

Mikrobiom velikih morskih kralješnjaka

Mihaljević, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:217:153293>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-01-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MIKROBIOM VELIKIH MORSKIH KRALJEŠNJAKA
THE MICROBIOME OF LARGE MARINE
VERTEBRATES

SEMINARSKI RAD

Mihaela Mihaljević

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Sunčica Bosak

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. MIKROBIOM MORSKIH SISAVACA	3
2.1. Kitovi (razred Cetacea).....	4
2.1.1. Mikrobiom probavnog sustava	4
2.1.2. Mikrobiom pokrovnog sustava	6
2.1.3. Mikrobiom dišnog sustava.....	8
2.2. Morske krave (razred Sirenia)	9
2.2.1. Mikrobiom probavnog sustava	9
2.3. Tuljani (podrazred Pinnipedia)	11
2.3.1. Mikrobiom probavnog sustava	11
3. MIKROBIOM MORSKIH GMAZOVA	13
3.1. Kornjače (razred Testudines).....	13
3.1.1. Mikrobiom probavnog sustava	13
3.1.2. Mikrobiom pokrovnog sustava	15
3.1.3. Mikrobiom ljuske jaja.....	15
3.2. Morska iguana (podrazred Iguania)	16
3.2.1. Mikrobiom probavnog sustava	16
4. MIKROBIOM MORSKIH RIBA HRSKAVIČNJAČA.....	17
4.1. Morski psi (nadržred Selachimorpha).....	17
4.1.1. Mikrobiom pokrovnog sustava	17
5. LITERATURA.....	18
6. SAŽETAK	24
7. SUMMARY	24

1. UVOD

Simbiotske interakcije imaju veliku ekološku ulogu (Doane i sur. 2017), a višestanični organizmi domaćini su brojnim mikroorganizmima (bakterijama, arhejama, virusima i piko-eukariotima) koji se zajedno nazvaju mikrobiota (mikrobiom) (Ursell i sur. 2012). Simbiotski mikroorganizmi ključni su za zdravlje domaćina u više aspekata: opskrba hranjivim tvarima, uspješan rast i razvoj te otpornost na bolesti (Doane i sur. 2017).

Posljednjih godina sve više istraživanja posvećeno je zajednicama mikroorganizama koje nastanjuju različite dijelove životinja. Pritom se sve više razjašnjava funkcionalna povezanost domaćina i pripadajućih mikroorganizama, a uveden je i novi pojam – hologenom. Hologenom označava skup gena nekog organizma i gena svih mikroorganizama kojima je on domaćin (Zilber-Rosenberg i Rosenberg, 2008). Također, važno je razlikovati dva dodatna pojma: mikrobiotu i mikrobiom. Mikrobiota se definira kao kompletni set svih mikrobnih vrsta koje žive u određenom okolišu, dok mikrobiom predstavlja ukupan genom tih mikroorganizama, odnosno set gena koji sadrži mikrobiota (Nelson i sur. 2008). U ovom seminarskom radu korišten je pojam mikrobiom kao termin za mikroorganizme prisutne u određenim organskim sustavima morskih kralježnjaka.

Omics pristup predstavlja skup analitičkih pristupa kojima se karakterizira sastav i dinamika mikrobnih zajednica bilo na razini DNA, RNA, proteina ili metabolizma. Kada se analizira DNA u nekom uzorku, radi se o metagenomskoj karakterizaciji mikrobioma (Nelson i sur. 2008.). Molekularne metode omogućuju istraživanje velikih zajednica bakterija i arheja koje se ne mogu kultivirati, čime se dobiva detaljniji uvid u mikrobni ekosustav (Glad i sur. 2010). Sekvenciranje velike protočnosti (eng. *high-throughput sequencing*) smanjivanjem trajanja i cijene analize omogućilo je veće razumijevanje raznolikosti i funkcije mikrobioma u istraživanjima provedenim u posljednjem desetljeću (Parfrey i sur. 2014).

U istraživanju mikrobioma najčešće se istražuju i uspoređuju bakterijske sekvence 16S rRNA, i to njene hipervarijabilne regije. Raznim analitičkim metodama genske sekvence 16S rRNA svrstavaju se u operativne taksonomske jedinice (eng. *operational taxonomic unit*, OTU) (Ley i sur. 2008). Kako bi se sekvence grupirale u isti OTU na razini vrste sličnost u sekvenci treba biti veća ili jednaka 97% (Nelson i sur. 2008). Iz uzetog uzorka (npr. brisa sluznice ili fecesa) prvo se ekstrahira sva genomski DNA, umnože se geni za 16S rRNA, sekvenciraju te uspoređuju i filogenetski analiziraju pomoću brojnih računalnih programa (Glad i sur. 2010).

Istraživanja eukariotskog mikrobioma su u velikom zaostatku za prokariotskim zbog toga što se metode sekvenciranja korištene u istraživanjima većinom temelje na prokariotskim sekvencama (Parfrey i sur. 2011). Unatoč tome, iz parazitoloških razloga, poznato je da su u mikrobiomu prisutni i eukariotski mikroorganizmi (Parfrey i sur. 2014). Razlika je u tome što je potrebno koristiti početnice koje ciljaju eukariotske sekvence i malom specifičnošću vežu bakterijske i arhejske sekvence. Takve su sekvence 18S rRNA (Parfrey i sur. 2014).

Zbog nedostatka provedenih istraživanja, ovaj seminarski rad ne sadrži potpuni pregled mikrobioma velikih morskih kralježnjaka, već samo djelomično iznosi podatke o sastavu mikrobioma pojedinih organskih sustava nekih predstavnika morskih sisavaca, gmazova i riba. Najmanje istražena skupina od tri nabrojane su morske ribe hrskavičnjače (morski psi i raže) jer je većina istraživanja provedena na komercijalno isplativijim i više lovljenim ribama koštunjačama.

Također, prema dostupnim literaturnim podacima, ovaj rad pokušava objasniti uloge mikroorganizama u mikrobnim zajednama i samim organizmima domaćinima. Kako bi se u budućnosti ova tema mogla jasnije prikazati, potrebno je provesti dodatna istraživanja na različitim vrstama životinja koje su izložene različitim uvjetima okoliša.

2. MIKROBIOM MORSKIH SISAVACA

Morski sisavci jedna su od najmanje istraženih skupina sisavaca u prirodi, iako se sastoje od 129 dosad poznatih vrsta raspoređenih u tri reda (Nelson i sur. 2015). Većinu vremena provode pod vodom, stoga imaju brojne fiziološke, anatomske i ekološke prilagodbe prema kojima se razlikuju od ostalih kopnenih sisavaca (Nelson i sur. 2013).

Prve bakterije koloniziraju crijeva sisavaca tijekom porođaja, odnosno prolaskom mladunca kroz porođajni kanal. Kako jedinka stari, tako se sastav njezinog probavnog sustava mijenja pod utjecajem raznih čimbenika: majčinog mlijeka, socijalne interakcije ili nasumično (Palmer i sur. 2007). Većina istraživanja mikrobioma provedena su na životinjama koje su uzgajane u kontroliranim uvjetima, uz čestu primjenu antibiotika koji značajno mijenjaju bakterijski sastav crijeva. Suprotno tome, prirodni sustavi su varijabilniji i vjerojatnije je da drugi čimbenici utječu na kolonizaciju bakterija ili odgovor samog domaćina (Nelson i sur. 2013) te su upravo zato istraživanja na životinjama u prirodnim ekosustavima od iznimne važnosti. Bakterije u probavnom sustavu sisavaca povećavaju njihov metabolički potencijal, odnosno povećavaju količinu energije dobivene razgradnjom hrane. Na taj način sisavcima je

evolucijski omogućeno zauzimanje velikog broja ekoloških niša (Ley i sur., 2008). Uz to mikrobnaj zajednica sisavaca važna je i za funkciju imunosnog sustava (Nelson i sur. 2015). Bakterije u crijevima mladunaca izazivaju primarni imunosni odgovor koji poboljšava rad imunosnog sustava (Rook i sur. 2004), a bakterije u kasnijim fazama života dodatno jačaju imunosni sustav.

Pionirska istraživanje crijevnog mikrobioma sisavaca proveli su Ley i sur. (2008) na kopnenim sisavcima na kojima su pokazali veću međusobnu sličnost mikrobioma jedinki iste vrste u odnosu na različite vrste. To je primjenjivo i za mikrobiom jedinki u prirodi i u zatočeništvu. Novija istraživanja sve više ističu da je prehrana najvažnija za funkcionalnost crijeva i da je upravo prehrana utjecala na konvergentnu evoluciju mikrobioma između filogenetski nesrodnih domaćina (Muegge i sur. 2011). Crijevni mikrobiom morskih sisavaca očito se razlikuje od mikrobioma kopnenih sisavaca: najraznolikiji sastav crijevnog mikrobioma imaju herbivorne vrste morskih sisavaca, dok karnivorne vrste morskih sisavaca imaju raznolikiji sastav crijevnog mikrobioma od kopnenih karnivora (Nelson i sur. 2013).

2.1. Kitovi (razred Cetacea)

U razred Cetacea spadaju kitovi, dupini i pliskavice. Dije se u dva podreda: kitove usane (eng. *baleen whales* ili *Mysticeti*) i kitove zubane (eng. *toothed whales* ili *Odontoceti*) (Herwig i sur. 1984).

