

Princip holobionta

Burkuš, Tajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:502341>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

PRINCIP HOLOBIONTA
THE HOLOBIONT PRINCIPLE
SEMINARSKI RAD

Tajana Burkuš

Preddiplomski studij znanosti o okolišu

Undergraduate Study of Environmental Sciences

Mentor: izv. prof. dr. sc. Goran Kovačević

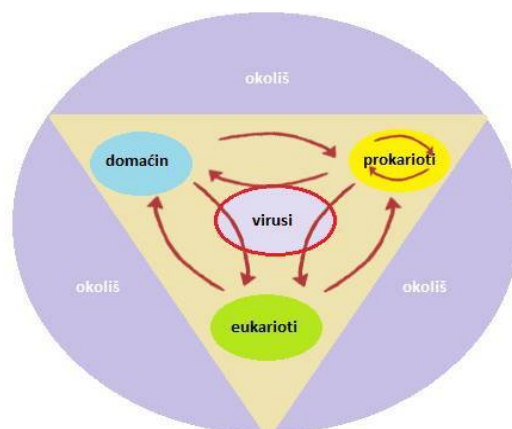
Zagreb, 2016.

1. UVOD

Holobiont je pojam koji obuhvaća jedinku domaćina i njegovu mikrobnu zajednicu, uključujući viruse i stanične mikroorganizme (Slika 1). Potječe od grčke riječi hólos što znači cijeli, sav, ispunjen. Joshua Lederberg definirao je holobionta kao ekološku zajednicu komezalnih, mutualističkih i patogenih mikroorganizama koje dijele prostor našeg tijela (Lederberg i McCray 2001). Lynn Margulis predložila je da se pod pojmom „simbioza“ smatra svaka fizička povezanost među jedinkama različitih vrsta koja traje većinu njihova života. Sudionici te simbioze su bionti, a skup svih bionata određuje holobionta (Margulis 1993).

Svaki do sada istražen mikroorganizam je u nekoj vrsti povezanosti s različitim bakterijama i virusima. Mikroorganizam je samo jedan od sudionika, bionata u cijelom interakcijskom skupu bionata koji svi zajedno čine funkcionalnog holobionta. Holobiont zauzima pojedine ekološke niše, prilagođava se i može evoluirati. Prilikom promjena u okolišu holobiont ima veće sposobnosti prilagodbe nego sam pojedini biont. Mikroorganizmi su uključeni u procese koji utječu na ponašanje, produkciju metabolita, imunološki sustav, morfogenezu. Prepoznavanje holobionta kao multicelularnog eukariota sa svojim simbiotima važno je u proučavanju anatomije, razvojne biologije, fiziologije, imunologije i evolucije.

U ovom radu pojašnjena je i primjerima potkrijepljena hologenomska teorija evolucije te su izloženi neki od danas često istraživanih holobiontskih sustava kao što su koraljni holobiont, hidrin holobiont, makroalgalni holobiont i gastrointestinalni sustav termita.



Slika 1. Princip holobionta

(prilagođeno prema Bosch i Miller 2016)

2. HOLOGENOMSKA TEORIJA EVOLUCIJE

Ovu teoriju evolucije prvi su predložili 2008. godine E. Rosenberg i I. Zilber-Rosenberg na temelju svoje prije predložene hipoteze o koraljnom probiotiku (Reshef i sur. 2006). Proučavajući infekcije koralja i njihovo izbjeljivanje, nakon nekoliko godina uočili su da je koralj postao rezistentan na infekciju svog specifičnog patogena, *Vibrio shiloi*. S obzirom da koralji posjeduju ograničeni imunološki sustav i ne proizvode antitijela, rezistencija na infekciju morala je biti rezultat nečeg drugog. Hipoteza pretpostavlja kako postoji dinamičan međuodnos koralja i njegovih simbiota unutar različitih okolišnih čimbenika čiji utjecaj dovodi do stvaranja najpovoljnijeg koraljnog holobionta u danim uvjetima.

Središnji pojam hologenomske teorije evolucije je holobiont, pojam koji označava živi organizam, životinju i biljku, sa svim svojim udruženim mikroorganizmima. Holobiont ima svoj hologenom koji se sastoji od genoma domaćina te ukupnog genoma mikroorganizama, mikrobioma. Takvo udruženje funkcionira kao jedinstvena biološka cjelina i u ovoj teoriji holobiont se smatra jedinicom selekcije u evoluciji (Slika 2). Teorija se bazira na četiri generalizacije: (1) Sve biljke i životinje uspostavljaju simbiotske odnose s mikroorganizmima. (2) Simbiotski organizmi se prenose kroz generacije. (3) Asocijacija simbiota i domaćina utječe na sposobnost preživljavanja holobionta u okolišu. (4) Varijacije u hologenom mogu biti posljedica promjene u genomu domaćina ili mikroorganizama.

S obzirom na prihvaćeno stajalište da su eukarioti proizašli iz prokariota, ne čudi činjenica kako su eukarioti i prokarioti u uskoj povezanosti sve do danas. Na površinama životinja i biljaka nalazi se mnoštvo raznih mikroorganizama. Neki od njih obitavaju i unutar eukariotskih stanica te ih stoga nazivamo endosimbiontima. Iako je praktički nemoguće ove mikroorganizme uzgajati u kulturi njihovo proučavanje se većinom bazira na novoj DNA „culture-free“ tehnologiji. Danas se zna kako je raznolikost vrsta mikroorganizama na određenom biljnom ili životinjskom organizmu velika i kako se te mikrobne zajednice domaćina poprilično razlikuju od onih koje se nalaze u pripadnom okolišu. Na istim vrstama koje su geografski udaljene nađene su slične, ali ne i potpuno iste mikrobne zajednice dok su na različitim vrstama istog područja nađene različite mikrobne zajednice. Različiti mikroorganizmi nalaze se na različitim tkivima istog organizma te na svakom tkivu određene grupe su zastupljenije u odnosu na druge (Rosenberg i Zilber-Rosenberg 2008).

