

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Sara Pauk

**SIMBIOZE MORSKIH ŽIVOTINJA I
MIKROORGANIZAMA**

Završni rad

Split, 2023.

University of Split

Faculty of science

Department of biology

Sara Pauk

**SYMBIOSES OF MARINE ANIMALS AND
MICROORGANISMS**

Bachelor thesis

Split, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Biologije na Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Biljane Apostolske.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

SIMBIOZE MORSKIH ŽIVOTINJA I MIKROORGANIZAMA

Sara Pauk

Simbioza je zajednički život dvaju ili više različitih organizama i izravno je utjecala na razvoj života na Zemlji, a danas je raširena po cijeloj biosferi i ima veliku ulogu u morskim ekosustavima. Životinje žive i evoluiraju u moru mikroorganizama. Simbioze životinja s kemosintetskim bakterijama omogućavaju život u ekstremnim morskim staništima, simbioze koralja i zooksantela temelj su postojanja cijelog ekosustava, a simbioze životinja s bioluminiscentnim bakterijama su česte u moru i od velike ekološke važnosti. Primjenom molekularno-bioloških tehnika poput sekvenciranja DNA koje ne zahtjevaju kultivaciju otvorio se novi prozor u svijet mikroorganizama, te je sve jasnije da su oni ključni za zdravlje i razvoj životinja, od spužvi pa do čovjeka.

Ključne riječi: simbioza, koralji, kemosinteza, spužve, bioluminiscencija, bioraznolikost

Rad sadrži: 34 stranice, 20 grafičkih prikaza, 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: prof. dr. sc. Biljana Apostolska, redoviti profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Sanja Puljas

doc. dr. sc. Antonela Sovulj

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor thesis

SYMBIOSES OF MARINE ANIMALS AND MICROORGANISMS

Sara Pauk

Symbiosis is the living together of dissimilar organisms and it has directly impacted the course of development of life on Earth. Today it is widespread in the biosphere, also having great importance in marine ecosystems. Animals live and evolve in a sea of microorganisms. Symbioses of animals with chemosynthetic bacteria enable life in extreme marine habitats, symbioses of corals and zooxanthellae are the foundation of a whole ecosystem and symbioses of animals with bioluminescent bacteria are present in all marine habitats and are of great ecological importance. With the application of molecular-biology techniques like DNA sequencing which do not rely on cultivation, a new window has been opened that peers into the world of microorganisms and thus it is becoming clear that they are fundamental for proper health and development of animals, ranging from sponge to man.

Keywords: symbiosis, corals, chemosynthesis, sponges, bioluminescence, biodiversity

Thesis consists of: 34 pages, 20 figures, 40 references. Original language: Croatian.

Mentor: Biljana Apostolska, PhD, Full professor

Reviewers: Sanja Puljas, PhD, Associate professor

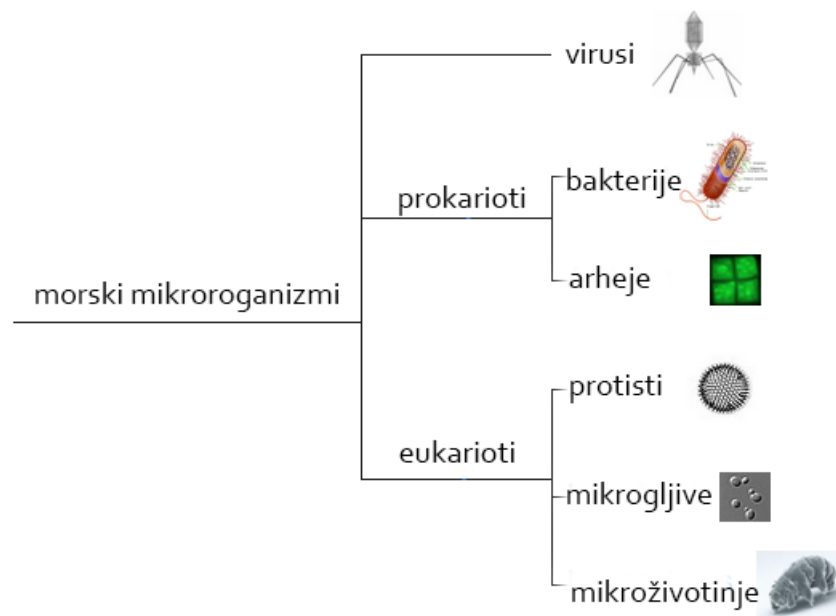
Antonela Sovulj, PhD, Assistant professor

Sadržaj

1. UVOD	1
1. 1. Povijest, koncept i mehanizmi simbioze	3
2. RAZRADA.....	5
2. 1. Simbioze temeljene na razmjeni hranidbenih tvari	5
2. 1. 1. Fotosintetske simbioze.....	5
2. 1. 1. 1. Koralji.....	6
2. 1. 2. Kemosintetske simbioze	11
2. 1. 2. 1. Fauna hidrotermalnih izvora	12
2. 2. Simbioze temeljene na proizvodnji zaštitnih tvari.....	18
2. 2. 1. Mikrobne zajednice spužvi	18
2. 3. Bakterijska bioluminiscencija u moru	23
2. 4. Simbioza kao predmet istraživanja	27
3. SAŽETAK.....	29
4. LITERATURA.....	30

1. UVOD

Zemljina površina je 70.8% voda sadržana u oceanima i morima koji zajedno čine povezani sustav. Život je nastao u oceanima prije barem 3.5 milijardi godina u obliku jednostaničnih mikroorganizama koji su bili jedina forma života kroz dvije trećine povijesti postojanja planeta Zemlje (Orgel, 1998). Danas, mikroorganizmi čine većinu biomase planeta i najbrojniji su oblici života u oceanima. Sam pojam „mikroorganizam“ označava organizme mikroskopske veličine (promjera manjeg od 1 mm) koji mogu pripadati svima trima domenama života (eubakterijama, arhejama ili eukariotima), a često se sinonimom „mikrob“ obuhvaćaju i nestanični virusi. (Slika 1)



Slika 1. Mikrororganizmi u moru.

Morske životinje predstavljaju jednu od najraznolikijih skupina živih bića na Zemlji, te su se na mnoge načine prilagodile na uvjete u ekosustavima koje naseljavaju. Za razliku od kopnenih životinja, razvili su mehanizme osmoregulacije i druge adaptacije potrebne za održavanje homeostaze u vodenom okolišu gdje abiotički čimbenici poput temperature i tlaka veoma variraju. Pelagičke (slobodno plivajuće) životinje prilagodile su se na varijacije u temperaturi, pH i tlaku na različitim dubinama, a bentičke (životinje koje naseljavaju morsko dno) na razne abiotičke uvjete i ograničenja poput raspoloživosti hrane i izbjegavanja predatora (Aprill, 2017).

Nijedan organizam ne živi u izolaciji, te se biologija svake jedinke mora sagledati u svjetlu interakcija s drugim oblicima života. Pogled na mikroorganizme kao isključivo patogene u novije se vrijeme zamjenjuje činjenicom da su svi eukarioti inficirani mnogim dobroćudnim i korisnim mikroorganizmima koji su esencijalni za zdrav život organizama (Ruby i sur., 2004). Mikroorganizmi koji se nalaze na ili unutar tijela životinje nazivaju se mikrobiom, a njihovo koegzistiranje u normalnim metaboličkim i imunološkim uvjetima naziva se simbioza. Kada se takav odnos poremeti (najčešće zbog stresa) simbioza prelazi u disbiozu (Apprill, 2017).

Simbioza podrazumijeva udruženje, odnosno ustrajanu interakciju između domaćina (obično se tim pojmom podrazumijeva veći organizam) i simbionta (jednog ili više), a često se i svi članovi simboze nazivaju simbiontima. Takvo udruženje stvara međusobno ovisnu biološku zajednicu koja se naziva holobiont, a karakterizirana je pojavom novih staničnih struktura i/ili metaboličkih sposobnosti (Douglas, 2014; Morris, 2018). Simbioza je i temelj našeg postojanja. Endosimbiotska teorija (simbiogeneza) govori da je eukariotska stanica nastala udruživanjem različitih prokariotskih oblika, te da su neki stanični organeli bakterijskog podrijetla – mitohondriji koji su postali od alfa proteobakterija i kloroplasti čiji su pretci cijanobakterije (Zimorski i sur., 2014). Također, simbioza je i mehanizam koji povećava evolucijski potencijal i uspješnost što vidimo po važnim evolucijskim prekretnicama poput izlaska biljaka na kopno (događaj koji je bio medijatiran mikorizom – simbiozom hifa gljiva i korijenja biljaka) i naseljevanja ekstremnih staništa (npr. hidrotermalnih izvora gdje kemosintetske bakterije kroz simbiozu sa životinjama omogućuju uzajamno preživljavanje) (Feijen i sur., 2018).

Oblik simbioze može varirati ovisno o tome kako simbiot utječe na domaćina, a dijeli se na: i) mutualizam (+/+) koji podrazumijeva uzajamno korisno udruženje, ii) parazitizam (+/-), udruženje u kojem jedan organizam ima korist, a drugi je ugrožen i iii) komenzalizam (+/0), odnosno interakciju u kojoj jedan organizam ima korist, a drugi nije ugrožen niti ima dobrobit. Ipak, promjenom okolišnih uvjeta granice između ovih interakcija mogu postati nejasne (Apprill, 2019). Trenutno, simbioze morskih staništa koje su najviše proučavane su mutualistička udruženja u kojima oba simbionta međusobno surađuju i proširuju svoje niše u svrhu preživljavanja.

Simbioza se najčešće definira kao dugotrajna interakcija u kojoj barem jedan od simbionata ima korist, te se može uspostaviti između jedinki različitih ali i istih vrsta. Simbioza nije ograničena na životinje već se može pojaviti između svih oblika živih organizama, uključujući između

mikroorganizama. Ove interakcije mogu biti veoma složene i specijalizirane, te se mogu mjenjati tijekom vremena da bi se osigurao opstanak partnera, a često su popraćene koevolucijom simbionata.

