

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Poláková

Prokaryotičtí symbionti volně žijících anaerobních protist

Prokaryotic symbionts of free-living anaerobic protists

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Johana Rotterová

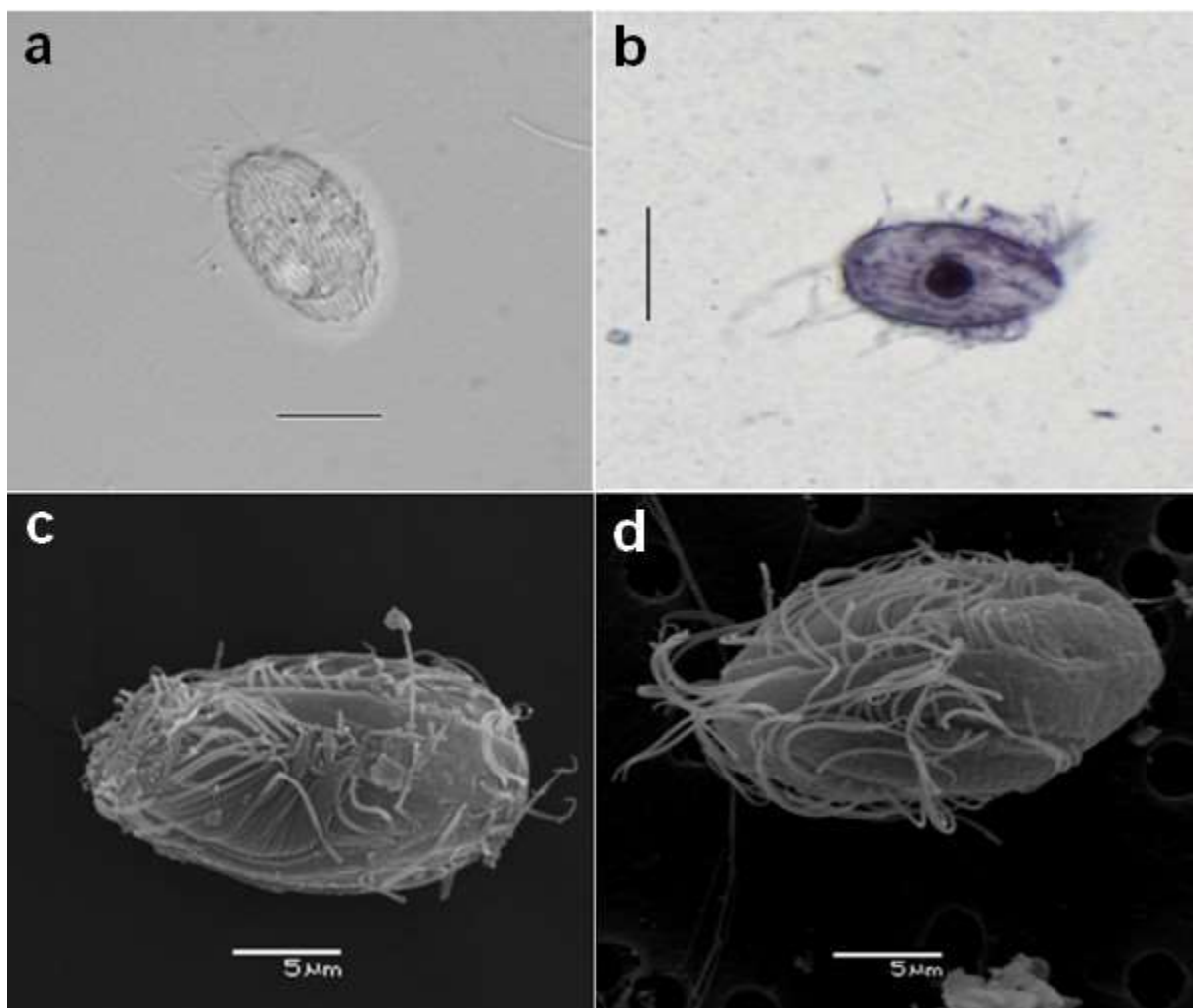
Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.5.2017

Kateřina Poláková



Anaerobní zástupci nálevníků třídy Scuticociliatia (Olygohymophorea).

a) Ektosymbiotičtí prokaryoti na povrchu buněk, měřítko: 10 μm; **b)** Barvení protargolem, měřítko: 10 μm; **c-d)** Scuticociliati zachyceni skenovací elektronovou mikroskopií. **Foto:** Kateřina Poláková

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Ivanovi Čepičkovi, Ph.D. za vstřícnost při vedení mé bakalářské práce a Mgr. Johaně Rotterové za zasloužení do práce v laboratoři, její čas, cenné rady a konzultace.

Abstrakt

Anaerobní prvoci jsou organismy obývající prostředí bez přítomnosti kyslíku. Najdeme je v anoxických habitatech, jako jsou mořské a sladkovodní sedimenty, komunální skládky, nesmíme opomenout zástupce žijící v batoru přežvýkavců, trávicím traktu švábů a dalších živočichů. Většinou mají anaerobní deriváty mitochondrií, často hydrogenosomy, organely produkující vodík. Metabolismus anaerobních prvoků je ve srovnání s aerobními organismy méně efektivní. Časté interakce anaerobních protist s prokaryotickými organismy však mohou zrychlit jejich metabolismus. Symbiózy mezi anaerobními prvoky a prokaryoty jsou běžné a vznikly u zástupců mnoha anaerobních linií. Prokaryoti mohou žít buď endosymbioticky, uvnitř buňky hostitele, nebo ektosymbioticky, na povrchu hostitelské buňky. Dvě ekologicky významné skupiny prokaryot si dokázaly osvojit život v symbiotickém vztahu s volně žijícími anaerobními prvoky. Metanogenní archebakterie, osídlující hlavně cytoplazmu prvoka, využívají vodík a organické sloučeniny k produkci metanu a síran redukující bakterie, žijící hlavně na povrchu buněk, využívají vodík a různé organické sloučeniny k redukci síranu na sulfan. Velmi málo se ví o bližším charakteru těchto vztahů, druhové identitě a hostitelské specifitě prokaryotických symbiontů. Další výzkum je nutný pro pochopení fenoménu symbióz v anoxickém světě.

Klíčová slova: **anaerobní prvoci, symbióza, metanogenní archebakterie, síran redukující bakterie, hydrogenosomy**

Abstract

Anaerobic protists are organisms that thrive in oxygen-free environments. They inhabit various anoxic habitats including marine and freshwater sediments, municipal landfills, but also gastrointestinal tracts of ruminants, cockroaches and other animals. They usually possess anaerobic mitochondrion-related organelles, usually hydrogenosomes that produce hydrogen. Compared to aerobes, metabolism of anaerobic protists is less efficient, but frequent interactions of anaerobes with prokaryotic organisms possibly enable them to increase their metabolic rate. Symbioses between protists and prokaryotes are ubiquitous and have arisen independently in many anaerobic lineages. Prokaryotes can be either endosymbiotic, living inside the host cell, or ectosymbiotic, attached to the surface of the host cell. There are two ecologically important groups of prokaryotes that are known to have established these symbiotic interactions with anaerobes. Methanogenic Archaea, mostly inhabiting the cytoplasm of the host, utilize H₂ and organic compounds to produce methane, and sulfate-reducing bacteria, mostly found as ectosymbionts, utilize H₂ and various organic compounds to use sulfate as terminal electron acceptor. Little is known about the exact nature of the relationships, species identity and host specificity of the prokaryotic symbionts. Further studies are required to fully understand the phenomenon of symbiosis in anoxic world.

Key words: anaerobic protists, symbiosis, methanogenic Archaea, sulfate-reducing bacteria, hydrogenosomes

Obsah

1. Úvod	1
1. Život bez kyslíku	2
1.1 ANAEROBNÍ A MIKROAEROFILNÍ PROTISTI.....	2
1.2 ANAEROBNÍ METABOLISMUS.....	5
2. Prokaryoti v symbióze s anaeroby	8
2.1 METANOGENNÍ ARCHAEA.....	10
2.2 SÍRAN REDUKUJÍCÍ BAKTERIE.....	11
2.3 MIKROBIÁLNÍ KOMUNITY: KOMPETICE NEBO KOOPERACE?.....	13
3. Kooperace v anaerobním prostředí	14
3.1 ŽIVOT UVNITŘ BUŇKY	14
3.1.1 Metanogenní endosymbionti	14
3.1.2 Nemetanogenní endosymbionti.....	18
3.2 ŽIVOT NA POVRCHU BUŇKY	19
Závěr	23
Přehled literatury	24

1. Úvod

Anaerobní a mikroaerofilní prvoci jsou organismy žijící v redukčním prostředí, bez přítomnosti kyslíku nebo pouze v jeho nízkých koncentracích. Jednou z adaptací na život v anoxickém prostředí je přítomnost specifických buněčných organel odvozených od mitochondrie. Hydrogenosomy, mitosomy a další anaerobní deriváty mitochondrií byly popsány převážně u endobiotických protist (např. *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis hominis*, *Neocallimastix patriciarum*, *Nyctotherus ovalis*) (Lindmark & Müller, 1973; Yarlett *et al.*, 1986; Akhmanova *et al.*, 1998; Roger *et al.*, 1998; Tovar *et al.*, 1999; Nasirudeen & Tan, 2004). O těchto organelách u volně žijících anaerobů toho ale doposud víme jen málo (viz Gill *et al.*, 2007; Hampl & Simpson, 2007).

Anaerobní prvoci obývají nejrůznější habitaty. Volně žijící anaerobní prvoky najdeme např. v mořských a sladkovodních sedimentech, nádržích či čističkách odpadních vod (Fenchel, 1967; Finlay, 1981; Wagener *et al.*, 1986; Broers *et al.*, 1990). Endobiotické prvoky pak známe z bachelu přežvýkavců, trávicího traktu švábů, termitů a mnohých dalších živočichů (Williams, 1986; Hackstein & Stumm, 1994; Brugerolle *et al.*, 2003; Ohkuma, 2008). Do anoxického a mikrooxického prostředí proniklo mnoho skupin protist z různých eukaryotických říší (Fenchel & Finlay, 1990a; Bernard *et al.*, 2000; Hampl & Simpson, 2007).

V anoxickém prostředí prvoci mnohdy žijí v symbiotické interakci s prokaryoty. Významnou skupinou jsou endosymbiotické metanogenní archebakterie žijící v časté asociaci s hydrogenosomy (van Bruggen *et al.*, 1983; Clarke *et al.*, 1993; Fenchel & Finlay, 2010). V cytoplazmě anaerobů jsou často přítomni i jiní endosymbionti (van Bruggen *et al.*, 1984; Finlay *et al.*, 1991), někteří prokaryoti dokázali osídlit i jádro hostitele (Sato *et al.*, 2014; Schulz *et al.*, 2014). Symbionty lze najít i na povrchu buněk, patří mezi ně ektosymbiotické síran redukující bakterie (Fenchel & Ramsing, 1992) či epixenosomy, bakterie připomínající eukaryotické extrusomy (Rosati *et al.*, 1996).

Symbiózy protistům umožňují zrychlit metabolismus v anoxickém prostředí, mohou ovlivňovat genovou expresi hostitele (Hamann *et al.*, 2016), poskytují prvokům energetickou výhodu (Finlay & Fenchel, 1992), mohou zastávat pohybovou funkci (Cleveland & Grimstone, 1964; Radek & Nitsch, 2007), sensorickou funkci (Dyer & Khalsa,

1993), fungovat mohou i jako antipredační mechanismus (Breglia *et al.*, 2010). Ukazuje se, že symbiózy mezi prvky a prokaryoty jsou běžné, často vysoce specifické (van Hoek *et al.*, 2000) a existovaly už při vzniku anaerobních linií (Esteban *et al.*, 1993).

Anoxické sedimenty skrývají nezměrnou diverzitu dosud nepopsaných organismů (Stoeck & Epstein, 2003) a díky snižování koncentrace rozpuštěného kyslíku ve světových oceánech lze očekávat další rozšiřování bezkyslíkatých zón (Orsi *et al.*, 2012). Studium anaerobních organismů je tedy nutné pro bližší pochopení tohoto prostředí. Je nad rámec této bakalářské práce shrnout symbiotické interakce u všech prvků, proto se moje práce nezabývá parazitickými či endobiotickými prvky, ale zaměřuje se pouze na symbiotické vztahy mezi prokaryoty a volně žijícími anaerobními prvky. Nepřestává mě fascinovat, že v mnoha případech žijí v jednom společenství zástupci všech tří domén – Eukaryota, Archaea i Bacteria, dokáží spolu kooperovat v bezkyslíkatém prostředí a osídlovat jinak těžko obyvatelné habitaty.

