

Praćenje stanja bolesti račje kuge u Nacionalnom parku Plitvička jezera

Pavić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:026515>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Pavić

Praćenje stanja bolesti račje kuge u Nacionalnom parku
Plitvička jezera

Diplomski rad

Zagreb, 2018

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehničkog fakulteta i Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Bielen i prof. dr. sc. Ivane Maguire. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Zahvale

Prvo se želim zahvaliti Nacionalnom parku Plitvička jezera što su omogućili provođenje ovog istraživanja. Istraživanje je financirano od strane Nacionalnog parka Plitvička jezera (projekt 'Istraživanje i nadzor populacija vrsti *Astacus astacus* i *Austropotamobius torrentium* u novoutvrđenim okolnostima prisutnosti račje kuge u Nacionalnom parku Plitvička jezera') i Fonda za zaštitu okoliša i energetske učinkovitost (projekt 'Kako će klimatske promjene utjecati na širenje račje kuge?' – Prilagodba smjernica za zaštitu zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova u kontekstu klimatskih promjena)

Dalje želim zahvaliti svojoj mentorici Ani Bielen na svesrdnoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem joj na uloženom vremenu istrpljivosti te na opuštenoj radnoj atmosferi.

Hvala profesorici Maguire na stručnom znanju, prepravcima i savjetima tijekom ovog istraživanja. Također hvala docentici Hudini na pomoći pri hvatanju rakova i uzorkovanju.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji, mami, tati i sekama Klari i Emi na podršci..

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PRAĆENJE STANJA BOLESTI RAČJE KUGE U NACIONALNOM PARKU PLITVIČKA JEZERA

Dora Pavić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Nacionalni park Plitvička jezera prirodno je stanište dvije zakonom zaštićene zavičajne vrste rakova, riječnog raka, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) i potočnog raka, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803). Slatkovodni deseteronožni rakovi ključne su vrste slatkovodnih ekosustava, ali se njihova brojnost sve više smanjuje. Jedan od glavnih uzroka njihova nestanka je smrtonosna bolest račja kuga uzrokovana patogenom *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) (Oomycetes). Bolest je već zabilježena u NP Plitvička jezera, ali je to istraživanje uključilo mali broj jedinki. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio pratiti prisutnost patogena *A. astaci* na većem broju jedinki i na više lokacija unutar NP. Uzorkovanje je provedeno na četiri lokacije. Vrsta *A. astacus* je uzorkovan na lokacijama Burgeti (68 jedinki) i Prštavci (10), a *A. torrentium* na potocima Prijeboj (22) i Sartuk (15). Korištena je novorazvijena neinvazivna metoda detekcije patogena koja se temelji na uzimanju briseva kutikule te ne uključuje žrtvovanje rakova. Iz briseva je izolirana DNA te je standardnim PCR-om provjerena prisutnost patogena. Od ukupno 115 testiranih rakova, patogen je utvrđen kod 9 jedinki riječnog raka (12 %, 9/78) s lokacija Burgeti i Prštavci. Uzorci pozitivni na *A. astaci* analizirani su i kvantitativnim PCR-testom kako bi se utvrdio intenzitet infekcije. Analizom mikrosatelitnih biljega utvrđeno je da se radi o patogenu genotipa As, što se podudara s rezultatima prethodnih istraživanja. Dobiveni rezultati mogu pomoći u razvoju planova zaštite ugroženih slatkovodnih rakova u NP.

(34 stranice, 9 slika, 5 tablica, 60 literaturnih navoda, 1 prilog, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Nacionalni park Plitvička jezera, zavičajne vrste rakova, *Aphanomyces astaci*, račja kuga, neinvazivna detekcija patogena

Voditelj: Doc. dr. sc. Ana Bielen, prof. dr. sc. Ivana Maguire

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Ivana Maguire,

Izv. prof.dr.sc. Danijel Orešić,

Izv. prof. dr. sc. Sven Jelaska,
Izv. prof. dr. sc. Alan Moro,
Prof. dr. sc. Jasenka Sremac (zamjena)

Rad prihvaćen: 01.03.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

MONITORING OF CRAYFISH PLAGUE IN THE PLITVICE LAKES NATIONAL PARK

Dora Pavić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Two protected indigenous freshwater crayfish species, the noble crayfish *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) and the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), inhabit waterbodies of the Plitvice Lakes National Park. Freshwater crayfish are keystone species in freshwater ecosystems, but their numbers are declining. One of the main threats for indigenous crayfish species is the pathogen *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) (Oomycetes), the causative agent of crayfish plague disease. Presence of this pathogen has already been recorded in the Plitvice Lakes but the previous research was done on a small sample. Thus, the main goal of this research was to monitor the presence of the pathogen *A. astaci* on a large number of individuals and at multiple locations within the National Park. Research was conducted at four locations. *Astacus astacus* was sampled at Burgeti (68 individuals) and Prštavci (10), and *A. torrentium* at streams Prijeboj (22) and Sartuk (15). New, non-invasive method for *A. astaci* detection was applied. The method is based on collecting swabs of mixed epibiotic microbial communities present on the crayfish carapax. The DNA was isolated and the presence of the pathogen's DNA was detected by PCR. Pathogen was detected only in nine noble crayfish specimens (12%, 9/78) from Burgeti and Prštavci. Positive samples were classified into semi-quantitative categories of pathogen load by quantitative PCR. Microsatellite genotyping was applied to identify *A. astaci* Group A strain (As genotype) which is consistent with the results of the previous research. Obtained results are applicable in the development of effective management plans aiming to protect vulnerable native species in NP.

(34 pages, 9 figures, 5 tables, 60 references, 1 appendix, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Keywords: Plitvice Lakes National Park, indigenous crayfish species, *Aphanomyces astaci*, crayfish plague, non-invasive disease monitoring

Supervisors: Asst. prof. Ana Bielen, Prof. Ivana Maguire

Reviewers: Ivana Maguire, Prof.,

Danijel Orešić, Assoc. prof.,

Sven Jelaska, Assoc. prof.,

Alan Moro, Assoc. prof.,

Jasenska Sremac, Prof. (replacement)

Thesis accepted: 01.03.2018.

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1.Deseteronožni rakovi u Europi i Hrvatskoj.....	1
1.2.Deseteronožni rakovi u Nacionalnom parku Plitvička jezera	2
1.3.Račja kuga	3
1.3.1. Životni ciklus patogena <i>Aphanomyces astaci</i>	3
1.3.2. Širenje račje kuge u Europi i Hrvatskoj.....	6
1.3.3. Genotipovi <i>A. astaci</i>	6
1.3.4.Metode detekcije uzročnika račje kuge	7
1.4.Ciljevi diplomskog rada	8
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	9
2.1.Nacionalni park Plitvička jezera	9
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Terensko sakupljanje rakova i uzimanje brisa kutikule	12
3.2. Izolacija DNA.....	14
3.3. Elektroforeza u agaroznom gelu	15
3.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i kvalitete uzoraka DNA. 16	
3.5. PCR-test za detekciju uzročnika račje kuge <i>A. astaci</i>	16
3.6. Analiza intenziteta infekcije i genotipa patogena	17
4. REZULTATI	18
5. RASPRAVA	22
6. ZAKLJUČAK	26
7. LITERATURA	27
8. ŽIVOTOPIS	33
9. PRILOZI	34

1.UVOD

1.1.Deseteronožni rakovi u Europi i Hrvatskoj

Deseteronožni rakovi zauzimaju raznolika staništa kao što su stajačice, tekućice, podzemne vode i bočate vode (Maguire, 2010). Oni su herbivori, predatori i detritivori, a mogu biti plijen mnogim kopnenim i vodenim životinjama (Maguire, 2010). Kao omnivori bitni su konzumenti u mnogim hranidbenim mrežama te njihova prisutnost utječe na stabilnost i raznolikost cijele životne zajednice (Reynolds i Souty- Grosset, 2012).

Na području Europe zabilježeno je pet zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae: *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) – riječni rak, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 – uskoškari rak, *Astacus pachypus* (Rathke, 1837), *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) – potočni rak, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) – bjelonogi rak. Međutim, rasprostranjenost većine zavičajnih vrsta rakova smanjila se zbog uništenja staništa (npr. regulacije vodenih tokova), prekomjernog izlova, onečišćenja, bolesti i kompeticije s alohtonim vrstama rakova koje većinom potječu iz Sjeverne Amerike (Holdich i sur., 2009). Alohtone vrste rakova unesene su krajem 19. stoljeća radi uzgoja, a njihovim su širenjem zavičajne vrste sve više istisnute iz svojih prirodnih staništa (Holdich, 2002). Tome je uzrok agresivnost invazivnih vrsta rakova, ranije spolno sazrijevanje i veći fekunditet, te činjenica da su prenosioci patogena koji kod zavičajnih rakova uzrokuje smrtonosnu bolest – račju kugu (Holdich, 2009).

U Hrvatskoj su rasprostranjene četiri zavičajne europske vrste slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae: riječni rak, uskoškari rak, bjelonogi rak i potočni rak (Maguire i sur., 2011). Riječni, potočni i bjelonogi rak u Hrvatskoj su zaštićeni Zakonom o zaštiti prirode (NN 15/18) i Pravilnikom o strogo zaštićenima vrstama (NN 144/13).

Od 10 alohtonih vrsta rakova koji su zabilježeni u Europi, u Hrvatskoj su raširene tri vrste: *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – signalni rak, *Procambrus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis* – mramorni rak i *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) – bodljobrادي rak (Holdich i sur., 2009; Maguire i sur., 2011; Maguire i sur., 2018; Samardžić i sur., 2014). Prva invazivna vrsta slatkovodnog raka koja je zabilježena u Hrvatskoj je bodljobrادي rak. Prvi je puta zabilježen u Parku prirode Kopački rit (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004) od kuda se nastavio širiti uzvodno u rijeku Dravu, što je dovelo do smanjenja populacije uskoškarog raka (Hudina i sur., 2009). Signalni rak je u Hrvatskoj prvi puta zabilježen u rijeci Muri 2008. godine (Maguire i sur., 2008) te se velikom brzinom raširio nizvodno u rijeku Dravu (Hudina

i sur., 2009). Također prema novijim istraživanjima Hudine i suradnika (2017) signalni rak je zabilježen i u rijeci Korani u koju je ilegalno unesen. Zadnji je zabilježen mramorni rak, 2013. godine u umjetnom jezeru Šoderica u blizini Koprivnice (Samardžić i sur., 2014).