U razdoblju kada klimatske promjene neviđenom brzinom mijenjaju uvjete života u oceanima, posebno je važno vidjeti njihov utjecaj na ključne morske vrste (Bierlich i sur. 2017). S obzirom na dugovječnost i veliku količinu hrane koju kitovi konzumiraju, oni mogu biti indikatori zdravlja morskog ekosustava (Bossart, 2011). Nedavna istraživanja pokazuju da se općenito stanje jedinke vidi u sastavu mikrobioma, a eksperimentalno je dokazana povezanost zdravlja kože i kožnog mikrobioma (Hoffmann i sur. 2014; Larsen i sur. 2010).

2.1.1. Mikrobiom probavnog sustava

Iako se kitovi danas svrstavaju u karnivore, evolucijski su se razvili iz herbivornih kopnenih četveronožaca srodnih kravama i nilskim konjima (Gatesy i sur. 2013). Kitovi usani hrane se manjim ribama i rakovima dobivenim filtracijom vode, stoga su slični kopnenim srodnim vrstama po tome što moraju prerađivati složene polisaharide. Kitovi prerađuju hitin iz egzoskeleta morskih organizama, a kopnene vrste celulozu iz biljaka i u oba slučaja im pri razgradnji pomažu bakterije u probavilu (Beier i Bertilsson. 2013; Sanders i sur. 2015).

Proučavanjem mikrobioma kitova određuje se uloga prehrane i filogenije u formiranju crijevne mikrobne zajednice.

Slično kao i kod većine kopnenih sisavaca, u crijevnom mikrobiomu kitova usana najzastupljeniji su predstavnici bakterijskih koljena Bacteroidetes i Firmicutes (Sanders i sur. 2015). Kitovi i kopneni sisavci imaju zajedničke više taksonomske jedinice poput razreda Bacteroidina i Clostridia ili roda *Treponema*, ali se u nižim taksonomskim jedinicama, točnije OTU-ima sličnosti 97%, drastično razlikuju. Prema zastupljenosti i raznolikosti, nešto manje od 90% svih grupiranih OTU-a razlikuje se u odnosu na kopnene vrste (Sanders i sur. 2015). Usporedbom sekvenci iz uzorka fecesa s poznatim sekvencama iz organizama kojima se kitovi hrane (kopepodnih račića) utvrđen je mali udio podudaranja (Sanders i sur. 2015), što je u skladu s očekivanjima. Sličnost u višim taksonomskim jedinicama, a razlika u nižim potaknula je ove znanstvenike da pokušaju odrediti povezanost crijevnog mikrobioma s metaboličkim funkcijama. Rezultati su pokazali da geni koji se odnose na karnivorni mikrobiom sudjeluju u razgradnji proteina i u procesima biosinteze, a herbivorni mikrobiom uključuje gene za metabolizam ugljika i energije te fermentaciju polisaharida. Postoji više uloga fermentacije u crijevnom mikrobiomu kitova usana. To dokazuje prisutnost gena za enzime razgradnje piruvata (međuprodukt mikrobne fermentacije), gena za enzime katalize masnih kiselina kratkih lanaca (krajnji produkti fermentacije), gena za enzime koji sudjeluju u mikrobnom putu iskorištenja viška vodika (nastaje tijekom fermentacije) te gena za metanogenezu. Zadnja uloga potvrđena je prisutstvom sekvenci bakterija iz roda *Methanomassiliicoccales* – bakterija koje su do sada isključivo pronađene u crijevima i za koje je poznato da proizvode metan (Sanders i sur. 2015).

Mikrobiom dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) koji spada u kitove zubane pokazuje veliku raznolikost te se bitno razlikuje od ostalih poznatih mikrobioma morskih i kopnenih sisavaca (Bik i sur. 2016). Upravo su Bik i sur. (2016) detektirali čak 25 koljena u uzorcima iz oralne šupljine dupina i 22 koljena mikroorganizama iz želuca. Dominantni do tada neodređeni bakterijski OTU u predželucu pripada koljenu Tenericutes i autori pretpostavljaju da je karakterističan za skupinu delfinoida (delfini i pliskavice). Dudek i sur. (2017) detektirali su i okarakterizirali predstavnike dva nova bakterijska koljena i predložili imena *Candidatus Delphibacteria* i *Candidatus Fertabacteria*. Još jedna stvar po kojoj se dupini razlikuju od ostalih sisavaca čiji je mikrobiom proučavan je ta da mikrobiom crijeva ima manju raznolikost; čak četiri puta manju u usporedbi s mikrobiomom oralne šupljine. Još jedna novost je da crijevni mikrobiom sadrži zasad neobjašnjivo mali broj bakterija iz koljena

Bacterioidetes (<1%). Ovo bakterijsko koljeno visoko je zastupljeno u crijevnom mikrobiomu većine sisavaca, kao što je opisano i u ostatku ovog seminarskog rada.

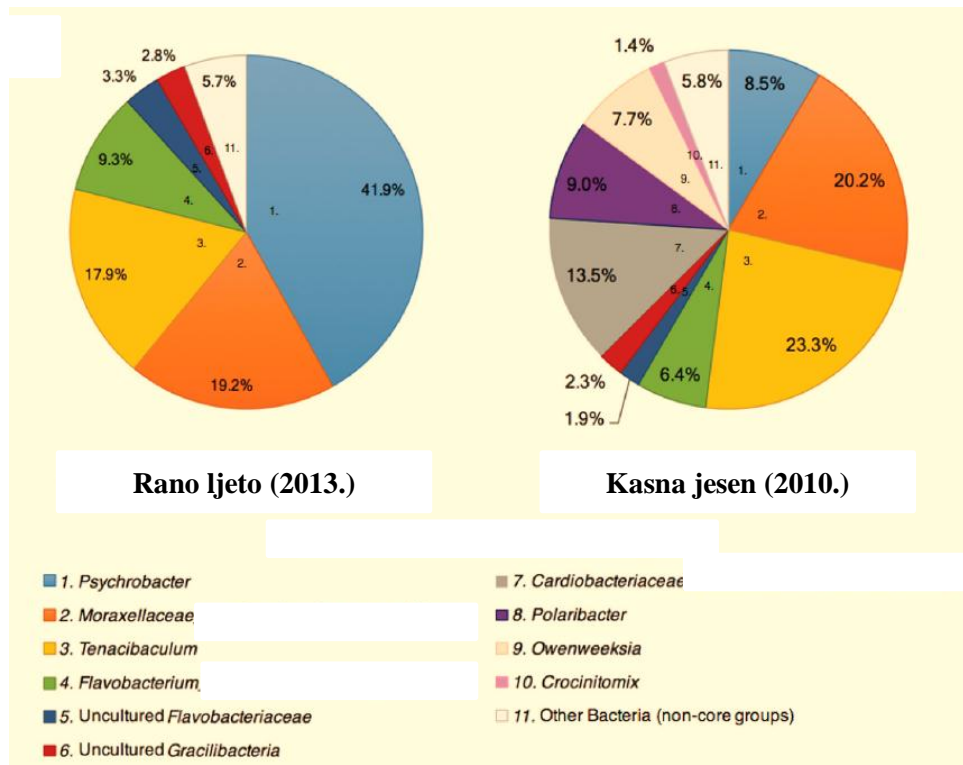
2.1.2. Mikrobiom pokrovnog sustava

Na sastav kožnog mikrobioma mogu utjecati brojni faktori: temperatura vode, pH kože, sastav lipida u epidermi, dostupnosti supstrata za rast bakterija te biofilmovi dijetomeja i ostalih epibiontskih protista koji bakterijama predstavljaju pogodno stanište. Jedno od prvih istraživanja mikroorganizama povezanih s kožom proveli su Shotts i sur. (1990) na grenlandskom glatkom kitu (*Baleana mysticetus*), i to uzgojem tkiva izoliranog s kože kita na Petrijevim zdjelicama s pogodnim medijem. U većem udjelu uzgojene su gram pozitivne bakterije rodova *Bacillus*, *Corynebacterium* i *Rhodococcus*, a gram negativne bakterije rodova *Pseudomonas*, *Moraxella* i *Acinetobacter*. Također, uzgojene su gljivice rodova *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* i *Torulopsis*. Iako se ne radi o metagenomskom istraživanju, svakako ga je važno spomenuti kao pionirsko istraživanje mikrobnih zajednica kitova usana.

Mikrobiom kože kitova usana proučavali su u svojem istraživanju Bierlich i sur. (2017). Uzorke su uzimali na području Zapadnog antarktičkog poluotoka, i to s kože grbavog kita (*Megaptera novaeangliae*). Ta je vrste zanimljiva za istraživanje jer obitava u svim oceanima i svake godine migrira na velike udaljenosti čime se koža izlaže raznim okolišnim uvjetima (Baker i sur. 1990; Bierlich i sur. 2017). Na koži grbavog kita prisutno je 50-ak različitih skupina bakterija i niti jedna skupina arheja, dakle govori se o bakterijskom mikrobiomu. Glavni rodovi iz uzoraka uzorkovanih tijekom ranog ljeta su *Psychrobacter*, *Tenacibaculum*, *Moraxellaceae*, *Flavobacterium*, *Flavobacteriaceae* i *Gracilibacteria*, a uzorci iz kasne jeseni (uz ovih šest rodova) sadrže još četiri dodatne skupine: rodove *Polaribacter*, *Owenweeksia* i *Crocinitomix* te jednog predstavnika iz porodice *Cardiobacteriaceae* (Slika 1.).