Kako bi se održao kontinuitet postojanja holobionta onakvog kakav jest, geni domaćina i njegovih simbionata moraju se moći prenijeti s velikom točnošću budućim generacijama. Osim uobičajenog vertikalnog prijenosa gena s roditelja na potomke postoje i mnogi primjeri drugačijih metoda prijenosa. Direktni prijenos nalazimo u simbionata koji su locirani u reproduktivnim stanicama domaćina kao što je to slučaj kod simbioze lisne uši *Acyrtosiphon pisum* i bakterije *Buchnera aphidiocola* koja se nalazi u bakteriocitama unutar jajnih stanica lisne uši. Kod sisavaca uočen je direktni prijenos simbionata prilikom prolaska kroz rodnicu ili putem fizičkog kontakta roditelja, obitelji i zajednice. Simbionti se također mogu prenijeti putem fecesa. U termita je poznato hranjenje tek izlegnutih juvenilnih jedinki fecesom odraslih jedinki koji sadži obilje korisnih mikroorganizama. Mlade jedinke preživača također pasu travu „zagađenu“ fecesom odraslih jedinki te tako obogaćuju svoju crijevnu floru. Zanimljiv primjer je i način prijenosa simbiotskih bakterija *Vibrio fischeri* koje su jedine sposobne nastaniti svjetleći organ u sipice *Euprymna scolopes*. Odrasla sipica svake večeri u vodu ispušta velike količine bakterije kako bi omogućile dovoljno simbionata za novi podmladak (McFall 1999). Ovakav horizontalni prijenos putem okoliša dovoljan je za razvoj novih holobionata. U biljaka i životinja koje se razmnožavaju vegetativno dovoljno je da somatska stanica iz koje će se razviti novi mladi organizam sadrži simbiote. Mnogo je takvih primjera u biljaka a osim direktnog prijenosa velika je mogućnost da će mlada biljka rastući neposredno pokraj biljke roditelja sama u sebe inkorporirati mikorizne gljive i ostale mikroorganizme koje se nalaze u tlu (Rosenberg i Zilber-Rosenberg 2008). U životinja koje se razmnožavaju i nespolno, treba spomenuti *Hydra* koja je dobar modelni organizam za istraživanje zbog svog jednostavnog plana građe, tek nekoliko specifičnih (bakterijskih) simbionata i dostupnosti kompletno sekvenciranog genoma (Bosch 2012).

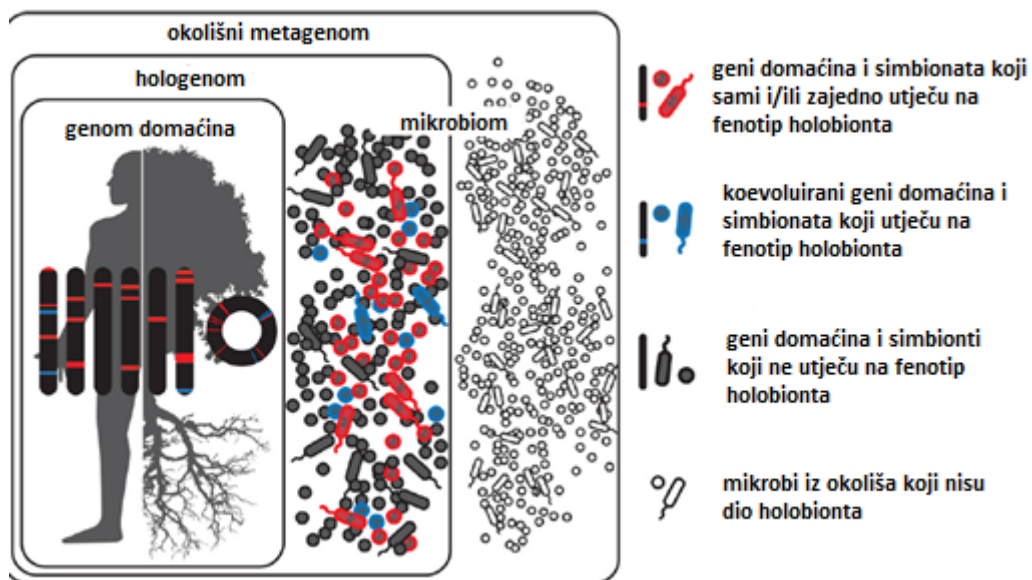
Asocijacija domaćina i simbionata u načelu pridonosi povećanom fitnessu holobionta. Prema Dobzhanskom, adaptivna vrijednost ili fitness je relativna sposobnost jedinke određenog genotipa da te gene prenese na slijedeću generaciju. Zato holobionta možemo smatrati jedinicom selekcije u evoluciji. Genetička raznolikost mikrobiote u mogućnosti je proširiti opseg okoliša u kojemu holobiont može boraviti. I ovdje možemo navesti mnoge primjere koje idu u prilog hologenomskoj teoriji evolucije. Veoma istraženi su goveđi burag te ljudski i mišji intestinalni sustav. Goveđi burag bakterijama služi kao anaerobno i temperaturno povoljno stanište u kojemu one svojim enzimima razgrađuju celulozu na glukozne sastavnice. Glukoza se potom fermentira do kraktolančanih masnih kiselina koje je

govedo sposobno apsorbirati (Dehority 2003). One bakterije koje završe u potonjim želucima govedo razgradi svojim enzimima kako bi si priuštilo potrebne dušikove spojeve i vitamine. Na taj način goveđi holobiont sposoban je rasti i reproducirati se temeljeći svoju prehranu na jednostavnoj ishrani od celuloze, vode i anorganskih soli. Ovakav koncept u kojem domaćin ima koristi od svojih mikroorganizama jer mu omogućuju dobivanje energije iz kompleksnijih spojeva, vitamine i esencijalne aminokiseline zapravo je uobičajen fenomen u životinjskom svijetu. U čovjeka je osim u kooperaciji u razgradnji hrane uočena i pomoć u biotransformaciji određenih molekula (Hylemon i Harder 1998), sudjelovanje u razvoju funkcije urođenog i stečenog imunog sustava (Hooper i Gordon 2001), izgradnji krvožilja (Stappenback i sur. 2002) te sudjelovanje u regulaciji akumulacije masti (Bäckhed i sur. 2004). Još jedan zanimljiv primjer povećanja fitnesa holobionta je simbioza između vrsta *Euprymna scolopes* i *Vibrio fischeri* u kojemu bakterijski simbiot pomaže u formiranju svjetlećeg organa sipice i stvaranju svjetlosti kojeg sipica koristi za kontrailuminaciju što joj u konačnici omogućuje kamuflažu u vodi (McFall-Ngai i sur. 1992).

