

МРНТИ 34.27.23

С.А. СУЛЕЙМЕНОВА^{1*}, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹,
А.И. КЫДЫРМАНОВ¹, С. ГУДМАН².

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан

²Университет Лидса, Великобритания

*suleymenova.87@inbox.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОМА ОСНОВНЫХ БИОТОПОВ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ

<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2021.01-02.04>

Аннотация

В статье приведены результаты метабаркодирования ДНК микробиома респираторного, урогенитального и желудочно-кишечного трактов каспийского тюленя. Показан профиль микробиома каспийского тюленя и отмечено отсутствие возбудителей бактериальных зоонозов в их бета-сообществе микробиот.

Ключевые слова: каспийский тюлень, метагеном, микробиом, секвенирование.

Исследование микробиома биологических видов связано с осознанием его роли в состоянии здоровья и экологии хозяев. Микробиота представляет собой естественный барьер для патогенных микробов, их также характеризуют как «резистентность к колонизации» [1]. В связи с этим, важным представляется изучение как нормальной, условно патогенной, так и патогенной микрофлоры у каспийских тюленей, что позволит оценить их роль в общей патологии при массовых вспышках инфекционных заболеваний.

Материалы и методы

От живых тюленей собраны сыворотки крови, носовые, ротовые, конъюнктивальные, ректальные, урогенитальные (препуциальные и вагинальные) смывы по сертифицированным методикам, рекомендованным комиссией по морским млекопитающим [2]. Методы исследований исключают гибель животных при отлове и взятии проб.

Смывы брали стерильными ватными тампонами с пластиковой ручкой. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196°C). Образцы для метагеномных исследований хранили в специальном реагенте – *DNA/RNA Shield*, сохраняющем генетическую целостность и профили экспрессии образцов при температуре окружающей среды без охлаждения или заморозки.

Экстракцию микробиомной ДНК из смывов осуществляли с помощью набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (A29790), в соответствии с рекомендациями производителя из 200 мкл образца [3]. Набор позволяет экстрагировать микробный ДНК из образцов фекалий, мочи, слюны, мазков (вагинальных, ротовых, кожных, ректальных, окружающей среды), транспортировочной среды, почвы.

Анализ микробиома проводили путем секвенирования фрагмента гена 16S рибосомальной РНК микрофлоры по протоколу Illumina для выявления возбудителей всех бактериальных инфекций респираторного и желудочно-кишечного трактов каспийского тюленя с применением геноспецифических праймеров 340F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') и 533R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') к 16S V3 и V4 регионам и наборов NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1), E7335S (24 reactions) [4].

Результаты и обсуждение

Для исследования использовали смывы ротовой, урогенитальной и ректальной микробиоты каспийских тюленей, собранные в 2019 г. Образцы объединили в пулы по половозрастным признакам животных (Таблица 1).

Таблица 1 - Характеристика смывов ротовой, урогенитальной и ректальной микробиоты каспийских тюленей, объединенных в пул

Номер животных, пробы которых объединены в пулы	Диапазон длины тела животного, см	Пол животных пробы, которых объединены в пулы	Номер пула смывов:		
			ротовой полости	мочеполовых путей	ректальный
#02, #05, #06	119-133	взрослый самец	1	4	7
#04, #07, #10	97-101	молодая самка	2	5	8
#01, #08	104-134	взрослая самка	3	6	9