Vremenska razlika u uzorkovanju važna je kako bi se odredio utjecaj migracije i doba godine na sastav mikrobioma, no u ovom istraživanju su i različite godine uzorkovanja mogle rezultirati različitim sastavom kožnog mikrobioma. Između sezona najveću promjenu u zastupljenosti pokazuje rod *Psychrobacter*, čija je prosječna zastupljenost spala s otprilike 40% u rano ljetno na svega 8,5% u kasnoj jeseni, a kod jedinki koje su uzorkovane u oba navrata s 97% u rano ljetno na 43% u kasnoj jeseni. Nije uočena razlika u raznolikosti i zastupljenosti bakterija (iako u nekim slučajevima postoji u sastavu) između kožnih mikrobioma kitova iz različitih geografskih regija (Aprill i sur. 2014; Bierlich i sur. 2017).

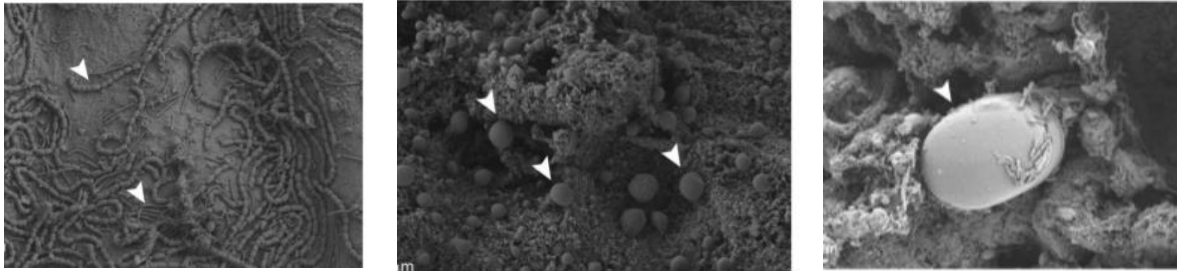
Zadnje saznanje je važno jer potvrđuje pretpostavku da filogenija ima važniju ulogu od okoliša.



Slika 1. Prosječna zastupljenost različitih bakterijskih skupina u mikrobiomu kože grbavog kita uzorkovanih u vodama oko Zapadnog antarktičkog poluotoka u dvjema različitim sezonama (rano ljeto 2013. godine i kasna jesen 2010.). Prilagođeno prema Bierlich i sur. (2017).

Aprill i sur. (2014) istraživali su mikrobiom kože grbavih kitova iz suptropskog područja (oko Havaja i Američke Samoe) te područja sjeverne polutke (oko Aljaske i u zaljevu Maine). Na koži zdravih jedinki dominirale su bakterije koljena Bacteroidetes i Gammaproteobacteria, a mnogi uzorci sadržavali su i bakterije koljena Firmicutes i Alphaproteobacteria. Dva roda, *Tenacibaculum* (Bacteroidetes) i *Psychrobacter* (Gammaproteobacteria) čine 55-75% ukupnog mikrobioma kože. Za vrijeme uzorkovanja, životinje u području Američke Samoe i Havaja nisu se aktivno hranile, stoga je njihov metabolizam bio u kataboličkom stanju koje karakterizira smanjen popravak i obnavljanje stanica kože te manja proizvodnja stanica imunskog sustava. Životinje oko Aljaske i Zaljeva Maine uzorkovane su za vrijeme hranjenja te je njihov metabolizam bio u anaboličkom stanju. Razlika u metaboličkim stanjima životinja uzrokovala je promjenu u sastavu bakterija na koži, vidljivu u različitim udjelima različitih varijanti sekvenci spomenutih rodova. Uzorci kože koji nisu poslužili za ekstrakciju DNA, proučeni su pod mikroskopom (Slika 2.). Dakle,

u oba istraživanja, najzastupljenija su dva roda (*Tenacibaculum* i *Psychrobacter*) te je zaključeno da su upravo ta dva roda kosmopolitska i karakteristična za sve grbave kitove.



Slika 2. Uzorci kože grbavog kita snimljeni skenirajućim elektronskim mikroskopom. Strelice pokazuju moguće bakterijske stanice. Prilagođeno prema Aprill i sur. (2014).

Rod *Psychrobacter* karakterističan je za mnoge morske organizme, a pripadnici tog roda mogu podnijeti ekstremno niske temperature (Bakermans i Neelson, 2004.). Moguće je da bakterije u skladu s promjenom temperature mijenjaju sastav membrana te sintetiziraju i u membranu ugrađuju proteine hladnog šoka (Ayala i sur. 2010). S obzirom da su grbavi kitovi tijekom godine izloženi velikom temperaturnom rasponu (5-25°C), to bakterijama daje prednost u preživljavanju ekstremnih uvjeta i osigurava veću zastupljenost u mikrobiomu (Aprill i sur. 2014).

Bakterije roda *Tenacibaculum* u nekim su istraživanjima pronađene kod bolesnih morskih i slatkovodnih riba (Bernardet i Nakagawa, 2006), no svi kitovi s čije kože su uzorkovane te bakterije izgledali su zdravo prema svim protokolima analize zdravlja na terenu (Bierlich i sur. 2017). Moguće je da ove bakterije proizvodnjom antibiotika sprečavaju kolonizaciju drugih patogenih bakterija na koži čime se osigurava stabilnost mikrobioma kože (Harrison i Thurley, 1974).

2.1.3. Mikrobiom dišnog sustava

Kada je riječ o bolestima kitova, dišni sustav je često mjesto infekcije (Venn-Watson i sur. 2012) te mikroorganizmi prisutni u izdahu kitova (eng. *blow*) služe kao indikator zdravlja dišnog sustava i omogućuju identifikaciju potencijalnih bakterijskih, virusnih ili gljivičnih patogena (Aprill i sur. 2017). U svojem su istraživanju Aprill i sur. (2017) u blizini obale SAD-a uz pomoć drona skupljali tekućinu koju su grbavi kitovi izdisali pri izronu i uzorke usporedili s bakterijskim i arhejskim sekvencama. Raznolikost mikroorganizama u uzorcima bila je velika, s 15 različitih koljena bakterija i dva koljena arheja. Glavna koljena bila su:

Actinobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Epsilonproteobacteria i Fusobacteria. U uzorcima nije detektiran niti jedan poznati potencijalni patogen dišnog sustava sisavaca.

Orka (*Orcinus orca*) jedna je od najraširenijih vrsta morskih sisavaca. Ravery i sur. (2017) istražili su mikroorganizme dišnog sustava ove vrste, no samo one koje je bilo moguće uzgojiti, vizualizirati bojanjem po Gramu ili detektirati PCR-om. Najviše bakterija bilo je iz porodica *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae* i *Vibrionaceae*. Detektirane su i gljivice iz porodica *Pleosporaceae* i *Davidiellaceae*.

2.2. Morske krave (razred Sirenia)

Morske krave jedini su vodeni herbivorni sisavci, a dijele se na dvije porodice: dugonge s jednom vrstom kao predstavnikom i lamantine s tri predstavnika (Kanelos i sur. 2014). Kao preživljači imaju specijalizirana crijeva za dobivanje energije iz biljnog materijala, u čemu im pomažu simbiotske bakterije u crijevima, stoga je karakterizacija crijevnog mikrobioma važna za razumijevanje ove skupine životinja (Suzuki i sur. 2019). U nekoliko radova opisan je crijevni mikrobiom jedine vrste dugonga (*Dugong dugong*) te jedinih dviju podvrsta zapadnoindijskog lamantina (*Trichechus manatus*): floridski lamantin (*Trichechus manatus latirostris*) i antilski lamantin (*Trichechus manatus manatus*). Cijela skupina i dalje ostaje uvelike neistražena.

2.2.1. Mikrobiom probavnog sustava

U uzorcima fecesa floridskog lamantina dominantna koljena bakterija su Firmicutes (s udjelom od 77%) i Bacterioidetes (udjela otprilike 20%), dominantni su redovi Bacterioidales i Clostridiales, a dominantan rod je rod *Clostridium*. Druga prisutna koljena su: Actinobacteria, Proteobacteria, Fibrobacteria, Tenericutes, Spirochaetes i Fusobacteria (Merson i sur. 2014). U istraživanju Merson i sur. (2014) 23 OTU-a određeno je kao glavne jedinice (s prisutnošću u više od 95% uzoraka). OTU kojima je bilo moguće odrediti rodove uključivali su rodove: *Adlercreutzia*, *Bacteriodes*, *Butyrivibrio*, *Caloramator*, *Cellulosilyticum*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* i *Sedimentibacter*. Usporedbom sekvence najviše zastupljenog OTU-a sa sekvencama u postojećim bazama, dobiveno je da je najbližnja bakteriji *Clostridium glycolicum*, reduktivnoj bakteriji iz sivih i crvenih klockana koja reduktivnom acetogenezom iz vodika i ugljika stvara acetat koji domaćin koristi kao izvor energije (Merson i sur. 2014; Ouwkerk i sur. 2009). Moguće je da ova vrsta kao dominantna bakterijska vrsta u crijevima floridskog lamantina smanjuje emisiju metana

dobivenog fermentacijom biljnog materijala. Drugi najzastupljeniji OTU u uzorku imao je 100%-tnu podudarnost sa sekvencom vrste *Clostridium butyricum*. Usporedbom OTU-a iz lamantina s OTU-ima drugih skupina životinja, najveća je sličnost s ostalim herbivorima: crvenim klokanom, afričkim slonom i konjem (Merson i sur. 2014).