Morski ekosustavi izloženi su sve većim promjenama koje su najviše uvjetovane antropogenim aktivnostima, a među ostalom uključuju povišenje temperature i zakiseljavanje oceana. Proučavanje mikrobnih simbioza morskih životinja doprinosi razumijevanju uloge koju one imaju u morskim ekosustavima i ujedno razumijevanju načina na koji stres utječe na život u oceanima. Mikroorganizmi koji stupaju u simbiotske odnose se najčešće ne mogu kultivirati *in vitro* jer se nalaze intimno vezani za ili unutar domaćina i ovise o njemu, no pojavom modernih metoda (koje ne uključuju kultivaciju) kao što su sekvenciranje genoma, transkriptomika i metagenomika sve je više informacija o mikrobnim simbiontima, a time i funkcionalnostima različitih simbioza (Douglas, 2014).

Iako simbioza podrazumijeva širok spektar različitih interakcija, u ovom radu fokus je na mutualističkim udruženjima morskih životinja i mikroorganizama.

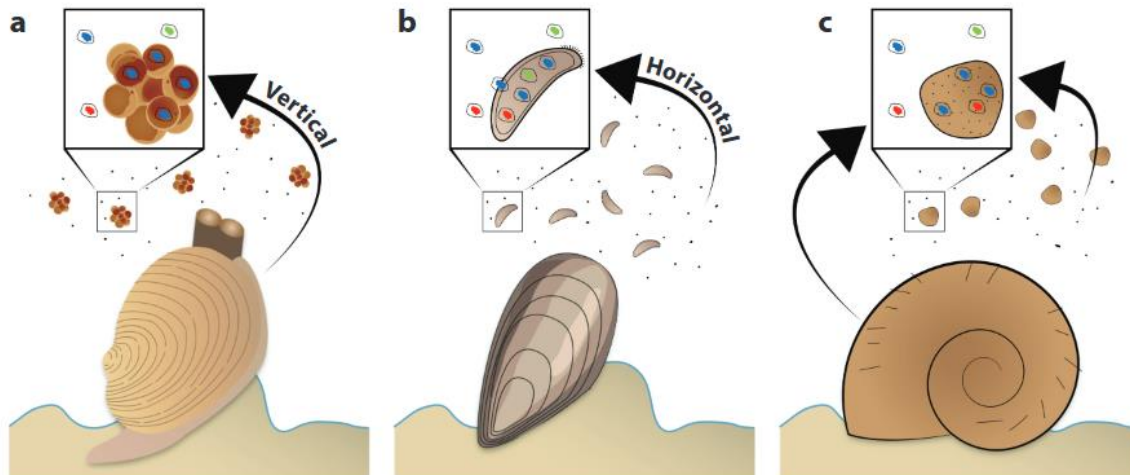
1. 1. Povijest, koncept i mehanizmi simbioze

Proučavanje mikroorganizama počelo je pojavom mikroskopa u 17. stoljeću, a prvi opis simbioze kao „zajedničkog života različitih organizama“ pripisuje se Antonu de Baryu (1831. – 1888.) (Sapp, 2004). Riječ „simbioza“ dolazi od grčkog „*sumbioûn*“ što u doslovnom prijevodu znači „živjeti zajedno“. Danas se definira kao dugotrajna interakcija organizama pri čemu nastaju nove stanične strukture ili metabolički putevi što implicira kontinuirano uspostavljanje interakcija u svakoj generaciji, te koevoluciju mehanizama komunikacije i prepoznavanja između partnera (Douglas, 2014; Duperron, 2016). Mehanizmi koji omogućavaju koevoluciju su genske mutacije (promjene u slijedu nukleinskih kiselina genoma) i horizontalni prijenos gena (prijenos genetskog materijala unutar iste generacije između različitih vrsta). Na primjer, morska vlasulja *Nematostella vectensis* ima gene stečene horizontalnim prijenosom koji kodiraju za šikiminsku kiselinu koja služi za obranu od UV zračenja, a podrijetlo gena je bakterijsko.

Lynn Margulis (1938. – 2011.), znanstvenica poznata po razvitku i popularizaciji endosimbiotske teorije (teorije o simbiogenezi), opisuje simbiozu dvama jednadžbama: „ $1+1=1$ “ i „ $1+1>2$ “ (Duperron, 2016). Prva govori kako dvije jedinice u simbiozi postaju jedan entitet (nazvan holobiont), a druga objašnjava kako su sposobnosti holobionta veće nego individualne sposobnosti

partnera. Ovaj koncept naglašava sinergičnu prirodu mutualističkih simbioza u kojima kooperacijom organizama nastaju nove biološke strukture, povećan je opstanak i evolucijski potencijal. Simbioza je pridonijela razvitku mnogih adaptacija u oceanima i to kroz puno kraće vrijeme nego kroz tradicionalne mehanizme evolucije kao što su mutacije gena i kompeticija između organizama (Apprill, 2019). Neki morski ekosustavi kao što su koraljni grebeni i hidrotermalni izvori su nastali isključivo zahvaljujući mutualističkim simbiozama između životinja i mikroorganizama i bez istih ne mogu opstati (Wood-Charlson, 2013).

Simbionti mogu živjeti na ili unutar tijela domaćina. Život simbionata unutar tijela domaćina naziva se endosimbioza, a često je karakterizirana specijaliziranim organima u kojem se nalaze mikroorganizmi (npr. trofosom crva cjevaša). Prednost ovakve simbioze je relativna zaštićenost od vanjskih utjecaja i dostatna količina hranjivih tvari dostupna simbiontima (Osman i Weinnig, 2021). U ektosimbiozi, mikroorganizmi žive na tijelu domaćina, a mogu imati konstantan kontakt (npr. bakterije na koži riba) ili rutinski kontakt (npr. ribe čistači koji nisu u stalnom kontaktu s domaćinom). Također, endosimbiozu karakterizira veći nivo evolucijske složenosti s obzirom na ektosimbiozu jer su endosimbionti intimnije vezani za domaćina, odnosno mogu se integrirati u genom domaćina što domaćinu može omogućiti preživljavanje ekstremnih uvjeta (Osman i Weinnig, 2021). Nadalje, obligatna (obavezna) simbioza podrazumijeva suživot u kojem jedan ili oba partnera ne mogu preživjeti samostalno, a fakultativna (opcionalna) odnos u kojem partneri ne moraju biti u simbiozi kroz cijeli životni ciklus. Obligatni simbionti ne mogu preživjeti u slobodno-živućem obliku i nalaze se u tkivu domaćina, dok fakultativni simbionti mogu imati stadij slobodnog života i stadij simbionta. Također, proces smanjivanja količine genetske informacije naziva se erozija genoma i često se identificira u organizmima koji su obligatni simbionti i koji gube određene gene radi smanjivanja utroška energije nakon što iz slobodno-živućeg oblika prijeđu u simbiotski način života (Apprill, 2019). Simbioze se razlikuju i po načinu snabdijevanja simbionata, te tako razlikujemo horizontalni, vertikalni i miješani način prijenosa. (Slika 2) Kod vertikalnog prijenosa simbionti se prenose s roditelja na potomstvo tijekom razmnožavanja što rezultira identičnim simbiontima u sljedećoj generaciji, a kod horizontalnog prijenosa jedinka stekne simbiote iz okoliša neovisno o roditeljima.



Slika 2. Različiti načini prijenosa mikroorganizama: vertikalni, horizontalni i miješani.

Istraživanje simbioze se kroz povijest provodilo promatrajući, eksperimentirajući i koristeći dostupne alate. Kroz 19. stoljeće razvijala se optička mikroskopija, a 1930.-ih prva elektronska mikroskopija koja je omogućila promatranje struktura na razini manjoj od stanice. Ipak, dosta mikroorganizama nije vidljivo pod mikroskopom, te je tek otkrićem metoda sekvenciranja RNA i DNA uspješno počelo identificiranje mikroorganizama (Woyke, 2006). Danas najnovije metode sekvenciranja nude ogromne mogućnosti i sve se više primjenjuju u određivanju strukture i raznolikosti zajednica mikroorganizama, a ne samo katalogiziranja (Douglas, 2014).

2. RAZRADA

2. 1. Simbioze temeljene na razmjeni hranidbenih tvari

Spomen simbioze najčešće implicira odnos u kojem se razmjenjuju hranjive tvari. Iako nutrijenti nisu jedina valuta razmjene dobara između simbionata, ova vrsta simbioze je od velike važnosti jer omogućava organizmu prilagodbu na različite niše i manji utrošak energije u procesu hranjenja (Duperron, 2016). Među ostalom, ovakve simbioze omogućile su nastanak koraljnih grebena (zooksantele koje koralja opskrbljuju velikom količinom hranjivih tvari tj. energijom za gradnju grebena) i naseljavanje ekstremnih morskih staništa (kemosintetske bakterije koje su omogućile život u hidrotermalnim izvorima).

2. 1. 1. Fotosintetske simbioze

Za razliku od biljaka i algi koji su fotoautotrofi (mogu proizvoditi organske spojeve koristeći sunčevu svjetlost i anorganski ugljik), životinje su striktno heterotrofne (konzumiraju

druge organizme za hranu). Fotosintetske simbioze su udruženja gdje jedan partner sintetizira organske produkte koristeći sunčevu energiju i dio dijeli s domaćinom. Najpoznatija grupa fotosintetskih simbiota u moru su zooxantele (dinoflagelati roda *Symbiodinium*) koje nalazimo kod mnogih žarnjaka i nekih spužvi, mekušaca i plošnjaka, a fotosintetski simbionti mogu biti i cijanobakterije, te zelene mikroalge (drugog naziva zooxantofite) (Munn, 2020). Morski ekosustavi sadrže mnogo primjera tzv. „fotosintetskih životinja“ odnosno udruženja životinja i algi ili cijanobakterija, a najčešći domaćini su životinje iz koljena Porifera (spužve) i Cnidaria (žarnjaci) (Venn i sur., 2008). Postoji naznaka da fotosintetski simbionti „biraju“ životinje jednostavne tjelesne građe s velikim omjerom tjelesnog volumena i površine što je komplementarno s boljom izloženosti sunčevoj svjetlosti. Stanice algi ili cijanobakterija najčešće se nalaze unutar stanice domaćina i omeđene su membranom čineći strukturu koja se naziva simbiosom, a ugljikov dioksid, vodu i sve potrebne supstrate za fotosintezu uzimaju iz stanice domaćina (Venn i sur., 2008). Poznat je primjer morskog puža *Elysia chlorotica* koji konzumira alge *Vaucheria litorea* i njihove kloroplaste zadržava u tijelu te ih koristi za fotosintezu (fenomen koji se zove kleptoplastija), no zbog činjenice da se kloroplasti ne dijele i ne prenose na potomstvo ovaj primjer se ne smatra simbiozom prema svim izvorima (Duperron, 2016).