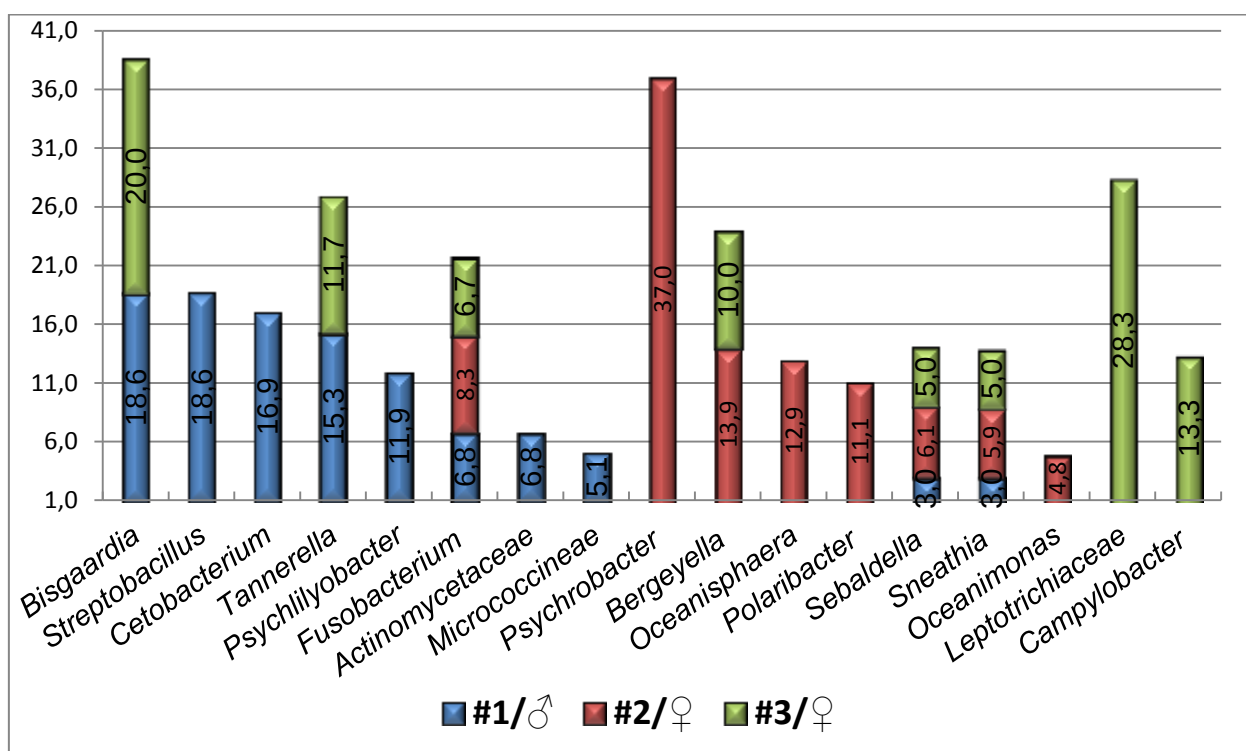


Рисунок 1 – Доминирующие таксоны в микробиоме ротовой полости каспийского тюленя

Как видно из рисунка 1, в микробиоме ротовой полости самцов каспийского тюленя в наибольшем процентном содержании представлены следующие роды: *Bisgaardia* и *Streptobacillus* – по 18,6%, *Cetobacterium*–16,9%, *Tannerella*–15,3%, *Psychlilyobacter*–11,9%, *Fusobacterium* и *Actinomycetaceae* – по 6,8%, *Micrococcineae* – 5,1%, *Sebaldella* и *Sneathia* – по 3%. Профиль микробиома ротовой полости самцов каспийского тюленя определялся микроорганизмами родов *Streptobacillus*, *Cetobacterium*, *Actinomycetaceae*, *Micrococcineae*, *Psychlilyobacter*.

Микробиом ротовой полости молодых самок каспийских тюленей отличался от микробиома самцов наличием и преобладанием родов *Psychrobacter* – 37,0%, *Bergeyella* – 13,9%, *Oceanisphaera* – 12,9%, *Polaribacter* – 11,1%, *Fusobacterium* – 6,7-8,3%, *Sneathia* – 5,9-6,1%, *Oceanimonas* – 4,8%, другие роды представлены в количестве 1% и менее. Микроорганизмы родов *Fusobacterium*, *Sebaldella* и *Sneathia* присутствовали в микробиоме ротовой полости у всех исследованных групп. Микробиом ротовой полости

взрослых самок тюленей отличался от остальных исследованных групп доминированием бактерией родов *Leptotrichiaceae*, *Campylobacter*. *Psychrobacter proteolyticus* - впервые выделен от антарктического криля (*Euphausia superba*), синтезирует холодо-адаптированную металлопротеазу - строго аэробная, психротрофная, галотолерантная, грамотрицательная неподвижная коккобактерия [5]. *Bergeyella zoohelcum* - грамотрицательная, аэробная, неподвижная бактерия, встречается в верхних дыхательных путях собак и кошек, способна вызывать респираторные заболевания у кошек и инфекции после укусов собак [6].

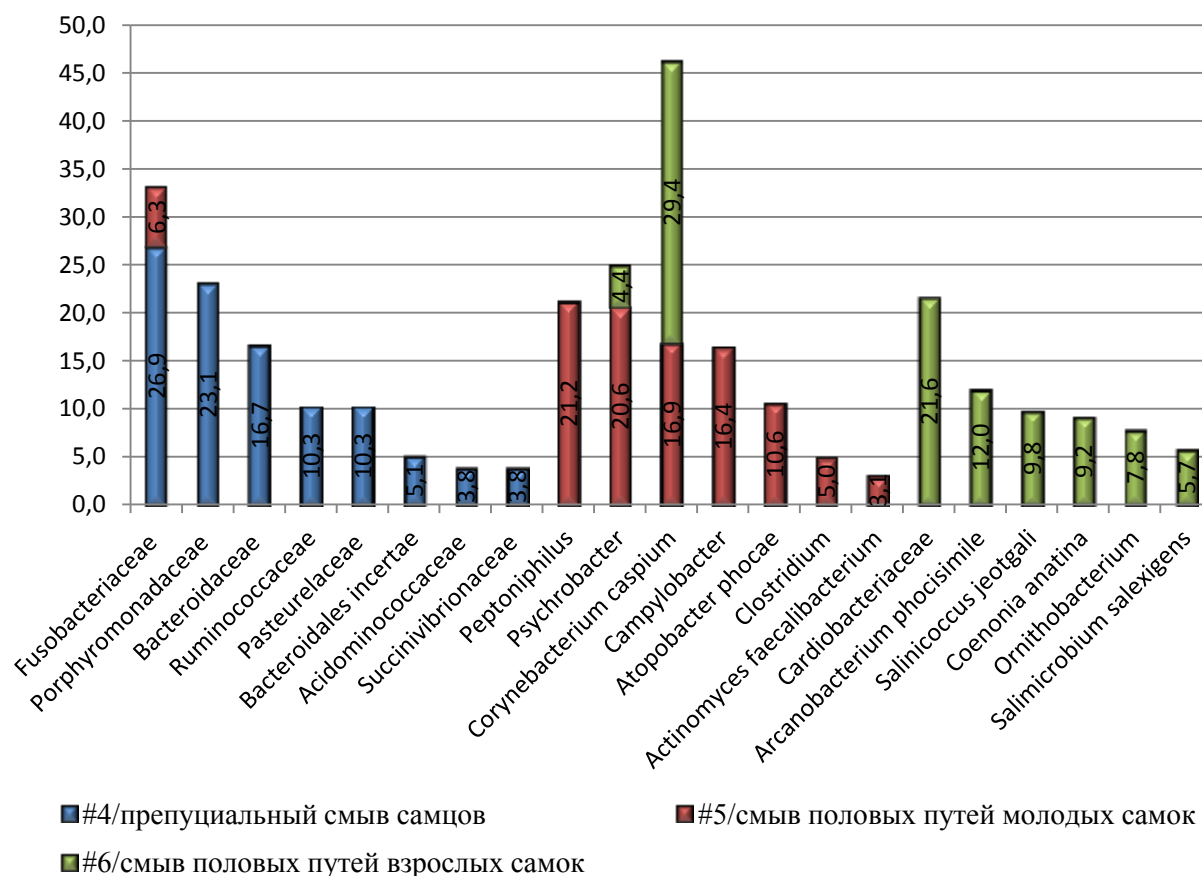


Рисунок 2 – Доминирующие таксоны в микробиоме урогенитального тракта каспийского тюленя