Crijevni mikrobiom antilskog lamantina okarakteriziran je na jedinkama koje žive u zatočeništvu. U istraživanju Suzuki i sur. (2019) rezultati su uspoređeni s prethodno opisanim istraživanjem crijevnog mikrobioma floridskog lamantina iz divljine. Naime, njihova prehrana u zatočeništvu uključuje primjerice kupus, tikvicu i mrkvu te se razlikuje od prehrane u divljini koja uključuje slatkovodno i morsko bilje, stoga je moguće da zatočeništvo utječe na crijevni mikrobiom. Određeno je preko tisuću OTU-a svrstanih u 16 bakterijskih koljena poredanih prema zastupljenosti: Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Proteobacteria, Lentisphaerae, Kiritimatiellaeota, Synergistetes, Spirochaetes, Cyanobacteria, Tenericutes, Epsilonbacteraeota, Planctomycetes, Fibrobacteres, Fusobacteria, Acidobacteria. Koljeno Firmicutes dominira zastupljenošću od otprilike 85%, Bacteroidetes ima mnogo manju zastupljenost od otprilike 9%, dok sva ostala koljena imaju mnogo nižu zastupljenost. Najzastupljeniji rodovi su *Akkermansia*, *Cellulosilyticum*, *Christensenella*, *Clostridium*, *Eubacterium* i *Terrisporobacter*. Prisutni rodovi *Terrisporobacter* i *Cellulosilyticum*, oba iz koljena Firmicutes, mogu hidrolizirati i fermentirati celulozu i produkt razgradnje celuloze; celobiozu, a vrste rodova *Eubacterium* i *Clostridium* dehidroksiliraju brojne kiseline i olakšavaju unos i razgradnju lipida (Suzuki i sur. 2019).

Sumarno, dvostruko veći broj bakterijskih koljena okarakteriziran je u uzorcima fecesa antilskog lamantina u zatočeništvu u odnosu na floridskog lamantina iz divljine, a i prema sastavu rodova ove dvije skupine se razlikuju. Ove razlike ukazuju i potvrđuju da zatočeništvo, ponajviše prehrana, utječu na sastav crijevnog mikrobioma (Nelson i sur. 2013, Suzuki i sur. 2019)

Eigeland i sur. (2012) proveli su istraživanje crijevnog mikrobioma dviju jedinki dugonga iz zatočeništva (na cijeloj Zemlji u zatočeništvu ih ima manje od deset) i više od 200 jedinki iz divljine. Dominantna koljena u obje skupine su Firmicutes i Bacteroidetes, a slijede ih Actinobacteria i Proteobacteria. Dominantni rodovi su: *Roseburia*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Sedimentibacter*, i *Ruminococcus*. Sastav crijevnog mikrobioma jedinki u zatočeništvu pokazao je manju kompleksnost u usporedbi s onima u divljini. Razlog tomu vjerojatno je hranjenje mladunaca mliječnom formulom jer su obje jedinke u zatočeništvu ostale bez majke

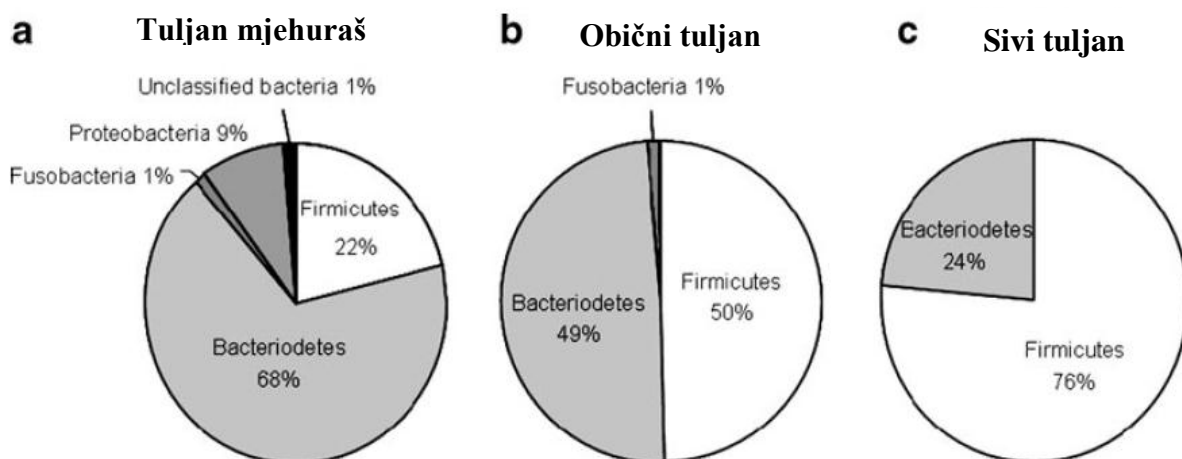
u prvom do trećem tjednu života, drugačija prehrana u kasnijim životnim stadijima i primjena antibiotika.

2.3. Tuljani (podrazred Pinnipedia)

Tuljani su karnivorne životinje koje dio života provode na kopnu, a dio u vodi. Istraživanja mikrobioma provedena na tuljanima najviše su obuhvaćala istraživanja crijevnog mikrobioma, a kako su u različitim radovima odabrani ili tuljani sjeverne ili južne polutke, tako su opisani i u ovom pregledu.

2.3.1. Mikrobiom probavnog sustava

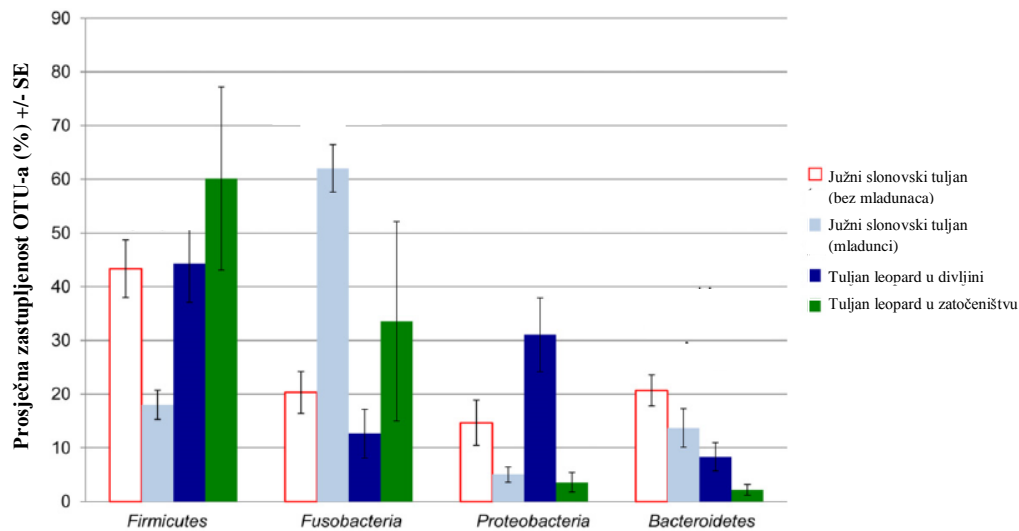
Mikrobiom oralne šupljine i ostatka probavnog sustava tuljana sličnog je sastava kada se promatra raspodjela viših i nižih taksonomskih jedinica (Bik i sur. 2016). U svom istraživanju Glad i sur. (2010) istražili su mikrobiom crijeva više vrsta tuljana na sjevernoj polutci, točnije na Arktiku te na obalama Atlantskog oceana i Baltičkog mora: tuljana mjehurša (*Cryosthophora cristata*), običnog tuljana (*Phoca vitulina*) i sivog tuljana (*Halichoerus grypus*). Najzastupljenija bakterijska koljena bila su: Bacterioidetes, Firmicutes, Proteobacteria te Fusobacteria. Pritom uzorci običnog i sivog tuljana nisu sadržavali niti jednog predstavnika Proteobacteria, a dodatno su u uzorcima sivog tuljana izostali i predstavnici Fusobacteria (Slika 3.). Nažalost, zbog malog broja uzorkovanih jedinki u ovom istraživanju nije bilo moguće provesti direktnu usporedbu između vrsta.



Slika 3. Zastupljenost sekvenci različitih koljena bakterija u uzorcima fecesa tuljana sjeverne polutke: a) tuljana mjehurša, b) običnog tuljana, c) sivog tuljana. Prilagođeno prema Glad i sur. (2010).

Nelson i sur. (2013) istražili su crijevni mikrobiom dviju filogenetski sličnih vrsta tuljana koji žive na južnoj polutci, točnije na Antarktici: južnog slonovskog tuljana (*Mirouga*

leonina) i tuljana leoparda (*Hydrurga leptonyx*). Rezultate su usporedili s rezultatima dobivenim uzorkovanjem fecesa tuljana leoparda držanog u zoološkom vrtu kako bi uvidjeli utjecaj zatočeništa na sastav crijevnog mikrobioma. Rezultati su pokazali da tuljan u zatočeništvu ima najbogatiji sastav crijevnog mikrobioma. Također, južni slonovski tuljan uzorkovan je u različitim dobnim skupinama kako bi se vidio utjecaj laktacije i starenja domaćina na sastav mikrobioma. Starije jedinice imale su općenito bogatiji sastav crijevnog mikrobioma u usporedbi s uzorcima mladunaca, a mikrobiom majki i mladunaca podudara se u 20-ak OTU-a. Dominantna koljena bakterija u uzorcima i u ovom istraživanju, kao i u onom prethodno opisanom bili su Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria i Bacteroidetes. Ipak, njihova zastupljenost ovisila je o vrsti domaćina (Slika 4.). Zanimljivo je da su mladunci južnog slonovskog tuljana imali mnogo veći udio bakterija koljena Fusobacteria u odnosu na sve ostale skupine. Divlji tuljani leopardi ističu se velikim udjelom Proteobacteria, a južni slonovski tuljan velikim udjelom OTU iz koljena Bacteroidetes.