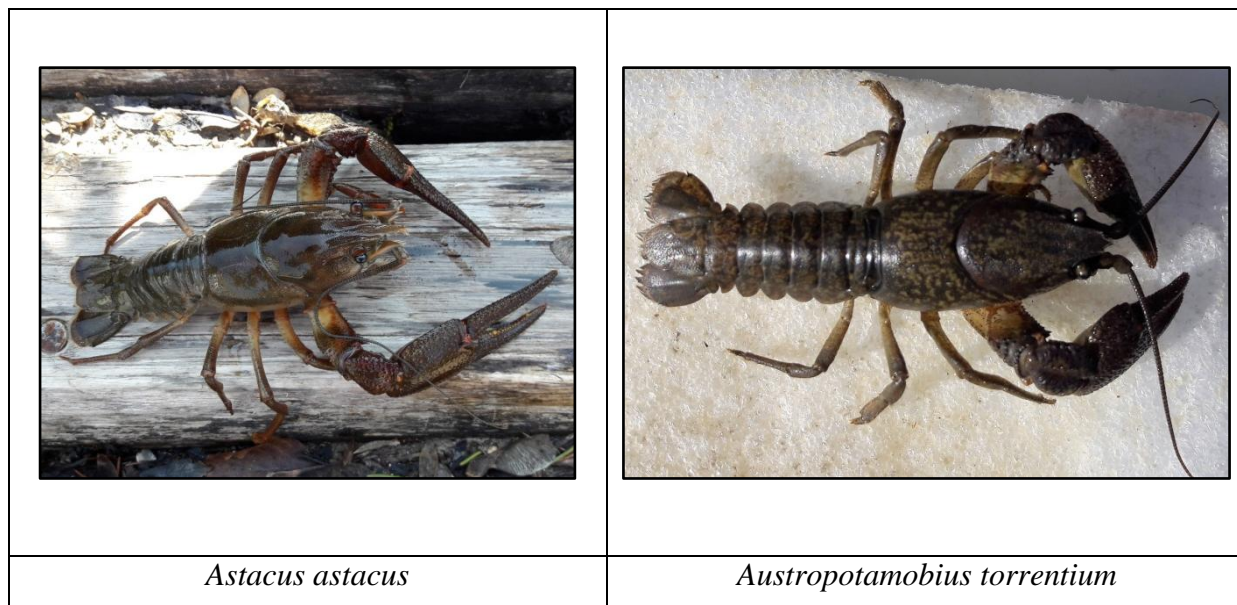
1.2.Deseteronožni rakovi u Nacionalnom parku Plitvička jezera

U NP Plitvička jezera prisutne su dvije zavičajne vrste rakova, riječni i potočni rak, dok alohtone vrste nisu zabilježene. U zapisima iz 19. stoljeća prvi puta se spominje potočni rak kao jedini stanovnik NP. Međutim, u kasnijim istraživanjima zabilježen je i riječni rak za kojeg se smatra da je antropogenim utjecajem dospio na područje NP (Maguire i sur., 2013).

U prošlosti je riječni rak bio vrlo raširena vrsta, ne samo u Hrvatskoj nego i u Europi. Često se zbog ekonomskih razloga, odnosno akvakulture, unosio u različita vodena staništa a danas se smatra ugroženom vrstom. U Hrvatskoj je rasprostranjen u vodama savskog i dravskog sliva (crnomorski sliv), ali je unesen i u pojedine rijeke jadranskog sliva tokom 20.stoljeća. Na Plitvičkim jezerima populacija riječnog raka najgušća je na lotičkim staništima u blizini sedrenih barijera (Maguire i sur., 2013). Generalno ova vrsta je rasprostranjena na sporijim riječnim tokovima čije je dno zemljano (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).

U Hrvatskoj potočni rak prevladava u rijekama crnomorskog sliva gdje naseljava brzace i potoke s kamenitim dnom na višim nadmorskim visinama (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Maguire i sur., 2011). Potočni je rak, kao i riječni rak, zabilježen u nekoliko rijeka jadranskog sliva, međutim kako on nikada nije bio od ekonomske važnosti mala je vjerojatnost da je u spomenute rijeke dospio pod antropogenim utjecajem (Maguire i sur., 2011). Stoga se vjeruje da se tim područjem proširio tijekom geološke prošlosti kada su crnomorski i jadranski sliv bili povezani (Maguire i sur., 2011). U NP Plitvička jezera može se naći u potocima koji opskrbljuju jezera (Maguire i sur., 2011, Maguire i sur., 2013).

Riječni i potočni rak (Slika 1) koegzistiraju na pojedinim lokacijama u NP što je vjerojatno posljedica zauzimanja različitih mikrostaništa te među njima nema kompeticije (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).



Slika 1. Zavičajne vrste rakova u NP Plitvička jezera. (Foto: Pavić D.)

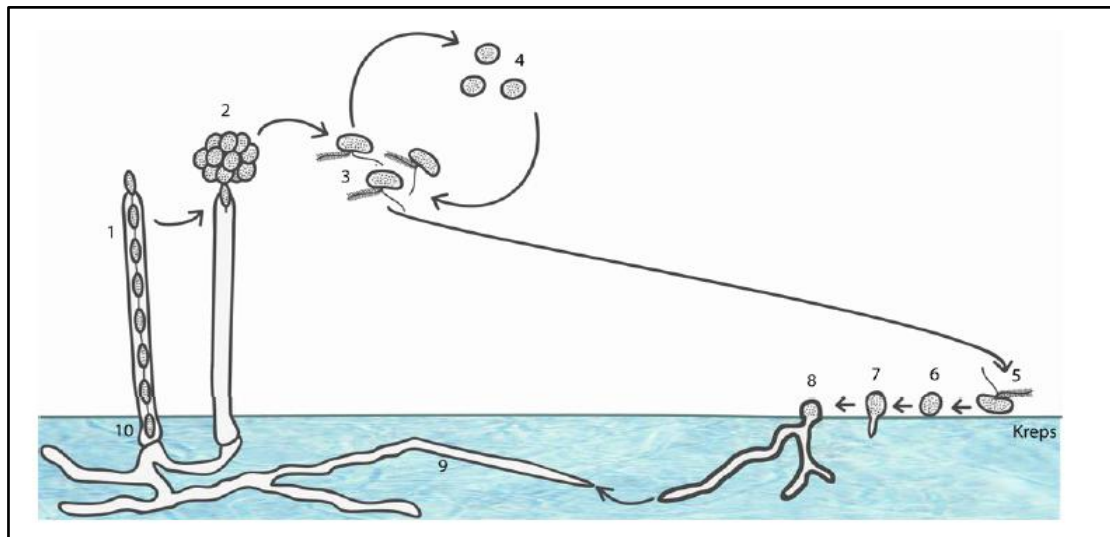
1.3. Račja kuga

Račja kuga je jedna od najpoznatijih i najopasnijih bolesti slatkovodnih rakova u Europi, a uzrokovana je patogenom *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) koji je svrstan među 100 najopasnijih invazivnih vrsta na svijetu (Lowe i sur., 2000). Spada u razred Oomycetes (red Saprolegniales), skupinu organizama poznatih kao vodene plijesni (OIE, 2016). Patogen *A. astaci* u Europu je dospio s invazivnim sjevernoameričkim vrstama rakova koji su zahvaljujući koevoluciji s patogenom razvili otpornost na razvoj bolesti te djeluju kao vektori širenja zaraze (Becking i sur., 2015). Suprotno tome, europske slatkovodne vrste vrlo su podložne zarazi što znači da nakon kontakta s patogenom u najvećem broju slučajeva nastupa razvoj smrtonosne bolesti.

1.3.1. Životni ciklus patogena *Aphanomyces astaci*

Životni ciklus patogena *A. astaci* prikazan je na Slici 2, a uključuje: hife (micelij) – razvijaju se na kutikuli i u unutrašnjosti tijela raka domaćina (Slika 2-9), zoospore – infektivni pokretni stadij koji se oslobađa iz micelija u vodu (Slika 2-3 i 2-5) i oblik ciste (Slika 2-4 i 2-

6) (Cerenius i Söderhall, 1984; Oidtmann i sur., 2002). Prije ili nakon što zaraženi rak uginе, na površinu kutikule izbijaju hife i stvaraju sporangije (Slika 2-1) iz kojih se onda oslobađaju zoospore (Slika 2-2). One se u vodi kreću pomoću biča i u roku od nekoliko dana moraju pronaći pogodnog domaćina jer ako ga ne pronađu pretvorit će se u cistu koja neće proklijati već će se pretvoriti u novu zoosporu (Slika 2-3 i 2-4). Taj proces se može ponoviti do tri puta, a ako ni nakon toga ne pronađe domaćina, zoospora će postati nevijabilna cista (Söderhall i Cerenius, 1999). Međutim, ako zoospora kemotaksijom pronađe pogodnog domaćina, prelazi u oblik ciste koja počinje klijati (Slika 2-7), a hife prodiru kroz kutikulu raka (Slika 2-8) i to najčešće na mjestima koja su ozlijeđena ili na područjima gdje je kutikula mekša (zglobovi i područje ventralne abdominalne kutikule) (Unestam i Weiss, 1970). Hife se granaju i prodiru dalje u tkivo i organe što dovodi do razvoja smrtonosne bolesti račje kuge. Hife *A. astaci* se primarno šire tijelom putem vezivnog tkiva, s tim da mogu biti zahvaćena i ostala tkiva (OIE, 2016). Završna faza infekcije, sporulacija i otpuštanje zoospora u vodu, nastupa neposredno prije ili nakon smrti zaražene jedinke. Simptomi bolesti su melanizacija kutikule (smeđe/crne točke na nogama i abdomenu, Slika 3), dnevna aktivnost, paraliza te nekoordinirano kretanje (Unestam i Weiss, 1970).



Slika 2. Životni ciklus *A. astaci*. Sporangij (1) sa zoosporama (2) koje imaju bič i ispuštaju se u vodu (3) gdje ostaju vijabilne nekoliko dana. Ukoliko u tom periodu ne nađu pogodnog domaćina, pretvaraju se u cistu (4). Ako kemotaksijom pronađu pogodnog domaćina (5) zoospore prelaze u oblik ciste (6), počinju klijati (7) i prodiru kroz kutikulu raka (8). Micelij se širi u unutrašnjosti domaćina (9) dok konačno ne dođe do smrti raka. Smrt domaćina

ujedno je i poticaj za ponovnu produkciju sporangija i izbacivanje zoospora (10). Preuzeto iz: Vrålstad, 2006.

Rakovi ne posjeduju imunoglobulin evec posjeduju druge vrste obrane od patogena: reakcije zgrušavanja hemolimfe i reakcije obrane organizma pomoću hemocita. Postoje tri vrste hemocita (hijalini, segmentirani i granulirani) koje stalno proizvodi hematopoetski organ. Hijalini i djelomično semigranulirani hemociti sudjeluju u staničnoj obrani organizma kroz fagocitozu i enkapsulaciju patogena koji su ušli u životinju. Semigranulirani hemociti okruže patogen te ga na taj način izoliraju pri čemu nastaju izolirane strukture koje su uvijek melanizirane (<http://rakovi.biol.pmf.unizg.hr/>).

Invazivne sjevernoameričke vrste rakova su, za razliku od zavičajnih vrsta, otporne na infekciju, jer pri kontaktu s patogenom dolazi do melanizacije hifa što znači da je patogen ograničen na kutikulu i ne može dalje prodirati u tkivo. To je rezultat aktivnosti sustava profenoloksidaze (eng. *prophenoloxidasesystem*, proPO). ProPO je enzim koji u svom aktivnom obliku katalizira oksidaciju fenola u melanin, odnosno dovodi do reakcije melanizacije. Kod američkih vrsta proPO sustav je stalno aktiviran što omogućuje bolju obranu od infekcije, dok europskim vrstama treba više vremena da se sustav aktivira. Važno je naglasiti da se i kod invazivnih rakova može razviti račja kuga ukoliko je imunost sustav jedinke oslabljen uslijed druge infekcije, stresa ili ako je jedinka ozlijeđena (Cerenius sur., 2003; Edsman i sur., 2015).



Slika 3. Riječni rak *A. astacus* s vanjskim simptomima račje kuge, melaniziranim mrljama (označeno crveno). (Foto: Pavić D.)