Holobiont može mijenjati svoj hologenom putem promjene u genomu domaćina ili mikrobioma. Varijacije u genomu domaćina mogu biti posljedica spolnog razmnožavanja, kromosomskih rearanžmana i mutacija. Isti procesi događaju se u mikroorganizmima simbiotima s time da se u haploidnih bakterija rekombinacija događa unutar iste vrste prilikom konjugacije, transdukcije i DNA transformacije. Osim ovih postoje i druge mogućnosti prijenosa genetičkog materijala mikrobiote holobionta. Jedna od njih je mikrobna amplifikacija gena. To je ujedno i najbrži način varijacije u holobionta. Amplifikacija gena je zapravo povećanje broja različitih mikroorganizama zbog promjena u temperaturi, izlaganju antibioticima, nedostatku nutrijenata i ostalih okolišnih promjena. Holobiont je dinamička cjelina u kojoj jedni mikroorganizmi povećavaju a drugi smanjuju svoju brojnost u domaćinu što je direktna posljedica promijenjenih lokalnih uvjeta. Mikrobna amplifikacija je moćan mehanizam prilagođavanja holobionta na promjenjive uvjete okoliša. Drugi mehanizam kojim se može postići varijacija u holobionta je stjecanje novih simbiotata iz okoliša što je velikim dijelom rezultat slučajnog događaja. Neki od tih novo stečenih mikroorganizama mogu povoljno utjecati na holobionta te se tako održati i povećati svoj broj u njemu. Horizontalni prijenos gena između različitih mikrobnih vrsta još je jedan dodatni mehanizam stjecanja varijacija u holobionta. On može biti posredovan putem plazmida, bakteriofaga, transpozona ili genomskih otoka koji se mogu nalaziti na bakterijskom kromosomu ili plazmidu. Kada bi se varijacije genoma događale samo u domaćinskom genomu to bi bio dugotrajan i spor

proces. S druge strane, mikrobne zajednice posjeduju mogućnost vrlo brze promjene gena. Zahvaljujući njima holobiont je u mogućnosti preživjeti i brzo se adaptirati na novo nastale okolišne uvjete te domaćinskom genomu pružati dovoljno vremena za njegovu evoluciju (Rosenberg i Zilber-Rosenberg 2008).

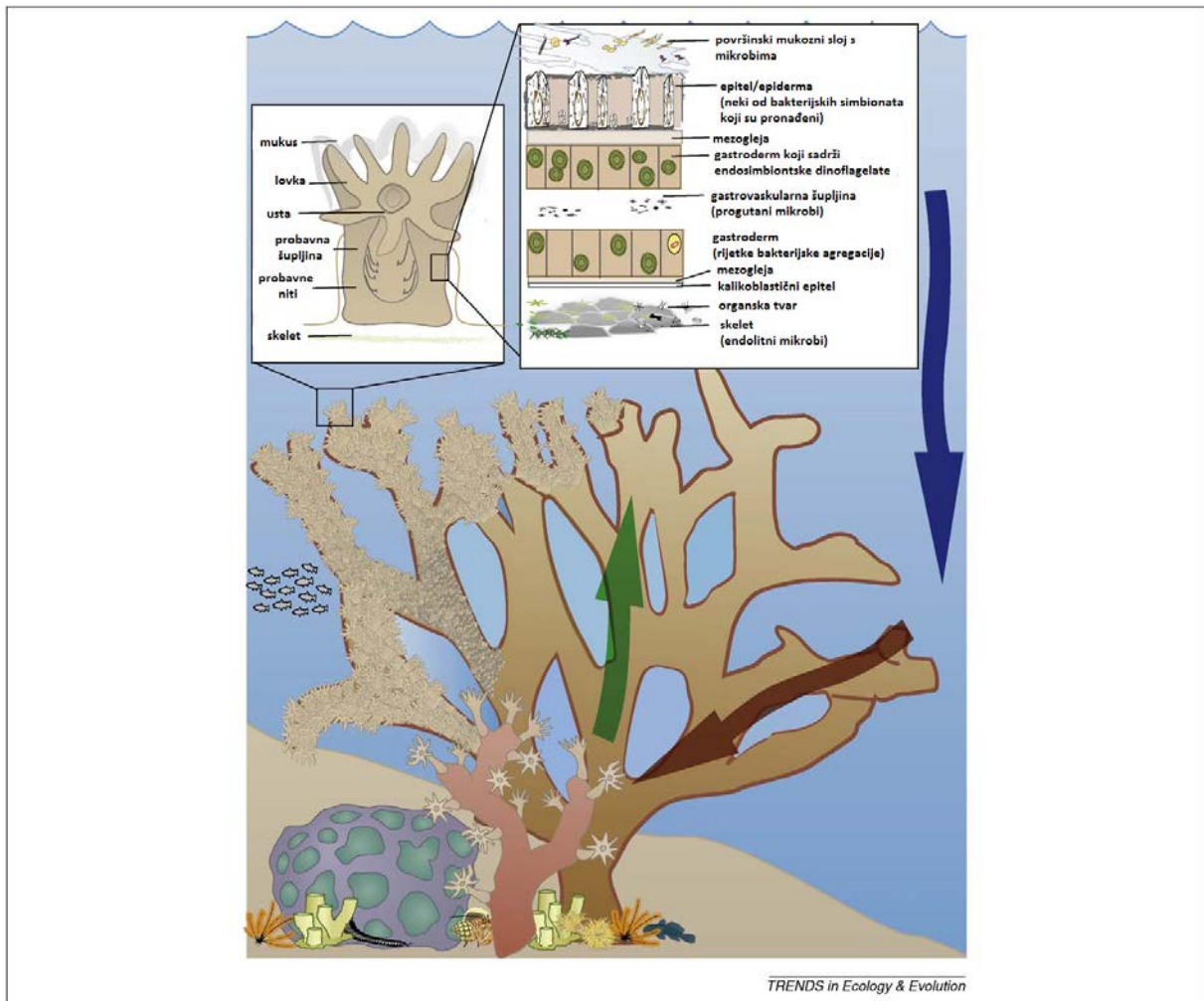
Zanimljivo je da hologenomska teorija evolucije uključuje aspekte i Darwinove i Lamarckove teorije. Lamarckova teorija nasljeđivanja putem stečenih karakteristika bazira se na uvjerenju da se organizam tijekom života mijenja kako bi se prilagodio svom okolišu i kako bi novo stečene promjene prenio na potomke. Darwin je smatrao kako stečene promjene tijekom života organizma ne utječu na evoluciju te vrste. On je vjerovao kako su organizmi, čak oni iste vrste, različiti te da upravo oni koji u sebi nose varijacije imaju veću mogućnost preživljavanja i reprodukcije. Oni koji nisu prilagođeni uvjetima okoliša umiru i izumiru. Organizmi evoluiraju selekcijom slučajnih varijanti dok holobionti imaju moć adaptacije na određene uvjete okoliša i na taj način tijekom života razvijaju osobine koje mogu prenijeti na slijedeće generacije (Rosenberg i sur. 2009).