1. Život bez kyslíku

„Life on earth is more like a verb. It repairs, maintains, re-creates, and outdoes itself.“

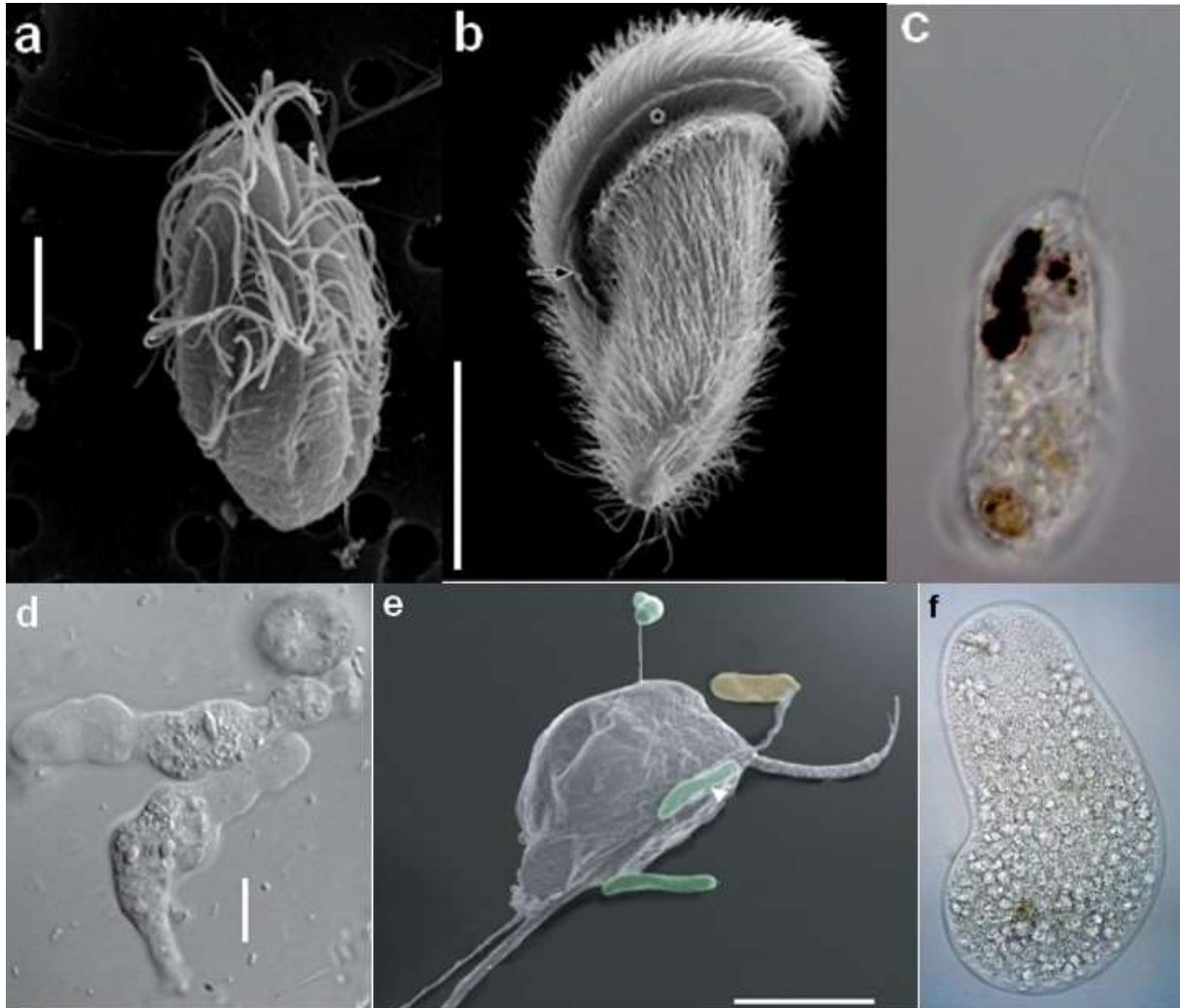
— Lynn Margulis

1.1 ANAEROBNÍ A MIKROAEROFILNÍ PROTISTI

Rozhodně nelze říci, že anaerobní způsob života je pouhým zjednodušením života v kyslíkatém prostředí. Navíc, ač na úkor nižších růstových rychlostí a delší generační doby, mnoho protistních linií dokázalo proniknout do anoxických habitatů nezávisle na sobě (Fenchel & Finlay, 1990a; Bernard *et al.*, 2000; Hampl & Simpson, 2007).

Volně žijící anaerobní prvci jsou kosmopolitně rozšířeni v nejrůznějších anoxických habitatech od půd, sladkých vod přes komunální skládky, rýžová pole až po mořské sedimenty (Finlay & Fenchel, 1991a; Schwarz & Frenzel, 2003; Esteban & Finlay, 2004; Murase *et al.*, 2006). Volně žijící anaerobní prvky najdeme napříč eukaryotickými liniemi (viz Obr. 1.), skutečná diverzita těchto organismů je však zjevně mnohem vyšší než ta dosud popsaná (Esteban *et al.*, 1993; Stoeck *et al.*, 2009; Kolisko *et al.*, 2010; Yubuki *et al.*, 2010; Pánek *et al.*, 2015).

Metabolismus anaerobů je méně efektivní, umožňuje ale využívat zdroje, které jsou pro ostatní organismy nedostupné. Anoxické sedimenty nejsou pro většinu mnohobuněčných fagotrofů úživné a anaerobní prvoci jsou v těchto habitatech často hlavními bakteriovozy (Fenchel & Finlay, 1990). Na zvýšení růstových rychlostí a zefektivnění metabolismu se mohou podílet prokaryotičtí symbionti (van Bruggen et al., 1985; Fenchel & Finlay, 1990; Yamada et al., 1997).



Obr. 1. Příklady volně žijících anaerobních a mikroaerofilních protist, kteří hostí symbiotické prokaryoty.

a) Nálevník z podtřídy Scuticociliatia. Měřítko: 5 μm . **b)** *Metopus fuscus*, nálevník z třídy Armophorea. Měřítko: 50 μm ; **c)** Bičíkovec z kmene Euglenozoa, *Bihospites bacati* (Symbiontida); **d)** Améboflagelát *Psalteriomonas lanterna* z kmene Heterolobosea. Měřítko: 10 μm ; **e)** *Lenisia limosa*, zástupce skupiny Breviatea. Lze vidět ektosymbiotické bakterie (zeleně). Měřítko: 2 μm ; **f)** 0,5 mm velká améba *Pelomyxa palustris* z kmene Archamoebae. (**b-f**) Upraveno z Bourland et al., 2014; Breglia et al., 2010; Pánek et al., 2011; Hamann et al., 2016; <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artsep01/amoeba.html>

Určitá tolerance ke kyslíku, pozorovaná u většiny zkoumaných anaerobních zástupců, je možným mechanismem, který prvokům umožňuje proniknout do dalších anoxických habitatů skrze kyslíkaté prostředí (Fenchel *et al.*, 1989). Jednotlivé druhy se svou tolerancí ke kyslíku liší. Někteří zástupci dokáží přežít při nízkých koncentracích kyslíku pouze několik hodin (např. nálevník *Parablepharisma collare*), jiní dokáží zvládat tyto podmínky i několik dní (např. nálevníci *Metopus contortus* a *Plagiopyla frontata*) (Fenchel & Finlay, 1990b). Vzhledem k možným výkyvům koncentrace kyslíku ve vodním prostředí je schopnost tolerance kyslíku dobrým předpokladem pro přežití. Není překvapivé, že se anaerobióza vyvinula u různých protistních liniích nezávisle na sobě (Fenchel & Finlay, 2010).

Těsně nad anoxickými zónami sedimentů žijí prvoci, kteří kyslík potřebují, ale vyhýbají se jeho vyšším koncentracím (Griffin, 1988; Fenchel *et al.*, 1989). Tito mikroaerofilní zástupci žijí na rozhraní mezi dvěma zcela odlišnými prostředími, musí se tedy umět vypořádat s problémy spojenými s životem na takto specifických místech. Například u nálevníka druhu *Loxodes striatus* je citlivost ke kyslíku navíc ovlivněna i přítomností světla. Po absorpci světla vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), a díky nízké schopnosti prvoka bránit se těmto kyslíkovým radikálům se tak zvyšuje jeho citlivost ke kyslíku (Finlay *et al.*, 1986; Fenchel & Finlay, 1986). Zvládnutí životních podmínek v minimálních koncentracích kyslíku může otevírat i nové potravní možnosti, jako u mikroaerofilního nálevníka rodu *Kentrophoros*, který se živí chemolitotrofními bakteriemi, jež hostí na svém povrchu. Tyto bakterie totiž vyžadují přítomnost redukovaných sloučenin síry a kyslíku zároveň (Fenchel & Finlay, 1989).

I některé aerobní druhy, mající enzymy typické pro aerobní respiraci, mohou po určité době žít bez kyslíku, dochází u nich ke zvětšení objemu mitochondrií (Bernard & Fenchel, 1996) a k zisku ATP využívají jiné cesty, možnými substráty mohou být sukcinát, propionát nebo nitrát (Finlay, 1985). Zajímavým příkladem je i chlorofytní řasa *Chlamydomonas reinhardtii*, která dokáže ve tmě změnit genovou expresi a přepnout na vodík produkující anaerobní metabolismus (Mus *et al.*, 2007).

1.2 ANAEROBNÍ METABOLISMUS

Jednou z adaptací eukaryotických organismů na anaerobní způsob života je modifikace mitochondrií. V několika posledních dekádách byla studiu organel mitochondriálního původu věnována velká pozornost. Přísun nových znalostí však způsobil i určité zmatky v klasifikaci těchto organel. Tradiční rozdělení na aerobní mitochondrie, anaerobní hydrogenosomy produkující vodík a anaerobní mitosomy bez energetického metabolismu už zdaleka nestačí na pojmenování mitochondriálních organel u všech protist.

Mnoho zástupců anaerobních prvoků má mitochondrie kombinující znaky kanonických mitochondrií a hydrogenosomů. Tyto organely jsou obecně označovány jako mitochondrion-like organelles (MLOs) (Makiuchi & Nozaki, 2014) nebo mitochondrion-related organelles (MROs) (Gray, 2012). Například anaerobní améba *Mastigamoeba balamuthi* (Archamoebae) exprimuje jak enzymy aerobního metabolismu, tak i pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu, hydrogenázu a další enzymy typické pro metabolismus hydrogenosomů (Gill *et al.*, 2007). Anaerobní mitochondrie nálevníka *Nyctotherus ovalis* jsou charakteristické přítomností některých součástí dýchacího řetězce, chybí však komplexy III, IV a ATP syntáza (de Graaf *et al.*, 2011), které chybí i u nepříbuzných protist, stramenopilních zástupců *Blastocystis* sp. a *Proteromonas lacertae* (Pérez-Brocal & Clark, 2008; Pérez-Brocal *et al.*, 2010). Anaerobní deriváty mitochondrií u různých protist tak tvoří jakési kontinuum (Boxma *et al.*, 2005; Stechmann *et al.*, 2008). Některé hypotézy navíc naznačují, že předek mitochondrie byl fakultativní anaerob a byl přizpůsoben životu v anoxii (Gabaldón & Huynen, 2007; Martin *et al.*, 2015).

O klasifikaci jednotlivých typů anaerobních derivátů mitochondrií se pokusilo několik autorů (např. Embley, 2006; Hjort *et al.*, 2010; Shiflett & Johnson, 2010). V roce 2012, Müller *et al.* rozdělili organely mitochondriálního původu na pět funkčních typů (viz. Fig. 1.). Prvním typem jsou kanonické mitochondrie se všemi komplexy elektron transportního řetězce (*electron transport chain*, ETC), organely produkující ATP a využívající O₂ jako terminální akceptor elektronů. Druhou skupinou jsou anaerobní mitochondrie, které využívají místo kyslíku jiný terminální akceptor elektronů, např. fumarát. Dále jsou to dva typy vodík produkujících organel. Vodík produkující mitochondrie s komplexy ETC, zároveň ale s funkční hydrogenázou, což je enzym, díky

kterému mohou využívat proton jako terminální akceptor elektronů a produkovat vodík. Tento typ najdeme např. u nálevníka druhu *Nyctotherus ovalis* (de Graaf *et al.*, 2011). Čtvrtým typem jsou hydrogenosomy, organely bez ETC, které produkují ATP pomocí substrátové fosforylace a jsou schopny díky přítomnosti hydrogenázy produkovat vodík. Známe však i prvoky, kteří umí produkovat vodík přímo v cytoplazmě (např. *Giardia intestinalis*) (Lloyd *et al.*, 2002). Posledním klasifikovaným typem jsou mitosomy, které najdeme hlavně u parazitických protist (León-Avila & Tovar, 2004; Tachezy & Šmíd, 2007). Mitosomy jsou ze všech výše zmíněných nejvíce redukované organely, nepodílí se totiž ani na produkci ATP. Ponechávají si však funkce spojené s biogenezí mitochondriálních Fe-S clusterů (Goldberg *et al.*, 2008). Právě biogeneze Fe-S center zůstává zásadní rolí všech organel mitochondriálního původu (Šuťák *et al.*, 2004). Zatím jediný známý organismus zcela postrádající mitochondriální organelu a s ní obvykle spojené funkce, je oxymonáda *Monocercomonoides* sp., u které se syntéza Fe-S clusterů odehrává pouze v cytosolu pomocí metabolické dráhy převzaté laterálním genovým přenosem od prokaryot (Karnkowska *et al.*, 2016).

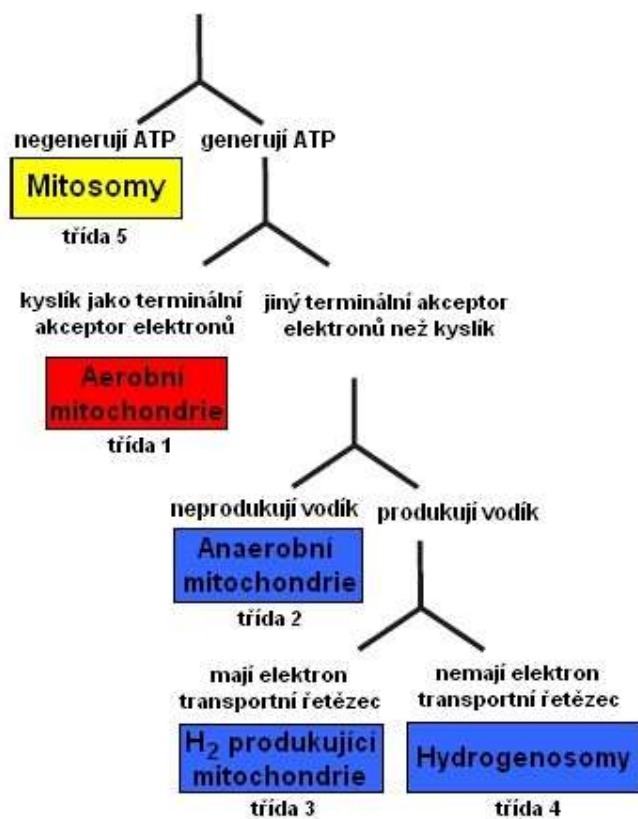


Fig. 1. Klasifikace organel mitochondriálního původu. Upraveno podle Müller *et al.* (2012).