1.3.2. Širenje račje kuge u Europi i Hrvatskoj

Postoji nekoliko načina prijenosa patogena: 1) kontaktom među rakovima, 2) kontaminiranom vodom ili predmetima koji su bili u kontaminiranoj vodi (ribarska oprema, vrše, čizme, čamci), 3) putem životinja koje se hrane ili su bile u kontaktu sa zaraženim jedinkama. Na širenje *A. astaci* može utjecati i čovjek tijekom trgovanja i transporta ribe i rakova za koje se ne zna da su nositelji patogena. Nadalje, zaražene jedinke pokazuju znakove neobičnog ponašanja, kao što je dnevna aktivnost (većina rakova su noćne životinje) zbog čega postaju laki plijen predatorima koji ih mogu transportirati na nove lokacije i tako proširiti područje zaraze (Oidtmann i sur., 2002).

Račja kuga je u Europi prvi puta zabilježena 1860-tih godina u Italiji (rijeka Po), nakon čega se vrlo brzo proširila Francuskom i Njemačkom te dalje kontinentalnom Europom. U drugoj polovici 20. stoljeća zahvaća Španjolsku, Grčku, Tursku i na kraju Veliku Britaniju i Irsku. Glavni uzrok ovog prvog vala epidemije je čovjek, odnosno njegovo trgovanje rakovima (Alderman, 1996). Američke slatkovodne vrste rakova danas su prisutne po cijeloj Europi i omogućile su patogenu širenje slatkovodnim ekosustavima.

Tokom povijesti račja se kuga nekoliko puta spominjala kao uzrok pomora rakova na području Hrvatske. Tako je poznat prvi masovni pomor rakova koji je bio 1880. godine u rijeci Odri (Anonymous, 1901), a sljedeći je zabilježen 1960-tih godina (Plančić, 1973). Nakon drugog pomora nisu se provodila detaljna istraživanja sve do nedavno kada su Maguire i suradnici (2016) prvi puta proveli sustavno znanstveno istraživanje rasprostranjenosti patogena *A. astaci* u Hrvatskoj. Istraživanje je provedeno u razdoblju između 2003. i 2013. godine na 165 jedinki autohtonih i alohtonih rakova iz hrvatskih slatkovodnih ekosustava. Prisutnost patogena je utvrđena kod svih ispitivanih vrsta rakova, s tim da je učestalost detekcije patogena varirala ovisno o vrsti (najčešći kod vrste *A. astacus*, a najrjeđi kod *A. leptodactylus*). Iznenadujuće je bilo kad je patogen pronađen na jedinkama *A. pallipes* i *A. torrentium* u rijekama jadranskog sliva, jer je u prošlosti račja kuga zabilježena samo u kontinentalnoj Hrvatskoj. Što se tiče NP Plitvička jezera analizirano je 14 jedinki riječnog raka i 3 jedinke potočnog raka te je kod 10 jedinki riječnog raka utvrđen patogen unatoč tome što na tom području nema alohtonih vrsta rakova (Maguire i sur., 2016).

1.3.3. Genotipovi *A. astaci*

Sojeve patogena *A. astaci* može se prema genotipu svrstati u pet različitih grupa, A — E., Grupa A (As genotip) obuhvaća sojeve *A. astaci* koji su izolirani iz dvije europske vrste rakova, *A. astacus* i *A. leptodactylus*. Pretpostavlja se da je ovaj genotip povezan s prvim valom širenja bolesti koji je uzrokovao masovni pomor rakova u 19. stoljeću i da je od tada prisutan u Europi, a originalni domaćin mu je nepoznat (Huang i sur., 1994). Grupa B (PsI genotip) i grupa C (PsII genotip) uključuju sojeve koji su izolirani iz vrste *P. leniusculus* koja potječe iz jezera Tahoe i Hennessy u SAD – u (genotip PsI) i iz jezera Pitt u Kanadi (genotip PsII). Genotip PsII nije široko rasprostranjen (Söderhall i Cerenius, 1999), dok je genotip PsI uzrok većine infekcija u Europi (Royo i sur., 2004). U grupu D (genotip Pc) spadaju sojevi koji su izolirani iz vrste *Procambarus clarkii* koja je unesena u Španjolsku te je ovaj genotip prilagođen toplijim uvjetima staništa (20 – 26 °C) u odnosu na grupe A – C kojima odgovaraju niže temperature vode (4 – 21 °C) (Diéguez-Uribeondo i sur., 1995). Zadnja opisana grupa je grupa E (genotip Or) koja predstavlja sojeve izolirane iz vrste *Orconectes limosus* (Kozubíková i sur., 2011).

Ranije se soj patogena određivao metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNA (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (Kozubíková i sur., 2011). Međutim, ovaj način zahtijeva uzgoj patogena u čistoj kulturi, što je komplicirano i dugotrajno. Stoga su Grandjean i suradnici (2014) nedavno razvili metodu genotipizacije pomoću mikrosatelitnih biljega pomoću kojih se direktno iz zaraženog tkiva raka može odrediti o kojem se genotipu/soju *A. astaci* radi.

Genotipske grupe *A. astaci* razlikuju se u virulenciji. Tako PsI ima višu razinu virulencije od As genotipa, na koje je adaptiran imuni sustav zavičajnih rakova (Jussila i sur., 2015). Budući da je As genotip povezan s prvom pojavom račje kuge u Europi (Huang i sur., 1994), može se pretpostaviti da je niži stupanj virulencije rezultat više od stoljetne interakcije genotipa As s europskim slatkovodnim rakovima (Jussila i sur. 2015).

Intenzitet zaraze, osim o genotipu patogena, ovisi i o populaciji rakova koja će biti zaražena (Jussila i sur., 2013), temperaturi vode (Alderman i Polglase, 1988; Bielen, neobjavljeni rezultati) te o broju spora kojem je domaćin izložen (Makkonen i sur. 2014).

1.3.4. Metode detekcije uzročnika račje kuge

Račja kuga širi se velikom brzinom i uzrokuje masovne pomore zavičajnih vrsta rakova, kako u Europi tako i u Hrvatskoj. Primjenom metoda detekcije patogena može se

utvrditi stanje populacije što pomaže u razvoju različitih načina zaštite ugroženih zavičajnih vrsta rakova.

Tradicionalna i široko rasprostranjena metoda detekcije je invazivna i uključuje žrtvovanje rakova, odnosno izrezivanje komadića kutikule, izolaciju DNA iz uzetog uzorka te utvrđivanje eventualne prisutnosti patogena standardnom PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) (Oidtmann i sur., 2006) ili kvantitativnom PCR (eng. *quantitative PCR*, qPCR) metodom (Strand i sur., 2011; Tuffs i Oidtmann, 2011; Vrålstad i sur., 2009). Uspoređujući ove dvije metode, qPCR se smatra osjetljivijom jer može detektirati vrlo nisku razinu (jednu zoosporu) patogena *A. astaci*. Osim toga, qPCR daje informaciju o intenzitetu infekcije koji se klasificira od A0 (jedinka nije zaražena) do A7 (maksimalni intenzitet infekcije) (Tuffs i Oidtmann, 2011; Vrålstad i sur. 2009).

Unatoč tome što su ove metode pouzdane, njima se može ispitati prisutnost patogena na manjem broju jedinki jer zahtijevaju žrtvovanje rakova, što u slučaju zavičajnih vrsta otežava istraživanje jer su vrste zaštićene. Međutim, nedavno su Bielen i suradnici razvili novu neinvazivnu metodu detekcije patogena u kojoj se uzima bris kutikule živog raka (Ljubej, 2017). Bris sadrži mješovitu epibiontsku zajednicu koja uključuje i patogena *A. astaci*, ukoliko je prisutan na određenoj jedinki. U sljedećem se koraku iz brisa izolira DNA te se standardnim PCR ili qPCR testom provjerava prisutnost *A. astaci*. Ova se metoda može primijeniti na većem broju jedinki kao i na više lokacija budući da ne zahtjeva žrtvovanje jedinki ugroženih vrsta rakova.

1.4. Ciljevi diplomskog rada

Prisutnost bolesti račje kuge utvrđena je u velikom dijelu Hrvatske te se može pretpostaviti da je ona jedan od uzroka smanjenja populacija zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova (Maguire i sur., 2016). Nacionalni park Plitvička jezera najposjećeniji je NP u Hrvatskoj, mjesto velike bioraznolikosti i prirodnih fenomena. Nedavno je na njegovom području zabilježena prisutnost račje kuge, ali je analiziran mali broj jedinki (17) s malog broja lokacija unutar parka (Burgeti – *A. astacus* i Sartuk – *A. torrentium*) (Maguire i sur, 2016). Osim toga, u spomenutom istraživanju korištena je invazivna metoda detekcije patogena koja uključuje žrtvovanje rakova (Vrålstad i sur., 2009). Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio pratiti rasprostranjenost bolesti račje kuge u NP Plitvička jezera na većem broju lokacija (Burgeti, Prijeboj, Sartuk, Prštavci) i na većem broju jedinki (oko 100),

a da se pritom po prvi puta koristi novorazvijena neinvazivna metoda detekcije patogena *in situ*. Dobiveni podatci o učestalosti patogena doprinijet će izradi novih planova zaštite i očuvanja ugroženih vrsta rakova, kako u Hrvatskoj tako i u Europi.

2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

2.1. Nacionalni park Plitvička jezera

Plitvička jezera su najveći, najstariji (od 1949. godine) i najposjećeniji nacionalni park u Hrvatskoj, a od 1979. godine nalaze se na Listi svjetske kulturne i prirodne baštine UNESCO-a zbog iznimnih prirodnih ljepota (sedrene barijere) i velike raznolikosti flore i faune (www.np-plitvicka-jezera.hr). Smještena su između Male Kapele na zapadu i sjeverozapadu i Ličke Plješivice na jugoistoku te su dio Dinarskog krškog područja (Bočić, 2009). Poznata su po velikim količinama vode, bogatim šumama i krškoj hidrogeologiji (Mužinić i Filipović, 2005).

Najprepoznatljivija pojava Plitvičkih jezera je proces stvaranja sedre taloženjem kalcijeva karbonata odnosno kalcita na potopljenim podlogama. Sedru čine porozni vapnenci nastali na slapovima jezera i rijeka te na izvorima, a izlučuju se po potopljenom drveću, vodenom bilju, cijanobakterijama i mahovinama. Talloženjem sedre nastaju sedrene barijere (Slika 4) koje povezuju 16 jezera u NP Plitvička jezera. Preko sedrenih barijera voda se prelijeva iz višeg jezera u niže, a rastom barijera se podiže razina vode u pojedinom jezeru te nastaju slapovi (Bočić, 2009). Proces stvaranja sedre i rast sedrenih barijera odvija se u vodi prezasićenoj kalcijevim karbonatom, s pH vrijednošću većom od 8 i niskom koncentracijom organske tvari. Osim toga, postanku sedre pogoduje topla i vlažna klima. Pored navedenih abiotičkih čimbenika koji su neophodni za taloženje kalcijeva karbonata važna je i prisutnost vodenih mahovina, algi i mikroorganizama na barijerama. Kalcijev karbonat (kalcit) se zbog rasprskavanja vode na sedrenim barijerama i brzacima izlučuje u obliku kristalića. Tako nastali kristali lijepo se na mukopolisaharidnu tvar koju izlučuju alge i bakterije na mahovinama. Nastali zalijepljeni kristalići predstavljaju mjesta kristalizacije oko kojih će se nastaviti taložiti kalcijev karbonat iz vode i dovesti do stvaranja sedrenih barijera (<http://www.np-plitvicka-jezera.hr>) koje se mogu vidjeti na Slici 4.