Slika 2. Holobiont i hologenom.
(prilagođeno prema Theis i sur. 2016)

3. KORALJI (razred ANTHOZOA)

Koraljni grebeni su jedan od najpoznatijih i najistraživanijih morskih sustava koji uključuju razne simbiotske odnose od kojih je dakako najznačajniji mutualizam koralja i simbiotskih algi. Koralji (Scleractinia) koji izgrađuju koraljne grebene mjesto su najveće bioraznolikosti u morskom okolišu na Zemlji, a za njihovo formiranje potrebno je i više stotina godina. Upravo ih iz tih razloga treba zaštititi od ugrožavajućeg utjecaja globalnog zatopljenja i ostalih okolišnih poremećaja. Odrasli koralji se u načelu sastoje od mnogobrojnih polipa koji stvaraju skelete od kalcijevog karbonata. Formiranje koralja ujedno je i formiranje cijelog jednog bogatog ekosustava. Osim što pružaju brojne niše makroorganizmima, svaka kolonija unutar grebena sadrži i mnoga mikrostaništa za raznovrsne mikrobne zajednice. Svako mikrostanište pruža posebne uvjete koji se očituju u različitim mikrobnim zajednicama unutar strukture koralja. Pojedina mikrostaništa, baza ili vrh koralja, mogu pružati više svjetla ili brži protok vode (Slika 3). Raznovrsne mikrobne zajednice nalaze se kako na površini tako i unutar koraljnog tkiva (Ainsworth i sur. 2009). U gastrodermalnom sloju koralja nalaze se fotosintetske jednostanične dinoflagelatne alge roda *Symbiodinium*, poznate i kao zooksantele. One su fakultativni endosimbionti koji koralje opskrbljuju potrebnim nutrijentima, a zauzvrat dobivaju sklonište u osvijetljenom okolišu te anorganski dušik i ugljik od koralja.



Slika 3. Kompleksnost strukture koraljnog grebena i mikrostaništa.
(prilagođeno prema Ainsworth i sur. 2010)

3.1. KORALJNI HOLOBIONT

Zahvaljujući napretku u sekvencijskoj tehnologiji kao što su „culture-free“ pristupi i sekvenciranje 16S rRNA, otkriven je još veći diverzitet simbionata u koralju. Pomoću metagenomike uočene su i promjene u proporciji mikrobnih gena vezanih za funkciju kruženja dušika i virulencije ovisno o vanjskim poremećajima okoliša (Thompson i sur. 2015). Kao što je već spomenuto najpoznatiji koraljni simbiot je dinoflagelat roda *Symbiodinium*. Ostale veliko zastupljene skupine su bakterije iz skupina Proteobacteria (Gamma- i Alphaproteobacteria), Actinobacteria, Bacteroides (Flavobacteria) i Cyanobacteria. Osim bakterija manje zastupljene su i Archaea koje su također važne zbog recikliranja nutrijenata u domaćinu. Crenarchaeota su najzastupljenije i sudjeluju u recikliranju dušika te uklanjaju amonijaka putem nitrifikacije, denitrifikacije i oksidacije amonijaka. Od eukariotskih simbionata korisne su i endolitske gljive koje sudjeluju u asimilaciji amonijaka u biositnezi. Jednostanični eukariotski alveolati (Ciliata, Dinoflagellata, Apicomplexa, Chromerida) također tvore asocijacije s koraljima. Smatra se da je kemotaksija između bakterija i koralja jedan od glavnih procesa koji omogućuju osnivanje i održavanje specifične koralj-bakterija asocijacije (Bourne i sur. 2016).

Kako bi potomci koraljnog holobionta bili isti, potrebno je proslijediti simbiote s jedne generacije koralja na drugu. Prijenos može biti vertikalni (putem roditeljskih gameta) ili horizontalni (pribavljanje simbionata iz okoliša).

Ukoliko dođe do raspada simbioze između koralja i simbiotskih algi, tada će koralji izgubiti svoju pigmentaciju i postati bijeli. Proces je poznatiji pod imenom izbijeljivanje koralja. Danas je to nažalost veoma rasprostranjen proces. Nekoliko okolišnih uvjeta može dovesti do te pojave, ali najutjecajniji je povišenje površinske temperature vode. Ukoliko su koralji duže vremena izloženi povišenoj temperaturi, onda doživljavaju termalni stres (Baird i sur. 2008). Unatoč tomu, u izbijeljenim koraljima postoji mogućnost da koralji izmijene omjere algalnih simbionata s onima koji su termotolerantniji. Tako je, na primjer, u koralja u Karipskom moru uočena promjena algi iz roda *Symbiodinium* grupe D i A, koje su termotolerantnije od grupe C koja obitava u koraljima nepogođenima termalnim stresom. Zanimljivo je napomenuti da se prvotna grupa C može nakon termalnog stresa ponovno vratiti

u asocijaciju s koraljem. Tomu je najvjerojatniji razlog manji fiziološki utrošak koji prouzrokuju domaćinu u odnosu na grupe D i A *Symbiodinium* algi (Medina 2011). Na taj način koralji pokazuju mogućnost oblikovanja povoljnijeg fiziološkog fenotipa kada se uvjeti okoliša promijene.

Mikrobna zajednica koralja igra važnu ulogu u održavanju zdravlja koralja. Sveopće zdravlje koralja ovisi o ujednačenosti mikroorganizmima te je stoga vrlo korisno čim bolje razumijeti kako promjene u vrsti i broju utječu na zdravlje i bolesti koralja. Buduća otkrića mogla bi dovesti do izrada plana spašavanja koraljnih grebena i njihovih bogatih ekosustava.

4. HIDRA (razred HYDROZOA)

Hidra se kao model istraživanja u evolucijskoj i razvojnoj biologiji koristi još od 1980-ih godina te zbog svoje jednostavnosti u građi i uzgoju ona predstavlja dobar eksperimentalni model. Stoga ne čudi činjenica da je upravo hidra taj model putem kojega je otkriveno mnogo toga što danas znamo o međuinterakciji domaćina i mikrobiote. Hidra ima samo dva epitelna sloja, endodermalni i ektodermalni sloj, odvojeni ekstracelularnim matriksom, mezoglejom. Tijelo se sastoji od gastralne cijevi s ustima i prstenom lovki na oralnom kraju te stopala i mukoznog sloja s aboralne strane (Slika 4). Hidra ima tek nekoliko tipova stanica koji nastaju iz tri različite linije matičnih stanica. Upravo zbog tako malog broja tipova stanica, diferencirane stanice su multifunkcionalne. Epitelne stanice hidre konstantno proliferiraju i obnavljaju se, a uz to hidra ima veliku sposobnost regeneracije.