Slika 4. Prosječna relativna zastupljenost bakterijskih koljena i OTU-a za svako koljeno u crijevnom mikrobiomu tuljana južne polutke: južnog slonovskog tuljana i tuljana leoparda. Južni slonovski tuljani podijeljeni su u dvije skupine: odrasle jedinice i mladunce. Tuljan leopard uzorkovan je u divljini i u zatočeništvu. Prikazane su i standardne devijacije (SE). Prilagođeno prema Nelson i sur. (2012).

Značajna razlika u sastavu mikrobioma filogenetski sličnih vrsta koje žive na istom staništu sugerira da na kolonizaciju crijeva djeluju nasumični čimbenici tijekom cijelog života, posebice različita prehrana jer se koljena bakterija u crijevima mogu točno povezati s izvorom hrane koju pojedina vrsta konzumira (Nelson i sur. 2013). U ovom istraživanju pokazan je i utjecaj socijalne interakcije na mikrobiom domaćina. Kao što je već rečeno, južni

slonovski tuljan ima veću raznolikost crijevnog mikrobioma u odnosu na tuljana leoparda. To se može objasniti razlikom u količini socijalizacije – južni slonovski tuljani veći dio svog vremena provode u skupinama 10-100 jedinki, dok je tuljan leopard u interakciji s drugim jedinkama samo tijekom sezone parenja i tijekom odgoja mladunaca u slučaju majki tuljana.

Kada bi se napravio presjek oba istraživanja, glavne skupine mikroorganizama u sastavu crijevnog mikrobioma tuljana uključuju rodove *Ilyobacter*, *Psychrilyobacter*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Subdoligranulum*, *Sporobacter*, *Sutterella*, *Weisella*, *Anaerococcus* i *Campylobacter* (Nelson i sur. 2015).

3. MIKROBIOM MORSKIH GMAZOVA

Od više od 12 000 danas živućih gmazova, njih manje od 100 živi u slanim vodama: sedam vrsta morskih kornjača, 80-ak vrsta morskih zmija, jedna vrsta krokodila i vrsta morske iguane Galapagoskog otočja (Rasmussen i sur. 2011).

Na mikrobiom životinja kao što je spomenuto utječe socijalizacija, odnosno interakcije s roditeljima, interakcije između odraslih jedinki i interakcije s okolišem (Price i sur. 2017). Količina socijalizacije ovisi o skupini životinja: primjerice, sisavci imaju ekstenzivniji postnatalni kontakt s majkom u usporedbi s gmazovima (Price i sur. 2017), stoga u gmazova izostaje vertikalni prijenos mikrobioma s roditelja na potomka. U tom slučaju, prehrana i okoliš vjerojatno imaju najveći utjecaj na razvoj crijevnog mikrobioma u ranim stadijima života (Price i sur. 2017). Neki gmazovi konzumiraju feces odraslih jedinki svoje vrste ili tlo na mjestu izlijevanja (Troyer, 1984) i na taj način u svoj probavni sustav unose prve mikroorganizme.

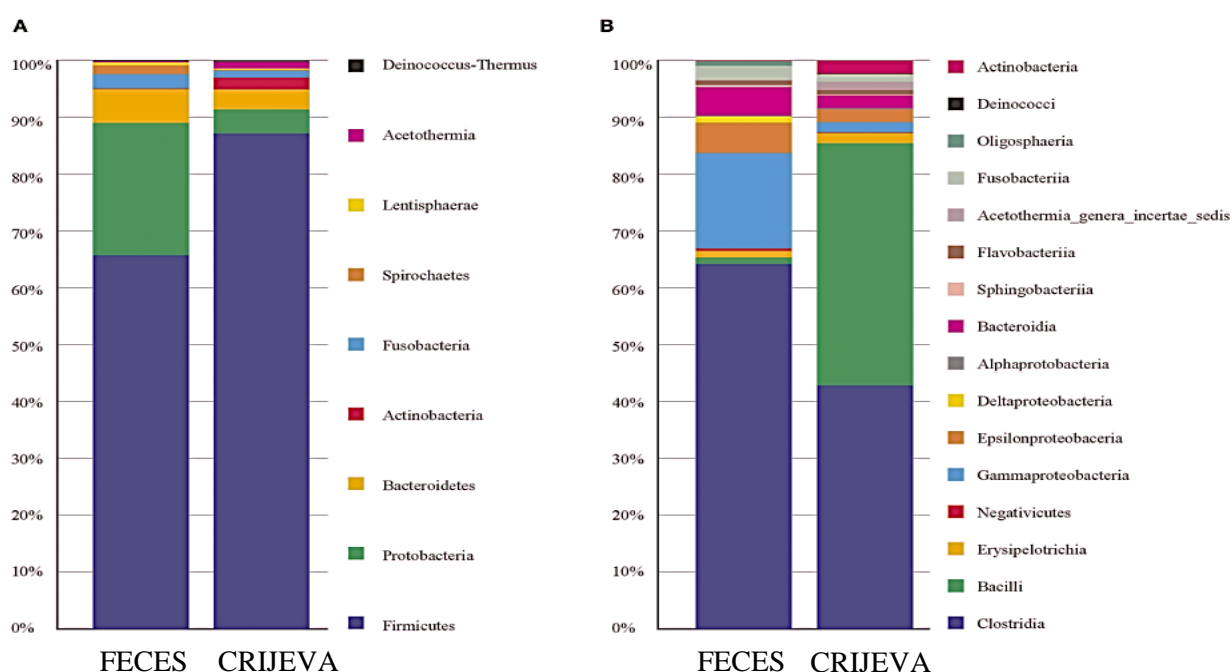
3.1. Kornjače (razred Testudines)

3.1.1. Mikrobiom probavnog sustava

Zelena morska kornjača (*Chaelonia mydas*) fakultativni je preživlač (Bjorndal, 1979). Prvih tri do šest godina života obitava u pelagičkoj (oceanskoj) zoni, a potom prelazi u neritičku (priobalnu) zonu. Pritom prolazi ontogenetičku promjenu s omnivornog na herbivorni način života (Arthur i sur. 2014). Price i sur. (2017) u svojem istraživanju uzimali su uzorke fecesa i brisa kloake ove vrste kornjača iz različitih dijelova Meksičkog zaljeva. Najzastupljenija bakterijska koljena bila su Proteobacteria, Bacteroidetes i Firmicutes. Koljeno Bacteroidetes zastupaju rodovi *Bacteroides*, *Paludibacter* i *Tenacibaculum*. Koljeno

Firmicutes gotovo u potpunosti čine pripadnici razreda Clostridia za koje je poznato da metaboliziraju kompleksne ugljikohidrate poput celuloze i za koje je moguće da se u zelenim morskim kornjačama specijaliziraju pri prijelazu s omnivorne na herbivornu prehranu. Iz koljena Gammaproteobacteria najzastupljenije su porodice *Moraxellaceae* i *Shewanellaceae*. Pripadnici *Shewanellaceae* karakteristični su za alge roda *Sargassum* kojima se kornjače hrane (Witherington i sur. 2012). Dakle, mikrobiom zelenih kornjača mijenja se tijekom života kako jedinka mijenja stanište i način prehrane (Price i sur. 2017).

Glavata želva (*Caretta caretta L.*) široko je rasprostranjena vrsta morskih kornjača koja živi na području Mediterana, Tihog, Indijskog i Atlantskog oceana (Abdelrahm i sur. 2016). Abdelrhman i sur. (2016) uzorkovali su fecese živih i crijeva mrtvih glavatih želvi na zapadnoj obali Italije. U uzorcima fecesa dominirala su koljena Firmicutes (66%), Proteobacteria (23%) i Bacteroidetes (6,2%) (Slika 5.). U koljenu Firmicutes, najbrojniji je razred Clostridia. U uzorcima crijeva dominiraju također koljena Firmicutes (87%), Proteobacteria (4,2%) i Bacteroidetes (3,4%). U ovom slučaju, u koljenu Firmicutes, uz razred Clostridia (43%), podjednako su bili prisutni i predstavnici razreda Bacili (42,5%) kojeg je u potpunosti sačinjavao red Lactobacillales. Najzastupljenija koljena u glavatih želvi (Firmicutes i Bacteroidetes) također su najbrojnija koljena u čovjeka (Ley i sur. 2008), kao i kod ostalih kopnenih kralježnjaka (Costello i sur. 2010). U tom radu ispitana je razlika između mikrobioma fecesa i crijeva. Rezultati pokazuju da je u crijevima prisutno više pripadnika roda *Vagococcus* i *Robinsoniella*.



Slika 5. Sastav mikrobioma fecesa i crijeva glavate želve prikazan na različitim taksonomskim razinama: A) Na razini koljena, B) Na razini razreda. Prilagođeno prema Abdelrhman i sur. (2016).