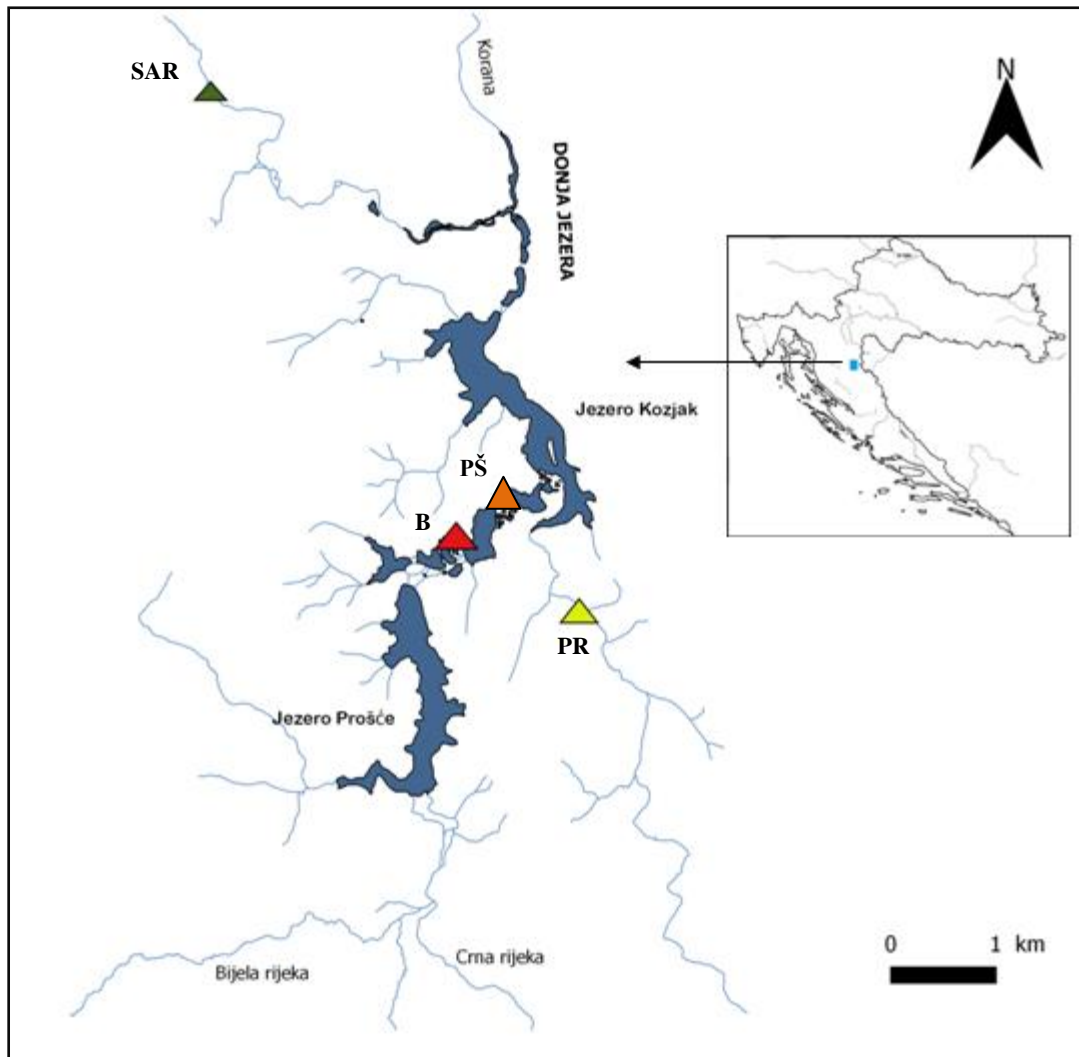


Slika 4. Sedrene barijere na slapovima u NP Plitvička jezera. (Foto: Pavić D.)

Od 16 jezera u NP, dvanaest ih pripada uzvodnim Gornjim jezerima od kojih su najveća jezera Kozjak i Prošće, a četiri nizvodnim Donjim jezerima. Jezera se pružaju od juga prema sjeveru (Slika 5). Prošćansko jezero je prvo u nizu iz kojeg se voda kaskadno prelijeva preko sedrenih barijera u niz Gornjih jezera, dok je jezero Kozjak posljednje. Gornja jezera su prostranija, razvedenijih i blaže nagnutih obala jer se nalaze u prostoru izgrađenom od dolomita. Suprotno tome, Donja jezera, koja se pružaju prema sjeveru, nalaze se u duboko usječenom kanjonu rijeke Korane koji je izgrađen od vapnenca. Stoga su obale ravne i strme, te su Donja jezera površinom manja od Gornjih. Plitvička jezera vodom prihranjuje voda Matice koja nastaje spajanjem tokova Crne i Bijele rijeke. Osim što se jezera opskrbljuju navedenim rijekama, mala količina vode dotječe i kratkim pritocima, a moguće i podzemnom vodom (Bočić, 2009). Kao što je ranije spomenuto, na području NP Plitvička jezera nalazi se izvor rijeke Korane koja je vrednovana kao međunarodno važno područje za divlje svojte i stanišne tipove u Ekološkoj mreži unutar granica NP (<http://www.np-plitvicka-jezera.hr>).

Što se tiče slatkovodnih ekosustava Plitvičkih jezera, ranija istraživanja pokazala su da je vodeni ekosustav relativno čist, a koncentracije pojedinih metala poput Zn, Cd, Pb, Cu i Hg nisu povišene (Vukosav i sur., 2014). Zabrinjavajuća može biti jedino eutrofikacija koja je posljedica unosa prirodnog organskog materijala (humusa) (Horvatinčić i sur., 2006; Mikac i sur., 2011). Zabilježena je na lokacijama na kojima je prisutna povećana koncentracija nitrata i amonijaka koji su tu dospjeli prirodnim putem (Horvatinčić i sur., 2006). Iako čovjek nije

njezin glavni uzrok, on je može ubrzati. Naime poznato je da u pojedina jezera u NP dopijevaju otpadne vode okolnih kućanstava i hotela što može potaknuti napredovanje eutrofikacije (Mikac i sur., 2011).



Slika 5. Nacionalni park Plitvička jezera i lokacije uzorkovanja. Sartuk - SAR, Burgeti - B, Prijeboj - PR, slap Prštavac – PŠ. Preuzeto iz Vukosav i sur. (2014) uz modifikacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Terensko sakupljanje rakova i uzimanje brisa kutikule

Uzorkovanje se provodilo na četiri različite lokacije na Plitvičkim jezerima (Burgeti, Prijeboj, Sartuk i Prštavci) kroz razdoblje od pet mjeseci: ožujak, travanj, lipanj, srpanj i rujan 2017 (Tablica 1). Rakovi su ulovljeni pomoću vrša za lov rakova (LiNi vrše) i pomoću ručno izrađenih vrša (izrađenih od PVC boca) (Maguire, 2010) (Slika 6). Vrše s mamcima ostavljene su preko noći u vodi te su vađene sljedeći dan. *Astacus astacus* i *A. torrentium* ciljano su uzorkovani na spomenutim lokacijama jer je prethodno utvrđeno da *A. astacus* dolazi na Burgetima i Prštavcima, a *A. torrentium* u Sartuku i Prijeboju (Maguire i sur., 2013).



Slika 6. LiNi vrša za hvatanje rakova (lijevo) i ručno izrađena vrša (desno). (Foto: Pavić D.)

Tablica 1. Lokacija i datum uzorkovanja te vrsta i broj analiziranih jedinki slatkovodnih rakova istraženih u ovom radu.

LOKACIJA	DATUM	VRSTA	BROJ
Burgeti	16.3.2017.	<i>Astacus astacus</i>	13
Burgeti	20.4.2017.	<i>Astacus astacus</i>	22

Burgeti	8.6.2017.	<i>Astacus astacus</i>	7
Burgeti	25.7.2017.	<i>Astacus astacus</i>	12
Burgeti	6.9.2017.	<i>Astacus astacus</i>	14
Prštavci	6.9.2017.	<i>Astacus astacus</i>	10
Prijeboj	16.3.2017.	<i>Austropotamobius torrentium</i>	11
Prijeboj	25.7.2017.	<i>Austropotamobius torrentium</i>	11
Sartuk	8.6.2017.	<i>Austropotamobius torrentium</i>	15
Ukupno			115

Rakovima je na terenu uzet bris kutikule koji sadrži ukupnu epibiontsku mikrobnu zajednicu (Ljubej, 2017). Životinja je stavljena u Petrijevu zdjelicu, polivena s 30 — 50mL sterilne otopine NaCl-Tween (0,1%NaCl i 0,15 M Tween 20) i temeljito istrljena sterilnom kompresom s dorzalne i ventralne strane (Slika 7). Potom je dobivena suspenzija s epibiontima vraćena u Falcon-epruvetu volumena 50mL zajedno s kompresom kojom je otrljan rak. Nakon obrade/trljanja svake životinje mijenjane su rukavice i sterilizirana je pinceta kojom je držana kompresa kako bi se spriječio prijenos materijala iz jednog uzorka u drugi. Uzorci su potom pohranjeni na led te transportirani u laboratorij na daljnju obradu, dok su rakovi vraćeni u svoje prirodno stanište. Rakovi za koje je postojala sumnja da su zaraženi račjom kugom zbog uočljivih melanizacija na kutikuli nisu vraćeni u prirodno stanište kako bi se smanjila vjerojatnost širenja bolesti u nacionalnom parku. Suspektni rakovi su žrtvovani i to tako da su prvo pothlađeni 5 – 10 minuta na ledu nakon čega im je prerezana trbušna živčana vrpca (Ljubej, 2017). Zatim su spremljeni u etanol i tako transportirani u laboratorij na daljnju obradu.



Slika 7. Trljanje rakova sterilnom kompresom. (Foto: Hudina S.)

Osim uzimanja briseva, svakom je raku izmjerena ukupna dužina tijela (od vrha rostruma do kraja telzona) i određen je spol.

3.2. Izolacija DNA

Prije izolacije DNA kompresa je ocijeđena i uklonjena, a suspenzija je centrifugirana pri 4 °C i 10000 x g / 15min (centrifuga Centric 200R, Domel, Slovenija). Supernatant je uklonjen, a dobiveni talog epibiontskih stanica smrznut na -20 °C.

DNA je izolirana iz dvije vrste uzoraka: taloga stanica epibionata dobivenih iz briseva (za sve rakove) i izrezanog komadića kutikule s melanizacijom (samo za žrtvovane suspektne rakove). Pretpostavka je da ukoliko je rak zaražen patogenom, obje će vrste uzoraka sadržavati DNA *A. astaci* (Ljubelj, 2017). Za izolaciju DNA korišten je standardni protokol kompleta NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka), uz određene modifikacije s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa DNA (Ljubelj, 2017). Talog stanica epibionata dobivenih iz briseva kutikula resuspendiran je u 100 µL pufera BE (iz Macherey Nagel NucleoSpin® Microbial DNA kompleta). Nakon toga je provedeno razbijanje stanica u trajanju od 12 min pri 30 Hz kuglicama tipa B (TissueLyser aparat, Qiagen, Njemačka). Kod izolacije DNA iz komadića kutikule tijekom razbijanja stanica u uzorak je dodano 5 sterilnih karbidnih kuglica promjera 3mm kako bi se razbila hitinska kutikula raka. Elucija DNA s kolonice rađena je tako da je na kolonicu naneseo 100 µL pufera BE nakon čega je

provedeno centrifugiranje pri 11,000 x g/30 s. Zatim je sakupljen eluat koji sadrži DNA te je kolonika još jednom isprana s istih 100 µL eluata čime je dobivena maksimalna koncentracija DNA. Paralelno s izolacijom DNA iz spomenutih uzoraka proveden je i postupak izolacije bez uzorka (tzv. negativna ekstrakcijska kontrola). Svrha negativne ekstrakcijske kontrole jest da se otkloni mogućnost da pozitivan rezultat PCR detekcije *A. astaci* potječe od kontaminacije prilikom postupka izolacije.