Slika 4. *Hydra viridissima*

(preuzeto sa www.mikro-foto.de)

4.1. HIDRA KAO HOLOBIONT

Istraživanja mikrobiote različitih vrsta hidri koje su više od 20 godina uzgajane u kontroliranim uvjetima u laboratoriju dovela su do nekoliko zanimljivih spoznaja. Unatoč godinama epitel hidri bio je koloniziran raznolikom i kompleksnom zajednicom mikroorganizama. Osim toga otkriveno je kako su hidre iz laboratorija i divlje hidre imale jako sličnu grupu kolonizirajućih mikroba. Ova zapažanja ukazuju na postojanje izrazitog međudjelovanja hidrinog epitela i mikrobiote. Očito je da epitel aktivno odabire i oblikuje mikrobnu zajednicu (Bosch 2012).

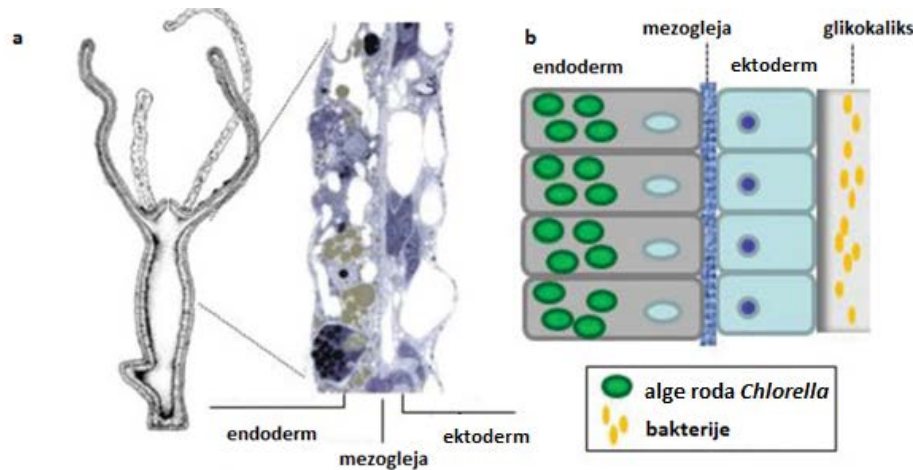
Hidra holobiont uključuje najmanje 3 tipa organizma (hidra, bakterije i alge) koji svi skupa dijele dugu koevoluciju i ovise jedan o drugome. Svaka vrsta hidre sadrži specifičnu mikrobnu zajednicu i sposobna ju je održati kroz dulje vremenske periode. Pomoću 16S rRNA sekvenciranja dobiveni su podaci o dominantnim grupama mikroba za svaku vrstu ispitivanih hidri. Tako na primjer laboratorijska linija vrste *Hydra vulgaris* sadži oko 75% bakterije *Curvibacter* sp. dok su u *Hydra oligactis* većina bakterija iz reda Rickettsiales. (Bosch 2013). Najveći broj bakterija na hidri nalazi se na vanjskom sloju glikokaliksa (Slika 5 b), dok unutarnji ostaje sterilni i služi kao barijera koja štiti unutarnji epitelni sloj od vanjskih utjecaja i učinaka (Bosch i Miller 2016).

Mikrobi embrija i adultnih jedinki se razlikuju. U ženskih hidri oocite se diferenciraju iz grozdova intersticijskih matičnih stanica i razvijaju u jaje koje je pričvršćeno na majci. Prilikom gametogeneze ženske intersticijske stanice proizvode antimikrobne peptide (AMP) iz porodice peptida perikulina koje pakiraju u vezikule koje će se u konačnici nalaziti u oociti. Nakon oplodnje vezikule perikulina ispuste svoj sadržaj na površinu kako bi se zaštitio embrij. Tijekom embriogeneze polako se povećava broj i raznolikost bakterijski stanica na hidri. Na primjer, već prije naveden *Curvibacter* sp. pojavit će se na hidri tek tijekom kasnijih razvojnih stadija, ali će na samom početku razvoja izostajati. Ovakva diferencijalna kolonizacija posljedica je različitih antimikrobnih svojstava u embrija i odraslog polipa. Točan razlog ovakvog odabiranja mikroba još nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da simbioziti ovdje imaju ulogu u zaštiti ranog embrija (Bosch i Miller 2016).

Ključni čimbenici u koevoluciji bakterija i hidre su već navedeni antimikrobni peptidi (AMP) koje proizvode ekto- i endodermalne epitelne stanice hidre. Oni su zajedno sa hidrinim urođenim imunološkim sustavom glavni čimbenici u kontroli mikrobne zajednice. Do ovih zaključaka došlo se uspoređujući mikrobne zajednice dviju hidri od kojih je jedna bila transgenična i eksprimirala znatno veće količine AMP perikulina. U usporedbi s divljim tipom hidri, u njoj je nađena znatno manja količina bakterija, ali i drastična promjena u strukturi mikrobne zajednice. Pretpostavlja se da su specifične asocijacije između domaćina i bakterije rezultat bakterijskih adaptacija na različite repertoare AMP molekula u različitim vrstama hidri.

Kako bi se dodatno razjasnila veza između bakterija i hidre, uzgojene su gnotobiotične hidre koje su lišene svih bakterija. Nikakve razlike nisu uočene u morfologiji, već u sklonosti gnotobiotičnih hidri prema gljivičnim infekcijama (Bosch i Fraune 2014).

Zanimljivo je kako jedna vrsta hidri, *Hydra viridissima* (zelena hidra), formira postojanu simbiozu sa intracelularnom algom roda *Chlorella*. Zelena hidra algama pruža stanište, zaštitu i neke od produkata svog metabolizma. Ona zauzvrat dobiva nutrijente poput maltoze i glukoze proizvedene fotosintezom koju vrši alga. Alge su locirane u endodermalnim epitelnim stanicama (gastrodermalne mioepitelne stanice) hidre (Slika 5 a). U svakoj stanici nalazi se između 20 i 40 algi, a svaka je alga okružena zasebnom vakuolarnom membranom te nalikuje plastidu eukariotskog podrijetla. Sve do nedavno smatralo se da su alge izgubile mogućnost autonomnog življenja zbog nemogućnosti njihovog uzgoja u kulturi. Dokazano je kako se alge ipak mogu izolirati i kontinuirano uzgajati u trajnim laboratorijskim kulturama. U usporedbi sa slobodnoživućim srodnim algama, izolirane alge znatno su slabije prilagođene novonastalim uvjetima mikrookoliša. Ova činjenica upućuje na nedovršeni proces simbiogeneze između hidre i algalnog simbionta (Kovačević i sur. 2010). Simbiotske alge imaju i ulogu u poticanju oogeneze u hidre. Veoma se malo zna o molekularnim i genetičkim procesima koji omogućuju algama preživljavanje i razmnožavanje u vakuolama stanica hidre i interakciji obaju partnera. Istraživanja *Hydra viridissima* holobionta u budućnosti će dati odgovore na mnoga pitanja vezana uz ovaj kompleksni međudnos hidre, bakterija, algi i njihovih interakcija (Bosch i Miller 2016).