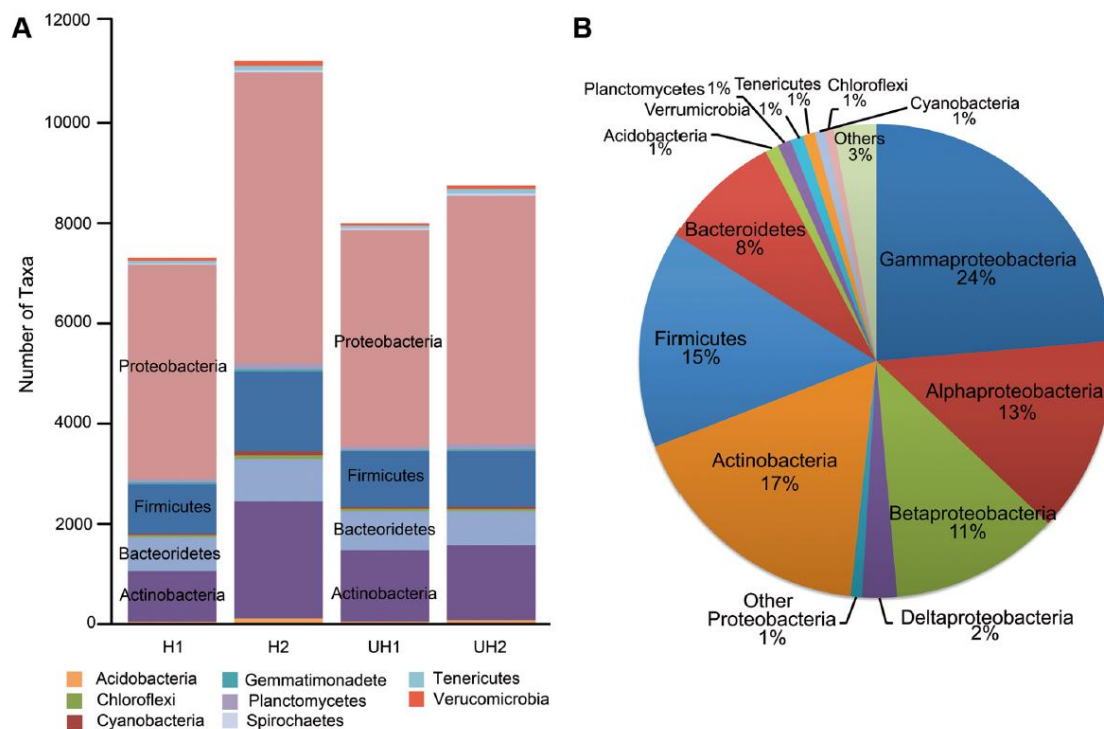
3.1.2. Mikrobiom pokrovnog sustava

Mikroepibiont predstavlja skupinu organizama koji žive na površini nekog većeg organizma, no do danas nema objavljenih prokariotskih metagenomskih istraživanja kože ni oklopa morskih kornjača. Jedino objavljeno metagenomsko istraživanje proveli su Rivera i sur. (2018), a u istraživanju je analiziran eukariotski mikroepibiont oklopa kornjača te je utvrđeno da su u uzorcima najzastupljenije dijatomeje. U svim ostalim objavljenim istraživanjima dijatomeja vrste su većinom određivane mikroskopski (Majewska i sur. 2015), no kako takva istraživanja ne daju ukupnu sliku mikrobioma, u ovom seminarskom radu se ne opisuju. S ciljem dobivanja šire slike, razvijeno je metabarkodiranje, metoda koja objedinjuje molekularne metode DNA barkodiranja sa sekvenciranjem visoke protočnosti (Rivera i sur. 2018). Istraživanja takve vrste za sada su malobrojna, a jedno od njih je istraživanje Rivera i sur. (2018). Oni su mikroskopskom analizom odredili 57 taksona dijatomeja s oklopa zelenih morskih kornjača. Najzastupljeniji je rod *Labellicula* (vrsta *Labellicula lecohuiana*) te vrste *Nitzschia inconspicua* i *Halamphora tenerrima* (široko rasprostranjene bentičke vrste). Metabarkodiranjem i klasteriranjem dobivena su ukupno 634 OTU-a, s otprilike 280 OTU-a po uzorku. Polovica OTU-a određena je samo do razine razreda (Bacillariophyceae, Coscinodiscophyceae, Fragilariophyceae ili Mediophyceae). Također, metabarkodiranjem samo mali postotak OTU-a određen je do razine vrste. Rezultati mikroskopske analize i metabarkodiranja različiti su i neusporedivi jer se mikroskopski i žive i mrtve dijatomeje karakteriziraju na temelju kostura od silicija, a metabarkodiranje detektira samo žive stanice.

3.1.3. Mikrobiom ljuske jaja

Morske kornjače jedna su od najugroženijih skupina životinja, a najveći uzrok tomu su nepristupačnost i onečišćenje plaža za njihovo gnježđenje, kao i bolesti koje uzrokuju smanjenje populacija. Sarmiento-Ramirez i sur. (2014) istražili su mikrobiom jaja karetno želve (*Eretmochelys imbricate*) zaražena gljivicama roda *Fusarium*. Zbog zaštićenosti vrste, dobivena je dozvola uzorkovanje samo četiriju jaja, no i to je bilo dovoljno za dobivanje početnog uvida u njihov mikrobiom. Prvo su odredili bakterijski sastav mikrobioma, potom ciljano izolirali i uzgojili specifične bakterijske rodove kako bi odredili djelovanje bakterija na infekcije patogenim gljivicama. U uzorcima je bilo prisutno preko 16 000 OTU-a, od kojih je nešto više od 50% bilo bakterija iz koljena Proteobacteria te značajno manje iz koljena Actinobacteria, Firmicutes i Bacteroidetes (Slika 6.B). Bakterije koljena Actinobacteria imaju antibakterijsko i antifungalno djelovanje (Godfellow i Fiedler, 2010) te je u istraživanju otprilike 30% nasumično izoliranih bakterija ovog koljena (rodova *Streptomyces*,

Amycolatopsis, *Micromonospora*, *Plantactinospora*, *Solvaraspora*), inhibiralo rast gljivica *Fusarium*. Nema značajne razlike između izlegnutih i neizlegnutih jaja niti između dva gnijezda iz kojih su jaja uzorkovana (Slika 6.A).



Slika 6. Sastav mikrobioma ljuski jajeta karetne želve: A) Broj OTU-a po koljenu detektiran u ljuski izlegnutog (H) i neizlegnutog (UH) jaja iz dva različita gnijezda, B) Prosječna raspodjela OTU-a u svim uzorcima. Prilagođeno prema Sarmiento-Ramirez i sur. (2014).

3.2. Morska iguana (podrazred Iguania)

Gušteri su najbrojnija skupina gmazova, a iguana s Galapagosa (*Amblyrhynchus cristatus*), iako se razmnožava na kopnu, odlično je prilagođena životu u moru (Rasmussen i sur. 2011). Jedina je vrsta koja se primarno hrani makrofitnim morskim algama (Sheperd i Hawkes, 2005), a razliku u prehrani kopnenih iguana i morske iguane uočio je čak i Darwin (1835) proučavanjem sadržaja želuca različitih vrsta iguana koje žive na Galapagosu. Razlika u načinu prehrane, kao i u slučaju drugih skupina životinja, utječe na razliku u crijevnom mikrobiomu (Ley i sur. 2008).

3.2.1. Mikrobiom probavnog sustava

Hong i sur. (2011) uzorkovali su feces morske iguane i rezultate usporedili s dvjema kopnenim vrstama iguana. U svim uzorcima prevladavali su bakterijski geni, dok su arheje u malom postotku pronađene kod kopnenih, ali ne i morskih iguana. I u ovom slučaju najviše su

zastupljene bakterije koljena Firmicutes i Bacteroidetes, dok veliki udio bakterija uopće nije bilo moguće svrstati niti u jedno koljeno. Bakterije iz ova dva koljena razgrađuju celulozu, hemicelulozu i pektin na heksoze i pentoze koje se dalje razgrađuju uz oslobađanje energije (Hong i sur. 2011). Iako su kopnene i morske iguane nastale od zajedničkog pretka, crijevni mikrobiom morskih iguana poprilično se razlikuje od ostalih herbivornih kopnenih guštera. Razlika je najveća u zastupljenosti bakterija *Lachnospiraceae* i *Clostridiaceae* (zastupljenije u uzorcima morskih iguana) te *Ruminococcaceae* (zastupljenije u uzorcima kopnenih iguana). Makrofitske alge sadrže razne polisaharide koji sadrže sulfatne skupine. Bakterije roda *Bacteroides* hidroliziraju razne polisaharide, a poznata bakterija *B. plebieus* sadrži beta-agaraze i beta-porfiranaze, enzime koji razgrađuju algalne polisaharide. Veći udio bakterija ovog roda u fecesu morskih iguana omogućuje im dobivanje energije iz morskih algi – jedine razlike u prehrani kopnenih i morskih iguana.