Как видно из рисунка 2, в бактериальном содержимом урогенитального тракта выявлены следующие наиболее представленные роды: *Fusobacteriaceae*-26,9%, *Porphyromonadaceae*-23,1%, *Bacteroidaceae*-16,7%, *Ruminococcaceae* и *Pasteurellaceae*- по 10,3%, *Bacteroidales incertae sedis* – 5,1%, *Acidominococcaceae* и *Succinivibrionaceae* – по 3,8%. Все перечисленные роды микроорганизмов, кроме *Ruminococcaceae* и *Acidominococcaceae*, являлись представителями микрофлоры кишечника этих животных, что указывает на возможную контаминацию препуциальных смывов самцов.

Микробиом урогенитального тракта молодых самок каспийских тюленей характеризовался наличием микроорганизмов родов: *Peptoniphilus*, *Psychrobacter*, *Corynebacterium caspium*, *Campylobacter*, *Atopobacter phocae*, *Clostridium*, *Actinomyces faecalibacterium* – которые характерны для микрофлоры толстого отдела кишечника этих животных, что указывает на возможную контаминацию материалов загрязнениями промежности. Микробиом половых путей взрослых самок каспийских тюленей отличался наличием *Cardiobacteriaceae*, *Arcanobacterium phocisimile*, *Salinicoccus jeotgali*, *Coenonia anatine*, *Ornithobacterium*, *Salimicrobium salexigens*.

Представители рода *Cardiobacteriaceae* встречались у обеих исследованных групп самок каспийского тюленя и не обнаружены у самцов. В пробах урогенитального тракта каспийских тюленей не выявлены сиквенсы бруцеллеза животных.

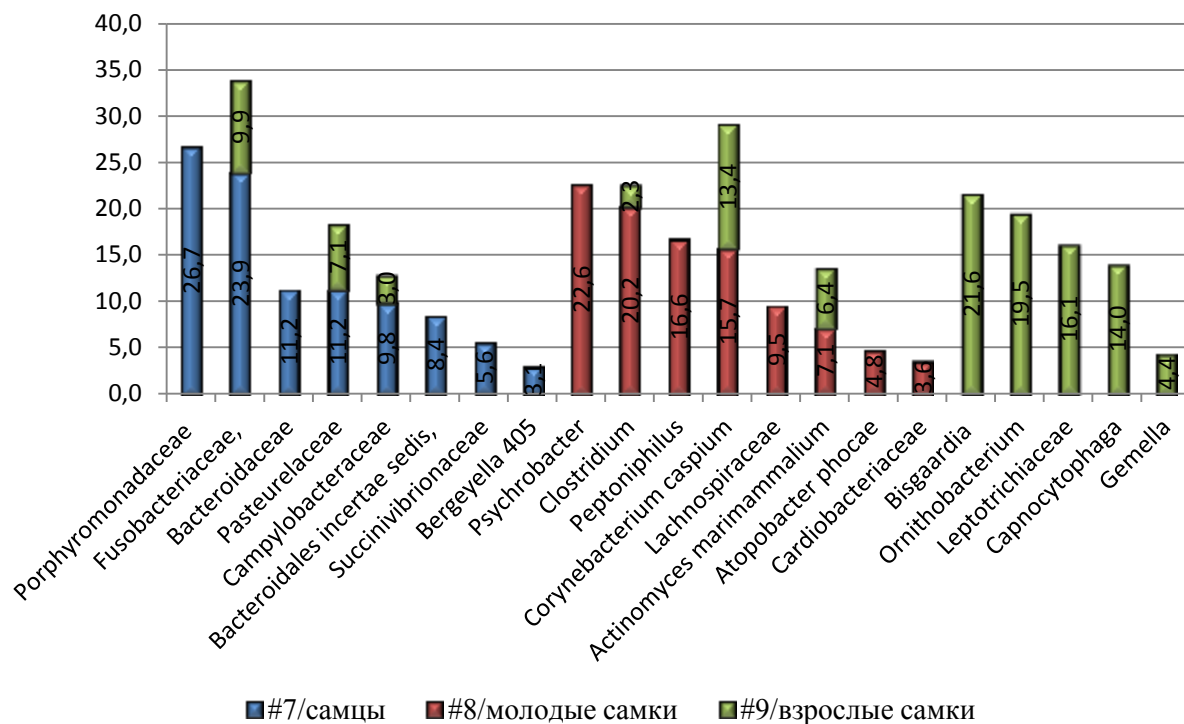


Рисунок 3 – Доминирующие таксоны в микробиоме толстого кишечника каспийского тюленя

Как видно из рисунка 3, в составе микробиома дистальной части кишечника самцов каспийских тюленей в наибольшем процентном отношении представлены следующие роды: *Porphyromonadaceae*-26,7%, *Fusobacteriaceae*-23,9%, *Bacteroidaceae* и *Pasteurellaceae*- по 11,2%, *Campylobacteraceae* – 9,8%, *Bacteroidales incertae sedis* – 8,4%, *Succinivibrionaceae* – 5,6% и *Bergeyella* 405 – 3,1%. Все перечисленные роды микроорганизмов кроме *Fusobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* характерны только для микробиома толстого отдела кишечника самцов каспийского тюленя.