Kvaliteta i koncentracija izolirane DNA provjerena je elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu te spektrofotometrijski uređajem NanoDrop 2000c (ThermoScientific, SAD). DNA izolati pohranjeni su na -20 °C.

3.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu je metoda kojom se razdvajaju fragmenti DNA i koja omogućuje određivanje njihove kvalitete i koncentracije. Zasniva se na različitoj pokretljivosti fragmenata u električnom polju ovisno o njihovoj molekularnoj masi što znači da se kraći DNA fragmenti kreću brže od dužih. Osim veličine, na pokretljivost DNA utječe i koncentracija agaroze u gelu, sastav pufera za elektroforezu, jačina napona te konformacija molekule (Lee i sur., 2012).

U ovom radu korišten je 1%-tni agarozni gel pripremljen s 80 mL pufera TAE (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1mM EDTA) kojemu je dodano 5 µL boje za vizualizaciju DNA [GelStar™ NucleicAcid Gel Stain 10,000X (Lonza, Švicarska)]. Nakon što se otopina agaroze ohladila na oko 60 °C izlivena je u kadicu za elektroforezu. Prije elektroforeze uzorci DNA pomiješani su s bojom za nanošenje uzoraka (MassRuler DNA Loading Dye 6x, Thermo Fisher Scientific, SAD). Ona služi za povećanje gustoće uzoraka, kako bi oni pali na dno jažice i, s obzirom da se DNA molekule ne vide tijekom elektroforeze, bojilo također omogućuje praćenje elektroforeze (putuje prema anodi ispred DNA molekule). Elektroforeza je provedena pri naponu od 100 V u puferu 1xTAE kroz 30 minuta na aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo scientific, SAD). Za provjeru veličine dobivenog fragmenta korišten je molekularni marker DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder (Sigma-Aldrich, SAD). Elektroforezom u agaroznom gelu analizirani su uzorci metagenomske DNA kao i DNA fragmenti dobiveni PCR-om.

3.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i kvalitete uzoraka DNA

Rezultati izolacije DNA, osim što su analizirani elektroforezom (Poglavlje 3.3.), analizirani su i uređajem NanoDrop 2000c (ThermoFisherScientific, SAD). Čistoća izolirane DNA utvrđena je omjerima apsorpcija 260/280 i 260/230 (Wilfinger i sur., 1997).

3.5. PCR-test za detekciju uzročnika račje kuge *A. astaci*

Metodom lančane reakcije polimerazom može se utvrditi prisutnost patogena *A. astaci* u uzorcima DNA. PCR je *in vitro* metoda kojom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Tri su osnovna koraka svakog PCR protokola: denaturacija DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica (eng. *primer*) na komplementarne segmente DNA te sinteza komplementarnog lanca DNA. U ovom je radu PCR korišten za detekciju uzročnika račje kuge u sakupljenim uzorcima, slijedeći ranije opisane postupke (Oidtmann i sur., 2006; Ljubej, 2017).

Ciljani dio DNA molekule koji se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim početnicama, koje su komplementarne krajevima DNA od interesa. U ovom slučaju u PCR reakciji su korištene dvije specifične početnice: uzvodna (eng. *forward*) početnica 42 i nizvodna (eng. *reverse*) početnica 640 koje umnažaju ITS (eng. *Internal Transcribed Spacer*) regiju 5.8 rRNA gena patogena *A. astaci* (Oidtmann i sur., 2006). Sastav reakcijske smjese za PCR naveden je u Tablici 2.

Početna denaturacija trajala je 5 min pri 96 °C, zatim je slijedilo 35 ciklusa od 1 min pri 96°C (denaturacija), 1 min pri 61 °C (sparivanje početnica), 1 min pri 72 °C (produljivanje lanaca) te 5 min pri 72 °C (završno produljivanje lanaca). Uspješnost PCR reakcije, odnosno umnažanje ITS fragmenta dužine 569 parova baza (pb), provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu. Kao pozitivna kontrola u PCR reakciji korištena je DNA *A. astaci*, a destilirana voda je umjesto DNA kalupa dodana u PCR smjesu i činila negativnu kontrolu. Ukoliko je dobiven fragment očekivane dužine (569pb), to je značilo da je detektirano prisustvo DNA *A. astaci* na određenoj jedinki raka.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za PCR-detekciju *A. astaci*.

• DNA kalup (genomska DNA <i>A. astaci</i> ili metagenomska DNA iz brisa/kutikule, različite količine)	1-4 μ L
• 2X EmeraldAmp MAX PCR MasterMix (TAKARA, Japan)	12,5 μ L
• 10 μ M uzvodna početnica 42 (konačna koncentracija 0,5 μ M)	1,25 μ L
• 10 μ M nizvodna početnica 640 (konačna koncentracija 0,5 μ M)	1,25 μ L
• deionizirana voda	9 μ L
Ukupno	25 μ L

3.6. Analiza intenziteta infekcije i genotipa patogena

Radi dodatne analize intenziteta infekcije i genotipa patogena uzorci u kojima je PCR-om detektiran patogen poslani su u laboratorij Prof. Frederica Grandjeana (Université de Poitiers, Francuska). Tamo je qPCR metodom (Vrålstad i sur., 2009) procijenjena količina DNA *A. astaci* u uzorcima te je ona klasificirana u kategorije A0 do A7 (A0 – DNA *A. astaci* se ne može detektirati do A7 – najveća količina DNA patogena u uzorku). Osim toga, u uzorcima u kojima je intenzitet infekcije bio A4 ili veći, bilo je moguće utvrditi genotip *A. astaci* analizom mikrosatelitnih biljega (Grandjean i sur., 2014).

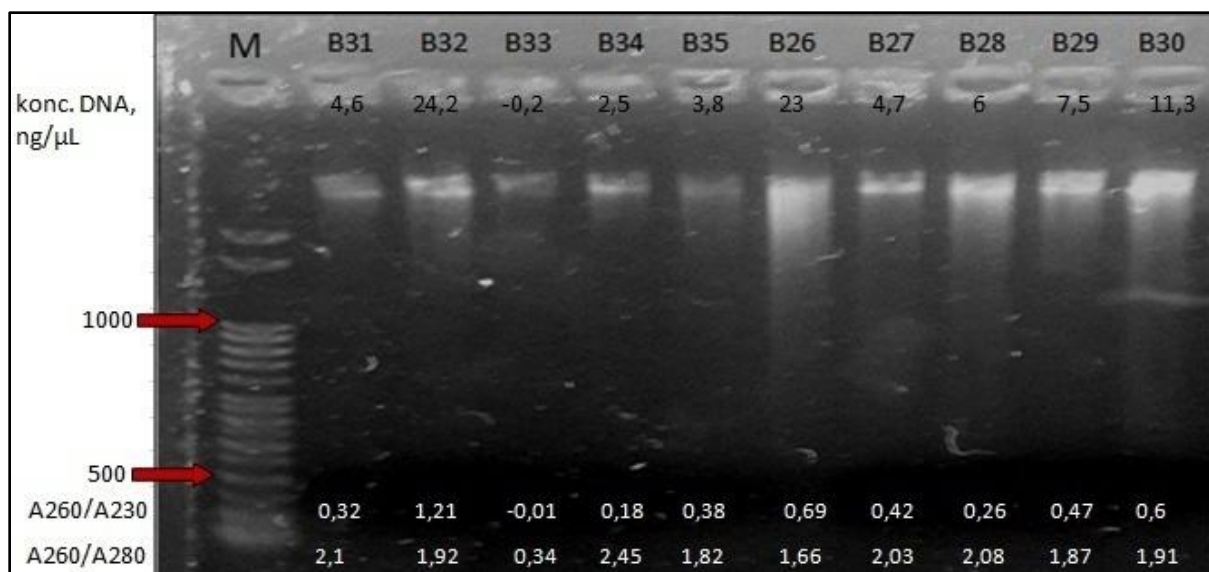
4. REZULTATI

Praćenje pojavnosti uzročnika račje kuge provedeno je na četiri lokacije u Nacionalnom parku Plitvička jezera. Detekcija patogena *A. astaci* provedena je na ukupno 115 rakova, od toga 68 (59%) iz Burgeta (B1–B68), 22 (19 %) iz potoka Prijeboj (PR1–PR22), 15 (13 %) iz potoka Sartuk (SAR1 – SAR15) i 10 (9 %) s Prštavaca (PŠ1–PŠ10). Na lokacijama Burgeti i Prštavci uhvaćeni su riječni rakovi *A. astacus* (78 od 115 jedinki, 68%), a na lokacijama Prijeboj i Sartuk potočni rakovi *A. torrentium* (37 od 115 jedinki, 32%). Svakoj je jedinki određena ukupna dužina i spol te su zabilježeni eventualno prisutni vanjski znakovi bolesti (Tablica 3 i Prilog 1). Na svim su lokacijama među uhvaćenim jedinkama prevladavali su mužjaci a jedinke riječnog raka bile su prosječno duže od jedinki potočnog raka.

Tablica 3. Vrsta, lokacija, broj ulovljenih mužjaka i ženki te srednje vrijednosti njihovih ukupnih dužina – TL (mm). B – Burgeti, PR – Prijeboj, SAR – Sartuk, PŠ – Prštavci.

Vrsta	Lokacija	Broj mužjaka	Prosječna TL mužjaka / mm	Broj ženki	Prosječna TL ženki / mm
<i>A. astacus</i>	B	62	99,65	6	85,33
	PŠ	8	101,51	2	98
<i>A. torrentium</i>	PR	19	83,82	3	83,89
	SAR	12	74,29	3	71,40

Bris kutikule uzet je s površine svake jedinke (115), jedino je suspektnim rakovima (9) uzet, uz bris, i komadić kutikule (ukupno 124 uzorka). DNA je izolirana iz obje vrste uzoraka, čija je kvaliteta provjerena elektroforezom i spektrofotometrijski, prema vrijednostima omjera apsorpcija 260/280 i 260/230. Vrijednosti omjera apsorpcija 260/280 i 260/230 uzoraka nisu uvijek bile u skladu s očekivanim za kvalitetne DNA (Slika 8).



Slika 8. Primjer elektroforeze metagenomske DNA i omjera apsorpcija A260/A280 i A260/A230, izolirane iz brisa kutikule rakova. Očekivane vrijednosti apsorpcija za čistu DNA su 1,8 za 260/280 i 2,0-2,2 za omjer 260/230. M – molekularni marker DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder. Na gel je nanoseno po 8 μL uzoraka DNA iz brisa jedinki B31, B32, B33, B34, B35, B26, B27, B28, B29, B30.