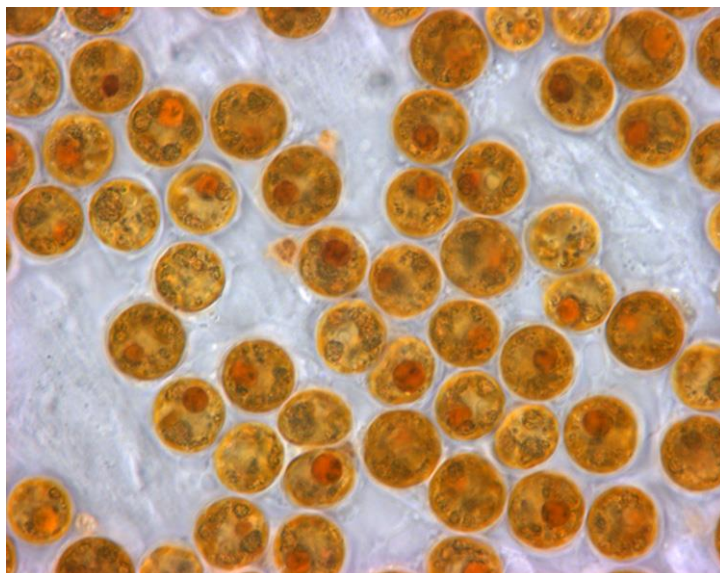
2. 1. 1. 1. Koralji

Koralji (koljeno Cnidaria) su sesilne životinje najviše poznate po tome što grade najveće strukture koje grade živi organizmi – koraljne grebene. (Slika 3) Pojava koraljnih grebena u Trijasu direktno se pripisuje evoluciji simbioze između koralja i dinoflagelata odnosno algi roda *Symbiodinium* (Davy i sur., 2012). Do nedavno se smatralo da su koralji u mutualističkoj simbiozi samo s algama roda *Symbiodinium* (znanima po imenu zooxantele), no novija istraživanja ukazuju da koralji sadrže velike i raznolike populacije i drugih simbiotskih mikroorganizama, te da su oni koevoluirali zajedno (Rosenberg i sur., 2007). Koraljni holobiont uz zooxantele sadrži mikrobne predstavnike i drugih protista, bakterija, arheja, gljiva i virusa koji zajedno doprinose zdravlju i prehrani koralja.



Slika 3. Tipičan koraljni greben.

Rod *Symbiodinium* (koljeno Dinoflagellata) uključuje više vrsta algi, a otkriven je 1883. promatranjem koralja pod mikroskopom. (Slika 4) Doprinos zooxantela u simbiozi s koraljem je pružanje fotosintetski fiksiranog ugljika domaćinu i proizvodnja velike količine molekularnog kisika koju koralj i simbiotski mikroorganizmi koralja koriste za disanje. Koralj zooxantelama pruža zaštitu i hranjive tvari u obliku otpadnih produkata (Davy i sur., 2012). Zooxantele u svom domaćinu žive unutar strukture zvane simbiosom u vakuoli domaćina. Slobodno-živeći i simbiotski oblik ovih dinoflagelata se razlikuje jer pri ulasku u simbiozu, među ostalom, gube bič. Zooxantele koriste svjetlosnu energiju za fiksiranje CO_2 kroz C3 put (Calvin—Benson ciklus) koristeći enzim RuBisCO. Pomoću radioaktivnog obilježavanja dokazano je da zooxantele ispuštaju veliku većinu fotosintetski fiksiranog ugljika u obliku malih molekula kao što su glicerol, glukoza i organske kiseline (Munn, 2020). Anatomski, zooxantele se u koraljima nalaze u gastrodermi (unutarnjem sloju stanica) i formiraju nakupine gustoće i do 10^6 cm^{-3} . Za hermatipske koralje (graditelje koraljnih grebena) ova simbioza je esencijalna jer omogućava nutrijente potrebne za brzu izgradnju grebena. Također, višak ugljika koralj izlučuje na površinu tijela u vidu sluzi koja je hrana za mnoge organizme što objašnjava bioraznolikost i produktivnost koraljnih grebena. Neke vrste dubokomorskih koralja koje žive na dubini i do 2000 metara ne sadrže zooxantele zbog oskudne količine svjetlosti potrebne za fotosintezu. Ipak, kod vrste *Lophelia pertusa* izotopskim označavanjem ugljika i dušika otkriveno je da takvi dubokomorski koralji sadrže mikrobne simbiote koji su sposobni za kemoautotrofiju i fiksaciju N_2 (Munn, 2020).



Slika 4. Zooksantele - alge roda *Symbiodinium*.

Izbjeljivanje koralja (engl. *coral bleaching*) je gubitak unutarstaničnih endosimbiotskih stanica *Symbiodiniuma* iz tkiva koralja, a događa se kada se interakcije između zooksantela i koralja poremete, najčešće zbog stresora poput povišene temperature ili povećane količine sunčevog zračenja. (Slika 5) Izbjeljivanje koralja je primjer disbioze, odnosno narušavanja mutualističkog odnosa između koralja i simbiotskih algi. Koraljni grebeni se smatraju jednim od najosjetljivijih ekosustava na Zemlji, te povišenje temperature za samo 1 °C može izazvati izbjeljivanje koralja (Pratchett i sur., 2011). Također, izmjene u mikrobiomu koralja dovode do razvitka mnogih bolesti.

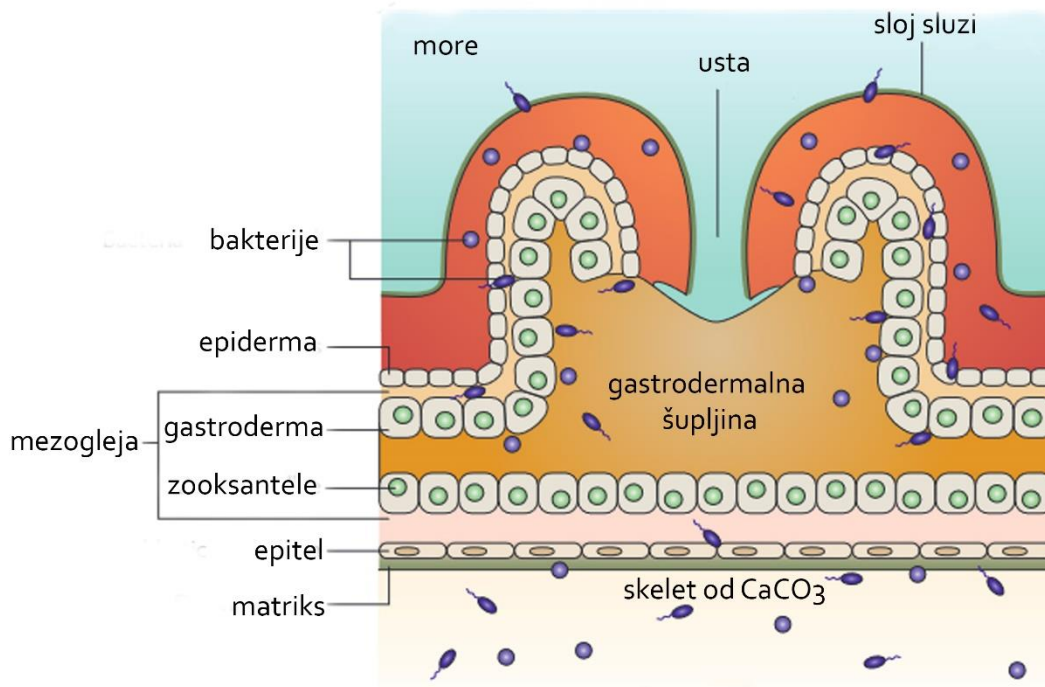


Slika 5. Koralj nakon izbjeljivanja.

Arheje su manje zastupljeni organizmi u mikrobiomu koralja ali su funkcionalno važni jer sudjeluju u kruženju hranjivih tvari koraljnog organizma, odnosno procesima kao što su kruženje dušika i uklanjanje amonijaka (Bourne i sur., 2016). Od eukariotskih organizama u mikrobiomu koralja nalazimo endolitske gljive (koje žive unutar kostura koralja) i jednostanične eukariote zvane alveolati (grupa protista koju karakteriziraju kortikalne alveole odnosno spljoštene vezikule ispod membrane). 2019. godine otkriveni su drugi najzastupljeniji članovi koraljnog mikrobioma (nakon zooksantela) nazvani koraljikolidi (engl. *corallicolid*), te je ustanovljeno da se nalaze u više od 70% rodova koralja. Oni pripadaju koljenu Apicomplexa, odnosno parazitskim alveolatima kojima pripada i *Plasmodium*, uzročnik malarije. Koraljikolidi žive unutar stanica koralja u gastrodermalnoj šupljini, a njihova neobična osobina je da imaju plastide sa svim očuvanim genima za fotosintezu što implicira da su prijelazni oblik između fototrofnog i parazitskog načina života jer ne fotosintetiziraju (Kwong i sur., 2019).

Novije metagenomske analize pokazale su veliku raznolikost DNA i RNA virusa koji stupaju u interakcije s koraljima, a njihova uloga je u strukturiranju prokariotske zajednice i medijatiranju prijenosa genetičkog materijala što može biti od koristi koralju. Ipak, povišena temperatura ili povećano ultraljubičasto zračenje može potaknuti viruse na ulazak u litički ciklus, a posljedica toga je razaranje stanica domaćina i time gubitak simbionata koralja.