Микробиом ректальных смывов молодых самок каспийских тюленей характеризовался наличием микроорганизмов рода *Psychrobacter* - 22,6%, *Clostridium* – 20,2%, *Peptoniphilus* - 16,6%, *Corynebacterium caspium* – 15,7%, *Lachnospiraceae* – 9,5%, *Actinomyces marimammalium* – 7,1%, *Atopobacter phocae* – 4,8%, *Cardiobacteriaceae* – 3,6%.

Микрофлора дистальной части толстого отдела кишечника взрослых самок каспийского тюленя отличалась от микрофлоры молодых особей преобладанием бактерий родов *Bisgaardia*, *Ornithobacterium*, *Leptotrichiaceae*, *Capnocytophaga*, *Gemella*. В микробиоме толстого кишечника обеих групп самок встречаются микроорганизмы, только у тюленей, такие как: *Actinomyces marimammalium* и *Atopobacter phocae*.

Несмотря на географическую и эволюционную изолированность каспийских тюленей от других морских млекопитающих мирового океана, в их микробиоме обнаружены виды бактерий, изолированных от тюленей в других частях мира, таких как *Corynebacterium phocae* и *Aerobacterium phocae*. *Corynebacterium phocae* выделен из носовых полостей обыкновенных тюленей - *Phoca vitulina* [7]. Другой вид этого рода, *Corynebacterium caspium*, изолирован из легких и препуциального смыва каспийских тюленей (*Phoca caspica*) во время эпизоотии морбилливирусной инфекции среди них в 2000 г. [8]. *Atopobacter phocae* был выделен от ректальных и вагинальных смывов погибших обыкновенных тюленей [9], фенотипически характеризуется CAMP-подобными

гемолитическими и биохимическими свойствами. Стоит обратить внимание на присутствие *Arcanobacterium phocisimile* в микрофлоре половых путей взрослых самок каспийского тюленя, так как другой вид этого рода, *Arcanobacterium phocae*, является распространенным патогеном в раневых инфекциях, который иногда ассоциируется с системными инфекциями у выброшенных на берег морских млекопитающих в Калифорнии [10].

Таким образом, анализ микробиома толстого отдела кишечника каспийских тюленей позволил установить определённый профиль нормальной микрофлоры животных в зависимости от их возраста и пола. За исключением некоторых условно-патогенных микроорганизмов, в бета-сообществе микробиоты каспийского тюленя не выявлены возбудители бактериальных зоонозов и оппортунистических инфекций морских млекопитающих. Проведенное исследование указывает на необходимость постоянного мониторинга параметров здоровья каспийского тюленя для выявления интродукции клинически значимых бактериальных патогенов в их популяцию.

Литература:

- 1 He, X., Y. Tian, L. Guo, R. Lux, D. R. Zusman, and W. Shi. 2010. Oral- derived bacterial flora defends its domain by recognizing and killing intruders A molecular analysis using *Escherichia coli* as a model intestinal bacterium. *Microb. Ecol.* 60:655–664.
- 2 The Marine Mammal Protection Act of 1972 as amended 2007. National Marine Mammal Tissue Bank and tissue analysis. <http://www.mmc.gov/legislation/pdf/mmpasec407.pdf>
- 3 PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. Purification of high-quality microbial and host DNA from buccal, vaginal, or skin swab samples. Catalog Number A29790Pub. No.MAN0014268 Rev. A.0
- 4 NEBNext® for DNA Sample Prep NEBNext_DNA_ILS Version 6.1 – 10/19
- 5 Denner E., Mark B., Busse H., Turkiewicz M., Lubitz W. "Psychrobacter proteolyticus sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease." *Syst Appl Microbiol.* 2001. - 24 (1). P. 44–53.
- 6 Jumi Yi., Humphries, Romney; Doerr, Laura; Jerris, Robert C.; Westblade, Lars F. *Bergeyella zoohelcum* Associated with Abscess and Cellulitis After a Dog Bite The Pediatric Infectious Disease Journal. 2016. – Vol. 35(2). P. 214–216.
- 7 Pascual C. Foster G. Alvarez N. Collins MD *Corynebacterium phocae* sp. nov., isolated from the common seal (*Phoca vitulina*). *Int J Svst Bacteriol* 1998 Apr4S Pt 2:601–4
- 8 Collins M. Hovles L. Foster G. Falsen E. *Corynebacterium caspium* sp. nov., from a Caspian seal (*Phoca caspica*) *Int J Svst Evol Microbiol.* 2004. Vol. 54(Pt 3). P.925–8.
- 9 Lawson, P A; Foster, G; Falsen, E; Ohlén, M; Collins, M D. "*Atopobacter phocae* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from common seals". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2000 September 50 (5): 1755–1760. doi:10.1099/00207713-50-5-1755
- 10 Johnson SP, Jang S, Gulland FM, Miller MA, Casper DR, Lawrence J, et al. Characterization and clinical manifestations of *Arcanobacterium phocae* infections in marine mammals stranded along the central California coast. *J Wildl Dis.* 2003. 39 (1): 36–44.

С.А. СУЛЕЙМЕНОВА^{1*}, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹, К.О. ҚАРАМЕНДИН¹,
А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹, С. ГУДМАН².