PCR-test za detekciju uzročnika račje kuge proveden je za sve sakupljene uzorke (Oidtmann i sur., 2006), a na Slici 9 prikazani su rezultati PCR-testa za odabrane uzorke. Dobiveni rezultati pokazali su da je patogen bio prisutan kod 9 ispitivanih jedinki vrste *A. astacus* (Tablica 4 i Prilog 1). Pojedini su uzorci analizirani i qPCR-om (Vrålstad i sur., 2009) te je procijenjena količina DNA *A. astaci* u uzorku (Tablica 4). Nadalje, analizom dužine odabranih mikrosatelitnih biljega (Grandjean i sur., 2014) za uzorak B24 bilo je moguće odrediti da pripada genotipu A patogena *A. astaci*, budući da je qPCR-om potvrđeno da je količina DNA patogena u uzorku bila klasificirana kao A4 ili više (Tablica 4). Od 9 jedinki koje su pokazale pozitivan signal na *A. astaci*, 8 je uhvaćeno na lokaciji Burgeti (8 od 68 jedinki s te lokacije, 12 %), a jedna je uhvaćena na lokaciji Prštavci (1 od 10 jedinki s te lokacije, 10 %) (Tablica 5). Na preostalim lokacijama (Prijeboj i Sartuk) nije zabilježena prisutnost patogena (Tablica 5).

Tablica 4. Jedinke na kojima je potvrđena prisutnost patogena *A. astaci*. B – DNA iz brisa, K – DNA iz kutikule, N.T. – nije testirano, + označuje pozitivan rezultat PCR-testa, a - negativan

Oznaka	Vrsta	Lokacija	PCR	qPCR	Soj (genotip)
B5	<i>A. astacus</i>	Burgeti	-(B), +(K)	A0(B), A3(K)	N.T.
B9	<i>A. astacus</i>	Burgeti	+(B)	N.T.	N.T.
B10	<i>A. astacus</i>	Burgeti	-(B), +(K)	A1(B), A3(K)	N.T.
B21	<i>A. astacus</i>	Burgeti	+(B)	N.T.	N.T.
B24	<i>A. astacus</i>	Burgeti	+(B), +(K)	A4(B), A5(K)	A(B), A(K)
B37	<i>A. astacus</i>	Burgeti	+(B)	N.T.	N.T.
B60	<i>A. astacus</i>	Burgeti	+(B)	N.T.	N.T.
B67	<i>A. astacus</i>	Burgeti	+(B)	N.T.	N.T.
PŠ1	<i>A. astacus</i>	Slap Prštavac	+(B)	N.T.	N.T.



Slika 9. Primjer rezultata PCR-testa za detekciju patogena *A. astaci* korištenjem DNA izolirane iz brisa rakova kao kalupa (neinvazivna metoda). B – Burgeti, SAR –Sartuk. M – molekularni marker DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder, + - pozitivna kontrola (genomska DNA patogena *A. astaci*), - - negativna kontrola. Na gel je nanoseno po 5 µL PCR produkata.

Tablica 5. Broj zaraženih i uzorkovanih jedinki po lokaciji.

Lokacija	Broj zaraženih/broj uzorkovanih
Burgeti (B)	8/68
Prijeboj (PR)	0/22
Sartuk (SAR)	0/15
Prštavci (PŠ)	1/10
Ukupno	9/115

5. RASPRAVA

U posljednjih se 100 godina brojnost zavičajnih vrsta rakova u Europi i Hrvatskoj drastično smanjila zbog različitih negativnih antropogenih utjecaja (Holdich i sur., 2009; Maguire i sur., 2011; Maguire i sur., 2018). Invazivne sjevernoameričke vrste rakova i s njima povezano širenje bolesti račje kuge jedan su od glavnih razloga ugroženosti zavičajnih populacija rakova diljem Europe, pa tako i na području NP Plitvička jezera (Holdich i sur., 2009; Maguire i sur., 2016). U NP Plitvička jezera do sada nije zabilježena pojava invazivnih vrsta rakova, ali je nedavno zabilježena prisutnost uzročnika račje kuge *A. astaci* soja A na manjem broju jedinki vrste *A. astacus* (Maguire i sur., 2016). Stoga je bilo od iznimne važnosti provesti opsežnije praćenje pojavnosti patogena *A. astaci* na području Parka, što je i bio cilj ovog diplomskog rada. Uz to je po prvi puta primjenjena novorazvijena metoda detekcije patogena *in situ*.

Jedan od glavnih simptoma račje kuge je pojava tamnih mrlja (melanizacija) na oklopu rakova (Slika 3). Međutim, melanizacije se mogu pojaviti i zbog drugih uzroka (mehaničke ozljede, druge vrste patogena) pa ne predstavljaju siguran znak bolesti (OIE, 2016). Stoga je za pouzdanu detekciju i identifikaciju patogena (i njegovog soja) potrebno provesti molekularne analize bazirane na PCR-u i qPCR-u (Grandjean i sur., 2014; Oidtmann i sur., 2006; Tuffs i Oidtmann, 2011; Vrålstad i sur., 2009). Sve ove metode počinju izolacijom DNA, a za uspješnost daljnjih koraka bitno je da je količina i kvaliteta izolirane DNA zadovoljavajuća. U ovom radu je za većinu uzoraka izolirana DNA u dovoljnoj koncentraciji za uspješno provođenje PCR reakcije. Iz pojedinih je uzoraka (16/76-Burgeti, 4/23-Prijeboj, 1/10-Prštavci, 11/15-Sartuk) izolirana je DNA u niskoj koncentraciji ($< 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$), što znači da negativan rezultat PCR testa nije pouzdan znak odsutnosti patogena u uzorku odnosno da postoji mogućnost lažno negativnih rezultata. Moguće je da jedinke nisu dovoljno dobro istrljane kompresom i time nije sakupljeno dovoljno materijala za izolaciju DNA. Stoga treba naglasiti važnost detaljnog uzimanja brisa s površine raka kako bi se sakupila što veća količina biomase. Nadalje, rezultati ukazuju na prisutnost kontaminanata u većini uzoraka DNA. Izolirana DNA smatra se čistom ako vrijednost omjera apsorpcije 260/280 iznosi $\approx 1,8$, dok omjer 260/230 treba biti između 2,0 i 2,2 (Wilfinger i sur., 1997). Međutim u nekim je uzorcima omjer apsorpcija 260/280 bio niži od 1,8 što ukazuje na mogućnost kontaminacije proteinima koji imaju maksimalnu apsorpciju pri 280 nm (<https://www.qiagen.com/hr/>). Kod nekih je drugih uzoraka vrijednost apsorpcija 260/280 veća od 2,0 što ukazuje na prisutnost RNA u uzorku. Druga mjera čistoće DNA je omjer 260/230 koji je za većinu uzoraka bio

dosta niži od očekivane vrijednosti, što može ukazati na onečišćenost uzorka gvanidinom porijeklom iz plastike korištene tokom izolacije DNA. Ovo je u skladu s qPCR rezultatima koji su ukazali na prisutnost inhibitora u uzorcima budući da je kod uzoraka uspješna amplifikacija dobivena tek kada je uzorak razrijeđen 10 puta (podaci nisu prikazani). Izolirana DNA, osobito iz okolišnih uzoraka, često sadrži kontaminante koji mogu inhibirati qPCR ako su prisutni u prevelikoj koncentraciji (Vrålstad i sur., 2009; Strand i sur., 2011) te se zbog toga danas sve češće koristi *DropletDigital* PCR (ddPCR). Ova je metoda veće osjetljivosti od qPCR, preciznije kvantifikacije i rezistentna na prisutnost inhibitora (Attali i sur., 2016; Doi i sur., 2015; Singh i sur., 2017) pa bi bilo poželjno da se u budućim istraživanjima razvije ddPCR test za detekciju patogena *A. astaci*.

Zbog ugroženosti zavičajnih vrsta u ovom je radu za monitoring korištena nedavno razvijena neinvazivna metoda detekcije patogena koja, za razliku od dosadašnjih metoda ne uključuje žrtvovanje rakova te je tako minimizirano izuzimanje rakova iz prirodnih staništa (Ljubej, 2017). Ovo je prvi put da je metoda korištena *in situ*. Radi se o metodi koja je još u fazi razvoja (publikacija u pripremi) te je za devet suspektnih rakova uspoređena učinkovitost detekcije *A. astaci* iz briseva (neinvazivna metoda) i iz kutikule (invazivna metoda) koristeći PCR i qPCR (Oidtmann i sur., 2006; Vrålstad i sur., 2009). Prema dobivenim rezultatima invazivna i neinvazivna metoda pokazale su podudaranje od 78% (7 od 9 parova uzoraka) (Tablica 4). Za preostala dva para uzoraka (jedinke B5 i B10) rezultati dobiveni iz brisa i kutikule nisu se podudarali. Uzrok tomu može biti nedovoljna količina izolirane DNA koja može rezultirati lažno negativnim rezultatom. Tako je za uzorke B5 i B10 DNA koja je izolirana iz kutikule bila veće kvantitete i kvalitete od DNA izolirane iz brisa. Može se zaključiti da metoda izolacije nije jednako djelotvorna za oba tipa uzorka ili da sterilnom kompresom nije sakupljeno dovoljno staničnog materijala s površine raka. U budućim bi istraživanjima trebalo dodatno optimirati postupak izolacije DNA iz brisa kako bi se izbjegli lažno negativni rezultati.

Nadalje, na području NP Plitvička jezera utvrđeno je prisustvo *A. astaci* soja A (*A. astacus* B24 s lokacije Burgeti, u ovom istraživanju; dvije jedinke vrste *A. astacus* s lokacije Burgeti u istraživanju Maguire i sur., 2016). Prilikom zaražavanja zdravih jedinki u laboratorijskim uvjetima uočen je različit stupanj virulencije različitih sojeva, odnosno genotipskih grupa *A. astaci* (Jussila i sur., 2013; Jussila i sur., 2015; Makkonen i sur., 2014). Tako je soj B (PsI genotip) pokazao višu razinu virulencije prema riječnom raku u odnosu na soj A (As genotip). Izlaganjem zavičajnih (*A. astacus*) vrsta 1 - 100 zoospora soja B / mL,

smrt je nastupila nakon 6 - 13 dana. Međutim, kada su rakovi zaraženi s istom koncentracijom zoospora soja A preživjeli su duži period (28 - 50 dana) ili čak izbjegli razvoj bolesti račje kuge (Makkonen i sur., 2014). Stoga se smatra da su zavičajne vrste rakova do određene mjere otporne na soj A. Pretpostavlja se da je tomu uzrok adaptacija imunog sustava domaćina ili dugi boravak soja A na području Europe (Jussila i sur., 2015; Maguire i sur., 2016). Dodatni dokaz za to je da se diljem Europe mogu naći populacije zavičajnih rakova koje su kronično zaražene sojem A ali vijabilne, poput populacije *A. astacus* na lokaciji Burgeti koja je proučavana u ovom radu (Jussila i sur., 2011; Maguire i sur., 2016; Viljamaa-Dirks i sur., 2011). Nadalje, kako kod Maguire i suradnika (2016) tako i u ovom istraživanju, soj se mogao odrediti samo za one uzorke koji su imali dovoljnu količinu DNA patogena (nivo infekcije A4 i više). Može se pretpostaviti da i ostali uzorci, kojima se u ovom radu nije mogao odrediti soj, pripadaju soju A. Tome u prilog ide i činjenica da u NP Plitvička jezera do danas nisu utvrđene invazivne vrste rakova (npr. *P. leniusculus*) koje bi potencijalno mogle unijeti druge, puno letalnije sojeve u jezerski sustav (Jussila i sur., 2015; Makkonen i sur., 2014).