Istraživanje ljudskog mikrobioma pokazalo je da različiti dijelovi tijela sadrže različite mikroorganizme, što je primjenjivo i na koralje. Koraljna mikrostaništa su zasebni odjeljci tijela koralja (sloj sluzi, tkivo, kostur i gastrodermalna šupljina) od kojih svaki sadrži određene mikroorganizme i time pruža mogućnost razvitka različitih niša. (Slika 6)



Slika 6. Poprečni presjek koralja. Vanjski sloj sluzi (uključujući gastrodermalnu šupljinu) i kostur od kalcijevog karbonata pružaju stanište bakterijama, a zooksantele se nalaze u gastrodermi.

Iako se mikroorganizmi izoliraju iz koralja od 1970.-ih, razna istraživanja nakon 2002. godine koja su implementirala metode temeljene na DNA sekvenciranju ukazala su na ogromnu bioraznolikost i brojnost mikroorganizama koji nastanjuju koralje (Munn, 2020). Potreba za znanjem o ulozi simbiotskih organizama u zdravlju koralja dovela je do nedavnog pojavljivanja novog znanstvenog polja, mikrobiologije koralja. Danas, najveći izazov u ovom polju je identifikacija nepoznatih simbionata i bolje razumijevanje funkcija poznatih simbionata kao što su zooksantele. Iako je općepoznato da su koraljni grebeni dom za više od 25% morskih životinjskih vrsta, koralji također predstavljaju velik izvor mikrobiološke bioraznolikosti (Mulhall, 2009; Keeling i sur., 2021). Razumijevanje intrikantnih simbioza koralja i mikroorganizama također je i temelj daljnje konzervacije koraljnih grebena. Manipuliranje mikrobioma koralja sve više se razmatra kao jedna od adekvatnih tehnika za sačuvanje koraljnih grebena, a najčešće uključuje inokuliranje koralja korisnim mikroorganizmima ili genetski modificiranim bakterijama (Vanwonderghem i Webster, 2020).

2. 1. 2. Kemosintetske simbioze

Do kraja 19. stoljeća pretpostavljalo se da je sav život na Zemlji ovisan o sunčevoj svjetlosti kao izvoru energije za proces fotosinteze. 1890. godine Sergei Winogradsky postavlja hipotezu o kemosintezi – procesu u kojem se energija dobivena iz oksidacije metana ili reduciranog sumpora koristi za pretvaranje ugljikovog dioksida (CO₂) ili metana (CH₄) u organske molekule neovisno o svjetlosti. Ova hipoteza potvrđena je skoro 90 godina kasnije, 1977. godine kada je prva svjetska dubokomorska ronilica Alvin zaronila u vulkanska podvodna žarišta Galapagosa i otkrila da život buja u hidrotermalnim izvorima (Petersen Bremen, 2009). (Slika 7) Danas je poznato da su fotosinteza i kemosinteza jedina dva oblika primarne proizvodnje na Zemlji.



Slika 7. Alvin je prva svjetska dubokomorska ronilica s posadom. Osim što je sudjelovala u otkriću hidrotermalnih izvora, ova ronilica je pomogla u identifikaciji preko 300 morskih životinjskih vrsta.

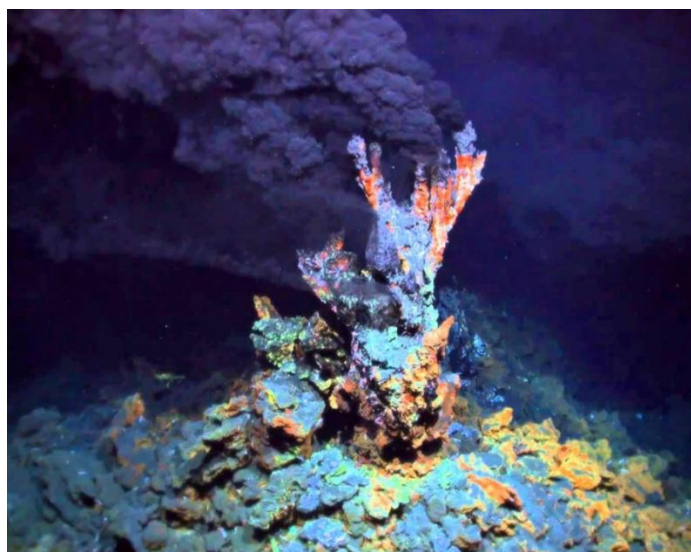
Prvootkriveni *Riftia pachyptila* crvi iz hidrotermalnih izvora već su otprije bili poznati znanstvenicima kao crvi koji nemaju usta niti želudac i koji pripadaju koljenu Pogonophora. Ipak, prvo se mislilo da se hrane upijajući nutrijente kroz površinu tijela u stanice, no daljnjim proučavanjem otkrilo se da sadrže bakterijske kemosintetske simbiozite (sumpor-oksidirajuće bakterije) o kojima izravno ovise za opskrbu hranjivim tvarima, odnosno crvi opskrbljavaju bakterije kisikom, sulfidima i ugljikovim dioksidom, te konzumiraju bakterije za energiju. Ovo je bila prva otkrivena kemosintetska simboza (Dubilier i sur., 2008).

Danas je jasno da su kemosintetske simbioze česte i prisutne u raznim staništima gdje ima oksidiranih i reduciranih spojeva, odnosno gdje anoksični i oksični uvjeti dolaze u kontakt. To su staništa poput sedimenata u plićaku, dubokomorskih hladnih izvora, leševa kitova i ostataka drva na dnu mora (engl. *whale falls* i *wood falls*) i hidrotermalnih izvora. Životinje iz bar sedam različitih koljena stupaju u kemosintetske simbioze, a raznolikost bakterijskih simbionata također je vrlo visoka (Dubilier i sur., 2008). Kemosintetske simbioze najčešće nalazimo kod beskralježnjaka i protista u okolišima gdje nema dovoljno organske tvari za heterotrofni način ishrane. Filogenetske analize pokazuju da su ove simbioze nastale više puta kroz povijest i da su primjer konvergentne evolucije (Sogin, 2020).

Pretpostavlja se da kemosintetski oblik života može postojati ispod površine planeta kao što su Mars i Jupiter. Također, postoji hipoteza da je kemosinteza bila prvi oblik metabolizma na Zemlji, odnosno da je život nastao u staništima poput današnjih hidrotermalnih izvora procesom abiogeneze (Martin i sur., 2008).

2. 1. 2. 1. Fauna hidrotermalnih izvora

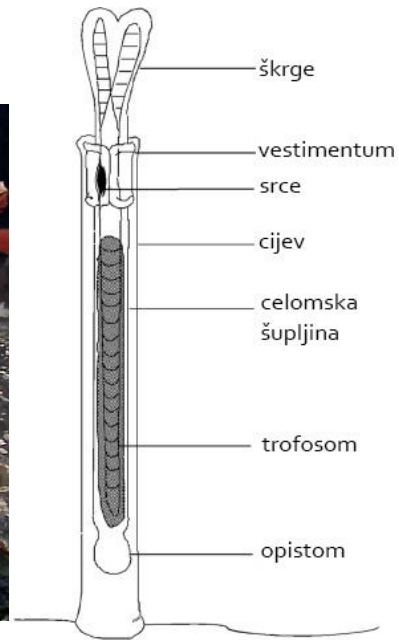
Hidrotermalni izvori su pukotine ili otvori u Zemljinoj kori iz kojih istječu geotermalno zagrijane tekućine bogate mineralima. Nalazimo ih u oceanima, najčešće na granicama kontinentalnih tektonskih ploča i blizu aktivnih vulkana. Hidrotermalne izvore karakterizira visoka temperatura (preko 300°C) i ekstremno velik pritisak, a tekućine koje izlaze iz tzv. dimnjaka su bogate otopljenim tvarima kao što su sulfidi, željezo i mangan. (Slika 8)



Slika 8. Dubokomorski hidrotermalni izvor s karakterističnim dimnjacima.

Dubokomorski hidrotermalni izvori su jedni od najproduktivnijih staništa na Zemlji. Gustoće zajednica živih bića hidrotermalnih izvora su 10 000 do 100 000 puta veće nego na uobičajnom morskom dnu. Hidrotermalni izvori mogu podržati toliku količinu organizama jer većina ovisi o kemosintetskim bakterijama s kojima stupaju u simbiozu i od kojih dobivaju hranjive tvari, a bakterije su brojne jer je voda koja izlazi iz izvora puna otopljenih minerala. Bakterije koriste spojeve sumpora (najčešće sumporovodik, H₂S) za kemosintezu koji su inače veoma otrovni za većinu životnih oblika.

Riftia pachyptila je crv cjevaš (koljeno Annelida), jedna od najčešćih vrsta koja nastanjuje hidrotermalne izvore i koja stupa u simbiozu s kemosintetskim bakterijama. Prvi opis kemosintetske simbioze je bio upravo prema ovoj vrsti, te ono predstavlja modelni organizam za proučavanje dubokomorskih simbioza. Može narasti i do 2 m dužine i nema oči, usta niti želudac. Ova životinja u potpunosti ovisi o gamaproteobakterijskim sumpor-oksidirajućim bakterijama koje se nalaze u specijaliziranom organu zvanom trofosom. (Slika 9) Ono se proteže kroz skoro cijelu dužinu celomske šupljine životinje i sadrži velik broj bakterija – 10⁹ po gramu (Munn, 2020). Autoradiografskim datiranjem otkriveno je da je trofosom mjesto gdje se događa fiksacija ugljika od strane bakterija i odakle organski ugljik odlazi u okolna tkiva crva. Biokemijski podatci o ovoj simbiozi upućuju da je ona obligatna za preživljavanje oba organizma. Bakterijski endosimbiont koristi anorganske spojeve iz okoliša za stvaranje organskih spojeva poput aminokiselina, prekursora pirimidina, kofaktora i vitamina dok *R. pachyptila* skladišti spojeve sumpora i ugljika i tako opskrbljuje bakterijske endosimbionte sumporovodikom potrebnim za proizvodnju energije (Minic, 2009).



Slika 9. *Riftia pachyptila* u divljini i shema anatomije tijela crva.