Nejdéle známé anaerobní deriváty mitochondrií jsou hydrogenosomy a vodík produkující mitochondrie, v průměru 0,5-2 μm velké organely objevené např. u parazitických trichomonád (Lindmark & Müller, 1973), některých chytridiomycet (*Piromyces* sp., *Neocallimastix frontalis*) (Yarlett *et al.*, 1986; Akhmanova *et al.*, 1999), anaerobních nálevníků (Zwart *et al.*, 1988; Finlay & Fenchel, 1989), heterolobosních protist (de Graaf *et al.*, 2009; Barberà *et al.*, 2010), byly popsány i u parazitické diplomonády *Spironucleus salmonicida* (Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2013).

Dosud jedinými mnohobuněčnými organismy, u kterých byly nalezeny organely podobné hydrogenosomům, jsou někteří zástupci kmene Loricifera (korzetky), objevení v anoxické hypersalinní pánvi Středozemního moře (Danovaro *et al.*, 2010).

Protože fosforylace u hydrogenosomů probíhá pouze na substrátové úrovni v důsledku chybějícího ETC, množství vyprodukovaného ATP je v porovnání s aerobními mitochondriemi o dost nižší (Müller, 1993). Hydrogenosomy ke své funkci potřebují specifické enzymy. Patří mezi ně hydrogenáza, katalyzující vznik vodíku, a typicky pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), nahrazující mitochondriální pyruvát dehydrogenázu (PDH) a katalyzující redukci ferredoxinu. Enzymatické složení se ale může různit (Marvin-Sikkema *et al.*, 1993). Heterolobosní mikroaerofil *Sawyeria marylandensis* má hydrogenosomy miskovitého tvaru s unikátní kombinací biochemických drah. Tyto organely nejsou blízce příbuzné hydrogenosomům trichomonád či chytridiomycet (Barberà *et al.*, 2010). Hydrogenázy anaerobů mají nejspíš polyfyletický původ, geny pro hydrogenázu mohly být zděděny od společného předka mitochondrií a hydrogenosomů, mohly být získány laterálním genovým přenosem od různých prokaryot nebo mohly vzniknout *de novo* z genetické výbavy prvoka (Akhmanova *et al.*, 1998; Horner *et al.*, 2000).

Nejasnosti okolo přesné identifikace organel panují i z důvodu použitých metod. Kupříkladu u mnoha linií anaerobních nálevníků se tvrdí, že mají hydrogenosomy (např. *Plagiopyla nasuta*, *Trimyema compressum*) (Zwart *et al.*, 1988; Goosen *et al.*, 1990). Tyto úsudky jsou ale mnohdy utvořeny pouze na základě morfologie organel (většinou absence krist), přítomnosti hydrogenázy nebo podle přítomnosti symbiontů odčerpávajících produkovaný vodík (van Bruggen *et al.*, 1986; Goosen *et al.*, 1988). Bez podrobnějšího výzkumu však nelze jednoznačně určit povahu těchto organel. Navíc, několik anaerobních nálevníků (např. *Metopus contortus*, *Brachonella spiralis*, *Plagiopyla* sp., *Parablepharisma*

pellitum) má vnitřní membránu organel s invaginacemi připomínajícími mitochondriální krysty (Finlay & Fenchel, 1989; Biagini *et al.*, 1997). Také anaerobní deriváty mitochondrií nálevníka rodu *Cristigera* se morfologicky podobají mitochondriím blízce příbuzných aerobních zástupců tohoto rodu (Fenchel & Finlay, 1991a).

Hledání genomu u anaerobních mitochondrií nebylo zatím úspěšné, až na několik výjimek (např. *Nyctotherus ovalis*, *Blastocystis hominis*, *Proteromonas lacertae*) (Akhmanova *et al.*, 1998; Pérez-Brocal & Clark, 2008; Pérez-Brocal *et al.*, 2010). Procesy spojené se ztrátou genomu organely a horizontálním přenosem genů do jaderného genomu hostitele však nejsou ojedinělé a vyskytují se i u mitochondrií a plastidů (Adams *et al.*, 2002; Archibald *et al.*, 2003).

I některé anaerobní deriváty mitochondrií umí zpracovávat kyslík (Müller & Lindmark, 1978). Tento proces však není asociován s konzervací energie, ale funguje pravděpodobně jako detoxifikační mechanismus chránící před toxicitou kyslíku (Fenchel & Finlay, 1990b).

S vodík produkujících organel jsou často v asociaci endosymbiotičtí prokaryoti, jejichž hlavní rolí je odčerpávat vznikající vodík z okolí těchto organel (Fenchel & Finlay, 1992). Nízké hladiny vodíku v okolí organel jsou pro prvoky výhodné, protože jim umožňují zefektivnit metabolismus (Fenchel & Finlay, 1990a). Hlavně u malých protist ale může vodík z buňky i volně difundovat (Wagener *et al.*, 1990). Vodík produkující mitochondrie a hydrogenosomy kromě vodíku produkují i další látky, jako mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, propionát a butyrát) (Stumm *et al.*, 1982; Yarlett *et al.*, 1985), které mohou být potenciálně využívány prokaryotickými symbionty (Edgcomb *et al.*, 2011a).

2. Prokaryoti v symbióze s anaeroby

„Coming together is the beginning. Keeping together is progress. Working together is success.”

— Henry Ford

Symbióza, obecně definovaná jako úzké soužití mezi dvěma různými organismy, je častou strategií protist jak rozšířit své biochemické možnosti, osídlit nové habitaty nebo získat jiné výhody pro přežití (Gill & Vogel, 1963; Dziallas *et al.*, 2012).

Bez symbiotických interakcí by nemohl vzniknout život, jak ho známe dnes. I semiautonomní organely, jako mitochondrie a plastidy, byly kdysi endosymbionty, kteří se až postupem času, v procesu symbiogeneze, stali esenciální součástí eukaryotických buněk. Při symbiogenezi dochází mimo jiné k horizontálnímu přenosu prokaryotických genů do jaderného genomu prvoka, a to v procesu zvaném *endosymbiotic gene transfer* (EGT). Je to přirozený a běžně se vyskytující proces, který kontinuálně ovlivňuje dynamiku jaderné DNA (Timmis *et al.*, 2004). Prvok tak díky endosymbióze může inovovat svou genetickou výbavu, podobně jako tomu je u vnitrodruhového nebo mezidruhového laterálního genového přenosu u prokaryot (Zhaxybayeva *et al.*, 2006).

Prvními kroky v evoluci endosymbiotického vztahu jsou ztráta genů, které symbiont v intracelulárním prostředí nepotřebuje, ztráta biochemických drah pro syntézu metabolitů, které jsou poskytovány hostitelskou buňkou, dále i snížená schopnost oprav DNA a ztráta některých transportních drah (Nowack & Melkonian, 2010). Všechny tyto kroky, spolu se synchronizovaným dělením, vertikálním přenosem symbiontů a obligátním charakterem soužití (van Hoek *et al.*, 2000), jsou možnou cestou k postupné transformaci symbionta na organelu. Pro osvětlení a bližší pochopení symbiogenetických událostí nám může pomoci studium volně žijících symbiotických interakcí, např. mezi volně žijícími anaerobními prvky a prokaryoty.

Symbionti protist mohou být kromě prokaryot i jiné eukaryotické organismy. Časté jsou symbiózy s řasou, které v mnohých ohledech mohou připomínat interakce mezi prvky a prokaryoty (Reisser, 1980). Některým nálevníkům (např. *Halteria viridis*, *Euplotes daidaleos*) umožňuje řasový endosymbiont, poskytující kyslík a organické látky, přežít v hlubších, anoxických vodách (Finlay *et al.*, 1996).

Podoba symbiotických vztahů zahrnuje všechny formy od parazitismu až k mutualismu (Goebel & Gross, 2001). Mutualistický vztah poskytuje prokaryotům hlavně oddělené prostředí bohaté na substrát. Podstatné výhody soužití pro symbionty často nelze demonstrovat, ne vždy lze tento vztah považovat za čistě mutualistický (Douglas & Smith, 1989). U symbióz mezi volně žijícími anaerobními prvky a prokaryoty tomu není jinak.

2.1 METANOGENNÍ ARCHAEA

Archaea jsou prokaryotické organismy, známé hlavně jako extremofilové, které jsou schopny obývat prostředí s teplotami přesahujícími i 100 °C, extrémním pH nebo vysokým obsahem solí (Woese, 1987). Dnes ale víme, že archebakterie jsou rozšířeny ve většině habitatů, včetně půd a mořských i sladkovodních sedimentů (DeLong, 1998). Jejich buňky mají tvar tyčinek, koků, spiril, disků, ale mohou mít i nepravidelné tvary. Archaea jsou velmi diverzifikovaná skupina i z pohledu metabolismu. Dokáží využívat rozmanité zdroje energie, najdeme mezi nimi chemotrofy i fototrofy, jako redukční ekvivalenty mohou využívat organické i anorganické látky (Blaut, 1994). Metanogenní archebakterie, patřící do skupiny Euryarchaeota, jsou významnou skupinou prokaryotických organismů. Podle analýz sekvence 16S rDNA je dnes dělíme do pěti hlavních linií – Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales a Methanopyrales (Garcia, 1990; Liu & Whitman, 2008). Jsou to striktní anaerobové a kyslík je pro ně toxický. Známe tři metabolické dráhy, které metanogeni využívají k produkci metanu: redukci CO₂, methylotrofii a redukci acetátu (Boone *et al.*, 1993). Hlavními produkty jejich metabolismu jsou metan a acetát, v menší míře i propionát a butyrát (Yamada *et al.*, 1997).

Metanogeni jsou častými symbionty anaerobních prvoků (van Bruggen *et al.*, 1983; Fenchel & Finlay, 1991b). Metanogenní Archaea mohou žít v hostiteli endosymbioticky, jako u volně žijících anaerobních prvoků (Fenchel & Finlay, 2010), i ektosymbioticky např. u bachorových nálevníků (Stumm *et al.*, 1982). Tato skupina prokaryot se vyznačuje typickou autofluorescencí koenzymů F₄₂₀ a F₃₄₂, která byla, spolu s přítomností methylkoenzym M reductázy, využívána jako důkaz přítomnosti metanogenních endosymbiontů (Doddema & Vogels, 1978; Thauer, 1998). Nevhodnost těchto metod k charakterizaci endosymbiontů dokazuje i fakt, že některá metanogenní Archaea emitují záření velmi slabě nebo vůbec (např. někteří zástupci čeledi Methanosaetaceae) (Zinder, 1993). Navíc, koenzym F₄₂₀ mají i nemetanogenní zástupci, jako jsou některá metanotrofní či síran redukující Archaea, dokonce i někteří zástupci bakterií (např. kmen Actinobacteria) (Greening *et al.*, 2016). Od 90. let 20. století jsou k přesnému určení metanogenů používány vhodnější metody, jako je fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickými fluorescenčními oligonukleotidovými próbami a sekvenování 16S rDNA se specifickými

primery (Embley *et al.*, 1992b; Clarke *et al.*, 1993; Narayanan *et al.*, 2009; Hirakata *et al.*, 2015).

Metan je po CO₂ druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem, je zodpovědný až za 20 % oteplení planety způsobeného skleníkovými plyny (Kirschke *et al.*, 2013). V porovnání s CO₂ má metan mnohem vyšší potenciál globálního oteplování - *global warming potencial* (GWP) (Koneswaran & Nierenberg, 2008), významně se tedy podílí na změnách klimatu v souvislosti se svou schopností zadržovat teplo. Množství metanu v atmosféře každoročně stoupá, a to hlavně díky antropogenním vlivům a globálnímu rozvoji chovů dobytka (McMichael *et al.*, 2007).

Významně se na celkové produkci metanu podílejí i endosymbiotičtí metanogeni (Holmes *et al.*, 2014). Symbiotičtí prokaryoti asociovaní s prvoky, kteří žijí v bachoru přežvýkavců, jsou zodpovědni za 9 až 37 % vyprodukovaného metanu (Finlay *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1995), u volně žijících zástupců nejvýznamněji přispívají prvoci v mořských sedimentech (např. nálevník *Metopus contortus*), kteří mohou být zodpovědni až za 90 % celkové produkce metanu v mořích (Fenchel & Finlay, 2010). Podstatně mohou k produkci metanu přispívat i endosymbiotičtí prokaryoti prvků obývajících zaplavená rýžová pole (Schwarz & Frenzel, 2005), naproti tomu většina sladkovodních druhů se na celkové produkci metanu podílí jen nepatrně (např. symbionti nálevníků *Caenomorpha* sp., *Heterometopus palaeformis*, *Plagiopyla* sp., *Cyclidium* sp.) (Fenchel, 1993; van Hoek *et al.*, 2006).

Anaerobní prvoci mají potenciální využití i v čištění odpadních vod a biotechnologiích (Priya *et al.*, 2007; Hirakata *et al.*, 2016). Nedávné studie naznačují důležitou roli anaerobních a mikroaerofilních protist (např. někteří zástupci rodů *Metopus*, *Cyclidium*, *Rhynchomonas*, *Menoidium* nebo *Bodo*) v procesu biometanace – přeměně organických látek pomocí anaerobních mikroorganismů na bioplyny (Prabhakaran *et al.*, 2016).

2.2 SÍRAN REDUKUJÍCÍ BAKTERIE

Síran redukující bakterie (SRB) jsou polyfyletickou skupinou prokaryotických organismů, které využívají síran jako terminální akceptor elektronů (Barton & Fauque, 2009). Jsou to anaerobní organismy, někdy tolerující nízké koncentrace kyslíku (Kjeldsen *et al.*, 2004).

Ně největší skupinu SRB tvoří δ -proteobakterie (např. rody *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*), dále sem patří zástupci třídy Clostridia (rody *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Desulfosporomusa*) nebo termofilní linie (např. rod *Thermodesulfobacterium*) (Muyzer & Stams, 2008). Mezi organismy schopné redukovat sírany patří i zástupci domény Archaea (např. rod *Archaeoglobus*) (Thauer & Kunow, 1995). Metabolismus síran redukujících bakterií je velmi různorodý, prokaryoti mohou využívat H_2 , acetát, laktát, butyrát, také další mastné kyseliny nebo aromatické sloučeniny (Muyzer & Stams, 2008).