4. MIKROBIOM MORSKIH RIBA HRSKAVIČNJAČA

4.1. Morski psi (nadržred Selachimorpha)

4.1.1. Mikrobiom pokrovnog sustava

Kožni mukus (sluz) kompleksan je kemijski spoj koji se sastoji od mucina i O-vezanih glikana, a proizvode ga stanice epiderme. Ribe hrskavičnjače, za razliku od koštunjača, imaju tanak sloj sluzi na koži (Doane i sur. 2017). Kod morskih pasa u divljini primijećene su brojne otvorene rane koje brzo zacijeljuju i rijetko podliježu infekcijama. Doane i sur. (2017) istražili su mikrobiom kože morskog psa lisice (*Alopias vulpius*) i dobili sljedeće rezultate: dominantno koljeno bilo je Proteobacteria (80-90%), a drugo najzastupljenije Bacteroidetes (4-14%). Sva ostala koljena (Planotomycetes, Actinobacteria) bila su prisutna u udjelu manjem od 1%. Najzastupljeniji bakterije su sve pripadnici Proteobacteria, točnije rodovi *Pseudoalteromonas*, *Erythrobacter*, *Idiomarina*, *Limnobacter* i *Marinobacter*. Mikrobiom morskog psa se razlikuje od mikrobioma okolne vode u nekoliko rodova, i to s ukupnim udjelom većim od 40%. To su rodovi: *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Alteromonas*, *Erythrobacter*, *Sphingopyxis* i *Limnobacter*. Bakterije roda *Pseudoalteromonas* sintetiziraju antimikrobne spojeve, a bakterije roda *Erythrobacter* provode fotosintezu čije produkte koriste i druge bakterije u mikrobiomu. Morski psi bioakumuliraju teške metale, stoga su za mikrobiom važne bakterije roda *Idiomarina* koje provode detoksifikaciju teških metala. Bakterije roda *Marinobacter*, četvrtog

najzastupljenijeg roda, razgrađuju ugljikovodike i sintetiziraju lipopolisaharide važne za pravilan imunski odgovor morskih pasa. Općenito, više su eksprimirani bakterijski geni koji sudjeluju u virulenciji, bolesti i obrani (1), pokretljivosti i kemotaksiji (2), metabolizmu željeza (3) i membranskom transportu (4). Također, Doane i sur. (2017) predložili su da tri selektivna uvjeta najviše utječu na sastav mikrobioma: tekstura površine kože, smanjena hidrodinamika vode i antimikrobna svojstva mukusa.

5. LITERATURA

Abdelrhman K. F. A., Bacci G., Mancusi C., Mengoni A., Serena F. Ugolini A., 2016. A First Insight into the Gut Microbiota of the Sea Turtle *Caretta caretta*, *Frontiers in Microbiology*, 7:1060.

Apprill A., Miller C. A., Moore M. J., Durban J. W., Fearnbach H., Barrett-Lennard L. G., 2017. Extensive Core Microbiome in Drone-captured Whale Blow Supports a Framework for Health Monitoring, *mSystems*, 2:e00119-17.

Apprill A., Robbins J., Eren A. M., Pack A. A., Reveillaud J., David M., Michael M., Niemeyer M., Moore K. M. T., Mincer T. J., 2014. Humpback Whale Populations Share a Core Skin Bacterial Community: Towards a Health Index for Marine Mammals?, *PLoS ONE*, 9(3): e90785.

Arthur K. E., Kelez S., Larsen T., Choy A. C., Popp B. N., 2014. Tracing the Biosynthetic Source of Essential Amino Acids in Marine Turtles Using d13C Fingerprints, *Ecology*, 85(5): 1285-1293.

Ayala-del-Río H. L., Chain P. S., Grzymiski J. J., Ponder M. A., Ivanova N., Bergholz P. W., Di Bartolo G., Hauser L., Land M., Bakermans C., Rodrigues D., Klappenbach J., Zarka D., Larimer F., Richardson P., Murray A., Thomashow M., Tiedje J. M., 2010. The Genome Sequence of *Psychrobacter arcticus* 273-4, a Psychroactive Siberian Permafrost Bacterium, Reveals Mechanisms for Adaptation to Low-temperature Growth, *Applied Environmental Microbiology*, 76(7): 2304-12.

Baker C. S., Palumbi S. R., Lambertsen R. H., Weinrich M. T., Calambokidis J., O'Brien S. J., 1990. Influence of Seasonal Migration on Geographic Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in Humpback Whales, *Nature*, 344:500.

- Bakermans C., Neelson K. H., 2004. Relationship of Critical Temperature to Macromolecular Synthesis and Growth Yield in *Psychrobacter cryopegella*, *Journal of Bacteriology*, 186: 2340-2345.
- Beier S., Bertilsson S., 2013. Bacterial Chitin Degradation-mechanisms and Ecophysiological Strategies, *Frontiers in Microbiology*, 4: 149.
- Bernardet J. F., Nakagawa Y., 2006. An Introduction to the Family *Flavobacteriaceae*, Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (ed), *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses, Deeply Rooting Bacteria*, Springer-Verlag New York, New York, NY, 7: 455–480.
- Bierlich K. C., Miller C., DeForce E., Friedlaender A. S., Johnston D. W., Apprilla A., 2017. Temporal and Regional Variability in the Skin Microbiome of Humpback Whales along the Western Antarctic Peninsula, *Environmental Microbiology*, 84(5): e02574-17.
- Bik E. M., Costello E. K., Switzer A. D., Callahan B. J., Holmes S. P., Wells R. S., Carlin K. P., Jensen E. D., Venn-Watson S., Relman D. A., 2017. Marine Mammals Harbor Unique Microbiotas Shaped by and yet Distinct from the Sea, *Nature Communications*, 7: 10516.
- Bjorndal K. A., 1979. Cellulose Digestion and Volatile Fatty-acid Production in the Green Turtle, *Chelonia-mydas*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 63:127–133.
- Bossart G.D., 2011. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health, *Veterinary Pathology*, 48:676-690.
- Costello E. K., Gordon J. I., Secor S. M., Knight, R., 2010. Postprandial Remodeling of the Gut Microbiota in Burmese Pythons, *The ISME Journal*, 4: 1375–1385.
- Darwin C., Browne J., Neve M. (ed), 1835. *The Voyage of the Beagle: Charles Darwin's Journal of Researches*. Penguin: London, UK (skraćeno izdanje, 1989).
- Doane M. P., Haggerty J. M., Kacev D., Papudeshi B., Dinsdale E. A., 2017. The Skin Microbiome of the Common Thresher Shark (*Alopias vulpinus*) Has Low Taxonomic and Gene Function β -diversity, *Environmental Microbiology Reports*, 9(4): 357-372.

- Dudek N. K., Sun C. L., Burstein D., Kantor R. S., Aliaga Goltsman D. S., Bik E. M., Thomas B. C., Banfield J. F., Relman D. A., 2017. Novel Microbial Diversity and Functional Potential in the Marine Mammal Oral Microbiome, *Current Biology*, 27: 1-11.
- Eigeland K., Lanyon J., Trott D., Ouwerkerk D., Blanshard W., Milinovich G., Gulino L., Martinez E., Merson S., Klieve, A., 2012. Bacterial Community Structure in the Hindgut of Wild and Captive Dugongs (*Dugong dugon*), *Aquatic Mammals*, 38(4): 402-411.
- Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T., 2015. Gammaproteobacteria Class, *Bergey's Manual® of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons, Inc.
- Gatesy J., Geisler J. H., Chang J., Buell C., Berta A., Meredith R. W., Springer M. S., McGowen M. R., 2013. A Phylogenetic Blueprint for a Modern Whale, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(2): 479-506.
- Glad T., Kristiansen V. F., Nielsen K. M., Brusetti L., Wright A.-D. G., Sundse M. A., 2010. Ecological Characterisation of the Colonic Microbiota in Arctic and Sub-Arctic Seals, *Microbial Ecology*, 60: 320-330.
- Goodfellow M., Fiedler H. P., 2010. A Guide to Successful Bioprospecting: Informed by Actinobacterial Systematics, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98: 119-142.
- Harrison R. J., Thurley K. W., 1974. Structure of the Epidermis in *Tursiops*, *Delphinus* and *Phocoena*. Harrison R. J. (ed), *Functional Anatomy of Marine Mammals*, London and New York: Academic Press, 45–71.
- Herwig R. P., Staley J. T., Nerini M. K., Braham H. W., 1984. Baleen Whales: Preliminary Evidence for Forestomach Microbial Fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2): 421-423.
- Hoffmann A. R., Patterson A. P., Diesel A., Lawhon S. D., Ly H. J., Stephenson C. E., Mansell J., Steiner J. M., Dowd S. E., Olivry T., Suchodolski J. S., 2014. The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs, *PLoS One*, 9:e83197.
- Hong P.-Y., Wheeler E., Cann I. K. O., Mackie R. I., 2011. Phylogenetic Analysis of the Fecal Microbial Community in Herbivorous Land and Marine Iguanas of the Galapagos Islands Using 16S rRNA-based Pyrosequencing, *The ISME Journal*, 5: 1461-1470.