Slika 5. *Hydra viridissima* holobiont.

- a) habitus hidre s uvećanim prikazom epitelnih slojeva i mezogleje. b) shematski prikaz smještaja algalnih simbionata u domaćinu.
(prilagođeno iz Bosch i Miller 2016)

5. MAKROALGALNI HOLOBIONT

Morski okoliš dom je ogromnom bogatstvu bakterija i sve je jasnija činjenica kako mnogi morski eukarioti ulaze u stalne asocijacije s bakterijama. Bakterije utječu na njihov rast, razvoj, zalihu nutrijenata kao i na zaštitu od kolonizacije drugih štetnih organizama i predacije. Makroalge su mnogostanični sesilni fotosintetski eukarioti koji čine raznolike i sveprisutne skupine organizama koje su od velike važnosti za akvatičke ekosisteme. One značajno utječu na globalnu primarnu proizvodnju, a osim toga tvore velika i raznovrsna staništa na stjenovitim podlogama u morima umjerenih temperatura. Ta staništa služe kao sklonište i izvor hrane mnogim drugim morskim organizmima. Makroalge kao i ostali eukariotski organizmi ulaze u asocijacije s mikroorganizmima koji utječu na njihovo sveopće zdravlje i obranu.

Površina makroalgi ispunjena je raznolikim skupinama bakterija čija gustoća varira od 10^2 - 10^7 stanica po cm^2 što zavisi do vrste alge i sezoni. Površinske (epifitske) bakterije koje su najzastupljenije pripadaju razredima Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Cyanobacteria i koljenu Bacterioidetes. Osim bakterija na površini obitavaju i arheje, drugi eukariotski mikrobi poput dinoflagelata, trepetljikaša, diatomeja, ameba i gljiva. Velika

raznolikost makroalgalnih domaćina i raznolikosti staništa u kojem obitavaju vjerojatno utječe na isto takvu raznolikost makroalga - bakterijskih interakcija čiji rang seže od specijalista do generalista.

Mnoga biološka, fizička i kemijska svojstva utječu na kvalitativnu i kvantitativnu strukturu mikrobne zajednice i njene metaboličke aktivnosti. Parametri koji određuju površinu makroalgalnog domaćina uključuju algalne metabolite, postojeću mikrobnu zajednicu i njene sekundarne metabolite te količinu kisika i ugljikovog dioksida koji određuju površinski pH. Zbog navedenih parametara, bakterije koje ulaze u stabilne asocijacije s makroalgalnim domaćinom moraju posjedovati određene adaptivne sposobnosti kako bi mogle živjeti u takvim nišama.

Makroalge u procesu fotosinteze proizvode kisik te bi stoga mogu poslužiti kao aerobno stanište tamo gdje je kisik manje zastupljen kao što je slučaj u većim morskim dubinama. Korištenjem metode qPCR-a pronađene su relativno velike količine bakterija koje oksidiraju amonijak na površini dubokomorskih makroalgi. S druge strane kisik može vrlo nepovoljno utjecati na zajednicu bakterijskih epifita ukoliko dođe do stvaranja štetnih radikala (ROS). Makroalge zapravo često koriste ROS poput superoksidnih iona i vodikovog peroksida kako bi se obranile od bakterija. Određene bakterije su stekle adaptacije

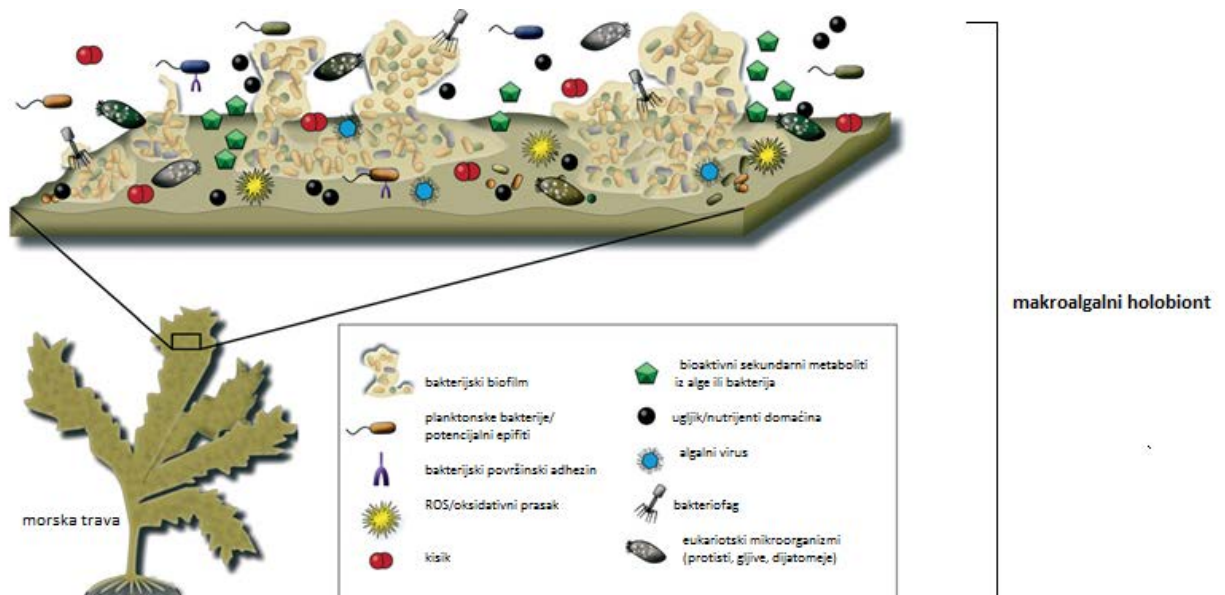
na takav okoliš i sposobne su se obraniti od ROS pomoću svojih peroksidaza, katalaza i ostalih oksidaza.

Ugljikom bogati spojevi makroalgalnih staničnih stijenki su još jedan od čimbenika koji uvjetuju bakterijsku kolonizaciju. Neke od bakterija sposobne su koristiti i razgrađivati biopolimere staničnih stijenki. Ukoliko razgradnja nije pod kontrolom, može doći do štete na makroalgalnom domaćinu. Prepostavlja se da bi se stabilne i dugoročne bakterijske asocijacije mogle uspostavljati ukoliko bi bakteriji nedostajala sposobnost početne razgradnje biopolimera. Na primjer, makroalgalnom bakterijskom epifitu *Pseudoalteromonas tunicata* nedostaju enzimi za hidrolazu biopolimera ali i dalje sadrži strukture koje joj omogućuju vezanje na polimere.