Vyskytují se v rozmanitých habitatech, hojně jsou zastoupeny v mořských sedimentech, najdeme je také v hydrotermálních větracích otvorech, sladkovodních habitatech s různou hodnotou pH nebo čističkách odpadních vod (Sass *et al.*, 1998; Jeanthon *et al.*, 2002; Mußmann *et al.*, 2005; Ben-Dov *et al.*, 2007). Významně se podílejí na koloběhu síry a uhlíku. Hrají jednu z hlavních rolí v degradaci organických látek v anoxickém prostředí. Spolu s metanotrofními prokaryoty se významně podílí na anaerobní oxidaci metanu (Orphan *et al.*, 2001).

SRB žijí často v symbióze s volně žijícími anaerobními prvky. Tento jev byl dosud popsán pouze u mořských anaerobů (Fenchel & Ramsing, 1992). Na rozdíl od metanogenních endosymbiontů najdeme SRB převážně na povrchu buňky, tedy v ektosymbiotickém vztahu. V několika případech byli symbionti určeni jako zástupci třídy δ -proteobakterií (Edgcomb *et al.*, 2011a; Orsi *et al.*, 2012).

Typickým znakem síran redukujících prokaryot je přítomnost specifické siřičitan reduktázy (*dissimilatory sulfite reductase*), katalyzující redukci siřičitanů na sulfidy (Klein *et al.*, 2001). Většina zkoumaných síran redukujících prokaryot však podle sekvence 16S rDNA spadá mezi dosud nekultivované organismy. Diverzita těchto prokaryot je tedy z velké části nepoznaná (van der Wielen & Heijs, 2007). Pro bližší určení symbiotických SRB pomocí metod fluorescenční *in-situ* hybridizace je potřeba navrhnout próby specifické pro co nejvíce linií této diverzní prokaryotické skupiny.

2.3 MIKROBIÁLNÍ KOMUNITY: KOMPETICE NEBO KOOPERACE?

Anaerobní protisti mohou hostit endosymbiotické metanogeny i ektosymbiotické síran redukující bakterie zároveň. Tento jev byl zatím popsán pouze u mořských anaerobů (např. nálevník *Metopus contortus*) (Embley *et al.*, 1992a; Fenchel & Ramsing, 1992). Volně žijící komunity těchto prokaryotických skupin se navzájem výrazně ovlivňují, také mezi nimi může docházet k mezidruhovému přenosu H₂, což je pravděpodobné i v případě symbiontů.

V prostředích, v kterých jsou přítomny kromě CO₂ i jiné akceptory elektronů (O₂, NO₃⁻, Fe³⁺ nebo SO₄²⁻), se metanogeneze v konkurenci se síran redukujícími bakteriemi, denitrikačními bakteriemi nebo bakteriemi redukujícími železo stává minoritním procesem. Metabolické cesty těchto prokaryot jsou termodynamicky výhodnější než redukce CO₂ na metan (Liu & Whitman, 2008). Síran redukující bakterie také dokáží využívat více typů substrátů než metanogeni (Muyzer & Stams, 2008).

V prostředí bohatém na sírany nemají metanogeni šanci konkurovat síran redukujícím bakteriím. Metanogeneze může dominovat pouze v prostředích chudých na sírany, ve sladkovodních habitatech, trávicím traktu savců, kde sírany v podstatě chybí, nebo v určitých oblastech moří, kde už je většina síranů spotřebována díky činnosti síran redukujících bakterií (D'Hondt *et al.*, 2002; Fenchel & Finlay, 2010). Metanogeneze je i v mořích důležitým anaerobním procesem, ale většina produkovaného metanu je postupně oxidována až na CO₂, neuniká tak do atmosféry (Liu & Whitman, 2008). Anaerobní oxidace metanu probíhá ve spolupráci metanotrofních prokaryot a síran redukujících bakterií (Boetius *et al.*, 2000).

Jak už bylo zmíněno, metanogenní symbionti anaerobních protist mohou přispívat k produkci metanu hlavně v mořích a metanogeneze je v těchto habitatech minoritním procesem. Hostitelská buňka prvoka však, v prostředí bohatém na sírany, funguje jako útočiště pro metanogenní archebakterie. Metanogenní symbionti tak ve vnitřním prostředí hostitele nemusí kompetovat se síran redukujícími bakteriemi (Fenchel & Finlay, 2010).

Kooperace mezi metanogeny a síran-redukujícími bakteriemi mohla být v době, kdy byly hluboké oceány převážně anoxické, tedy ještě před jednou miliardou let (Anbar & Knoll, 2002), častou a stěžejní interakcí (Hoffmeister & Martin, 2003). Mezidruhový

přenos vodíku mezi metanogenními archebakteriemi a síran redukujícími deltaproteobakteriemi byl možná i pohonem pro vznik eukaryotické buňky, jak předpovídá syntrofní hypotéza eukaryogeneze (Moreira & López-García, 1998).

3. Kooperace v anaerobním prostředí

„Symbiosis is a much higher reflection of intelligent life.“
— Frederick Lenz

3.1 ŽIVOT UVNITŘ BUŇKY

Uvnitř buněk anaerobních protist často žijí prokaryotické organismy. Ať už to jsou Archaea nebo Bacteria, všechny využívají substrát poskytovaný hostitelem a prosperují ve vnitřním prostředí prvoka (Finlay & Fenchel, 1992). Významnou skupinou endosymbiontů jsou metanogenní archebakterie, obvykle jsou ale přítomni i nemetanogenní prokaryoti (Finlay *et al.*, 1991; Esteban *et al.*, 1995). Kromě cytoplazmy mohou prokaryoti obývat i jádro a perinukleární prostor hostitele (Bourland *et al.*, 2014; Schulz & Horn, 2015). O jaderných symbiontech volně žijících anaerobů toho ale stále víme jen velmi málo (Walochnik *et al.*, 2005).

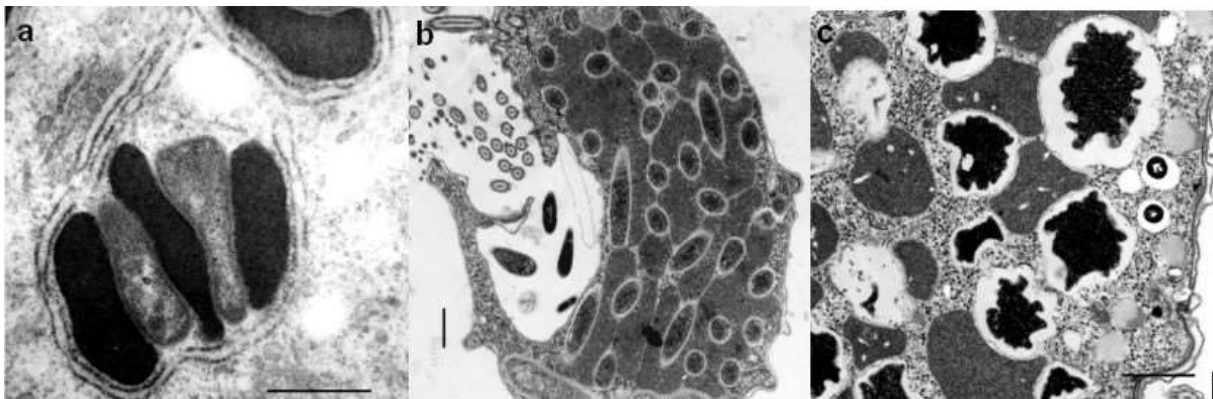
Obecným trendem v evoluci symbióz v anoxických prostředích je blízká asociace prokaryot s vodík produkujícími organelami zvyšující efektivitu interakce (Embley *et al.*, 1992a). Není těžké si představit, že v případě bakteriovorních organismů mohlo dojít k úniku pozřené prokaryota z potravní vakuoly a následnému osvojení si života v cytoplazmě prvoka (Hackstein *et al.*, 2004).

Je nutné zdůraznit, že u volně žijících druhů anaerobních prvoků byly tyto endosymbiózy blíže zkoumány pouze u nálevníků a několika málo dalších skupin. Navíc i v těchto případech existuje ještě řada nezodpovězených otázek.

3.1.1 Metanogenní endosymbionti

Metanogenní Archaea jsou častí endosymbionti volně žijících anaerobních prvoků. Symbiont od prvoka získává produkty vodík generujících organel, hlavně H₂ a CO₂, a

využívá je v procesu metanogeneze (Holmes *et al.*, 2014). Sladkovodní nálevník *Metopus* hostí acetotrofní metanogeny rodu *Methanosaeta*, kteří spolu s vodíkem využívají i acetát produkovaný hydrogenosomy. Pro funkci hydrogenosomů a vodík produkujících mitochondrií je výhodný nízký parciální tlak vodíku v jejich okolí, a právě odčerpávání vodíku je pravděpodobně hlavní rolí těchto metanogenních archebakterií (Bruggen *et al.*, 1985; Finlay & Fenchel, 1991a). Ačkoli ne všichni anaerobové, kteří mají vodík produkující orgány, hostí metanogenní endosymbionty, u některých druhů (např. anaerobní zástupci rodu *Cristigera* a většina bachorových nálevníků) najdeme nemetanogenní bakterie, které mohou vodík také odčerpávat (Fenchel & Finlay, 1991b). Prameno se ví o tom, jakým způsobem produkují H₂ prvoci postrádající vodík produkující orgány (př. améba rodu *Pelomyxa*), ale Fenchel & Finlay naznačili (2010), že by tuto roli mohli zastávat endosymbiotičtí prokaryoti schopní produkce vodíku. Mezi oběma účastníky symbiomy pravděpodobně probíhá i výměna dalších metabolitů (Fenchel & Finlay, 1991b; Edgcomb *et al.*, 2011a).



Obr. 2. Metanogenní endosymbionti v různém uspořádání v buňce prvoka. **a)** Střídající se hydrogenosomy (tmavší) a metanogenní endosymbionti u nálevníka *Plagiopyla frontata*; **b)** Komplex metanogenních archebakterií a hydrogenosomů u nálevníka *Cyclidium porcatum*; **c)** Nepravidelně tvarovaní metanogeni v blízké asociaci s hydrogenosomy u nálevníka *Trimyema* sp.. Měřítko: 0,5 μ m. (Fenchel & Finlay, 2010)

V případě volně žijících anaerobních prvoků jsou symbionti často v těsné asociaci s vodík produkujícími organelami, uspořádání symbiontů v hostitelské buňce se však může velmi lišit. Prokaryoty najdeme v cytoplazmě jednotlivě, někdy jako řetízky několika buněk (Broers *et al.*, 1990). Endosymbionti mohou být rozmístěni v rámci celé buňky hostitele (např. *Pelomyxa palustris*, *Mastigella* sp., *Heterometopus palaeformis*) (van Bruggen *et al.*, 1985; van Bruggen, 1988; Finlay & Fenchel, 1991a). Naproti tomu u několika nálevníků z třídy Plagiopylea (*Plagiopyla frontata*, *P. minuta*, *Lechriopyla mystax*) jsou symbionti

uspořádání střídavě s hydrogenosomy a tvoří charakteristické uskupení, viz. Obr. 2 (Fenchel & Finlay, 1991c; Berger & Lynn, 1992). Sladkovodní druh nálevníka *Cyclidium porcatum* hostí metanogenní symbionty i blíže neurčené tyčinkovité bakterie, kteří v buňce obklopují hydrogenosomy a společně tvoří charakteristické komplexy viz. Obr. 2 (Clarke *et al.*, 1993).

I počet metanogenů v buňce se u různých druhů prvoků velmi liší. Z části může počet korelovat s velikostí buňky prvoka, a to pokud srovnáme relativně drobný heterolobosní druh *Psalteriomonas lanterna* (bičíkaté stadium kolem 30 μm) s cca 200 symbionty uspořádanými v centru buňky (Broers *et al.*, 1992) a sladkovodní amébu rodu *Mastigella* (více než 100 μm) s až 22 000 metanogeny na buňku (van Bruggen *et al.*, 1985). Na druhou stranu i zástupci stejného rodu se mohou v počtu symbiontů výrazně odlišovat. Srovnáme-li dva zástupce nálevníků rodu *Metopus*, druh *Metopus es* s cca 800 metanogeny na buňku (Narayanan *et al.*, 2009) s druhem *Metopus contortus* s cca 4500 symbionty na buňku (van Bruggen *et al.*, 1986).

Mořský nálevník *Metopus contortus* hostí morfologicky různorodé endosymbionty, tyčinkovité volně v cytoplazmě a diskovité v úzkém napojení na hydrogenosomy (Embley *et al.*, 1992a). Na druhé straně nálevník druhu *Plagiopyla frontata* má v cytoplazmě výhradně diskovité endosymbionty těsně přichycené k hydrogenosomům. Blízká asociace s hydrogenosomy u *P. frontata* nejspíš naznačuje evolučně pokročilejší stav vývoje symbiózy (Finlay & Fenchel, 1991b), porovnáme-li situaci s přítomností polymorfních endosymbiontů u druhu *M. contortus*. Rozmístění tyčinkovitých symbiontů převážně volně v cytoplazmě u sladkovodního nálevníka druhu *Heterometopus palaeformis* pak pravděpodobně zachycuje raný evoluční stav symbiózy (Esteban *et al.*, 1995). Asociace s vodík produkujícími organelami je tedy adaptací, která symbiontům umožňuje co nejlépe zachytit H_2 dříve, než volně difunduje vně buňky. V případě symbiotické interakce u nálevníka druhu *Cyclidium porcatum* mají hydrogenosomy dokonce specifické invaginace, které slouží k těsnějšímu napojení metanogenů (Clarke *et al.*, 1993).

Vertikální přenos endosymbiontů, jejich schopnost přežít v cystách hostitele i jejich napojení na životní cyklus prvoka (Fenchel & Finlay, 1991c; van Hoek *et al.*, 2000) ukazují na dlouhodobý vývoj těchto asociací. Obligátnost těchto interakcí však dosud není úplně objasněna. Po dlouhodobé kultivaci mohou prvoci endosymbionty ztratit (Wagener & Pfennig, 1987; Shinzato & Kamagata, 2010). Zdá se, že prvoci, kteří endosymbionty

ztratili, obecně nemohou být reinfikováni volně žijícími metanogeny (Broers *et al.*, 1992), i přesto, že se to v jednom případě u nálevníka druhu *Trimyema compressum* povedlo (Wagener *et al.*, 1990).