Prijenosnik soja B (PsI genotip) je signalni rak (Huang i sur., 1994) koji je u Hrvatskoj zastupljen u miješanim populacijama *A. leptodactylus* i *P. leniusculus* (Maguire i sur., 2016). To je invazivna strana vrsta raka koja je prisutna nizvodno od NP u rijeci Korani. Predstavlja opasnost za zavičajne vrste rakova kako zbog velikog potencijala za istiskivanje zavičajnih rakova kroz kompeticiju, tako i zbog prenošenja račje kuge (Hudina i sur., 2009, 2017; Maguire i sur., 2016). Nadalje, pokazano je da se osjetljivost signalnih rakova na soj B može povećati kad su rakovi pod stresom (Jussila i sur., 2015). Poznato je da invazivne vrste rakova otpuštaju malu količinu spora tijekom kronične infekcije račjom kugom, ali u slučaju pada fitnesa domaćina može doći do masovne sporulacije i posljedično do još uspješnijeg i bržeg širenja soja B u slatkovodnim ekosustavima Europe (Jussila i sur., 2015; Strand i sur., 2012).

Iako su dosadašnja istraživanja pokazala da na području NP Plitvička jezera nema invazivnih sjevernoameričkih vrsta rakova (Maguire i sur., 2013, 2016) što je potvrđeno i u ovom radu, ipak postoji opasnost da bi se signalni rak s vremenom mogao proširiti uzvodno kroz Koranu (Hudina i sur., 2017) i tako ugroziti autohtonu astakofaunu Plitvičkih jezera. Prirodno se širi izuzetno velikom brzinom, kako je zabilježeno u radu Hudina i suradnici (2009), gdje je njegova nizvodna brzina širenja Murom procijenjena na 18-24,4 km godišnje, što je ujedno i najveća brzina zabilježena u Europi. Trenutna brzina širenja Koranom je 2,23 km godišnje uzvodno i 2,84 km godišnje nizvodno (Hudina i sur., 2017). Danas je signalni

rak rasprostranjen na području od 25 km donjeg toka rijeke Korane, a kako bi došao do Plitvičkih jezera trebao bi prijeći još oko 98 km riječnog toka (Hudina i sur., 2017). U rijeci Korani je prvi puta zabilježen 2012., gdje je ilegalno unesen te je u posljednjih pet godina proširio areal i istisnuo populacije *A. leptodactylus* (Hudina i sur. 2017; Maguire i sur., 2018). Velika je vjerojatnost da će se isto dogoditi i vrstama *A. astacus* i *A. torrentium* ako se ne poduzmu određene mjere kako bi se *P. leniusculus* uklonio i kako bi se spriječilo njegovo daljnje širenje (Maguire i sur., 2018). Osim prirodnog širenja, postoji velika opasnost od ilegalnog prijenosa, koji predstavlja najčešći način širenja njegovog areala (Bohman i sur., 2011; Hudina i sur., 2009, 2013, 2017). Ilegalni se prijenos može smanjiti jedino kontinuiranom edukacijom stanovništva i podizanjem svijesti o opasnostima koje uzrokuju invazivne vrste te o važnosti zavičajnih vrsta za ekosustav (Maguire i sur., 2018).

Zaključno, ovim je radom potvrđena prisutnost patogena *A. astaci* soja A na lokaciji Burgeti te njegov izostanak s vrste *A. torrentium* te je po prvi puta primijenjena nedavno razvijena neinvazivna metoda detekcije patogena za *in situ* monitoring pojavnosti bolesti. Budući da postoji opravdana prijetnja ulaska signalnog raka i soja B u NP, potrebno je nastaviti s redovitim monitoringom populacija zavičajnih rakova na različitim lokacijama unutar parka. Pri tome se preporučuje korištenje neinvazivne metode detekcije patogena *A. astaci* (Ljubej, 2017) koja omogućuje monitoring račje kuge bez nepotrebnog žrtvovanja autohtonih vrsta slatkovodnih rakova.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Zahvaljujući korištenju neinvazivne metode detekcije patogena *A. astaci* uzorkovano je 115 jedinki na četiri različite lokacije unutar Parka bez nepotrebnog žrtvovanja rakova.
- Potvrđena je prisutnost patogena *A. astaci* soja A u Nacionalnom parku Plitvička jezera kod 9 od 78 jedinki vrste *A. astacus* na lokacijama Burgeti i Prštavci.
- Analizirane jedinke *A. torrentium* nisu bile zaražene.
- Usporedbom rezultata detekcije patogena klasičnom invazivnom i novorazvijenom neinvazivnom metodom dobiveno je podudaranje kod 7 od 9 parova uzoraka (78 %). Za preostala dva para uzoraka ne podudaranje se može pripisati nedovoljnoj kvantiteti i kvaliteti izolirane DNA iz brisa te se može zaključiti da je potrebna dodatna optimizacija metode izolacije DNA iz brisa rakova.

7. LITERATURA

Alderman D. J., Polglase J. L. (1988): Pathogens, parasites and commensals. U: Holdich D. M., Lowery R. S. (ur.) Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation. London, Croom Helm, str. 167-212.

Alderman D. J. (1996): Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue scientifique et technique* **15**: 603-632.

Anonymous (1901): Nješto o racima. *Lovačko Ribarski Viestnik* **10**: 109-111.

Attali D., Bidshahri R., Haynes C., Bryan J. (2016): ddpcr: an R package and web application for analysis of droplet digital PCR data. *F1000Research*, **5**: 1411.

Becking T., Mrugala A., Delaunay C., Svoboda J., Raimond M., Viljamaa-Dirks S., Petrussek A., Grandjean F., Braquart-Varnier C. (2015): Effect of experimental exposure to differently virulent *Aphanomyces astaci* strains on the immune response of the noble crayfish *Astacus astacus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**: 115-124.

Bočić N. (2009): Plitvička jezera - tamo gdje voda prkosi kršu. *Geografija.hr*. <http://www.geografija.hr/hrvatska/plitvicka-jezera-tamo-gdje-voda-prkosi-krsu/>

Bohman P., Degerman E., Edsman L., Sers B. (2011): Exponential increase of signal crayfish in running waters in Sweden – due to illegal introductions. *Knowledge and management of aquatic ecosystems* **401**: 23.

Cerenius L., Söderhäll K. (1984): Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* **8**: 370-377.

Cerenius L., Bangyeekhun E., Keyser P., Söderhäll I., Söderhäll K. (2003): Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology* **5**: 353-357.

Diéguez-Uribeondo J., Huang T. S., Cerenius L. (1995): Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research* **99(5)**: 574-578.

Doi H., Takahara T., Minamoto T., Matsushashi S., Uchii K., Yamanka H. (2015): Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of

environmental DNA from an invasive fish species. *Environment Science & Tehnology*. **49(9)**: 5601-5608.

Edsman L., Nyström P., Sandström A., Stenberg M., Kokko H., Tiitinen V. (2015): Eroded swimmeret syndrome in female crayfish *Pacifastacus leniusculus* associated with *Aphanomyces astaci* and *Fusarium* spp. infections. *Diseases of Aquatic Organisms* **112**: 219-228.

Grandjean F., Vrålstad T., Diéguez-Uribeondo J. (2014): Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Veterinary Microbiology* **170**: 317-324.

Holdich D. M. (2002): Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin francais de la peche et de la pisciculture* **367**: 611-650.

Holdich D. M., Reynolds J. D., Souty-Grosset C., Sibley P. J. (2009): A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **11**: 394-395.

Horvatinčić N., Briansó J. L., Obelić B., Barešić J., Bronić I. K. (2006): Study of pollution of the Plitvice Lakes by water and sediment analyses. *Water, Air and Soil Pollution* **6**: 475-485.

Huang T. S., Cerenius L., Söderhäll K. (1994): Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* **126**: 1-10.

Hudina S., Faller M., Lucić A., Klobučar G., Maguire I. (2009): Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava River basin, Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **9**: 394-395.

Hudina S., Žganec K., Lucić A., Trgovčić K., Maguire I. (2013): Recent invasion of the karstic river system in Croatia through illegal introductions of the signal crayfish. *Freshwater Crayfish* **19(1)**: 21-27.

Hudina S., Kutleša P., Trgovčević K., Duplić A. (2017): Dynamics of range expansion of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region in Croatia. *Aquatic Invasions* **12**: 67–75.

- Jussila J., Makkonen J., Vainikka A., Kortet R., Kokko H. (2011): Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture* **321**: 17-20.
- Jussila J., Kokko H., Kortet H., Makkonen J. (2013): *Aphanomyces astaci* PsI-genotype isolates from different Finnish signal crayfish stocks show variation in their virulence but still kill fast. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **411**: 10.
- Jussila J., Vrezec A., Makkonen J., Kortet R., Kokko H. (2015): Invasive crayfish and their invasive diseases in Europe with the focus on the virulence evolution of the crayfish plague. U: Canning-Clode J. (ur.) *Biological invasions in changing ecosystems. Vectors, Ecological Impacts, Management and Predictions*. Warsaw/Berlin, De Gruyter Ltd, str. 183-211.
- Kozubíková E., Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S., Petrusek A. (2011): Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**: 214-216.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* **62**.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000): 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. http://www.issg.org/pdf/publications/worst_100/english_100_worst.pdf.
- Ljubej L. (2017): Razvoj neinvazivne metode detekcije uzročnika račje kuge, *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Maguire I., Gottstein-Matočec S. (2004): The Distribution Pattern of Freshwater Crayfish in Croatia. *Crustaceana* **77**: 25-47.
- Maguire I., Klobučar G., Marčić Z., Zanella D. (2008): The first record of *Pacifastacus leniusculus* in Croatia. *Crustaceana* **77**: 25-49.
- Maguire I. (2010): Slatkovodni rakovi – priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja. DZZP. Zagreb.
- Maguire I., Jelić M., Klobučar G. (2011): Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **401**: 31.

Maguire I., Špoljaric I., Klobučar G. (2013): The indigenous crayfish of Plitvice Lakes National Park, Croatia. *Freshwater Crayfish* **19(1)**: 91–96.

Maguire I., Jelić M., Klobučar G., Delpy M., Delaunay C., Grandjean F. (2016): Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Diseases of Aquatic Organisms* **118**: 45-53.

Maguire I., Klobučar G., Žganec K., Jelić M., Lucić A., Hudina S. (2018): Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia – threats and perspectives. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **419**: 2.

Makkonen J., Kokko H., Vainikka A., Kortet R., Jussila J. (2014): Dose-dependant mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). *Journal of Invertebrate Pathology* **115**: 86-91.

Mikac I., Fiket Ž., Terzić S., Barešić J., Mikac N., Ahel M. (2011): Chemical indicators of anthropogenic impacts in sediments of the pristine karst lakes. *Chemosphere* **84(8)**: 1140–1149.

Mužinić J., Filipović M. (2005): The Plitvice Lakes: world's natural heritage. *Croatian Medical Journal* **47(1)**: 1-3.

Nacionalni park Plitvička jezera. <https://np-plitvicka-jezera.hr/>.

Oidtmann B., Heitz E., Rogers D., Hoffmann R. W. (2002): Transmission of crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* **52**: 159-167.

Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W. (2006): Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* **72**: 53-64.

OIE. (2016): Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*.

Plančić J. (1973): Rakovi u našim slatkim vodama. U: Livojević Z. (ur.) *Izbor naučnih i stručnih radova*. Zagreb, Institut za slatkovodno ribarstvo, str. 133-143.

Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine br. 144/13)

Qiagen. <https://www.qiagen.com/hr/>.

Rakovi. <http://rakovi.biol.pmf.unizg.hr/rakovi/index.htm>.