¹«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,
Алматы, Қазақстан

²Лидс Университеті, Ұлыбритания
*suleymenova.87@inbox.ru

КАСПИЙ ИТБАЛЫҚТАРЫНЫҢ НЕГІЗГІ БИОТОПТАРЫНЫҢ МИКРОБИОМЫНА СИПАТТАМА

Түйін

Мақалада Каспий итбалықтарының тыныс алу, урогенитальды және асқазан-ішек жолдарының микробиомының ДНҚ-ын метабаркодтау нәтижелері келтірілген. Каспий итбалықтарының микробиомдық профилі көрсетілген және олардың бета-микробиоталар қауымдастығында бактериялық зооноз қоздырғыштарының жоқтығы атап өтілген.

Кілтті сөздер: Каспий итбалығы, метагеном, микробиом, тізбектеу.

IRSTI 34.27.23

S.A. SULEIMENOVA^{1*}, E.T. KASYMBEKOV¹, K.O. KARAMENDIN¹,
A.I. KYDYRMANOV¹, S. GOODMAN²

¹LLP "Research and Production Center of Microbiology and Virology", Almaty, Kazakhstan

²University of Leeds, UK
*suleymenova.87@inbox.ru

CHARACTERISTICS OF THE MICROBIOME OF THE MAIN BIOTOPES OF THE CASPIAN SEAL

<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2021.01-02.04>

Summary

The article presents the results of metabarcoding of the microbiome DNA of the respiratory, urogenital and gastrointestinal tracts of the Caspian seal. The microbiome profile of the Caspian seal is shown, and the absence of pathogens of bacterial zoonoses in their beta microbiota community is noted.

Key words: Caspian seal, metagenome, microbiome, sequencing.

The study of the microbiome of biological species is associated with the awareness of its role in the health and ecology of hosts. Microbiota is a natural barrier for pathogenic microbes, they are also characterized as "resistance to colonization" [1]. In this regard, it is important to study both normal, conditionally pathogenic and pathogenic microflora in Caspian seals, which will allow us to assess their role in general pathology during mass outbreaks of infectious diseases.

Materials and methods

Blood serum, nasal, oral, conjunctival, rectal, urogenital (preputial and vaginal) washes have collected from live seals according to certified methods recommended by the Commission on Marine Mammals [2]. Research methods exclude the death of animals during capture and sampling.

Swabs have taken with sterile cotton swabs with a plastic handle. Samples have stored in liquid nitrogen (-196° C) before testing. Specimens for metagenomic studies have placed in a

particular reagent - DNA / RNA Shield, which preserves the samples' genetic integrity and expression profiles at ambient temperature without refrigeration or freezing.

Extraction of microbiome DNA from the swabs have performed using the PureLink™ MicrobiomeDNA Purification Kit (A29790), according to the manufacturer's recommendations, from a 200 µL sample [3]. The kit allows microbial DNA extraction from samples of faeces, urine, saliva, smears (vaginal, oral, skin, rectal, environment), transport medium, soil.

Microbiome analysis conducted by sequencing the fragment of the 16S ribosomal RNA gene of microflora according to the Illumina protocol. Gene-specific primers 340F (5' - CCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 533R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') to 16S V3 and V4 regions and NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1) kits [4] used to identify the bacterial taxons in the respiratory and gastrointestinal tracts of the Caspian seal.

Results and Discussions

For the study, we used washings of the oral, urogenital and rectal microbiota of the Caspian seals collected in 2019. The samples have pooled according to the sex and age characteristics of the animals (Table 1).

Table 1 - Characteristics of oral, urogenital and rectal swabs of Caspian seals combined into a pool

The pooled samples of seals No:	Range of animal body length, cm	Gender	Swab pool No:		
			Buccal	Urogenital	Rectal
#02, #05, #06	119-133	Adult males	1	4	7
#04, #07, #10	97-101	Juvenile females	2	5	8
#01, #08	104-134	Adult females	3	6	9