Calyptogena magnifica je vrsta gigantskog školjkaša (koljeno Mollusca) koju nalazimo kod hidrotermalnih izvora na dubinama 4 000 – 6 000 m. (Slika 10) U svojim škrgama koje su s jedne strane izložene morskoj vodi, a s druge su prokrvljene sadrži simbiotske kemosintetske bakterije o kojima izravno ovisi jer ima reduciran probavni trakt. Ovo je jedan od rijetkih primjera kemosintetske simbioze u kojoj se simbionti prenose vertikalno kroz generacije što je rezultiralo velikom erozijom genoma kod simbionata (veličine je 1-1.2 Mb i kodira otprilike 1000 gena) (Munn, 2020). Genom ovih mikroorganizama ujedno je i najmanji poznati genom autotrofnih bakterija (Dubilier i sur., 2008). Endosimbiotske bakterije ove vrste su tiotrofne (oksidiraju sumpor).



Slika 10. *Calyptogena magnifica*.

Chrysomallon squamiferum je morski puž (koljeno Mollusca) drugog imena „morski pangolin“. Njegovo stopalo prekriveno je ljuskama (skleritima) od proteinskog materijala s uklopljenim sulfidima što nalikuje na oklop, a kućica je trodijelna: vanjski dio sadrži željezove sulfide, središnji je nalik periostrakumu drugih puževa, a unutarnji je od aragonita. (Slika 11) Ove anatomske modifikacije inspiracija su znanstvenicima za proizvodnju novih zaštitnih materijala, a pužu služe za obranu od predatora i preživljavanje ekstremnih uvjeta u hidrotermalnim izvorima. *C. squamiferum* sadrži episimbiotske bakterije na skleritima i endosimbiotske bakterije u bakteriocitama (specijaliziranim masnim stanicama) u jednjaku koje ga opskrbljuju hranjivim tvarima s obzirom da ima veoma reduciran probavni trakt (Munn, 2020).



Slika 11. *Chrysomallon squamiferum*.

Kiwa hirsuta je rak (koljeno Arthropoda) otkriven 2005. godine u južnom dijelu Tihog oceana. Pronađen je u hidrotermalnom izvoru na 220 m dubine. Prekriven je četinama nalik krznu i zbog karakterističnog izgleda je dobio nadimak „jeti rak“. (Slika 12) Otkriveno je da su četine nastanjene populacijama bakterija koje životinja koristi za detoksifikaciju otrovnih minerala koji dolaze iz hidrotermalnih izvora (Munn, 2020). Ovo je primjer episimbioze u kojoj rak dobiva nutrijente od kemosintetskih bakterija na njegovom tijelu.



Slika 12: *Kiwa hirsuta* ili „jeti rak“.

Alvinella pompejana ili Pompeii crv (koljeno Annelida) otkriven je 1980. godine na vanjskim stijenkama dimnjaka hidrotermalnih izvora. (Slika 13) Ono je jedan od najizdržljivijih višestaničnih organizama po pitanju otpornosti na visoke temperature jer može preživjeti temperature veće od 80°C (dok većina životinja može tolerirati maksimalno 40°C). Iako nije u potpunosti znano na koji način Pompeii crv preživljava ekstremne uvjete, pretpostavlja se da episimbiotske bakterije na njegovoj dorzalnoj strani tijela sudjeluju u zaštiti od visokih temperatura kroz proizvodnju enzima i detoksifikaciju otrovnih tvari, te služe kao izolacijski pokrov (Munn, 2020). Ono preživljava život na dimnjacima izvora tako što svoj prednji dio tijela izloži hladnijoj vodi koja je ujedno bogatija kisikom, a stražnjim dijelom tijela pričvršćen je za stijenke dimnjaka iz kojih istječe voda bogata mineralima. Odrasli organizmi ove vrste imaju sposobnost građenja cijevi, odnosno "egzoskeleta" koji je višeslojne, hidrofobne strukture koja je stabilna na temperaturama od 0-100°C. *Alvinella pompejana* provodi većinu vremena u cijevi koja je, pretpostavlja se, još jedan način prilagodbe na visoke temperature (Le Bris i Gaill, 2007).



Slika 13. Pompeii crv nazvan je po Pompejima, rimskom gradu koji je uništen erupcijom vulkana Vezuva. Ova životinja je ekstremofil i ima razne fiziološke prilagodbe na okoliš u kojem živi, no bez simbiotskih bakterija (zaslužnih za detoksifikaciju) nebi mogla nastanjivati hidrotermalne izvore.

Kemosintetske bakterije hidrotermalnih izvora žive u gustim populacijama na morskom dnu i uz stupanje u simbiotske odnose ujedno su hrana manjim organizmima kao što su veslonošci (lat. Copepoda) i rakušci (lat. Amphipoda). Iako beskralježnjaci predstavljaju većinu organizama u ovakvim staništima, pojavljuju se i neki kralježnjaci kao npr. jegulje.

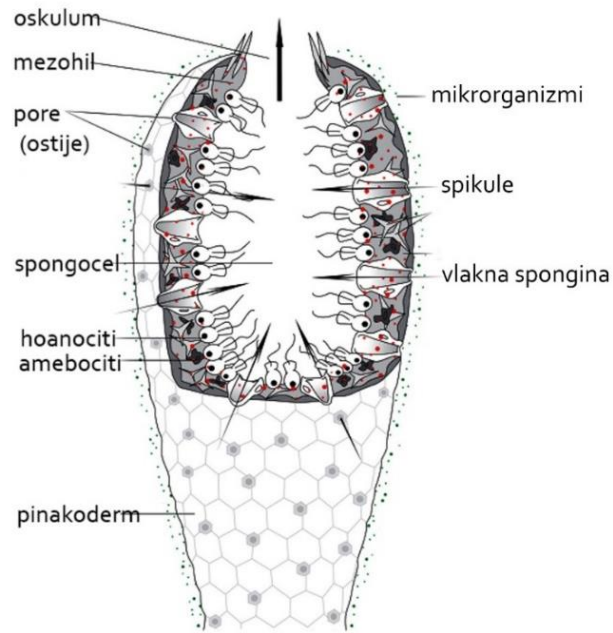
Kemosinteza omogućava život u staništima bez izravnog dotoka sunčeve energije, no aerobni organizmi ovih staništa ipak jednim dijelom ovise o kisiku dobivenim primarnom proizvodnjom kroz proces fotosinteze.

2. 2. Simbioze temeljene na proizvodnji zaštitnih tvari

Simbioze koje se temelje na proizvodnji zaštitnih tvari podrazumijevaju najčešće mutualistički odnos u kojem jedan od partnera proizvodi obrambene spojeve koji mogu pomoći u obrani od parazita, patogena i predatora. Najčešće se pojavljuju kod sesilnih morskih organizama poput koralja, spužvi i drugih morskih beskralježnjaka.

2. 2. 1. Mikrobne zajednice spužvi

Spužve (koljeno Porifera) najstarija su grupa višestaničnih životinja čiji fosili dosežu do 630 milijuna godina starosti (Li, 2019). Kao jedne od najprimitivnijih životinja, nemaju prava tkiva ili organe. Obuhvaćaju otprilike 8000 vrsta koje žive u velikom rasponu različitih morskih staništa i nekoliko slatkovodnih. Kroz svoje morfološki jednostavno trodijelno tijelo s unutarnjim sustavom pora i kanalića obloženih hoanocitima (stanicama s bičevima) kontinuirano filtriraju vodu i na taj način se hrane mikroorganizmima iz vode (uz iznimku mesojednih dubokomorskih spužvi). (Slika 14)



Slika 14. Shema tijela spužve.

Spužve su jednostavni, sesilni organizmi koji nemaju nikakve aktivne obrambene sposobnosti za borbu protiv predatora niti stečeni imunološki sustav za obranu od patogena. Ipak, svoj evolucijski uspjeh najviše duguju velikoj paleti simbiotskih mikroorganizama koji proizvode zaštitne metabolite. Jedan od najvažnijih ciljeva simbioze spužvi i mikroorganizama je proizvodnja bioaktivnih spojeva koji imaju potencijal zaštititi spužvu od raznih utjecaja kao što je oksidativni stres, ultraljubičasto zračenje i predacija. Uz obrambene pogodnosti, simbionti spužvi također sudjeluju u razmjeni hranjivih tvari. Pretpostavlja se da je simbioza između spužvi i mikroorganizama nastala odmah nakon pojave spužvi, što ju čini najstarijom simbiozom između životinja i mikroorganizama (Taylor i sur., 2007). Zbog činjenice da je ova simbioza opstala kroz cijelu evolucijsku povijest spužvi, pretpostavlja se da je mutualistička. Osim ekološke i evolucijske važnosti simbioze spužvi i mikroorganizama, simbionti spužvi proizvode mnoge bioaktivne metabolite koji su i od biotehnoške važnosti. Zbog svoje anatomske jednostavnosti spužve se koriste kao modelni organizmi u proučavanju simbioza između više vrsta mikroorganizama i domaćina (Siegl i sur., 2008). (Slika 15)



Slika 15. Neke zaštićene spužve autohtone Jadranskom moru: (A) *Geodia cydonium*, (B) *Tethya spp.*, (C) *Aplysina cavernicola*.

Mezohil (tijelo spužve) sadrži veliki broj različitih mikroorganizama koji čine i do pola ukupnog volumena organizma, a gustoća mikroba može biti i do 100 puta veća od gustoće okolišne vode (Wood-Charlson, 2013). Mikroorganizmi (najčešće bakterije, arheje i zatim mikroalge, virusi i gljive) spužvi mogu živjeti van stanica ili unutar stanica jedinke. Iako se spužve hrane mikroorganizmima, ujedno žive i u simbiozi s njima – pretpostavlja se da se simbionti razlikuju od slobodno živućih vrsta po tome što sadrže promijenjene stanične stijenke i obrambene proteine što sprječava ingestiju od strane spužve (Munn, 2020).