Volně žijící anaerobové hostí různé druhy prokaryot. V mnoha případech však byli symbionti popsáni pouze na základě morfologie a ultrastruktury, výzkum pomocí moderních metod je tedy potřebný pro jednoznačné určení symbionta. Podle ultrastruktury byl metanogenní symbiont nálevníka *Metopus striatus* určen jako druh *Methanobacterium formicicum* (van Bruggen *et al.*, 1984), o deset let později se však díky použití pokročilejších metod ukázalo, že se jedná o dosud nepopsaného metanogena (Embley & Finlay, 1994).

Hostitelské spektrum u volně žijících anaerobů je velmi široké (Esteban *et al.*, 1993). Blízce příbuzní prvoci mohou hostit odlišné druhy endosymbiontů. U zástupců rodu *Metopus* bylo detekováno spektrum metanogenních druhů, mezi endosymbionty patří zástupci příbuzní rodům *Methanobacterium* (řád Methanobacteriales), *Methanocorpusculum* (řád Methanomicrobiales), *Methanosaeta* (řád Methanosarcinales) a *Methanoregula* (řád Methanomicrobiales) (Embley *et al.*, 1992b, 1992a; Narayanan *et al.*, 2009; Hirakata *et al.*, 2015). I přesto, že jsou symbionti do dalších generací obecně předáváni vertikálním přenosem, muselo v průběhu evoluce symbióz několikrát dojít k horizontální výměně jednoho symbionta za jiný druh (van Hoek *et al.*, 2000). Zároveň i nepříbuzné druhy mohou hostit blízce příbuzné metanogeny, což dokazuje přítomnost metanogenního symbionta blízce příbuzného druhu *Methanocorpusculum parvum* u dvou nepříbuzných nálevníků z odlišných habitatů – mořského druhu *Metopus contortus* a sladkovodního zástupce *Trimyema* sp. (Embley *et al.*, 1992a; Finlay *et al.*, 1993). Zdá se tedy, že hostitelská specifita metanogenních endosymbiontů je velmi malá a metanogenní Archaea jsou generalisté schopní žít v symbiotickém vztahu s různými hostiteli.

Fylogenetická pozice prokaryotických symbiontů pravděpodobně koreluje s prostředím, jaké prvok obývá, a symbionti jsou obecně blízce příbuzní volně žijícím metanogenům (Esteban *et al.*, 1993; van Hoek *et al.*, 2000). Příbuznost volně žijícím metanogenům naznačuje i neúplná genomová sekvence endosymbiotického metanogena (*Methanobacterium formicicum*) archaméby druhu *Pelomyxa palustris* (Gutiérrez, 2012). Přesto podle fylogenetických analýz víme, že se endosymbionti od volně žijících zástupců liší a pravděpodobně nikdy nejsou s volně žijícími metanogeny totožní (Clarke *et al.*, 1993;

Fenchel & Finlay, 2010). Metanogeni se mohou od volně žijících zástupců odlišovat i morfologicky. U nálevníka druhu *Metopus contortus* pravděpodobně dochází ke ztrátě buněčné stěny endosymbionta (Finlay & Fenchel, 1991b; Embley *et al.*, 1992a). Endosymbionti nálevníka rodu *Trimyema* si sice ponechávají buněčnou stěnu, ale tvoří specifickou hvězdicovitou strukturu viz. Obr 2. (Embley & Finlay, 1993).

Je tedy zřejmé, že k zisku endosymbiotických metanogenů došlo několikrát nezávisle na sobě a v průběhu adaptace na specifické habitaty muselo alespoň jednou dojít k nahrazení jednoho symbionta jiným druhem (van Hoek *et al.*, 2000). Výzkum symbióz mezi volně žijícími anaeroby a metanogeny nás utvrzuje v tom, že u těchto interakcí nejsou známy obecné trendy a snaha o shrnutí dosavadních znalostí se stále omezuje pouze na popis jednotlivostí.

3.1.2 Nemetanogenní endosymbionti

Mnoho anaerobních protist hostí kromě metanogenních archebakterií i další prokaryoty (Finlay *et al.*, 1991). Znalost těchto endosymbiontů je zatím velmi omezená, ve většině případů známe pouze morfologii a ultrastrukturu prokaryot (van Bruggen *et al.*, 1983; Goosen *et al.*, 1990). Bližší studie však naznačují, že diverzita těchto prokaryot je velká. U mořského nálevníka *Strombidium purpureum* jsou přítomny purpurové nesírné bakterie příbuzné rodu *Rhodopseudomonas* (Bernard & Fenchel, 1994). V anoxickém prostředí s přístupem světla se tyto prvoci chovají jako fototrofní anaerobové, protože využívají endosymbiotické bakterie, které odebírají H₂ a organické látky a provádí anoxygenní fotosyntézu. V kyslíkatém prostředí nebo ve tmě přežívají jako mikroaerofilní díky oxidativní fosforylaci (Fenchel & Bernard, 1993). Spolu s metanogeny jsou v cytoplazmě nálevníka *Metopus* sp. přítomni i bakteriální symbionti druhu *Clostridium aminobutyricum* (Hirakata *et al.*, 2015). I u dalšího zástupce rodu *Metopus*, druh *Metopus yantaiensis*, najdeme endosymbionty z řádu Clostridiales (Omar *et al.*, 2017). U tohoto druhu navíc najdeme další prokaryoty, jedná se o tzv. bakterie odolávající trávení (*digestion-resistant bacteria*, DRB), u kterých zatím není jasné, zda se jedná o symbionty nebo o možné parazity. Dominantu zde tvoří α a γ -proteobakterie, které byly objeveny i u jiných protist (Gong *et al.*, 2016).

Mnohonásobných endosymbióz známe celou řadu. Mikroaerofilní nálevník blízce příbuzný druhu *Parduzcia orbis* hostí, kromě metanogenních endosymbiontů, dva druhy

síran redukujících bakterií, navíc také dva bakteriální symbionty, nejspíše jednoho zástupce třídy Bacteroidetes a jeden metanotrofní druh (Edgcomb *et al.*, 2011a). Výše zmínění symbionti využívají odlišné metabolické dráhy zahrnující mimo jiné redukcí síranu, metanogenezi nebo metanotrofii. Mnohonásobné symbiózy pak naznačují vzájemné metabolické interakce mezi jednotlivými organismy, které jsou u prokaryotických komunit dobře známé (Morris *et al.*, 2013).

3.2 ŽIVOT NA POVRCHU BUŇKY

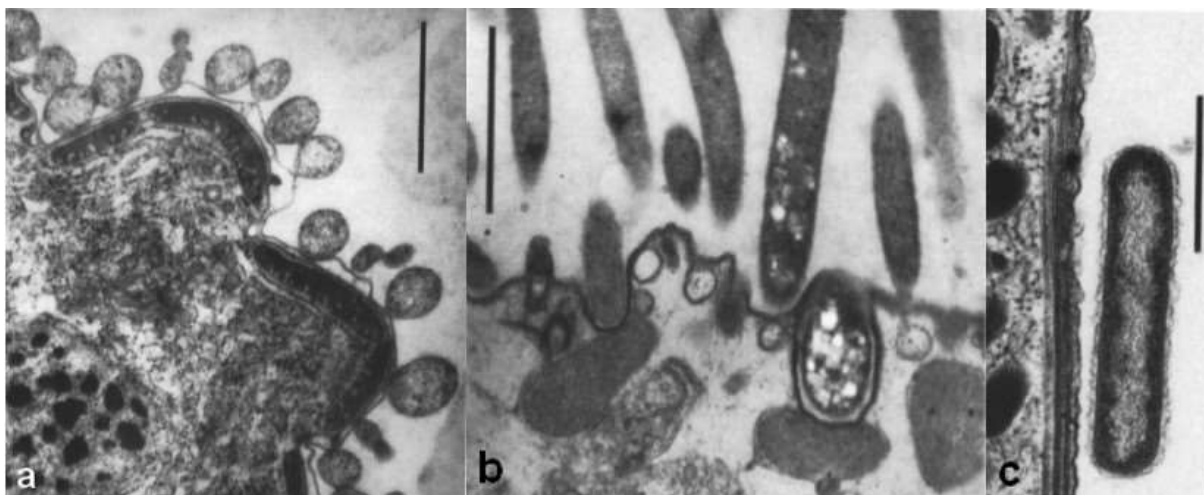
Kromě endosymbiotických prokaryot anaerobní prvoci mnohdy hostí také ektsymbionty, organismy žijící na povrchu buňky. Při výzkumu mořských anoxických sedimentů z venezuelské Cariaco Basin, Edgcomb *et al.* (2014) pozorovali, že více než 90 % zkoumaných anaerobních nálevníků hostí ektsymbiotické prokaryoty, na rozdíl od vzorků z kyslíkatého prostředí, kde tyto interakce nebyly pozorovány. Ačkoli se zdá, že ektsymbiotické asociace jsou mezi anaeroby velmi časté, o bližší povaze těchto symbiotických prokaryot víme stále velmi málo (Bernhard *et al.*, 2000; Gast *et al.*, 2009). Studium ektsymbiontů je obtížné také z důvodu možné disociace symbiontů z povrchu při manipulaci s buňkami (Edgcomb *et al.*, 2011b).

Někteří endobiotičtí prvoci, např. bičíkovci žijící ve střevech termitů hostí ektsymbionty z různých prokaryotických skupin, např. spirochéty u prvoka *Mixotricha paradoxa* (kmen Metamonada) (Wenzel *et al.*, 2003) nebo zástupce linie Bacteroidetes u oxymonády *Streblomastix strix*, (Noda *et al.*, 2006), u některých bachorových nálevníků jsou však ektsymbionti i metanogenní archebakterie (Stumm *et al.*, 1982). Epibiotičtí prokaryoti volně žijících protist jsou však hlavně nemetanogenní bakterie z různých prokaryotických skupin. Ektsymbiotické interakce se vyskytují hlavně u mořských prvoků (Epstein *et al.*, 1998), výjimku tvoří sladkovodní druhy žijící v prostředí bohatém na sloučeniny síry (např. nálevník *Caenomorpha medusula*) (Finlay *et al.*, 1991). U několika anaerobů byli ektsymbionti popsáni jako síran redukující bakterie (např. nálevníci *Metopus contortus*, *Caenomorpha levanderi*) (Fenchel & Ramsing, 1992). Pravděpodobně je tomu tak i u dalších mořských protist (Fenchel & Finlay, 2010). Bližší identifikace prokaryot pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace určila v několika

případech ektsymbiotické SRB jako zástupce třídy δ -proteobakterií (Orsi *et al.*, 2012). Nicméně, ať už jsou symbionty metanogeni uvnitř buňky nebo síran redukující bakterie na povrchu buňky, jejich hlavní výhoda pro hostitele je stejná. Podílejí na odčerpávání H_2 a jiných organických látek, které jsou produkovány prvokem, a zvyšují efektivitu jeho metabolismu (Fenchel & Finlay, 2010; Hamann *et al.*, 2016).

Síran redukující bakterie rozhodně nejsou jedinými ektsymbiotickými prokaryoty anaerobních protist, u velké většiny však dosud neznáme sekvenci 16S rDNA. Známe převážně jen jejich morfologii, symbionti byli jen v několika případech poměrně přesně identifikováni pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickými fluorescenčními oligonukleotidovými próbami. Dva zástupci exkavátních bičíkovců z kmene Euglenozoa (*Calkinsia aureus*, *Bihospites bacati*) hostí autotrofní ektsymbionty oxidující sulfidy, kteří byli pomocí metody catalyzed reporter deposition *in situ* hybridizace (CARD-FISH) identifikováni jako ϵ -proteobakterie rodu *Arcobacter* (Edgcomb *et al.*, 2011b). Další zástupce rodu *Arcobacter* byl určen jako ektsymbiont nově popsaného améboidního flageláta ze skupiny Breviatea (*Lenisia limosa*). Tento ektsymbiont odčerpává vodík z okolí anaerobních derivátů mitochondrií podobně, jako to dělají metanogenní endosymbionti. Ektsymbiont v tomto případě dokáže ovlivnit genovou expresi hostitele. V nepřítomnosti ektsymbionta produkci vodíku u druhu *L. limosa* katalyzuje ferredoxin-dependentní hydrogenáza. U tohoto druhu však byla objevena další hydrogenáza, specifická NADH-dependentní fúzní hydrogenáza, která je aktivní pouze v přítomnosti ektsymbiontů a která značně zvyšuje efektivitu metabolismu (Hamann *et al.*, 2016).

Ektsymbionti mohou být přichyceni v invaginacích povrchu hostitele (např. u nálevníka *Parablepharisma pellitum*) (Fenchel *et al.*, 1977). Někdy jsou ektsymbionti zanořeni v prohlubních na povrchu buňky většinou svého povrchu (např. u nálevníka *Geleia fossata*) (Epstein *et al.*, 1998). O předpokládané metabolické interakci mezi symbiontem a hostitelem svědčí i fakt, že v mnoha případech jsou tyto invaginace na povrchu buněk v kontaktu s anaerobními deriváty mitochondrií uvnitř buňky (Edgcomb *et al.*, 2011b; Fokin, 2012).



