.G., 2019. Microbiomes of the polychaete *Hydroides elegans* (Polychaeta: Serpulidae) across its life-history stages // Marine Biology. V. 166. № 2. P. 1–13.
- Vortsepneva E., Chevaldonné P., Klyukina A., Naduvaeva E., Todt C. et al., 2021. Microbial associations of shallow-water Mediterranean marine cave Solenogastres (Mollusca) // PeerJ (13) 9:e12655. <https://doi.org/10.7717/peerj.12655>
- Williams S.J., 1984. The status of *Terebellides stroemi* (Polychaeta; Trichobranchidae) as a cosmopolitan species, based on a worldwide morphological survey, including description of new species // Proceedings of the First International Polychaete Conference, Sydney, Australia. P. 118–142.
- Wippler J., Kleiner M., Lott C., Gruhl A., Abraham P.E. et al., 2016. Transcriptomic and proteomic insights into innate immunity and adaptations to a symbiotic lifestyle in the gutless marine worm *Olavius algarvensis* // BMC Genomics. V. 17. № 1. P. 1–19.
- Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N., Huntemann M., Richter M. et al., 2014. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium // Nature. V. 443. № 7114. P. 950–955.
- Zhang J., Hutchings P., 2018. Taxonomy and distribution of *Terebellides* (Polychaeta: Trichobranchidae) in the northern South China Sea, with description of three new species // Zootaxa. V. 4377. № 3. P. 387–411.

THE STUDY OF MICROBIAL ASSOCIATIONS HELPS US UNDERSTAND THE LIFESTYLE OF *TEREBELLIDES* CF. *STROEMII* (ANNELIDA, TEREBELLIFORMIA, TRICHOBRANCHIDAE) IN THE WHITE SEA

A. B. Tzetlin^{1, *}, A. A. Klyukina², A. G. Elcheninov², P. A. Shcherbakova¹, L. A. Gavirova¹,
A. I. Shestakov¹, E. V. Vortsepneva¹, A. E. Zhadan¹, I. V. Kublanov²

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234 Russia

²Vinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”, 60th Anniversary of October Ave., 7, bldg. 2, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: atzetlin@gmail.com

Polychaete annelids are one of the main components of oceanic benthos, but little is known about their microbial symbionts. The purpose of this work is to study the microbiome associated with representatives of *Terebellides* cf. *stroemii* and to describe their lifestyle in the White Sea. To do this, the worms and their tubes were examined using light and electron microscopy, and the composition of the microbiome was studied by sequencing the hypervariable V4 regions of the 16S rRNA gene. The tubes of *Terebellides* cf. *stroemii* are shown to be loose and, most likely, temporary, whereas the worms dig actively into the ground, yet spending part of their time collecting food from the ground surface with the help of tentacles. Bacteria were found neither in integument cells nor in the intestinal epithelium. Phylogenetic and cluster analyses revealed significant differences in the taxonomic composition of the microbiomes of *T. cf. stroemii* worms from the soil microbiome and allowed us to determine specific components of the microbiomes of intestines and tentacles, whereas the microbiomes of bottom sediments and worm tubes appeared to be similar. The microbiomes of the tubes are dominated by *Pseudomonadota*, *Desulfobacterota* and *Bacteroidota*. While the intestines are home to *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Cyanobacteriota*, *Chloroflexota* and *Planctomycetota*, this bacterial community is very different from the microbiomes both of the surrounding sediment and the tentacles. The microbiome of the tentacles of *T. cf. stroemii* differs significantly from that of the surrounding soil, tube and intestine, as it contains *Pseudomonadota*, *Bacillota* and *Bacteroidota*, in addition to a significant number of representatives of the archaeal superfamily DPANN observed in two samples. Modern technologies for studying microbiomes demonstrate the presence of specific communities of microorganisms associated with the study species, with a combination of morphological and molecular methods being promising for studying the microbiomes associated with marine annelids and their functional relationships with the animals.

Keywords: polychaetes, biology, digestive tract, microbiome, metagenomic methods, *Proteobacteria*, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota*, DPANN