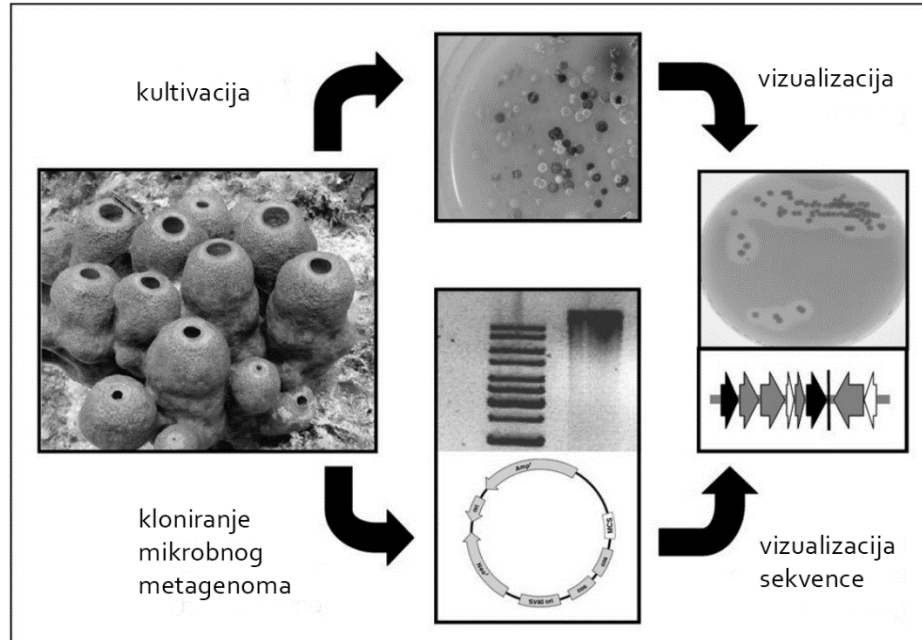
Mikrobne simbioze spužvi proučavaju se od 1970-ih. Kroz ova rana istraživanja, spužve su podijeljene u spužve visokog mikrobnog sadržaja (HMA; engl. *High Microbial Abundance*) i niskog sadržaja (LMA; engl. *Low Microbial Abundance*). HMA spužve mogu sadržavati i do četiri puta veću količinu mikroorganizama nego okolno more, dok LMA spužve sadrže otprilike istu količinu kao okoliš (Siegl i sur., 2008). U prošlosti, prvotni razlozi izučavanja mikrobnog sadržaja spužvi temeljili su se na istraživanju biotehnoloških pogodnosti simbioze (antibiotičkih i antitumorskih spojeva koje stvaraju simbionti spužvi), a danas postoji interes i za biološke i ekološke aspekte njihovog mikrobioma.

Taylor i sur. (2007) izolirali su i klasificirali 1500 DNA sekvenci iz spužvi, te tako ukazali na veliku raznolikost simbionata. Također, mnogo otkrivenih filotipova pronađeno je u taksonomski i geografski različitih spužvi, no ne u okolnoj morskoj vodi što ukazuje na mikroorganizme koji su specifični za spužve i ne postoje u slobodno-živućem obliku. Koljeno Poribacteria predstavlja bakterije koje se mogu pronaći isključivo kao simbionti spužvi (Siegl i sur., 2008). Zajednice mikroorganizama spužvi su veoma raznolike te predstavljaju velik doprinos

ukupnoj mikrobnj razolikosti u oceanima (Thomas i sur., 2016). Sekvenciranjem rRNA gena otkriveno je da u mikrobnim zajednicama spužvi sudjeluje barem 46 bakterijskih koljena, 3 koljena arheja, 3 koljena gljiva i mnogo filogenetski različitih algi (Li, 2019). Oni stupaju u razne oblike simbioze sa spužvama, odnosno uspostavljaju mutualističke, parazitske i komenzalističke odnose. Postoje naznake o selektivnosti vrsta prema različitim mikrobnim partnerima i zajedničkom jezgrenom (engl. *core*) mikrobiomu sastavljenom od češćih i rjeđih vrsta koje su pojavljuju u svim članovima određene vrste. Takva selektivnost i stabilnost objašnjava se time da su specifični mikroorganizmi stupili su simbiozu sa prvim spužvama i ostali prisutni kroz cijelu evolucijsku povijest. Mikroorganizmi spužvi se prenose vertikalno putem jaja, embrija i ličinki tijekom seksualnog razmnožavanja, a prilikom aseksualnog preko komadića tkiva (pupova), te je moguć i horizontalan prijenos u kojem spužva stupa u interakcije s mikroorganizmima iz okolne vode (Li, 2019).

Simbioze spužvi i mikroorganizama su uvijek temeljene na metaboličkoj izmjeni između simbionta i domaćina, a najčešće to podrazumijeva fiksaciju CO₂, razmjenu dušika, proizvodnju sekundarnih metabolita i korištenje raspadnute organske tvari od strane mikroorganizama. Radi ovih karakteristika, simbionti spužvi imaju analognu funkciju simbiontima probavnog sustava sisavaca (Thomas i sur., 2016).

Spužve su organizmi koji su bogat izvor biološki aktivnih spojeva. Neke spojeve proizvode spužve, a neke mikroorganizmi simbionti, no smatra se da je većina metabolita proizvod usklađenog suživota organizma domaćina i mikroba. Mnogi spojevi imaju velik biotehnološki značaj, a među ostalom spadaju u alkaloidne, peptide i terpenoide. Za identifikaciju sekundarnih metabolita najčešće se koriste metagenomske tehnike. (Slika 16) Neki spojevi koji se ističu u svojoj važnosti su npr. PKS (engl. *polyketide synthases*) i NRPS (engl. *non-ribosomal peptide synthetases*) enzimi koji kataliziraju sintezu antibiotika i spojeva antimikrobne aktivnosti. Također se ističu halogenalkani koji imaju svoju primjenu kao herbicidi i pesticidi (Siegl i sur., 2008).



Slika 16. Metoda temeljena na kombinaciji kultivacije i metagenomske analize u svrhu određivanja simbionata spužvi.

Spužve se sve više prepoznaju kao ključne (engl. *keystone*) vrste mnogih ekosustava gdje sudjeluju u važnim ekološkim procesima poput providiranja staništa i kruženja hranjivih tvari (Hudspith i sur., 2021). Neke spužve imaju funkciju graditelja grebena umjesto koralja, na primjer u morima dubljim od 80 m gdje gotovo nema živih koralja (Li, 2019). Istražuje se i mogućnost da spužve na većim dubinama (30-200 m), gdje je manji antropogeni utjecaj nego u plitkim vodama, pruže utočište vrstama koje se prirodno pojavljuju u koraljnim grebenima (Webster i Taylor, 2012). Mikrobiom spužvi proučava se i radi potrebe za razumijevanjem utjecaja raznih ekoloških prijetnji na zdravlje ovih životinja poput zagađenja, zakiseljavanja oceana i klimatskih promjena.

Morske spužve bitan su dio bentičkog ekosustava gdje pružaju stanište životinjama i doprinose mikrobnj bioraznolikosti. Najnovija istraživanja pokazuju da su spužve i njihovi simbiotski mikroorganizmi (holobiont) često veoma otporni na stresore kao što su povećanje temperature ili zakiseljavanje okolne vode što implicira da bi spužve mogle uspijevati u oceanima i nakon promjene globalne klime. Ipak, ova otpornost nije općenita već ovisi o vrsti spužvi i intenzitetu promjena. Također, bilo kakva varijacija u sastavu spužvi implicira i promjenu u sastavu ostale faune bentosa, što nosi posljedice za cijeli ekosustav (Vanwonterghem i Webster, 2020).

2017. godine je uspješno dovršen Sponge Microbiome Project i ono predstavlja skup podataka o mikrobnim zajednicama spužvi određenih sekvenciranjem 16S rRNA gena (Li, 2019).

2. 3. Bakterijska bioluminiscencija u moru

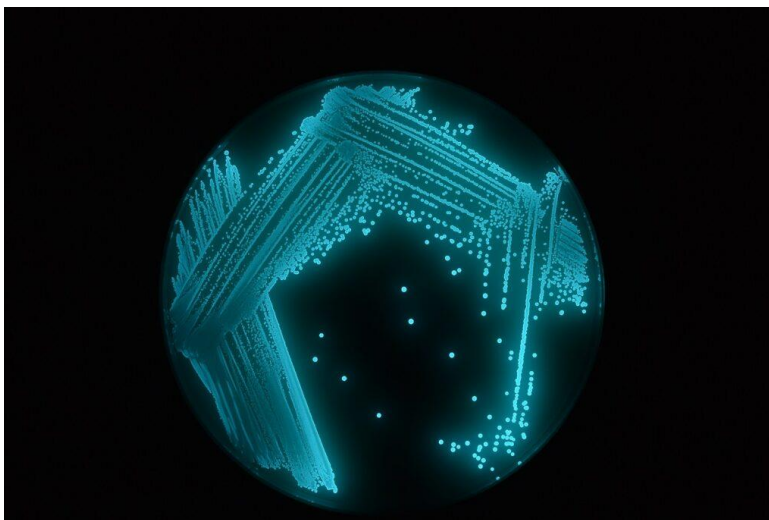
Bioluminiscencija je proizvodnja svjetla od strane živih organizama i najčešća je u morskim ekosustavima. Korisna je za organizam jer mu olakšava pronalazak plijena, pruža mu kamuflažu ili privlači partnera. U moru je česta autogena bioluminiscencija (sama životinja proizvodi svjetlost), no kod nekih riba i lignji pojavljuju se simbiotska udruženja s bakterijama koje proizvode svjetlost, te to predstavlja zajednicu u kojoj se razmjena metaboličkih dobara ne temelji na nutritivnim vrijednostima, već na ekološkim i bihevioralnim pogodnostima. Bioluminiscencija je evoluirala u više navrata, a svim oblicima je zajedničko korištenje kisika što može značiti da je isprva nastala kao antioksidacijski mehanizam (Munn, 2020). Svjetlo najčešće proizvodi životinja, no u moru nailazimo na primjere gdje simbiotske bakterije unutar specijaliziranih organa životinjskih jedinki generiraju svjetlost. Razlike između bakterijske i autogene bioluminiscencije su: i) izolacijom bakterija svjetlo se može proizvoditi u kulturi stanica, ii) svjetlo koje proizvode bakterije je kontinuirano, dok se kod eukariota emitira u bljeskovima i iii) bakterijska luminiscencija ima jedinstveno svojstvo korištenja reduciranog flavin mononukleotida (FMNH₂) (Haygood, 1993). Kemijsku reakciju proizvodnje svjetlosti karakterizira oksidacija organske molekule luciferina, a katalizira je enzim luciferaza. U bakterijskoj bioluminiscenciji oksidira se alifatski aldehid pomoću reduciranog flavin mononukleotida i nastaje oksidirani flavin mononukleotid, lanac masne kisline i energija u obliku vidljive svjetlosti. (Slika 17)



Slika 17. Kemijska reakcija proizvodnje svjetlosti od strane bakterija.