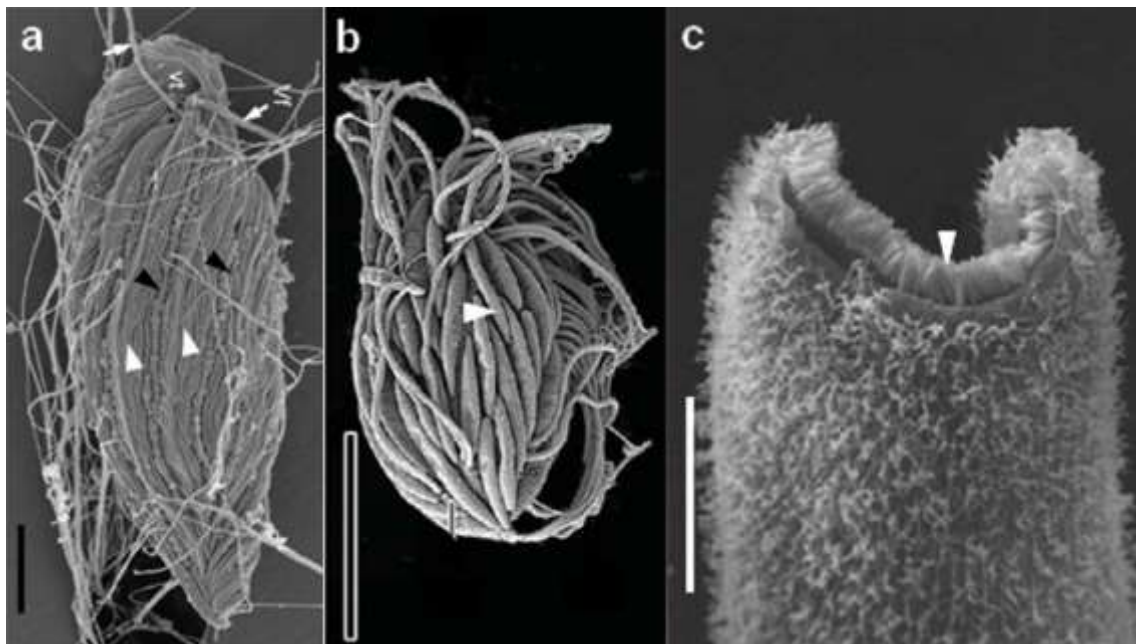
Obr. 3. Ektosymbiotičtí prokaryoti a jejich přichycení na buňku hostitele. **a)** Ektosymbionti v asociaci s hydrogenosomy (elektrondenzní struktury) u nálevníka *Cristigera vestita*; **b)** Ektosymbionti ukotvení kolmo na povrch buňky v invaginacích pelikuly nálevníka *Parablepharisma pellitum* a jejich napojení na hydrogenosomy; **c)** Ektosymbionti u nálevníka *Metopus contortus* sedící podélně na povrchu buňky. Měřítko: 0,5 μm . (Fenchel & Finlay, 1991b)

Ačkoli mohou prvoci některé z ektosymbiontů strávit, neslouží prokaryoti jako významný zdroj potravy (Finlay & Fenchel, 1991a). Výjimkou je mikroaerofilní nálevník rodu *Kentrophoros*, který si na svém povrchu „pěstuje“ bakterie, kterými se živí (Fenchel & Finlay, 1989).

O způsobu, jakým jsou ektosymbionti ukotveni na povrchu buňky prvoka, se ví málo. Na *Obr. 3* vidíme, že na povrch buňky mohou být přichyceni kolmo (např. u nálevníků *Parablepharisma pellitum*, *Metopus vestitus*) i podélně (např. *Metopus contortus*, *Calkinsia aureus*, *Bihospites bacati*) (Fenchel *et al.*, 1977; Esteban *et al.*, 1995; Edgcomb *et al.*, 2011b). U mnoha nálevníků (např. *Metopus*, *Sonderia* a *Caenomorpha* spp.) nejsou symbionti ukotveni v invaginacích buňky, mohou však být obaleni vrstvou mukusu, která může pomáhat jejich přichycení na povrch hostitele. Ektosymbionti druhu *Metopus vestitus* jsou obaleni až v 1,6 μm tlusté vrstvě mukusu (Fenchel *et al.*, 1977). U oxymonády *Streblomastix strix*, která obývá střevo termitů, jsou ektosymbionti k hostitelské buňce přichyceni „jemnými vlákny“ připomínajícími glykokalyx (Leander & Keeling, 2004).

Zajímavým případem je ektosymbiont rodu *Arcobacter*, popsáný u výše zmíněného améboflageláta *Lenisia limosa*, který k osídlení povrchu hostitele nejspíš využil specifické „virulentní“ proteiny, vázající se pravděpodobně na fibronektin typu III, dříve popsáné u patogenních druhů rodu *Arcobacter* (Ferreira *et al.*, 2016; Hamann *et al.*, 2016).

Mikroaerofilní bičíkovec *Bihospites bacati* (Symbiontida, Euglenozoa) hostí kromě bakteriálních ektosymbiontů, podélně přichycených na povrchu buňky, i kulaté epixenosomy, epibiotické bakterie s extrusivním aparátem, které byly identifikovány jako zástupci linie Verrucomicrobia viz. Obr. 4 (Breglia *et al.*, 2010). Epixenosomy, původně popsány u aerobního nálevníka *Euplotidium itoi* (Hypotrichia) (Verni & Rosati, 1990; Petroni *et al.*, 2000), slouží po vystřelení obsahu extrusivního aparátu jako obrana proti predaci, podobně jako jejich eukaryotické analogy, extrusomy. *B. bacati* je zatím jediným známým mikroaerofilním druhem, který tyto epibiotické bakterie na svém povrchu hostí. Ačkoli blízký příbuzný bičíkovec *Calkinsia aureus* má na svém povrchu bakteriální ektosymbionty, epixenosomy překvapivě nemá (Yubuki *et al.*, 2009).



Obr. 4. Ektosymbiočtí prokaryoti ze skenovacího mikroskopu. **a)** *Bihospites bacati* (Euglenozoa) s tyčinkovými symbionty (bílá šipka) a s kulatými epixenosomy (černá šipka). Měřítko: 15 μm ; **b)** Ektosymbionti tyčinkovitého tvaru (bílá šipka) podélně přichycení na nálevníkovi z podtřídy Scuticociliatia. Měřítko: 3 μm ; **c)** Nálevník *Kentrophoros fistulosus* (Karyorelictea) s ektosymbiotickými bakteriemi na dorsální straně těla. Měřítko: 20 μm . (Upraveno z Foissner, 1995; Yubuki *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2012)

Fylogenetický vztah mezi bakteriálními ektosymbionty těchto výše zmíněných zástupců kmene Euglenozoa (*Bihospites bacati*, *Calkinsia aureus*) naznačuje koevoluci symbionta s hostitelem (Edgcomb *et al.*, 2011b). O koevoluci u jiných protist s ektosymbionty nevíme skoro nic. Několik mořských zástupců hlístic (kmen Nematoda) hostí kromě jednoho

druhu ektsymbiotických prokaryot i dva druhy endosymbiotických prokaryot. Fylogenetická analýza těchto symbiontů odhalila, že jeden z endosymbiontů je příbuzný ektsymbiotickému druhu (Polz *et al.*, 1994). Nabízí se tedy otázka, zda může být život na povrchu buňky předpokladem pro průnik symbionta do cytoplazmy prvoka, tzn. pro vznik endosymbiózy (Rosati, 2004).

Závěr

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o symbiózách volně žijících anaerobních prvoků s prokaryoty. Anaerobní protisti jsou zajímavé organismy obývající nehostinné prostředí anoxických habitatů. Nedávné studie naznačují možnou roli anaerobních protist v biotechnologiích, výzkum těchto organismů by tedy mohl mít v budoucnu i praktické uplatnění.

Symbióza je častou evoluční strategií eukaryot, která jim umožňuje získat nové biochemické možnosti a další důležité výhody. Symbiózy mezi prvoky a prokaryoty jsou, dá se říci, všudypřítomné, naše znalosti jsou ale stále velmi omezené. Před objevem sekvenování a dalších moderních metod se znalost symbiontů omezovala pouze na jejich morfologii, právě proto v některých starších publikacích autoři identifikují symbionty pouze podle morfologie a ultrastruktury. Revize taxonomie je tedy potřebná a pomohla by osvětlit problematiku symbiotických interakcí, nejen u anaerobních protist.

Studium symbiotických asociací v laboratorních kulturách pomocí metod, jako je např. fluorescenční *in situ* hybridizace, v kombinaci s fylogenetickými studiemi, nám pomohou lépe pochopit symbiotické vztahy mezi protisty a prokaryoty. V posledních letech se nabízí využití dalších moderních metod, např. sekvenování nové generace, single-cell genomiky nebo transkriptomiky.

Jedním z důvodů omezených znalostí symbióz je i neúspěšná kultivace protist a jejich symbiontů v mnoha laboratořích. Jedním z pracovišť, kde se dlouhodobě daří kultivovat velké množství anaerobních protist z celého světa, je Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. V budoucnu bych ráda přispěla k rozšíření této sbírky kultur a zapojila se do výzkumu symbiotických interakcí mezi anaerobními protisty a prokaryoty na naší fakultě.

Přehled literatury

- Adams, K.L., Qiu, Y.-L., Stoutemyer, M. and Palmer, J.D. 2002. Punctuated evolution of mitochondrial gene content: High and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9905–9912.
- Akhmanova, A., Voncken, F., Alen, T.A. van, van Hoek, A.H.A.M., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M. and Hackstein, J.H.P. 1998. A hydrogenosome with a genome. *Nature* 396: 527–528.
- Akhmanova, A., Voncken, F.G., Hosea, K.M., Harhangi, H., Keltjens, J.T., op den Camp, H.J., Vogels, G.D. and Hackstein, J.H. 1999. A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Molecular Microbiology* 32: 1103–1114.
- Anbar, A.D. and Knoll, A.H. 2002. Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge? *Science* 297: 1137–1142.
- Archibald, J.M., Rogers, M.B., Toop, M., Ishida, K. and Keeling, P.J. 2003. Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 7678–7683.
- Barberà, M.J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J.Y.A., Bery, A., Silberman, J.D. and Roger, A.J. 2010. *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell* 9: 1913–1924.
- Barton, L.L. and Fauque, G.D. 2009. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 68: 41–98.
- Ben-Dov, E., Brenner, A. and Kushmaro, A. 2007. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microbial Ecology* 54: 439–451.
- Berger, J. and Lynn, D.H. 1992. Hydrogenosome-methanogen assemblages in the echinoid endocommensal plagiopylid ciliates, *Lechriopyla mystax* Lynch, 1930 and *Plagiopyla minuta* Powers, 1933. *The Journal of Protozoology* 39: 4–8.
- Bernard, C. and Fenchel, T. 1994. Chemosensory behaviour of *Strombidium purpureum*, an anaerobic oligotrich with endosymbiotic purple non-sulphur bacteria. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41: 391–396.
- Bernard, C. and Fenchel, T. 1996. Some microaerobic ciliates are facultative anaerobes. *European Journal of Protistology* 32: 293–297.
- Bernard, C., Simpson, A.G.B. and Patterson, D.J. 2000. Some free-living flagellates (protista) from anoxic habitats. *Ophelia* 52: 113–142.
- Bernhard, J.M., Buck, K.R., Farmer, M.A. and Bowser, S.S. 2000. The Santa Barbara Basin is a symbiosis oasis. *Nature* 403: 77–80.

- Biagini, G.A., Hayes, A.J., Suller, M.T.E., Winters, C., Finlay, B.J. and Lloyd, D. 1997. Hydrogenosomes of *Metopus contortus* physiologically resemble mitochondria. *Microbiology* 143: 1623–1629.
- Blaut, M. 1994. Metabolism of methanogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66: 187–208.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B.B., Witte, U. and Pfannkuche, O. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407: 623–626.
- Boone, D.R., Whitman, W.B. and Rouvière, P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In: Ferry, D.J.G. (Ed.), *Methanogenesis*, Springer US, Chapman & Hall Microbiology Series. pp. 35–80.
- Bourland, W.A., Wendell, L. and Hampikian, G. 2014. Morphologic and molecular description of *Metopus fuscus* Kahl from North America and new rDNA sequences from seven metopids (Armophorea, Metopidae). *European Journal of Protistology* 50.
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W.M., Alen, T.A. van, Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A.H.A.M., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J.H., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G.M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M.A. and Hackstein, J.H.P. 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434: 74–79.
- Breglia, S.A., Yubuki, N., Hoppenrath, M. and Leander, B.S. 2010. Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel euglenozoan with extrusive episymbiotic bacteria: *Bihospites bacati* n. gen. et sp. (Symbiontida). *BMC Microbiology* 10: 145.
- Broers, C.A., Stumm, C.K., Vogels, G.D. and Brugerolle, G. 1990. *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *European Journal of Protistology* 25: 369–380.
- Broers, C.A.M., Berkhout, R.J.M., Yu Hua, L., Stumm, C.K. and Vogels, G.D. 1992. Oxygen responses of the free-living anaerobic amoeboflagellate *Psalteriomonas lanterna*. *FEMS Microbiology Letters* 101: 165–172.
- Brugerolle, G., Silva-Neto, I.D., Pellens, R. and Grandcolas, P. 2003. Electron microscopic identification of the intestinal protozoan flagellates of the xylophagous cockroach *Parasphaeria boleiriana* from Brazil. *Parasitology Research* 90: 249–256.
- van Bruggen, J.J.A. 1988. Isolation of a methanogenic endosymbiont of the sapropelic amoeba *Pelomyxa palustris* Greeff. *The Journal of Protozoology* 35: 20–23.
- van Bruggen, J.J.A., Stumm, C.K. and Vogels, G.D. 1983. Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology* 136: 89–95.
- van Bruggen, J.J.A., Stumm, C.K., Zwart, K.B. and Vogels, G.D. 1985. Endosymbiotic methanogenic bacteria of the sapropelic amoeba *Mastigella*. *FEMS Microbiology Letters* 31: 187–192.
- van Bruggen, J.J.A., Zwart, K.B., Assema, R.M. van, Stumm, C.K. and Vogels, G.G. 1984. *Methanobacterium formicicum*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *Archives of Microbiology* 139: 1–7.