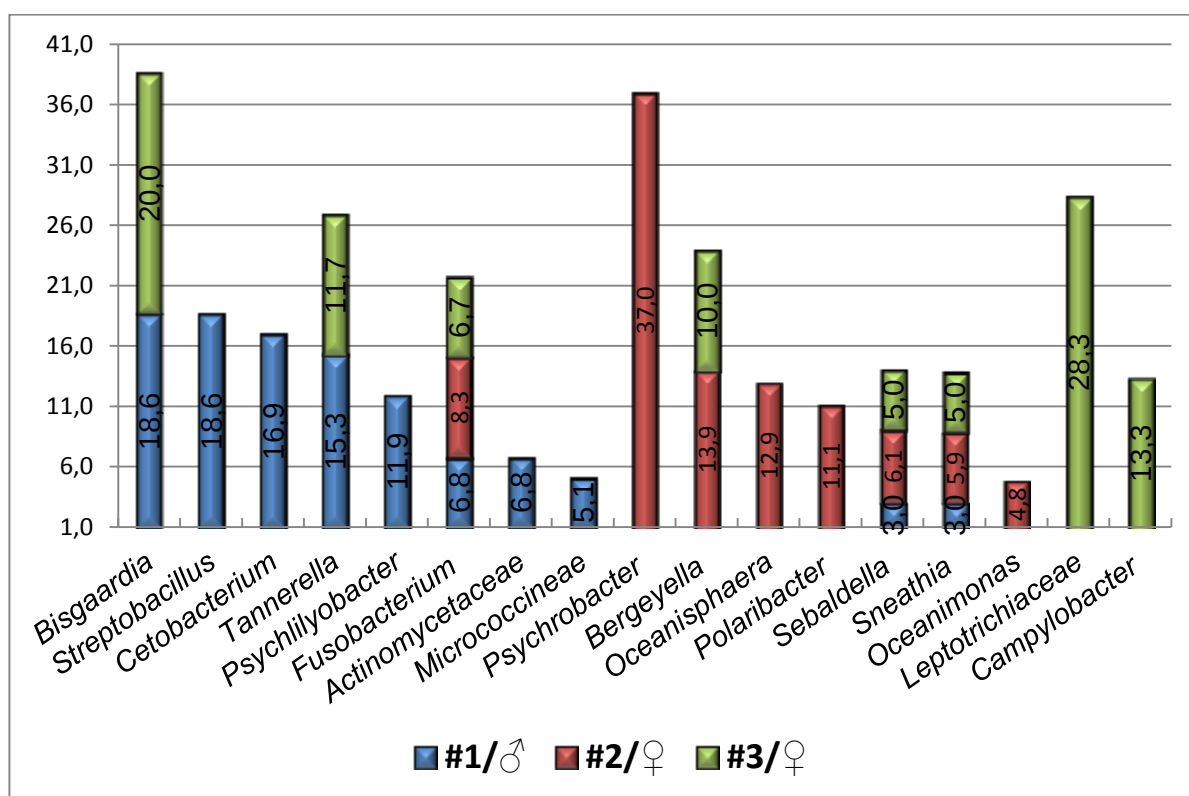


Figure 1 – Dominant bacterial taxa in the oral microbiome of the Caspian seals

As can be seen from Figure 1, in the microbiome of the oral cavity of male Caspian seals, the highest percentage has represented by the following genera: *Bisgaardia* and *Streptobacillus* - 18.6% each, *Cetobacterium* - 16.9%, *Tannerella* - 15.3%, *Psychlilyobacter* - 11.9%, *Fusobacterium* and *Actinomycetaceae* - 6.8% each, *Micrococcineae* - 5.1%, *Sebaldella* and *Sneathia* - 3% each. The microbiome profile of male Caspian seals' oral cavity has determined by microorganisms of the genera *Streptobacillus*, *Cetobacterium*, *Actinomycetaceae*, *Micrococcineae*, *Psychlilyobacter*.

The oral microbiome of juvenile female Caspian seals differed from those of males in the presence and predominance of the genera *Psychrobacter* - 37.0%, *Bergeyella* - 13.9%, *Oceanisphaera* - 12.9%, *Polaribacter* - 11.1%, *Fusobacterium* - 6.7-8, 3%, *Sneathia* - 5.9-6.1%, *Oceanimonas* - 4.8%, other genera are represented in the content of 1% or less. Microorganisms of the genera *Fusobacterium*, *Sebaldella*, and *Sneathia* were present in all studied groups' oral microbiome. The microbiome of the oral cavity of adult female seals has characterized by the dominance of bacteria of the genera *Leptotrichiaceae*, *Campylobacter*.

Psychrobacter proteolyticus - first isolated from Antarctic krill (*Euphausia superba*), synthesizes cold-adapted metalloprotease - strictly aerobic, psychrotrophic, halotolerant, gram-negative immotile coccobacterium [5]. *Bergeyella zoohelcum* is a gram-negative, aerobic, non-motile bacterium found in the upper respiratory tract of dogs and cats, can cause respiratory diseases in cats and infections after dog bites [6].