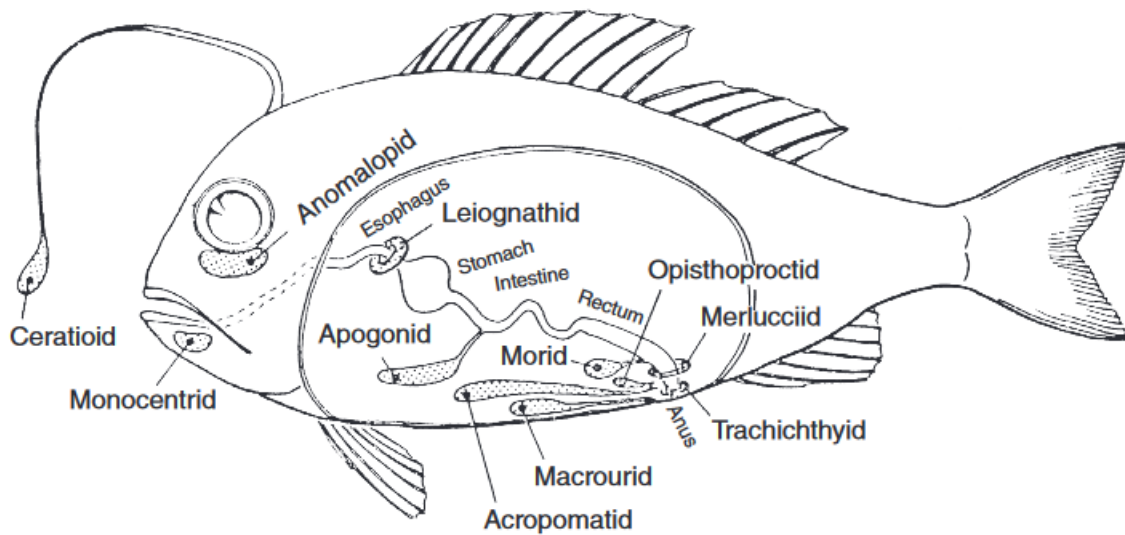
Svjetleće bakterije su sveprisutne u morskom okolišu, a mogu biti saprofiti, enterički simbionti ili simbionti u svjetlećim organima životinja (Haygood, 1993). Sve poznate luminiscentne bakterije koje stupaju u simbiozu su članovi reda Vibrionaceae, a najpoznatije vrste su *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi* i *Aliivibrio fischeri* (poznata i pod imenom *Vibrio fischeri*) (Munn, 2020). (Slika 18) Većina ovih bakterija stupa u fakultativnu simbiozu i prenosi se horizontalno što omogućava kultivaciju istih bakterija, a kod nekih riba (red udičarki ili Lophiiformes) nalazimo luminiscentne bakterijske simbionte koji su obligatni, no još

uvijek nisu identificirani niti se mogu kultivirati. Bioluminiscenciju nalazimo i na kopnu i ponekad u slatkim vodama, no najčešća je u moru (otprilike 75% vrsta životinja sposobnih za bioluminiscenciju su morske vrste), a česta je kod životinja koje su nokturalne i najčešće žive u plitkim vodama ili su vrste koje žive na velikim dubinama (Paitio i Oba, 2023).



Slika 18. Bioluminiscentne bakterije *Aliivibrio fischeri* u kulturi.

Ribe su jedini bioluminiscentni kralježnjaci i brojačno predstavljaju 37% ukupnog broja vrsta bioluminiscentnih životinja u moru, a od toga je 42% vrsta riba u simbiozi sa svjetlećim mikroorganizama, dok ostatak karakterizira endogena bioluminiscencija (Paitio i Oba, 2023). Konkretno, simbiotsku bioluminiscenciju nalazimo u oko 500 vrsta riba (Karplus, 2014). U ovakvim simbiotskim odnosima mikroorganizmi se nalaze unutar svjetlećeg organa koji predstavlja idealan okoliš za život bakterija jer je bogat hranjivim tvarima, kisikom i zaštićen od okoline. Raznolikost anatomije svjetlećih organa kod riba je velika: mogu biti vanjski i povezani s okolišem kroz sustave cjevčica ili se nalaziti unutar tijela ribe i biti indirektno povezani s okolišem. (Slika 19) Funkcije svjetlećeg organa u riba su izbjegavanje predatora, hvatanje plijena i interspecijska komunikacija (Karplus, 2014). Neke ribe u svjetlećim organima sadrže jedinstvene vrste bakterijskih simbionata, no u većini slučajeva su domaćini većem broju vrsta mikroorganizama.



Slika 19. Skupni prikaz smještaja i veličina svjetlećih organa na tijelu u svih vrsta riba koje stupaju u bioluminiscentne simbioze s bakterijama.

Havajska lignja (*Euprymna scolopes*, koljeno Mollusca) živi u plitkim vodama havajskog arhipelaga i stupa u simbiozu s bioluminiscentnom bakterijom *Aliivibrio fischeri*. (Slika 20) Pretpostavka je da ova simbioza lignji omogućava kamuflažu: svjetleća ventralna strana lignjinog tijela osvjetljava njenu siluetu koja se uklopi sa svjetlošću mjeseca i tako lignja bude nevidljiva predatorima koji plivaju ispod nje (kontra-iluminacija).



Slika 20. *Euprymna scolopes* je malena (otprilike 4 cm duga), noćna životinja koja se danju zakopa u pijesak, a noću lovi.

Simbionti se kod ovog udruženja ne prenose generacijama (vertikalno), već su novorođene jedinice havajske lignje aposimbotske i kroz prvih nekoliko sati (najmanje 2 sata) života budu kolonizirane od strane *A. fischeri* (horizontalni prijenos). Takva uspostavljena simbioza ima cirkadijalni ritam, odnosno svako jutro *E. scolopes* iz svjetlećeg organa izbacuje 90% bakterija što osigurava da kultura bakterija uvijek bude dovoljno gusta za uspješnu bioluminiscenciju (Munn, 2020). Također, svakodnevnim izbacivanjem bakterije postaju brojnije u okolišu što je selektivna prednost za *A. fischeri* jer omogućava veće bakterijske populacije nego u slučaju da su samo slobodno-žive. Na neki način, lignja tolerira bakterije do određenog trenutka. Istraživanja genske ekspresije *A. fischeri* pokazuju da se njihovi geni virulencije (npr. geni za toksine) pale nešto prije zore što korelira s dnevnim ritmom izbacivanja bakterija iz tijela lignje.

A. fischeri kolonizira lignjin svjetleći organ, odnosno dvije zatvorene tjelesne vreće nazvane kripte. Svjetleći organ anatomski, fiziološki, biokemijski i molekularno nalikuje oku što omogućuje lignji da detektira i kontrolira svjetlost bioluminiscentnih bakterija. U njemu se eksprimiraju neki geni inače uključeni u razvoj oka u sisavaca (npr. *eya* i *dac*). Svjetleći organ također sadrži proteine kristaline i leću, te strukturu analognu *tapetumu lucidumu* (sloj tkiva mnogih kralježnjaka koji pospješuje količinu svjetlosti u oku) (Peyer i sur., 2014).

Uspješni horizontalni prijenos bakterija u svjetleći organ odvija se kroz procese inicijacije, prepoznavanja i uspostavljanja simbioze. Iako *A. fischeri* u moru predstavlja samo <0.1% populacije bakterija, *E. scolopes* uspješno regrutira svoje svjetleće simbiozite kroz proces lučenja sluzi za koju se mogu hvatati samo određene Gram-negativne bakterije. Kroz proces prepoznavanja sve ostale vrste mikroorganizama osim *A. fischeri* izlaze iz svjetlećeg organa, a simbioza se dalje uspostavlja djeljenjem bakterija unutar kripti. Također, *E. scolopes* iz tijela izbacuje sve sojeve *A. fischeri* koji ne mogu proizvesti svjetlo (Wood-Charlson, 2013).

Ova simbioza počela se proučavati 1990.-ih, a danas predstavlja idealan eksperimentalni model binarne simbioze jer je havajsku lignju (domaćina) lako uzgojiti, a simbionti (bakterije) mogu rasti u kulturi, što sve omogućava biotehnološke manipulacije. Proučavanje ove simbioze dovelo je do novih spoznaja o utjecaju mikroorganizama na zdravlje, razvoj i evoluciju životinja, uključujući ljude. *E. scolopes* proučava se i u svrhu istraživanja evolucije i mehanizama razvojnog puta glavonožaca, te biologije tkiva svjetlećih organa (McFall-Ngai, 2014). Također, 1970. godine na primjeru kultivirane *Aliivibrio fischeri* prvi put je otkriven QS (engl. *quorum sensing*) odnosno

„govor bakterija“ – sustav kojim bakterije odgovaraju na gustoću populacije koordiniranom regulacijom ekspresije gena (Nealson i sur., 1970). Ovaj mehanizam podrazumijeva konstantno ispuštanje kemijskih spojeva u okoliš, te povećana koncentracija istih pokrene određeni metabolički proces u bakterija. Kod bioluminiscencije, kroz ovaj proces pale se geni za sintezu bakterijskog enzima luciferaze (Wood-Charlson, 2013).

2021. godine desetak mladih havajskih lignji poslano je u svemir da bi se utvrdio učinak koji svemirsko putovanje ima na imunološki sustav i mikrobiom organizama.