Važan selektivni čimbenik u kolonizaciji epifitskih bakterija mogli bi biti i algalni sekundarni metaboliti. Oni algama pomažu u kemijskoj obrani od potencijalnih patogena i obraštaja. Istraživanja u laboratoriju i na terenu pokazala su kako specifični makroalgalni ekstrakti imaju znatan učinak na formiranje bakterijskog biofilma i strukture bakterijskih kolonizatora. Dakle, već i sami algalni metaboliti tvore jak selektivan pritisak na formiranje bakterijske zajednice.

Heterotrofni bakterijski epifiti pružaju makroalgama CO₂ za potrebe fotosinteze ali u nekim slučajevima i fiksirani dušik. Na vrsti *Laurentia dendroidea* pronađene su cijanobakterije koje mogu fiksirati dušik. Osim pribavljanja nutrijenata zapaženo je kako bakterije utječu i na morfološki razvoj makroalgi. Zelene alge poput vrsta *Uva linza*, *U. compressa*, *U. pertusa*, *U. fasciata* zahtijevaju bakterije (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes) za normalnu morfogenezu (Egan i sur. 2013).

Epifitske bakterije posjeduju i inhibitornu aktivnost prema nekim uobičajenim organizmima koji stvaraju obraštaje na makroalgama. Na primjer vrste *Vibrio* sp. i *Pseudoalteromonas* sp. inhibiraju naseljenje i metamorfozu polihete *Hydroides elegans* na makroalgalmom domaćinu.



Slika 6. Makroalgalni holobiont i čimbenici koji utječu na bakterijsku kolonizaciju
(prilagođeno prema Egan i sur. 2013)

6. TERMITNI GASTROINTESTINALNI SUSTAV

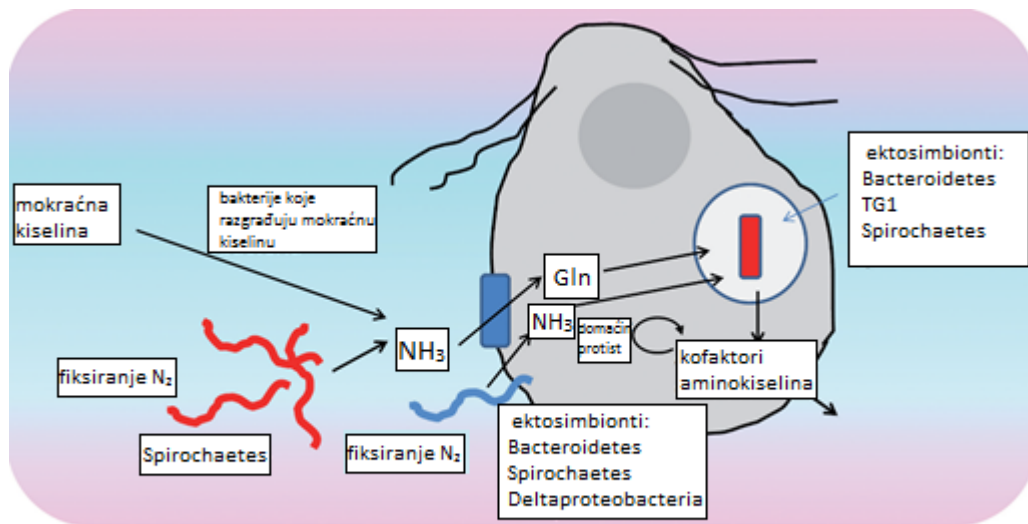
Termiti (red Isoptera) su zahvaljujući visoko specijaliziranom probavnom sustavu jedni od rijetkih životinjskih vrsta s mogućnošću iskorištenja drveta (lignoceluloze) kao izvora energije. Crijevo termita, iako malo u svojoj veličini, prepuno je raznolikih mikroba koji kataliziraju pretvorbu biljnih sastojaka sve do fermentacijskih produkata. Moglo bi se reći kako crijevo termita služi kao efikasan bioreaktor pokretač metabolizma u termita (Rosenberg i Zilber-Rosenberg 2013).

Crijevo „nižih“ termita kao što je na primjer vrsta *Reticulitermes grassei* sadrži raznoliku mikrobnu zajednicu protista (rodovi: *Holomastigotes*, *Microjoenia*, *Trichonympha*, *Spironympha*, *Monoceromonas* itd.) i bakterija (koljena: Spirochaete, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes). U crijevu „viših“ termita nedostaju protisti te većinu mikrobnih zajednica zauzimaju prokarioti od kojih su najzastupljenija koljena Spirochaeta i Fibrobacteres (Berlanga 2015).

Zahvaljujući navedenim mikrobima, termiti su u mogućnosti probavljati drveni materijal (ksilofagija). Drveni materijal ili lignoceluloza sastoji se od celuloze (20-50%), hemiceluloze (15-35%) i lignina (18-35%). U crijevu termita zastupljene glikozidne hidrolaze, od kojih neke proizvodi sam termit, a ostale potječu od bakterija. Hidrolaze razlažu celulozu i hemicelulozu u jednostavnije šećerne ostatke. Smatra se da je celulolitički sustav u „viših“ termita efikasniji nego u „nižih“ termita te da su ulogu celulolize u „viših“ termita preuzele isključivo bakterije. Kod „nižih“ termita drvene čestice fagocitiraju celulolitički protisti flagelati koji celulozu pretvaraju u acetat, vodik i ugljikov dioksid. (Berlanga 2015). Produkti mikrobne fermentacije od kojih je najviše kratkolančanih masnih kiselina bivaju apsorbirani od strane domaćina dok se ostaci bogati ligninom u načelu rješavaju putem fecesa.

Za rast svih živih bića potreban je dušik. Drveni materijal zbog svoje siromašne opskrbljenosti dušikom termitima ne pruža dovoljnu količinu za rast i razvoj. Mikrobiota stoga igra važnu ulogu zbog svoje mogućnosti fiksacije i recikliranja dušika. Diazotrofne bakterije procesom didušikove fiksacije pribavljaju čak 30-60% potrebnog dušika. Geni za dušikovu fiksaciju, *nifH* geni, nađeni su u razreda Spirochaetes, Clostridia i Bacteroidetes. Protisti također mogu fiksirati dušik, ali ne samostalno, već pomoću svojih simbiotskih ekto- i endobakterija (Slika 7). Glavni nusproizvod dušikovog metabolizma je mokraćna kiselina

koja se pomoću urolitičkih intestinalnih bakterija reciklira u dušik i amonijak. Recikliranje dušika je važan aspekt simbioze termita i mikrobiote upravo zbog toga što je prehrana termita tako ograničena dušikom.