- van Bruggen, J.J.A., Zwart, K.B., Hermans, J.G.F., van Hove, E.M., Stumm, C.K. and Vogels, G.D. 1986. Isolation and characterization of *Methanoplanus endosymbiosus* sp. nov., an endosymbiont of the marine sapropelic ciliate *Metopus contortus* quennerstedt. *Archives of Microbiology* 144: 367–374.
- Clarke, K.J., Finlay, B.J., Esteban, G., Guhl, B.E. and Embley, T.M. 1993. *Cyclidium porcatum* n. sp.: a free-living anaerobic scuticociliate containing a stable complex of hydrogenosomes, eubacteria and archaeobacteria. *European Journal of Protistology* 29: 262–270.
- Cleveland, L.R. and Grimstone, A.V. 1964. The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated micro-organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 159: 668–686.
- Danovaro, R., Dell’Anno, A., Pusceddu, A., Gambi, C., Heiner, I. and Møbjerg Kristensen, R. 2010. The first metazoa living in permanently anoxic conditions. *BMC Biology* 8: 30.
- DeLong, E.F. 1998. Everything in moderation: archaea as ‘non-extremophiles’. *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 649–654.
- D’Hondt, S., Rutherford, S. and Spivack, A.J. 2002. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science* 295: 2067–2070.
- Doddema, H.J. and Vogels, G.D. 1978. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 752–754.
- Douglas, A.E. and Smith, D.C. 1989. Are endosymbioses mutualistic? *Trends in Ecology & Evolution* 4: 350–352.
- Dyer, B.D. and Khalsa, O. 1993. Surface bacteria of *Streblomastix strix* are sensory symbionts. *Bio Systems* 31: 169–180.
- Dziallas, C., Allgaier, M., Monaghan, M.T. and Grossart, H.-P. 2012. Act together—implications of symbioses in aquatic ciliates. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Edgcomb, V.P. and Pachiadaki, M. 2014. Ciliates along oxyclines of permanently stratified marine water columns. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61: 434–445.
- Edgcomb, V.P., Leadbetter, E.R., Bourland, W., Beaudoin, D. and Bernhard, J.M. 2011a. Structured multiple endosymbiosis of bacteria and archaea in a ciliate from marine sulfidic sediments: a survival mechanism in low oxygen, sulfidic sediments? *Frontiers in Microbiology* 2.
- Edgcomb, V.P., Breglia, S.A., Yubuki, N., Beaudoin, D., Patterson, D.J., Leander, B.S. and Bernhard, J.M. 2011b. Identity of epibiotic bacteria on symbiontid euglenozoans in O₂-depleted marine sediments: evidence for symbiont and host co-evolution. *The ISME Journal* 5: 231–243.
- Embley, T.M. 2006. Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 1055–1067.
- Embley, T.M. and Finlay, B.J. 1993. Systematic and morphological diversity of endosymbiotic methanogens in anaerobic ciliates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64: 261–271.

- Embley, T.M. and Finlay, B.J. 1994. Phylogenetic diversity of methanogen endosymbionts of anaerobic ciliates. In: Priest, F.G., A. Ramos-Cormenzana and B.J. Tindall (Eds.), *Bacterial Diversity and Systematics*, Springer US, Federation of European Microbiological Societies Symposium Series. pp. 153–160.
- Embley, T.M., Finlay, B.J. and Brown, S. 1992a. RNA sequence analysis shows that the symbionts in the ciliate *Metopus contortus* are polymorphs of a single methanogen species. *FEMS Microbiology Letters* 76: 57–61.
- Embley, T.M., Finlay, B.J., Thomas, R.H. and Dyal, P.L. 1992b. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. *Journal of General Microbiology* 138: 1479–1487.
- Epstein, S.S., Bazylnski, D.A. and Fowle, W.H. 1998. Epibiotic bacteria on several ciliates from marine sediments. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 64–70.
- Esteban, G., Finlay, B.J. and Embley, T.M. 1993. New species double the diversity of anaerobic ciliates in a Spanish lake. *FEMS Microbiology Letters* 109: 93–99.
- Esteban, G., Finlay, B.J. and Fenchel, T. 1995. Diversity of free-living morphospecies in the ciliate genus *Metopus*. *Archiv Für Protistenkunde* 137–164.
- Esteban, G.F. and Finlay, B.J. 2004. Marine ciliates (protozoa) in Central Spain. *Ophelia* 58: 12–22.
- Fenchel, T. 1967. The ecology of marine microbenthos I. The quantitative importance of ciliates as compared with metazoans in various types of sediments. *Ophelia* 4: 121–137.
- Fenchel, T. 1993. Methanogenesis in marine shallow water sediments: The quantitative role of anaerobic protozoa with endosymbiotic methanogenic bacteria. *Ophelia* 37: 67–82.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1986. Photobehavior of the ciliated protozoon *Loxodes*: Taxic, transient, and kinetic responses in the presence and absence of oxygen. *The Journal of Protozoology* 33: 139–145.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1989. *Kentrophoros*: a mouthless ciliate with a symbiotic kitchen garden. *Ophelia*.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1990a. Anaerobic free-living protozoa: growth efficiencies and the structure of anaerobic communities. *FEMS Microbiology Letters* 74: 269–275.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1990b. Oxygen toxicity, respiration and behavioural responses to oxygen in free-living anaerobic ciliates. *Microbiology* 136: 1953–1959.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1991a. The biology of free-living anaerobic ciliates. *European Journal of Protistology* 26: 201–215.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1991b. Endosymbiotic methanogenic bacteria in anaerobic ciliates: significance for the growth efficiency of the host. *The Journal of Protozoology* 38: 18–22.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1991c. Synchronous division of an endosymbiotic methanogenic bacterium in the anaerobic ciliate *Plagiopyla frontata* Kahl. *Journal of Protozoology Research* 38: 22–28.

- Fenchel, T. and Ramsing, N.B. 1992. Identification of sulphate-reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes. *Archives of Microbiology* 158: 394–397.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1992. Production of methane and hydrogen by anaerobic ciliates containing symbiotic methanogens. *Archives of Microbiology* 157: 475–480.
- Fenchel, T. and Bernard, C. 1993. Endosymbiotic purple non-sulphur bacteria in an anaerobic ciliated protozoon. *FEMS Microbiology Letters* 110: 21–25.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 2010. Free-living protozoa with endosymbiotic methanogens. In: Hackstein, J.H.P. (Ed.), *(Endo)symbiotic Methanogenic Archaea*, Springer Berlin Heidelberg, Microbiology Monographs. pp. 1–11.
- Fenchel, T., Perry, T. and Thane, A. 1977. Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *The Journal of Protozoology* 24: 154–163.
- Fenchel, T., Finlay, B.J. and Gianni, A. 1989. Microaerophily in ciliates: Responses of an *Euplotes* species (Hypotrichida) to oxygen tension. *Archiv Für Protistenkunde* 137: 317–330.
- Ferreira, S., Queiroz, J.A., Oleastro, M. and Domingues, F.C. 2016. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical Reviews in Microbiology* 42: 364–383.
- Finlay, B.J. 1981. Oxygen availability and seasonal migrations of ciliated protozoa in a freshwater lake. *Microbiology* 123: 173–178.
- Finlay, B.J. 1985. Nitrate respiration by Protozoa (*Loxodes* spp.) in the hypolimnetic nitrite maximum of a productive freshwater pond. *Freshwater Biology* 15: 333–346.
- Finlay, B.J. and Fenchel, T. 1989. Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *FEMS Microbiology Letters* 65: 311–314.
- Finlay, B.J. and Fenchel, T. 1991a. An anaerobic protozoon, with symbiotic methanogens, living in municipal landfill material. *FEMS Microbiology Letters* 85: 169–179.
- Finlay, B.J. and Fenchel, T. 1991b. Polymorphic bacterial symbionts in the anaerobic ciliated protozoon *Metopus*. *FEMS Microbiology Letters* 79: 187–190.
- Finlay, B.J. and Fenchel, T. 1992. An anaerobic ciliate as a natural chemostat for the growth of endosymbiotic methanogens. *European Journal of Protistology* 28: 127–137.
- Finlay, B.J., Fenchel, T. and Gardener, S. 1986. Oxygen perception and O₂ toxicity in the freshwater ciliated protozoon *Loxodes*. *The Journal of Protozoology* 33: 157–165.
- Finlay, B.J., Embley, T.M. and Fenchel, T. 1993. A new polymorphic methanogen, closely related to *Methanocorpusculum parvum*, living in stable symbiosis within the anaerobic ciliate *Trimyema* sp. *Journal of General Microbiology* 139: 371–378.
- Finlay, B.J., Maberly, S.C. and Esteban, G.F. 1996. Spectacular abundance of ciliates in anoxic pond water: contribution of symbiont photosynthesis to host respiratory oxygen requirements. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 229–235.
- Finlay, B.J., Clarke, K.J., Vicente, E. and Miracle, M.R. 1991. Anaerobic ciliates from a sulphide-rich solution lake in Spain. *European Journal of Protistology* 27: 148–159.

- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M. and Hirt, R.P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 117: 157–161.
- Foissner, W. 1995. *Kentrophoros* (Ciliophora, Karyorelictea) has oral vestiges: a reinvestigation of *K. fistulosus* (FaurÉ-Fremiet, 1950) using protargol impregnation. *Archiv Für Protistenkunde* 146: 165–179.
- Fokin, S.I. 2012. Frequency and biodiversity of symbionts in representatives of the main classes of Ciliophora. *European Journal of Protistology* 48: 138–148.
- Gabaldón, T. and Huynen, M.A. 2007. From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Computational Biology* 3: e219.
- Garcia, J. I. 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 87: 297–308.
- Gast, R.J., Sanders, R.W. and Caron, D.A. 2009. Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends in Microbiology* 17: 563–569.
- Gill and Vogel 1963. A bacterial endosymbiote in *Crithidia* (*Strigomonas*) *oncopelti*: biochemical and morphological aspects. *The Journal of Protozoology* 10 (2): 148–152.
- Gill, E.E., Diaz-Triviño, S., Barberà, M.J., Silberman, J.D., Stechmann, A., Gaston, D., Tamas, I. and Roger, A.J. 2007. Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Molecular Microbiology* 66: 1306–1320.
- Goebel, W. and Gross, R. 2001. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends in Microbiology* 9: 267–273.
- Goldberg, A.V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R. and Embley, T.M. 2008. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452: 624–628.
- Gong, J., Qing, Y., Zou, S., Fu, R., Su, L., Zhang, X. and Zhang, Q. 2016. Protist-bacteria associations: Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria are prevalent as digestion-resistant bacteria in ciliated protozoa. *Frontiers in Microbiology* 7: 498.
- Goosen, N.K., Wagener, S. and Stumm, C.K. 1990. A comparison of two strains of the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Archives of Microbiology* 153: 187–192.
- Goosen, N.K., Horemans, A.M.C., Hillebrand, S.J.W., Stumm, C.K. and Vogels, G.D. 1988. Cultivation of the sapropelic ciliate *Plagiopyla nasuta* Stein and isolation of the endosymbiont *Methanobacterium formicicum*. *Archives of Microbiology* 150: 165–170.
- de Graaf, R.M., Duarte, I., van Alen, T.A., Kuiper, J.W., Schotanus, K., Rosenberg, J., Huynen, M.A. and Hackstein, J.H. 2009. The hydrogenosomes of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology* 9: 287.
- de Graaf, R.M., Ricard, G., van Alen, T.A., Duarte, I., Dutilh, B.E., Burgtorf, C., Kuiper, J.W.P., van der Staay, G.W.M., Tielens, A.G.M., Huynen, M.A. and Hackstein, J.H.P. 2011. The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen-producing

- mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2379–2391.
- Gray, M.W. 2012. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a011403.
- Greening, C., Ahmed, F.H., Mohamed, A.E., Lee, B.M., Pandey, G., Warden, A.C., Scott, C., Oakeshott, J.G., Taylor, M.C. and Jackson, C.J. 2016. Physiology, biochemistry, and applications of F₄₂₀- and F_o-dependent redox reactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 80: 451–493.
- Griffin, J.L. 1988. Fine structure and taxonomic position of the giant amoeboid flagellate *Pelomyxa palustris*. *The Journal of Protozoology* 35: 300–315.
- Gutiérrez, G. 2012. Draft genome sequence of *Methanobacterium formicicum* DSM 3637, an archaeobacterium isolated from the methane producer amoeba *Pelomyxa palustris*. *Journal of Bacteriology* 194: 6967–6968.
- Hackstein, J.H. and Stumm, C.K. 1994. Methane production in terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5441–5445.
- Hackstein, J.H.P., van Hoek, A.H.A.M., Leunissen, J. a. M. and Huynen, M. 2004. Anaerobic ciliates and their methanogenic endosymbionts. In: *Symbiosis*, pp. 451–464.
- Hamann, E., Gruber-Vodicka, H., Kleiner, M., Tegetmeyer, H.E., Riedel, D., Littmann, S., Chen, J., Milucka, J., Viehweger, B., Becker, K.W., Dong, X., Stairs, C.W., Hinrichs, K.-U., Brown, M.W., Roger, A.J. and Strous, M. 2016. Environmental Breviatea harbour mutualistic *Arcobacter* epibionts. *Nature* 534: 254–258.
- Hampl, V. and Simpson, A.G.B. 2007. Possible mitochondria-related organelles in poorly-studied ‘amitochondriate’ eukaryotes. In: Tachezy, J. (Ed.), *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, Microbiology Monographs. pp. 265–282.
- Hirakata, Y., Oshiki, M., Kuroda, K., Hatamoto, M., Kubota, K., Yamaguchi, T., Harada, H. and Araki, N. 2015. Identification and detection of prokaryotic symbionts in the ciliate *Metopus* from anaerobic granular sludge. *Microbes and Environments* 30: 335–338.
- Hirakata, Y., Oshiki, M., Kuroda, K., Hatamoto, M., Kubota, K., Yamaguchi, T., Harada, H. and Araki, N. 2016. Effects of predation by protists on prokaryotic community function, structure, and diversity in anaerobic granular sludge. *Microbes and Environments* 31: 279–287.
- Hjort, K., Goldberg, A.V., Tsaousis, A.D., Hirt, R.P. and Embley, T.M. 2010. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 713–727.
- van Hoek, A.H.A.M., van Alen, T.A., Vogels, G.D. and Hackstein, J.H.P. 2006. Contribution by the methanogenic endosymbionts of anaerobic ciliates to methane production in Dutch freshwater sediments. *Acta Protozoologica* 45: 215–224.
- van Hoek, A.H.A.M., van Alen, T.A., Sprakel, V.S., Leunissen, J.A., Brigge, T., Vogels, G.D. and Hackstein, J.H. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution* 17: 251–258.