2. 4. Simbioza kao predmet istraživanja

Simbioza je riječ koja se često koristi u mnogim kontekstima za opisivanje najčešće recipročno korisnih udruženja, no u biologiji je danas ova riječ primjenjiva na kontinuum interakcija koje ne moraju biti jednako povoljne za sve organizme uključene u takvu životnu zajednicu i koje često prelaze iz jednog oblika u drugi. Danas, proučavanje simbioze zahtjeva poznavanje raznih polja prirodnih znanosti, te holistički i integrirajući pristup istraživanju. Razumijevanje simbioza, pogotovo simbioza s mikroorganizama, zahtjeva novi pogled na koncept individualnosti i evolucije.

Značaj simbioze u živom svijetu je velik. Simbiotski odnosi utječu izravno na jedinku ali i na funkcionalnost ekosustava, bioraznolikost i biosferu. Također, i sam čovjek je izravno pod utjecajem simbiotskih odnosa – od mikrobioma u i na tijelu, pa sve do korištenja znanja o simbiozi u biotehnologiji i agrikulturi za svoju dobrobit. S druge strane, antropogeni utjecaji na okoliš se pokazuju kao veliki stresori koji mogu potaknuti prijelaz simbioze u disbiozu. Oceani predstavljaju okoliš koji je veoma osjetljiv na promjene što za posljedicu ima ugroženost organizama koji u njemu žive. Zakiseljavanje oceana, eutrofikacija, povišenje temperature i unos invazivnih vrsta su neki od čimbenika koji predstavljaju opasnost za simbiotske zajednice u moru ali i za sav ostali živi svijet.

Proučavanje simbioze u današnje doba prolazi kroz svojevrsnu renesansu. Tehnike poput sekvenciranja nukleinskih kiselina i tehnika temeljenih na multi-OMICS pristupu (analiza genoma, proteoma, transkriptoma, ...) zajedno s eksperimentalnim sustavima pružaju beskraj novih otkrića u polju istraživanja simbiotskih udruženja. Simbioza, koja se nekad smatrala iznimkom, danas je prepoznata kao biološko pravilo.

Ovaj rad zamišljen je kao pregled raznovrsnosti simbioze u morskim staništima i kao osvrt na bioraznolikost i složenost živog svijeta oko nas, uz naglasak na mutualizam kao sredstvo zajedničkog napretka različitih vrsta živih bića. Gledajući kroz koncept simbioze, teško je smatrati ijedan organizam izoliranom jedinkom već je jasno da smo svi povezani na mikroskopskoj i makroskopskoj razini, te da su naši životi i u biološkom smislu međusobno isprepleteni.

3. SAŽETAK

Simbioza je zajednički život dvaju ili više različitih organizama i izravno je utjecala na razvoj života na Zemlji, a danas je raširena po cijeloj biosferi i ima veliku ulogu u morskim ekosustavima. Životinje žive i evoluiraju u moru mikroorganizama. Simbioze životinja s kemosintetskim bakterijama omogućavaju život u ekstremnim morskim staništima, simbioze koralja i zooksantela temelj su postojanja cijelog ekosustava, a simbioze životinja s bioluminiscentim bakterijama su česte u moru i od velike ekološke važnosti. Primjenom molekularno-bioloških tehnika poput sekvenciranja DNA koje ne zahtjevaju kultivaciju otvorio se novi prozor u svijet mikroorganizama, te je sve jasnije da su oni ključni za zdravlje i razvoj životinja, od spužvi pa do čovjeka.

4. LITERATURA

- Apprill, A. (2017). Marine animal microbiomes: Toward understanding host-microbiome interactions in a changing ocean. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 4, Issue JUL). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00222>
- Apprill, A. (2019). *The Role of Symbioses in the Adaptation and Stress Responses of Marine Organisms*. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419>
- Bourne, D. G., Morrow, K. M., & Webster, N. S. (2016). Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 70, 317–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095440>
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229–261. <https://doi.org/10.1128/mnbr.05014-11>
- Douglas, A. E. (2014). Symbiosis as a general principle in eukaryotic evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016113>
- Dubilier, N., Bergin, C., & Lott, C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 10, pp. 725–740). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1992>
- Duperron, S. (2016). *Microbial symbioses*.
- Feijen, F. A. A., Vos, R. A., Nuytinck, J., & Merckx, V. S. F. T. (2018). Evolutionary dynamics of mycorrhizal symbiosis in land plant diversification. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28920-x>
- Haygood, M. G. (1993). Light Organ Symbioses in Fishes. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 19, Issue 4).
- Hudspith, M., Rix, L., Achlatis, M., Bougoure, J., Guagliardo, P., Clode, P. L., Webster, N. S., Muyzer, G., Pernice, M., & de Goeij, J. M. (2021). Subcellular view of host–microbiome nutrient exchange in sponges: insights into the ecological success of an early metazoan–microbe symbiosis. *Microbiome*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00984-w>

- Karplus, I. (2014). *Symbiosis in Fishes: The Biology of Interspecific Partnerships, First Edition*. Ilan Karplus.
- Keeling, P. J., Mathur, V., & Kwong, W. K. (2021). Corallicolids: The elusive coral-infecting apicomplexans. *PLoS Pathogens*, *17*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009845>
- Kwong, W. K., del Campo, J., Mathur, V., Vermeij, M. J. A., & Keeling, P. J. (2019). A widespread coral-infecting apicomplexan with chlorophyll biosynthesis genes. *Nature*, *568*(7750), 103–107. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1072-z>
- Le Bris, N., & Gaill, F. (2007). How does the annelid *Alvinella pompejana* deal with an extreme hydrothermal environment? In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 6, Issues 1–3, pp. 197–221). <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9112-1>
- Li, Z. (2019). Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals. In *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1>
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., & Russell, M. J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 11, pp. 805–814). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1991>
- McFall-Ngai, M. (2014). Divining the Essence of Symbiosis: Insights from the Squid-Vibrio Model. *PLoS Biology*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001783>
- Minic, Z. (2009). *Organisms of deep sea hydrothermal vents as a source for studying adaptation and evolution*.
- Morris, J. J. (2018). What is the hologenome concept of evolution? [version 1; peer review: 2 approved]. In *F1000Research* (Vol. 7). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.14385.1>
- Mulhall, M. (2009). *Saving the Rainforests of the Sea: An Analysis of International Efforts to Conserve Coral Reefs*. <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2005/102911/index.html>.
- Munn, B. C. (2020). *Marine Microbiology*.

- Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System¹. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- Orgel, L. (1998). *The origin of life – a review of facts and speculations*.
- Osman, E. O., & Weinnig, A. M. (2021). *Annual Review of Animal Biosciences Microbiomes and Obligate Symbiosis of Deep-Sea Animals*. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-081621>
- Paitio, J., & Oba, Y. (2023). Luminous fishes: Endocrine and neuronal regulation of bioluminescence. In *Aquaculture and Fisheries*. KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.04.003>
- Petersen Bremen, J. M. (2009). *Diversity and Ecology of Chemosynthetic Symbioses in Deep-Sea Invertebrates*.
- Peyer, S. M., Pankey, M. S., Oakley, T. H., & McFall-Ngai, M. J. (2014). Eye-specification genes in the bacterial light organ of the bobtail squid *Euprymna scolopes*, and their expression in response to symbiont cues. *Mechanisms of Development*, *131*(1), 111–126. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.09.004>
- Pratchett, M. S., Hoey, A. S., Wilson, S. K., Messmer, V., & Graham, N. A. J. (2011). Changes in biodiversity and functioning of reef fish assemblages following coral bleaching and coral loss. In *Diversity* (Vol. 3, Issue 3, pp. 424–452). <https://doi.org/10.3390/d3030424>
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 5, Issue 5, pp. 355–362). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Ruby, E., Henderson, B., & McFall-Ngai, M. (2004). We Get by with a Little Help from Our (Little) Friends. In *Science* (Vol. 303, Issue 5662, pp. 1305–1307). <https://doi.org/10.1126/science.1094662>
- Sapp, J. (2004). The dynamics of symbiosis: An historical overview. *Canadian Journal of Botany*, *82*(8), 1046–1056. <https://doi.org/10.1139/B04-055>
- Siegl, A., Bayer, K., Kozytska, S., Hentschel, U., & Schmitt, S. (2008). *Sponges and Microbes - New Frontiers in an Ancient Symbiosis*. <https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03246120>

- Sogin, E. (2020). Chemosynthetic symbioses. *Current Biology*.
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., Olson, J. B., Erwin, P. M., López-Legentil, S., Luter, H., Chaves-Fonnegra, A., Costa, R., Schupp, P. J., Steindler, L., Erpenbeck, D., Gilbert, J., Knight, R., Ackermann, G., Victor Lopez, J., ... Webster, N. S. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11870>
- Vanwonderghem, I., & Webster, N. S. (2020). *Coral Reef Microorganisms in a Changing Climate*. <https://doi.org/10.1016/j.isci>
- Venn, A. A., Loram, J. E., & Douglas, A. E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1069–1080. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm328>
- Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: Love and other relationships. In *Environmental Microbiology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 335–346). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x>
- Wood-Charlson, E. M. (2013). Marine Symbioses: Metazoans and Microbes. In *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition* (pp. 116–126). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00409-3>
- Woyke, T. (2006). Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature*, 443, 950–955. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature05192>
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W. F., & Gould, S. B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 22, pp. 38–48). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.008>

https://en.wikipedia.org/wiki/Marine_microorganisms

<https://news.ucar.edu/132854/ncar-study-identifies-where-coral-reefs-may-be-buffered-against-warming-oceans>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Zooxanthellae>

<https://www.nbcnews.com/science/environment/earth-s-coral-reefs-could-be-gone-2100-research-finds-n1138151>

<https://exploration.marinersmuseum.org/watercraft/alvin/>

<https://www.sci.news/biology/life-hydrothermal-vents-07772.html>

https://en.wikipedia.org/wiki/Riftia_pachyptila

<https://www.biolib.cz/en/taxon/id1228631/>

<https://ocean.si.edu/ocean-life/invertebrates/yeti-crab>

<https://serc.carleton.edu/microbelife/topics/marinesymbiosis/pompeii.html>

https://en.wikipedia.org/wiki/Bioluminescent_bacteria

<https://www.microbiotests.com/aliivibrio-fischeri-luminescent-bacteria-toxicity-test-2/>

<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/vibrio-fischeri-scheda-batteriologia-e-approfondimenti/>