Slika 7. Proces opskrbe dušikom u „nižih“ termita pomoću protista, njihovih simbiotskih bakterija i ostalih bakterija sposobnih za fiksaciju i recikiranje N₂.

(prilagođeno prema Berlanga 2015)

Intestinalni sustavi životinja vjerojatno su najdinamičniji sustavi organa s intenzivnim i neprestanim izmjenjivanjem međustaničnih signala između raznolikih i brojnih vrsta bakterija i stanica domaćina.

7. ZAKLJUČAK

U prirodi ne postoje životinje koje nisu u kontaktu s mikrobima. Biljke i životinje danas možemo sagledavati na razini holobionta. Epitel životinja nastanjen je raznolikim mikrobnim zajednicama i kako bismo ispravno shvatili evolucijske odnose u živom svijetu, svaki mnogostanični organizam potrebno je promatrati kao udruženje makroskopskog domaćina u uzajamnom međudjelovanju s bakterijama, arhejama, gljivama i mnogim vrstama koje pripadaju eukariotima. Svaki holobiont je neovisno biološki entitet i jedinica selekcije u evoluciji.

Sve veće razumijevanje ovakve situacije, kako životinje ne mogu biti smatrane izoliranim sustavom, već samo u asocijaciji sa simbiontima, dovelo je do dva bitna zaključka. Prvi je da se u evoluciji i biologiji određena vrsta ne bi trebala proučavati strogo zasebno, već u određenom suodnosu prema ostalim vrstama iz holobiontskog sustava kao i iz neposrednog mikrookoliša. Drugi je da je zdravlje životinja u načelu multiorganizmalno i da bilo kakva promjena u toj kompleksnoj zajednici može dovesti do posljedica, pa i drastičnih, koje utječu na dobrobit svih članova holobionta.

Daljnja istraživanja, suvremene metode i tehnike zasigurno će nam pružati nove poglede i spoznaje vezane uz ove vrlo intrigirajuće i kompleksne sustave koje nazivamo holobiontima.

8. LITERATURA

Ainsworth TD, Vega Thurber R, Gates RD (2010) The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 233-240

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF & Gordon JI (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 15718–15723

Baird AH, Bhagooli R, Ralph PJ, Takahashi S (2009) Coral bleaching: the role of the host. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 16-20

Berlanga M (2015) Functional symbiosis and communication in microbial ecosystems. The case of wood-eating termites and cockroaches. *International Microbiology* 18: 159-169

Bosch TCG, Miller D (2016) *The Holobiont Imperative Perspectives from Early Emerging Animals*. Springer, Vienna

Bourne DG, Morrow KM, Webster NS (2016) Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*. 70: 317-40

Dehority BA (2003) *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK

Egan S, Harder T, Burke C, Steinberg P, Kjelleberg S, Thomas T (2013) The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 462-476

- Fraune S, Bosch TCG (2010) Why bacteria matter in animal development and evolution. *Bioessays* 32: 571-580
- Hooper LV, Gordon JI (2001) Commensal host–bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115–1118
- Hylemon PB, Harder J (1998) Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiology Rev* 22: 475–488
- Kovačević G, Franjević D, Jelenčić B, Kalafatić M (2010) Isolation and Cultivation of Endosymbiotic Algae from Green Hydra and Phylogenetic Analysis of 18S rDNA Sequences. *Folia Biologica Kraków* /1-2: 135-143
- Lederberg J, McCray AT (2001) 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. *Scientist*. 15: 8-8
- Margulis L (1993) *Symbiosis in cell evolution* (2 ed.). W.H. Herman & Co., New York
- Medina M (2011) Analyzing Coral Reefs and Their Microbial Assemblages Coral reefs harbor Symbiodinium algae and simpler microbes that contribute to host physiology, and pathogens that can undermine it. *Microbe* 6: 226
- McFall-Ngai MJ (1999) Consequences of evolving with bacterial symbionts: insights from the squid-*Vibrio* association. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 235-256

- McFall-Ngai MJ, Ruby EG (1992) A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. *Journal of Bacteriology* 174: 4865
- Reshef L, Koren O, Loya Y, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2006) The coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology* 8: 2068-2073
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2008a) From bacterial bleaching to the hologenome theory of evolution. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft Lauderdale, Florida*
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2008b) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 723-735
- Rosenberg E, Sharon G, Zilber-Rosenberg I (2009) The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental Microbiology* 11: 2959-2962
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2013) *The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota*. Springer, Berlin Heidelberg
- Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 15451–15455
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, Cryan JF, Gilbert SF, Goodnight CJ, Lloyd EA, Sapp J, Vandenkoornhuysen P, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, Bordenstein SR (2016) Getting the hologenome concept right: An eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *American Society for Microbiology, mSystems* 1: 00028-16. doi: 10.1128/mSystems.00028-16

Thompson JR, Rivera HE, Closek CJ, Medina M (2015) Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 4: 176

www.mikro-foto.de

9. SAŽETAK

Sve biljne i životinjske vrste obiluju raznovrsnim mikroorganizmima s kojima stvaraju razne asocijacije čineći jednu cjelinu - holobionta. Holobiont posjeduje svoj hologenom i on se sastoji od zbroja domaćinskog i svih pripadajućih mikrobnih genoma. Cjelokupan hologenom može se mijenjati, kao posljedica promjene domaćinskog ili mikrobnih genoma. On se može prenositi s jedne generacije na drugu i na taj način proslijediti jedinstvena svojstva na budućeg holobionta. Mikroorganizmi i domaćin mogu međusobno komunicirati te zajedno oblikovati fiziološke i adaptivne vrijednosti unutar (mikro-)okoliša u kojem se nalaze.

U ovom radu ukratko su predstavljeni koraljni, hidrin, makroalgalni i termitni holobiont koji su među ostalima često istraživani sustavi.

10. SUMMARY

All animal and plant species carry plenty of diverse microorganisms. They create interactions and form a whole unit called holobiont. Holobiont has its own hologenome which consists of both host's and microorganisms' genomes. Genetic variation in the hologenome is possible by either the change in host's or microbes' genomes. The hologenome can be transmitted from one generation to the next and thus contribute to the unique traits of the holobiont. Microbes and host have the ability to cross-talk and influence on the overall health and fitness of the holobiont within its environment.

In this paper, some of today present studied systems, coral, hydra, seaweed and termite holobiont are presented.