- Hoffmeister, M. and Martin, W. 2003. Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environmental Microbiology* 5: 641–649.
- Holmes, D.E., Giloteaux, L., Orellana, R., Williams, K.H., Robbins, M.J. and Lovley, D.R. 2014. Methane production from protozoan endosymbionts following stimulation of microbial metabolism within subsurface sediments. *Frontiers in Microbiology* 5.
- Horner, D.S., Foster, P.G. and Embley, T.M. 2000. Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1695–1709.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuffe, V., Banta, A., Reysenbach, A.-L. and Prieur, D. 2002. *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 765–772.
- Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Xu, F., Hjort, K., Ek, B., Steinhilber, D., Hultenby, K., Bergquist, J., Andersson, J.O. and Svärd, S.G. 2013. Hydrogenosomes in the diplomonad *Spironucleus salmonicida*. *Nature Communications* 4: 2493.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S.C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L.D., Herman, E.K., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C.W., Roger, A.J., Eliáš, M., Dacks, J.B., Vlček, Č. and Hampl, V. 2016. A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology* 26: 1274–1284.
- Kirschke, S., Bousquet, P., Ciais, P., Saunoy, M., Canadell, J.G., Dlugokencky, E.J., Bergamaschi, P., Bergmann, D., Blake, D.R., Bruhwiler, L., Cameron-Smith, P., Castaldi, S., Chevallier, F., Feng, L., Fraser, A., Heimann, M., Hodson, E.L., Houweling, S., Josse, B., Fraser, P.J., Krummel, P.B., Lamarque, J.-F., Langenfelds, R.L., Le Quééré, C., Naik, V., O'Doherty, S., Palmer, P.I., Pison, I., Plummer, D., Poulter, B., Prinn, R.G., Rigby, M., Ringeval, B., Santini, M., Schmidt, M., Shindell, D.T., Simpson, I.J., Spahni, R., Steele, L.P., Strode, S.A., Sudo, K., Szopa, S., van der Werf, G.R., Voulgarakis, A., van Weele, M., Weiss, R.F., Williams, J.E. and Zeng, G. 2013. Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geoscience* 6: 813–823.
- Kjeldsen, K.U., Joulain, C. and Ingvorsen, K. 2004. Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. *Environmental Science & Technology* 38: 2038–2043.
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A.J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H., Blackall, L.L., Stahl, D.A. and Wagner, M. 2001. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *Journal of Bacteriology* 183: 6028–6035.
- Kolisko, M., Silberman, J.D., Čepicka, I., Yubuki, N., Takishita, K., Yabuki, A., Leander, B.S., Inouye, I., Inagaki, Y., Roger, A.J. and Simpson, A.G.B. 2010. A wide diversity of previously undetected free-living relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. *Environmental Microbiology* 12: 2700–2710.
- Koneswaran, G. and Nierenberg, D. 2008. Global farm animal production and global warming: impacting and mitigating climate change. *Environmental Health Perspectives* 116: 578–582.

- Leander, B.S. and Keeling, P.J. 2004. Symbiotic innovation in the oxymonad *Streblomastix strix*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 51: 291–300.
- León-Avila, G. and Tovar, J. 2004. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* 150: 1245–1250.
- Lindmark, D.G. and Müller, M. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* 248: 7724–7728.
- Liu, Y. and Whitman, W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 171–189.
- Lloyd, D., Ralphs, J.R. and Harris, J.C. 2002. *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology (Reading, England)* 148: 727–733.
- Makiuchi, T. and Nozaki, T. 2014. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* 100: 3–17.
- Martin, W.F., Garg, S. and Zimorski, V. 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370: 20140330.
- Marvin-Sikkema, F.D., Pedro Gomes, T.M., Grivet, J.P., Gottschal, J.C. and Prins, R.A. 1993. Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2. *Archives of Microbiology* 160: 388–396.
- McMichael, A.J., Powles, J.W., Butler, C.D. and Uauy, R. 2007. Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet* 370: 1253–1263.
- Moreira, D. and López-García, P. 1998. Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* 47: 517–530.
- Morris, B.E.L., Henneberger, R., Huber, H. and Moissl-Eichinger, C. 2013. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 384–406.
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *Microbiology* 139: 2879–2889.
- Müller, M. and Lindmark, D.G. 1978. Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. II. Effect of CoA on pyruvate oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 1215–1218.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J.J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A.G.M. and Martin, W.F. 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76: 444–495.
- Murase, J., Noll, M. and Frenzel, P. 2006. Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5436–5444.

- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M.C. and Grossman, A.R. 2007. Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 25475–25486.
- Mußmann, M., Ishii, K., Rabus, R. and Amann, R. 2005. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology* 7: 405–418.
- Muyzer, G. and Stams, A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6: 441–454.
- Narayanan, N., Krishnakumar, B., Anupama, V.N. and Manilal, V.B. 2009. *Methanosaeta* sp., the major archaeal endosymbiont of *Metopus es*. *Research in Microbiology* 160: 600–607.
- Nasirudeen, A.M.A. and Tan, K.S.W. 2004. Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *Journal of Microbiological Methods* 58: 101–109.
- Newbold, C.J., Lassalas, B. and Jouany, J.P. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology* 21: 230–234.
- Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Nalepa, C.A., Vongkaluang, C., Kudo, T. and Ohkuma, M. 2006. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in Bacteroidales attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environmental Microbiology* 8: 11–20.
- Nowack, E.C.M. and Melkonian, M. 2010. Endosymbiotic associations within protists. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 699–712.
- Ohkuma, M. 2008. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends in Microbiology* 16: 345–352.
- Omar, A., Zhang, Q., Zou, S. and Gong, J. 2017. Morphology and phylogeny of the soil ciliate *Metopus yantaiensis* n. sp. (Ciliophora, Metopida), with identification of the intracellular bacteria. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*.
- Orphan, V.J., Hinrichs, K.-U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M. and Delong, E.F. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1922–1934.
- Orsi, W., Charvet, S., Vd'ačný, P., Bernhard, J.M. and Edgcomb, V.P. 2012. Prevalence of partnerships between bacteria and ciliates in oxygen-depleted marine water columns. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Pánek, T., Táborský, P., Pachiadaki, M.G., Hroudová, M., Vlček, Č., Edgcomb, V.P. and Čepička, I. 2015. Combined culture-based and culture-independent approaches provide insights into diversity of Jakobids, an extremely plesiomorphic eukaryotic lineage. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Pérez-Brocal, V. and Clark, C.G. 2008. Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene

- content, and genome organization. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2475–2482.
- Pérez-Brocail, V., Shahar-Golan, R. and Clark, C.G. 2010. A linear molecule with two large inverted repeats: the mitochondrial genome of the stramenopile *Proteromonas lacertae*. *Genome Biology and Evolution* 2: 257–266.
- Petroni, G., Spring, S., Schleifer, K.-H., Verni, F. and Rosati, G. 2000. Defensive extrusive ectosymbionts of *Euplotidium* (Ciliophora) that contain microtubule-like structures are bacteria related to Verrucomicrobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 1813–1817.
- Polz, M.F., Distel, D.L., Zarda, B., Amann, R., Felbeck, H., Ott, J.A. and Cavanaugh, C.M. 1994. Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4461–4467.
- Prabhakaran, P., Bhasi, A., Ali, S., Narayanan, N., Balakrishnan, M.V. and Bhaskaran, K. 2016. Community dynamics and significance of anaerobic protozoa during biomethanation of lignocellulosic waste. *Renewable Energy* 98: 148–152.
- Priya, M., Haridas, A. and Manilal, V.B. 2007. Involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process. *Water Research* 41: 4639–4645.
- Radek, R. and Nitsch, G. 2007. Ectobiotic spirochetes of flagellates from the termite *Mastotermes darwiniensis*: attachment and cyst formation. *European Journal of Protistology* 43: 281–294.
- Reisser, W. 1980. The metabolic interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella* spec. in the *Paramecium bursaria*-symbiosis. I. The nitrogen and the carbon metabolism. *Archives of Microbiology* 107: 357–360.
- Roger, A.J., Svård, S.G., Tovar, J., Clark, C.G., Smith, M.W., Gillin, F.D. and Sogin, M.L. 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 229–234.
- Rosati, G. 2004. Ectosymbiosis in ciliated protozoa. In: *Symbiosis*, pp. 475–488.
- Rosati, G., Giambelluca, M.A. and Taiti, E. 1996. Epixenosomes: peculiar epibionts of the ciliate *Euplotidium itoi*: morphological and functional cell compartmentalization. *Tissue and Cell* 28: 313–320.
- Sass, H., Wieringa, E., Cypionka, H., Babenzien, H.-D. and Overmann, J. 1998. High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Archives of Microbiology* 170: 243–251.
- Sato, T., Kuwahara, H., Fujita, K., Noda, S., Kihara, K., Yamada, A., Ohkuma, M. and Hongoh, Y. 2014. Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut. *The ISME Journal* 8: 1008–1019.
- Schulz, F. and Horn, M. 2015. Intranuclear bacteria: inside the cellular control center of eukaryotes. *Trends in Cell Biology* 25: 339–346.

- Schulz, F., Lagkouvardos, I., Wascher, F., Aistleitner, K., Kostanjšek, R. and Horn, M. 2014. Life in an unusual intracellular niche: a bacterial symbiont infecting the nucleus of amoebae. *The ISME Journal* 8: 1634–1644.
- Schwarz, M.V.J. and Frenzel, P. 2003. Population dynamics and ecology of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an anoxic rice field soil. *Biology and Fertility of Soils* 38: 245–252.
- Schwarz, M.V.J. and Frenzel, P. 2005. Methanogenic symbionts of anaerobic ciliates and their contribution to methanogenesis in an anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 93–99.
- Shiflett, A. and Johnson, P.J. 2010. Mitochondrion-related organelles in parasitic eukaryotes. *Annual Review of Microbiology* 64: 409–429.
- Shinzato, N. and Kamagata, Y. 2010. The methanogenic and eubacterial endosymbionts of *Trimyema*. In: Hackstein, J.H.P. (Ed.) , *(Endo)symbiotic Methanogenic Archaea*, Springer Berlin Heidelberg, Microbiology Monographs. pp. 35–53.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., Giezen, M. van der, Clark, C.G. and Roger, A.J. 2008. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* 18: 580–585.
- Stoeck, T. and Epstein, S. 2003. Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2657–2663.
- Stoeck, T., Behnke, A., Christen, R., Amaral-Zettler, L., Rodriguez-Mora, M.J., Chistoserdov, A., Orsi, W. and Edgcomb, V.P. 2009. Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. *BMC Biology* 7: 72.
- Stumm, C.K., Gijzen, H.J. and Vogels, G.D. 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *The British Journal of Nutrition* 47: 95–99.
- Štuřák, R., Doležal, P., Fiumera, H.L., Hrdý, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P.J., Müller, M. and Tachezy, J. 2004. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 10368–10373.
- Tachezy, J. and Šmíd, O. 2007. Mitosomes in parasitic protists. In: *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 201–230.
- Thauer, R.K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144 (Pt 9): 2377–2406.
- Thauer, R.K. and Kunow, J. 1995. Sulfate-reducing Archaea. In: Barton, L.L. (Ed.), *Sulfate-Reducing Bacteria*, Springer US, Biotechnology Handbooks. pp. 33–48.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. and Martin, W. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* 5: 123–135.

- Tovar, J., Fischer, A. and Clark, C.G. 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 32: 1013–1021.
- Verni, F. and Rosati, G. 1990. Peculiar epibionts in *Euplotidium itoi* (Ciliata, Hypotrichida). *The Journal of Protozoology* 37: 337–343.
- Wagener, S. and Pfennig, N. 1987. Monoxenic culture of the anaerobic ciliate *Trimyema compressum* Lackey. *Archives of Microbiology* 149: 4–11.
- Wagener, S., Stumm, C.K. and Vogels, G.D. 1986. Electromigration, a tool for studies on anaerobic ciliates. *FEMS Microbiology Letters* 38: 197–203.
- Wagener, S., Bardele, C.F. and Pfennig, N. 1990. Functional integration of *Methanobacterium formicium* in the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Archives of Microbiology* 153: 496–501.
- Walochnik, J., Müller, K.-D., Aspöck, H. and Rolf, M. 2005. An endocytobiont harbouring *Naegleria* strain identified as *N. clarki* De Jonckheere, 1994. *Acta Protozoologica* 44: 301–310.
- Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle, G. and König, H. 2003. Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. *European Journal of Protistology* 39: 11–23.
- van der Wielen, P.W.J.J. and Heijs, S.K. 2007. Sulfate-reducing prokaryotic communities in two deep hypersaline anoxic basins in the Eastern Mediterranean deep sea. *Environmental Microbiology* 9: 1335–1340.
- Williams, A.G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews* 50: 25–49.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221–271.
- Yamada, K., Kamagata, Y. and Nakamura, K. 1997. The effect of endosymbiotic methanogens on the growth and metabolic profile of the anaerobic free-living ciliate *Trimyema compressum*. *FEMS Microbiology Letters* 149: 129–132.
- Yarlett, N., Lloyd, D. and Williams, A.G. 1985. Butyrate formation from glucose by the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium*. *Biochemical Journal* 228: 187–192.
- Yarlett, N., Orpin, C.G., Munn, E.A., Yarlett, N.C. and Greenwood, C.A. 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochemical Journal* 236: 729–739.
- Yubuki, N., Edgcomb, V.P., Bernhard, J.M. and Leander, B.S. 2009. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Calkinsia aureus*: cellular identity of a novel clade of deep-sea euglenozoans with epibiotic bacteria. *BMC Microbiology* 9: 16.
- Yubuki, N., Céza, V., Čepicka, I., Yabuki, A., Inagaki, Y., Nakayama, T., Inouye, I. and Leander, B.S. 2010. Cryptic diversity of free-living parabasalids, *Pseudotrichomonas keilini* and *Lacustera cypriaca* n. g., n. sp., as inferred from small subunit rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57: 554–561.
- Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F. and Papke, R.T. 2006. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Research* 16: 1099–1108.

- Zinder, S.H. 1993. Physiological ecology of methanogens. In: Ferry, D.J.G. (Ed.) , *Methanogenesis*, Springer US, Chapman & Hall Microbiology Series. pp. 128–206.
- Zwart, K.B., Goosen, N.K., Van Schijnde, M.W., Broers, C.A.M., Stumm, C.K. and Vogels, G.D. 1988. Cytochemical localization of hydrogenase activity in the anaerobic protozoa *Trichomonas vaginalis*, *Plagiopyla nasuta* and *Trimyema compressum*. *Microbiology* 134: 2165–2170.