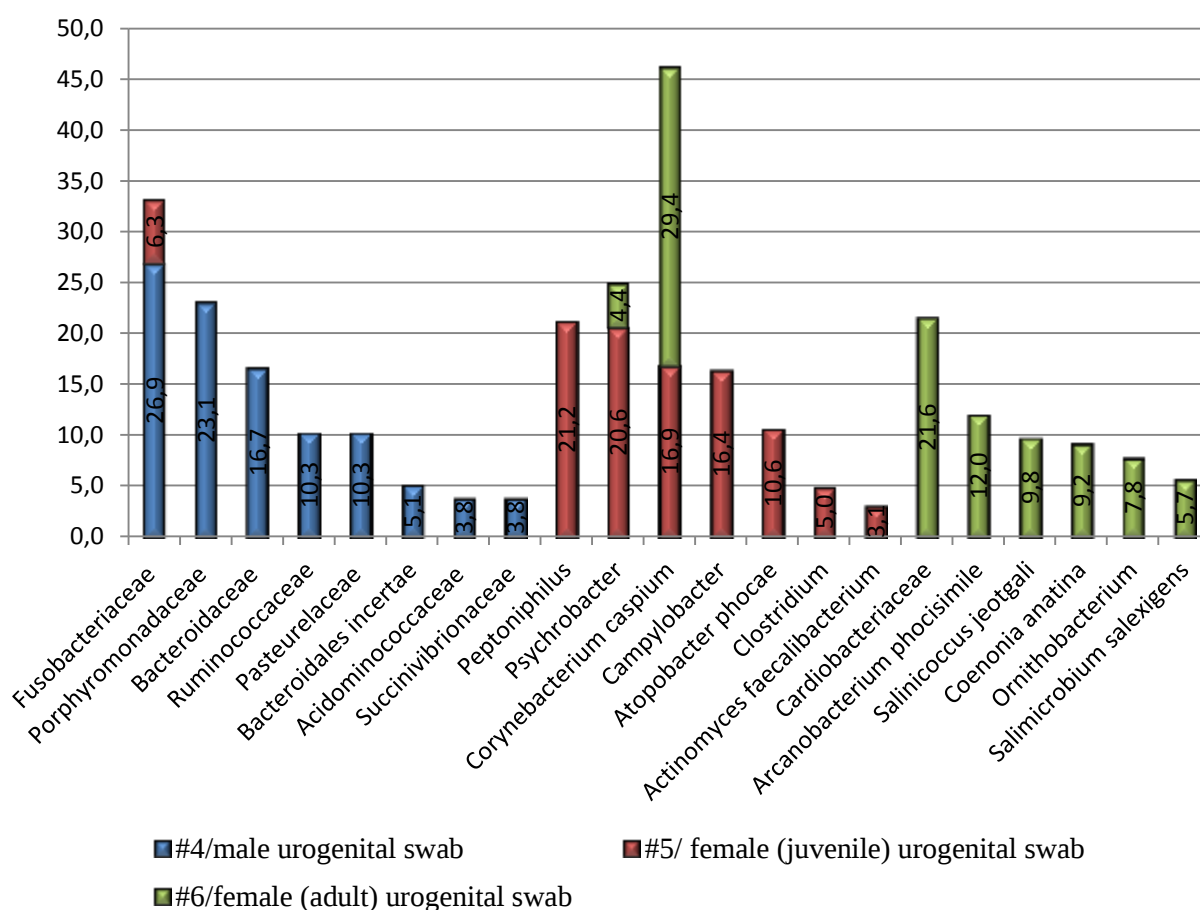


Figure 2 - Dominant bacterial taxa in the microbiome of the urogenital tract of the Caspian seals

As can be seen from Figure 2, the following most represented genera were identified in the bacterial contents of the urogenital tract: *Fusobacteriaceae* - 26.9%, *Porphyromonadaceae* - 23.1%, *Bacteroidaceae* - 16.7%, *Ruminococcaceae* and *Pasteurellaceae* - 10.3% each, *Bacteroidales incertae sedis* - 5.1%, *Acidominococcaceae* and *Succinivibrionaceae* - 3.8% each.

All genera of microorganisms are listed, except those *Ruminococcaceae* and *Acidominococcaceae* were representatives of these animals' intestinal microflora, indicating the probable contamination of preputial swabs of males.

The presence of microorganisms of the genus *Peptoniphilus*, *Psychrobacter*, *Corynebacterium caspium*, *Campylobacter*, *Atopobacter phocae*, *Clostridium*, *Actinomyces faecalibacterium* characterized the microbiome of genital tract of juvenile female Caspian seals. They are characteristic of these animals' intestine microflora; consequently, this indicates the possible perineum related contamination of materials. The microbiome of adult female Caspian seals' reproductive tract was distinguished by *Cardiobacteriaceae*, *Arcanobacterium phocisimile*, *Salinicoccus jeotgali*, *Coenonia anatine*, *Ornithobacterium*, *Salimicrobium salexigens*.

Representatives of the genus *Cardiobacteriaceae* found in both studied groups of females of the Caspian seal and not revealed in males. The sequences characteristic of animal brucellosis not detected in the reproductive tract of the Caspian seals.