- Kanelos M., Larson J., McDonald K., Siciliano M. L., 2014. "Sirenia" (On-line), Animal Diversity Web. <https://animaldiversity.org/accounts/Sirenia/> Pristupljeno: 28.7.2019.
- Larsen N., Vogensen F. K., van den Berg F. W., Nielsen D. S., Andreasen A. S., Pedersen B. K., Al-Soud W. A., Sorensen S. J., Hansen L. H., Jakobsen M., 2010. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults, *PLoS One*, 5:e9085.
- Ley R. E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P. J., Ramey R. R., Bircher J. S., Schlegel M. L., Tucker T. A., Schrenzel M. D., Knight R., Gordon J. I., 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes, *Science*, 320(5883): 1647-1651.
- Ley R. E. Lozupone C. A., Hamady M., Knight R., Gordon J. I., 2008. Worlds within Worlds: Evolution of the Vertebrate Gut Microbiota, *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 776-778.
- Majewska R., Santoro M., Bolaños F., Chaves G., De Stefano M., 2015. Diatoms and Other Epibionts Associated with Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) Sea Turtles from the Pacific Coast of Costa Rica, *PLoS ONE*, 10(6): e0130351.
- Merson S. D., Ouwerkerk D., Gulino L.-M., Klieve A., Bonde R. K., Burgess E. A., Lanyon J. M., 2014. Variation in the Hindgut Microbial Communities of the Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris* over Winter in Crystal River, Florida, *FEMS Microbiology Ecology*, 87(3): 601–615.
- Muegge B. D., Kuczynski J., Knights D., Clemente J. C., Gonzalez A., Fontana L., Henrissat B., Knight R., Gordon J. I., 2011. Diet Drives Convergence in Gut Microbiome Functions Across Mammalian Phylogeny and Within Humans, *Science*, 332: 970–974.
- Nelson T. M., Aprill A., Mann J., Rogers T. L., Brown M. V., 2015. The Marine Mammal Microbiome: Current Knowledge and Future Directions, *Microbiology Australia*, 8-13.
- Nelson T. M., Rogers T. L., Carlini A. R., Brown M. V., 2013. Diet and Phylogeny Shape the Gut Microbiota of Antarctic Seals: a Comparison of Wild and Captive Animals, *Environmental Microbiology*, 15(4): 1132-1145.
- Nelson T. M., Rogers T. L., Brown M. V., 2013. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats, *PLOS Biology*, 8(12): e83655.

- Ouwerkerk D., Maguire A. J., McMillen L., Klieve A. V., 2009. Hydrogen Bacteria From the Forestomach of Eastern Grey (*Macropus giganteus*) and Red (*Macropus rufus*) Kangaroos, *Animal Production Science*, 49: 1043–1051.
- Palmer C., Bik E. M., DiGiulio D. B., Relman D. A., Brown P. O., 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota, *PLOS Biology*, 5(7): e177.
- Parfrey L. W., Walters W. A., Knight R., 2011. Microbial Eukaryotes in the Human Microbiome: Ecology, Evolution, and Future Directions, *Frontiers in Microbiology*, 2:153.
- Parfrey L. W., Walters W. A., Lauber C. L., Clemente J. C., Berg-Lyons D., Teiling C., Kodira C., Mohiuddin M., Brunelle J., Driscoll M., Fierer N., Gilbert J. A., Knight R., 2014. Communities of Microbial Eukaryotes in the Mammalian Gut within the Context of Environmental Eukaryotic Diversity, *Frontiers in Microbiology*, 5:298.
- Price J. T., Paladino F. V., Lamont M. M., Witherington B. E., Bates S. T., Soule T., 2017. Characterization of the Juvenile Green Turtle (*Chelonia mydas*) Microbiome throughout an Ontogenetic Shift from Pelagic to Neritic Habitats, *PLoS ONE*, 12(5): e0177642.
- Rasmussen A. R., Murphy J. C., Ompi M., Gibbons J. W., Uetz P., 2011. Marine Reptiles, *PLoS ONE*, 6(11): e27373.
- Raverty S. A., Rhodes L. D., Zabek E., Eshghi A., Cameron C. E., Hanson M. B., Schroeder J. P., 2017. Respiratory Microbiome of Endangered Southern Resident Killer Whales and Microbiota of Surrounding Sea Surface Microlayer in the Eastern North Pacific, *Scientific Reports*, 7(1): 394.
- Rivera S.F., Vasselon V., Ballorain K., Carpentier A., Wetzel C. E., Ector L., Bouches A., Rimet F., 2018. DNA Metabarcoding and Microscopic Analyses of Sea Turtles Biofilms: Complementary to Understand Turtle Behavior, *PLoS ONE*, 13(4): e0195770.
- Rook, G. A. W., Brunet, L. R., 2005. Microbes, Immunoregulation, and the Gut, *Gut* 54: 317–320.
- Shepherd S. A., Hawkes M.W., 2005. Algal Food Preferences and Seasonal Foraging Strategy of the Marine Iguana, *Amblyrhynchus cristatus*, on Santa Cruz, Galapagos, *Bulletin of Marine Science*, 77: 51–72.

- Sanders J. G., Beichman A. C., Roman J., Scott J. J., Emerson D., McCarthy J. J., Girguis P. R., 2015. Baleen Whales Host a Unique Gut Microbiome with Similarities to Both Carnivores and Herbivores, *Nature Communications*, 6: 8252.
- Sarmiento-Ramirez J. M., van der Voort M., Raaijmakers J. M., Die'guez-Uribeondo J., 2014. Unravelling the Microbiome of Eggs of the Endangered Sea Turtle *Eretmochelys imbricata* Identifies Bacteria with Activity against the Emerging Pathogen *Fusarium falciforme*, *PLoS ONE*, 9(4): e95206.
- Shotts E. B., Albert T. F., Wooley R. E., Brown J., 1990. Microflora Associated with the Skin of the Bowhead Whale (*Balaena mysticetus*), *Journal of Wildlife Diseases*, 26(3): 351-359.
- Suzuki A., Ueda K., Segawa T., Suzuki M., 2019. Fecal Microbiota of Captive Antillean Manatee *Trichechus manatus manatus*, *FEMS Microbiology Letters*, 366(11): fnz134.
- Troyer K., 1984. Behavioral Acquisition of the Hindgut Fermentation System by Hatchling *Iguana iguana*, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14: 189-193.
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., and Knight, R., 2012. Defining the Human Microbiome, *Nutrition Reviews*, 70: 38-44.
- Venn-Watson S., Daniels R., Smith C., 2012. Thirty Year Retrospective Evaluation of Pneumonia in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Population, *Diseases of Aquatic Organisms*, 99:237–242.
- Witherington B. E., Hiram S., Hardy R., 2012. Young Sea Turtles of the Pelagic *Sargassum*-dominated Drift Community: Habitat Use, Population Density, and Threats. *Marine Ecology Progress Series*, 463: 1-22.
- Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E., 2008. Role of Microorganisms in the Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Theory of Evolution, *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 723–735.

6. SAŽETAK

Veliki morski kralježnjaci iznimno su važni stanovnici oceanskih ekosustava, a mogu biti domaćini velikom broju mikroorganizama. Sve više istraživanja pokazuje da je mikrobiom, skup svih gena zajednice mikroorganizama, od velike evolucijske važnosti za brojne višestanične organizame, a od velike važnosti je i danas, posebice za normalan rad probavnog, pokrovnog i dišnog sustava. U velike morske kralježnjake ubrajaju se svi morski sisavci, nekoliko gmazova (sedam vrsta morskih kornjača i jedna iguana) te ribe hrskavičnjače. Njihov mikrobiom je, unatoč sve većem broju nedavnih istraživanja na tu temu, i dalje nedovoljno istražen. Crijevni mikrobiom sisavaca i gmazova većinom čine bakterije koljena Bacteroidetes i Firmicutes, a manje su prisutne bakterije koljena Proteobacteria, Fusobacteria i Actinobacteria. Dobri dupin za sada je jedina poznata vrsta sisavaca čiji se mikrobiom bitno razlikuje u odnosu na ostale sisavce. Sastav crijevnog mikrobioma ovisi o načinu prehrane sisavaca i gmazova, s time da je zavisnost o prehrani izraženija kod gmazova. Zdravlje pokrovnog sustava morskih kralježnjaka ovisi o sastavu mikrobioma – u svim skupinama prisutni su geni bakterija za koje je poznato da imaju antimikrobno djelovanje. Moguće je da se na taj način održava stalan i stabilan sastav kožnog mikrobioma sisavaca i riba ili mikrobioma ljuske jajeta u kornjača. Sastav mikrobioma dišnog sustava sisavaca raznolik je te u uzorcima zdravih jedinki nisu detektirani prisutni patogeni, no važno je napomenuti da je ovaj organski sustav ujedno i najmanje istražen.

7. SUMMARY

Large marine vertebrates are important in marine ecosystems and can host a wide range of microorganisms. The microbiome is the full collection of genes of all microorganisms in a community, but often it is used as a term for all the microorganisms in a sample, not just their genes. Research that has been done in recent years shows that the microbiome had an impact on evolution of multicellular organisms. Moreover, it still plays an important role in normal functioning of digestive, integumentary and respiratory system. Large marine vertebrates include all marine mammals, several reptiles (seven species of marine turtles and one species of iguana) and cartilaginous fish (sharks and rays). Despite increasing amount of research, their microbiome has still not been sufficiently investigated. Gut microbiome of mammals and reptiles mostly consists of bacterial OTUs from phyla Bacteroidetes and Firmicutes, with less OTUs from phyla Proteobacteria, Fusobacteria and Actinobacteria. Bottlenose dolphin is (for

now) the only mammal species that has significantly different microbiome from the rest of the mammals. Even though both mammals and reptiles show a correlation between gut microbiome and diet, the correlation is more pronounced among reptiles. When it comes to integumentary system, its health depends on the microbiome. All of the groups have genes specific for bacteria which produce antimicrobial substances. There is a possibility that these substances help maintain stable composition of skin microbiome or microbiome of turtle egg shells. The microbiome of respiratory system in mammals varies and there has not been any evidence of pathogen bacteria in healthy individuals. However, microbiome of this system is poorly researched and understood.