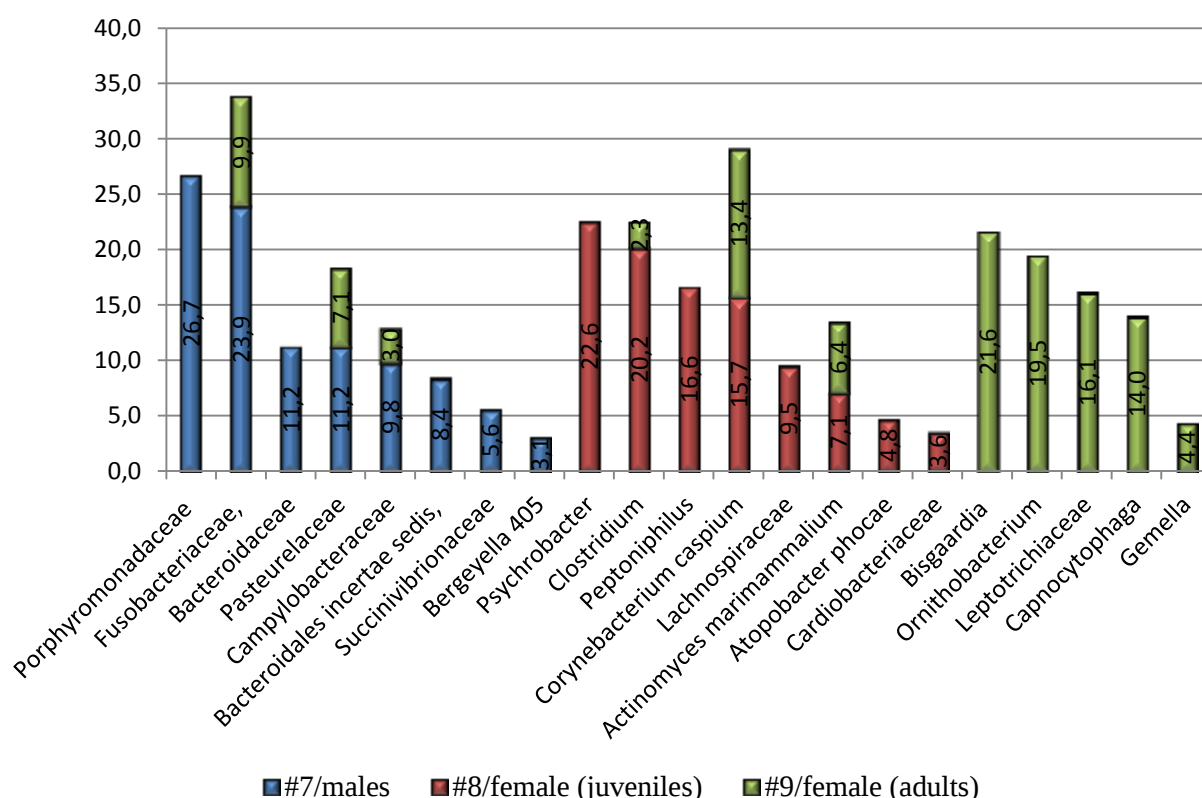


Figure 3 - Dominant taxa in the rectal microbiome of the Caspian seals

As can be seen from Figure 3, the following genera are represented in the highest percentage on the microbiome of the distal part of the squash of male Caspian seals by *Porphyromonadaceae* - 26.7%, *Fusobacteriaceae* - 23.9%, *Bacteroidaceae* and *Pasteurellaceae* - 11.2% each, *Campylobacteraceae* - 9, 8%, *Bacteroidales incertae sedis* - 8.4%, *Succinivibrionaceae* - 5.6%, and *Bergeyella 405* - 3.1%. All the listed genera of microorganisms except *Fusobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* are characteristic only for male Caspian seals' colon microbiome.

The microbiome of rectal washings of young female Caspian seals was characterized by the presence of microorganisms of the genus *Psychrobacter* - 22.6%, *Clostridium* - 20.2%, *Peptoniphilus* - 16.6%, *Corynebacterium caspium* - 15.7%, *Lachnospiraceae* - 9.5%, *Actinomyces marimammalium* - 7.1%, *Atopobacter phocae* - 4.8%, *Cardiobacteriaceae* - 3.6%.

The microflora of the distal part of the thick squash of adult females of the Caspian seal differed from that of juveniles by the predominance of bacteria of the genera *Bisgaardia*,

Ornithobacterium, Leptotrichiaceae, Capnocytophaga, Gemella. Microorganisms *Actinomyces marimammalium* and *Atopobacter phocae* found only in seals also revealed in the microbiome of the rectal swabs of both groups of female Caspian seals.

Despite the geographical and evolutionary isolation of Caspian seals from other marine mammals of the world's oceans, bacterial species isolated from seals in other parts of the world, such as *Corynebacterium phocae* and *Arcanobacterium phocae*, have been found in their microbiome. *Corynebacterium phocae* was isolated from the nasal cavities of the common seal *Phoca vitulina* [7]. Another species of this genus, *Corynebacterium caspium*, was isolated from the lungs and preputial flushing of the Caspian seals (*Phoca caspica*) during the epizootic of morbillivirus infections among them in 2000 [8]. *Atopobacter phocae* was isolated from rectal and vaginal swabs of dead common seals [9] and is phenotypically characterized by CAMP-like hemolytic and biochemical properties. It is worth paying attention to the presence of *Arcanobacterium phocisimile* in the microflora of the reproductive tract of adult female Caspian seals, since another species of this genus, *Arcanobacterium phocae*, is a common pathogen in wound infections, which is sometimes associated with systemic infections in stranded marine mammals in California [10].

Thus, the microbiome analysis of the colon of the Caspian seals made it possible to establish a certain profile of the normal microflora of animals depending on their age and sex. Except for some opportunistic microorganisms, no agents of bacterial zoonoses and opportunistic infections of marine mammals have been identified in the Caspian seal microbiota's beta community. The study indicates the need for constant monitoring of the Caspian seal's health parameters to identify the introduction of clinically significant bacterial pathogens into their population.

References:

- 1 He, X., Y. Tian, L. Guo, R. Lux, D. R. Zusman, and W. Shi. 2010. Oral- derived bacterial flora defends its domain by recognizing and killing intruders A molecular analysis using Escherichia coli as a model intestinal bacterium. Microb. Ecol. 60:655–664.
- 2 The Marine Mammal Protection Act of 1972 as amended 2007. National Marine Mammal Tissue Bank and tissue analysis. <http://www.mmc.gov/legislation/pdf/mmpasec407.pdf>
- 3 PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. Purification of high-quality microbial and host DNA from buccal, vaginal, or skin swab samples. Catalog Number A29790Pub. No.MAN0014268 Rev. A.0
- 4 NEBNext® for DNA Sample Prep / NEBNext_DNA_ILS Version 6.1 – 10/19
- 5 Denner E., Mark B., Busse H., Turkiewicz M., Lubitz W. "Psychrobacter proteolyticus sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill Euphausia superba Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease." Syst Appl Microbiol. 2001. 24 (1). P. 44–53.
- 6 Jumi Yi., Humphries, Romney; Doerr, Laura; Jerris, Robert C.; Westblade, Lars F. Bergeyella zoohelcum Associated with Abscess and Cellulitis After a Dog Bite The Pediatric Infectious Disease Journal. - 2016. – Vol. 35(2). P. 214–216.
- 7 Pascual C. Foster G. Alvarez N. Collins MD Corynebacterium phocae sp. nov., isolated from the common seal (Phoca vitulina). Int J Syst Bacteriol 1998 Apr4S Pt 2:601–4
- 8 Collins M. Hovles L. Foster G. Falsen E. Corynebacterium caspium sp. nov., from a Caspian seal (Phoca caspica) Int J Syst Evol Microbiol. 2004. Vol. 54 (Pt 3). P.925–8.
- 9 Lawson, P A; Foster, G; Falsen, E; Ohlén, M; Collins, M D. "Atopobacter phocae gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from common seals". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000 September 50 (5): 1755–1760. doi:10.1099/00207713-50-5-1755
- 10 Johnson SP, Jang S, Gulland FM, Miller MA, Casper DR, Lawrence J, et al. Characterization and clinical manifestations of Arcanobacterium phocae infections in marine mammals stranded along the central California coast. J Wildl Dis. 2003. 39 (1): 36–44.