Reynolds J., Souty-Grosset C. (2012): Management of freshwater biodiversity: crayfish as bioindicators. University Press, Cambridge, str. 374.

Royo F., Andersson G., Bangyeekhun E., Muzquiz J. L., Söderhäll K., Cerenius L. (2004): Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. *Veterinary Microbiology* **104**: 103-112.

Samardžić M., Lucić A., Maguire I., Hudina S. (2014): The first record of marbled crayfish (*Procambarus fallax* [Hagen, 1870] *f. virginalis*) in Croatia. *Crayfish News* **36**: 4.

Singh G., Sithebe A., Enitan A. M., Kumari S., Bux F., Stenström T. A. (2017): Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection of *Salmonella* and its application for river sediments. *Journal of Water and Health* **15(4)**: 505-508.

Söderhäll K., Cerenius L. (1999): The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshwater Crayfish* **12**: 11-35.

Strand D. A., Holst-Jensen A., Viljugrein H., Edvardsen B., Klaveness D., Jussila J., Vrålstad T. (2011): Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Diseases of Aquatic Organisms* **95**: 9-17.

Strand D. A., Jussila J., Viljamaa-Dirks S., Kokko H., Makkonen J., Holst-Jensen A., Viljugrein H., Vrålstad T. (2012): Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Veterinary Microbiology* **160**: 99-107.

Tuffs S., Oidtmann B. (2011): A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* **153**: 343-353.

Unestam T., Weiss D. W. (1970): The host-parasite Relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *Journal of General Microbiology* **60**: 77-90.

Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S., Nieminen M., Vennerström P., Pelkonen S. (2011): Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population - a case report. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists* **31(5)**: 182-188.

Vrålstad T., Håstein T., Taugbøl T., Lillehaug A. (2006): Krepsepest - smitteforhold i norske vassdrag og forebyggende tiltak mot videre spredning av krepsepest. Veterinærinstituttets rapportserie **6**: 1-25.

Vrålstad T., Knutsen A. K., Tengs T., Holst-Jensen A. (2009): A quantitative TagMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for the detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. Veterinary Microbiology **137**: 146-155.

Vukosav P., Mlakar M., Cukrov N., Kwokal Ž. (2014): Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park (Croatia). Environmental Science and Pollution Research **21(5)**: 3826–3839.

Wilfinger W. W., Mackey K., Chomczynski P. (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques **22**: 474-481.

Zakon o zaštiti prirode (Narodne novine br. 15/18).

8. ŽIVOTOPIS

Dora Pavić rođena je 11. listopada 1993. godine u Bjelovaru. Pohađala je IV. osnovnu školu i Opću gimnaziju u Bjelovaru. Preddiplomski sveučilišni studij upisala je 2012. godine na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu smjer Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša. Akademski naziv sveučilišnog prvostupnika inženjera urbanog šumarstva, zaštite prirode i okoliša stječe 18. rujna 2015. godine izradom završnog rada «Utjecaj promjena klime u prošlosti na razvitak šumske vegetacije» pod vodstvom prof. dr. sc. Daria Baričevića na Zavodu za ekologiju i uzgajanje šuma Šumarskog fakulteta. Iste godine upisuje diplomski studij znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Sudjelovanje na projektima, simpozijima, razmjenama:

- Noć biologije – 07.04.2017, Zagreb.
- Simpozij studenata bioloških usmjerenja – 27.05.2017, Zagreb.
- Youth Exchange S.T.E.P.S. Italy, 05.05. - 13.05.2017.
- Youth Exchange "Connection, Culture - Future", Hungary, 01.07. - 08.07.2017.
- Erasmus + stručna praksa , AmbiosLtd (Velika Britanija), 02.10.-22.12.2017.
- 1. ZORH susret (Susret znanstvenika, stručnih djelatnika i studenata na temu zaštite okoliša u Hrvatskoj – 05.03.2018., Split.

9. PRILOZI

Prilog I. Popis uzoraka. K-kutikula, m-mužjak, f-ženka, N.T.-nije testirano.

oznaka	datum uzorkovanja	lokacija uzorkovanja	vrsta	spol	konc DNA, ng/μl	260/280	260/230	PCR	qPCR	genotipizacija
B1	16.3.2017.	Burgeti	<i>Astacus astacus</i>	m	0,9	-8,61	0,07	negativan	N.T.	N.T.
B2	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,5	2,09	0,21	negativan	N.T.	N.T.
B3	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,5	78,25	0,13	negativan	N.T.	N.T.
B4	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	7,7	2,24	0,46	negativan	N.T.	N.T.
B5	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,3	2,95	0,07	negativan	A0	N.T.
B5 (K)	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	39,6	1,9	1,08	pozitivan	A3	N.T.
B6	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,3	24,41	0,15	negativan	N.T.	N.T.
B7	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,7	4,31	0,02	negativan	N.T.	N.T.
B7 (K)	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	73,2	1,89	1,52	negativan	N.T.	N.T.
B8	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,4	1,99	0,14	negativan	N.T.	N.T.
B9	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,4	4,18	0,07	pozitivan	N.T.	N.T.
B10	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	N.T.	N.T.	N.T.	negativan	A1	N.T.
B10 (K)	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	N.T.	N.T.	N.T.	pozitivan	A3	N.T.
B11	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,1	-11,23	0,01	negativan	N.T.	N.T.
B12	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,4	2,06	0,16	negativan	N.T.	N.T.
B13	16.3.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,4	-1,19	0,01	negativan	N.T.	N.T.
B14	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,1	2,64	0,11	negativan	N.T.	N.T.
B15	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,2	2,12	0,18	negativan	N.T.	N.T.
B16	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	6,1	1,92	0,47	negativan	N.T.	N.T.
B17	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,9	1,91	0,38	negativan	N.T.	N.T.
B18	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,6	2,01	0,26	negativan	N.T.	N.T.
B18 (K)	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	N.T.	N.T.	N.T.	negativan	N.T.	N.T.
B19	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,1	1,9	0,15	negativan	N.T.	N.T.
B20	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,2	2,11	0,22	negativan	N.T.	N.T.
B21	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2	2,12	0,24	pozitivan	N.T.	N.T.
B22	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	4,8	2,05	0,35	negativan	N.T.	N.T.
B23	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	4,9	1,93	0,85	negativan	N.T.	N.T.
B24	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	5,29	5,7	0,04	pozitivan	A4	A
B24 (K)	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1	3,73	0,43	pozitivan	A5	A
B25	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,8	2,66	0,66	negativan	N.T.	N.T.
B25 (K)	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3	2,38	0,3	negativan	N.T.	N.T.
B26	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	23	1,66	0,69	negativan	N.T.	N.T.
B27	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	4,7	2,03	0,42	negativan	N.T.	N.T.
B28	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	6	2,08	0,26	negativan	N.T.	N.T.
B29	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	7,5	1,87	0,47	negativan	N.T.	N.T.
B30	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	11,3	1,91	0,6	negativan	N.T.	N.T.
B31	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	4,6	2,1	0,32	negativan	N.T.	N.T.
B32	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	7,3	1,89	0,49	negativan	N.T.	N.T.
B32 (K)	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	24,2	1,92	1,21	negativan	N.T.	N.T.
B33	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	-0,2	0,34	-0,01	negativan	N.T.	N.T.
B33 (K)	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3	2,1	0,45	negativan	N.T.	N.T.
B34	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,5	2,45	0,18	negativan	N.T.	N.T.
B35	20.4.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,8	1,82	0,38	negativan	N.T.	N.T.
B36	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,6	-190,51	0,05	negativan	N.T.	N.T.
B37	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,2	2,12	0,15	pozitivan	N.T.	N.T.
B38	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,7	2,31	0,39	negativan	N.T.	N.T.
B39	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,8	1,82	0,1	negativan	N.T.	N.T.
B40	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,9	2,23	0,24	negativan	N.T.	N.T.
B41	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,3	2,51	0,15	negativan	N.T.	N.T.
B42	8.6.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	3,1	2,29	0,19	negativan	N.T.	N.T.
B43	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1	-364,77	0,03	negativan	N.T.	N.T.
B44	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,5	1,82	0,1	negativan	N.T.	N.T.
B45	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,8	2,41	0,06	negativan	N.T.	N.T.
B46	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,6	4,78	0,05	negativan	N.T.	N.T.
B47	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	f	0,5	-2,32	0,04	negativan	N.T.	N.T.
B48	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,6	2,45	0,07	negativan	N.T.	N.T.
B49	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	-0,6	0,48	-0,03	negativan	N.T.	N.T.
B50	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,1	-0,07	0,01	negativan	N.T.	N.T.
B51	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,9	-3,22	0,08	negativan	N.T.	N.T.
B52	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,7	3,34	0,2	negativan	N.T.	N.T.
B53	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,6	6,47	0,02	negativan	N.T.	N.T.
B54	25.7.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	f	3,6	1,88	0,56	negativan	N.T.	N.T.

B55	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	6,6	1,65	0,26	negativan	N.T.	N.T.
B56	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,6	11,82	0,04	negativan	N.T.	N.T.
B57	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,3	3,03	0,08	negativan	N.T.	N.T.
B58	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	f	1,7	2,82	0,11	negativan	N.T.	N.T.
B59	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	24,1	1,37	0,59	negativan	N.T.	N.T.
B60	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	4,4	2,13	0,17	pozitivan	N.T.	N.T.
B61	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	f	1,6	5,06	0,09	negativan	N.T.	N.T.
B62	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	f	0,9	-19,67	0,07	negativan	N.T.	N.T.
B63	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m/f	2,2	1,88	0,14	negativan	N.T.	N.T.
B64	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,5	-5,63	0,02	negativan	N.T.	N.T.
B65	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,5	-2,7	0,04	negativan	N.T.	N.T.
B66	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	2,1	2,79	0,15	negativan	N.T.	N.T.
B67	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	1,2	3,2	0,07	pozitivan	N.T.	N.T.
B68	6.9.2017.	Burgeti	<i>A. astacus</i>	m	0,6	18,64	0,05	negativan	N.T.	N.T.
PR1	16.3.2017.	Prijeboj	<i>Austroptamobius torrentium</i>	m	2,3	2,12	0,19	negativan	N.T.	N.T.
PR1 (K)	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	1,7	2,4	0,04	negativan	N.T.	N.T.
PR2	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	19,8	1,94	0,95	negativan	N.T.	N.T.
PR3	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	12,6	2,02	0,39	negativan	N.T.	N.T.
PR4	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	30,8	1,84	0,87	negativan	N.T.	N.T.
PR5	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	1,1	-19,4	0,07	negativan	N.T.	N.T.
PR6	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	0,4	-1,11	0,01	negativan	N.T.	N.T.
PR7	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	2	3,35	0,13	negativan	N.T.	N.T.
PR8	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	41,4	1,95	1,4	negativan	N.T.	N.T.
PR9	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	1,5	3,03	0,09	negativan	N.T.	N.T.
PR10	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	3,7	1,81	0,2	negativan	N.T.	N.T.
PR11	16.3.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	12,2	1,65	0,49	negativan	N.T.	N.T.
PR12	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	2,9	1,94	0,29	negativan	N.T.	N.T.
PR13	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	f	0,6	-12,16	0,07	negativan	N.T.	N.T.
PR14	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	f	8,2	2,01	0,78	negativan	N.T.	N.T.
PR15	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	0,5	-1,76	0,18	negativan	N.T.	N.T.
PR16	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	3,2	3,5	0,28	negativan	N.T.	N.T.
PR17	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	3,5	2,42	0,23	negativan	N.T.	N.T.
PR18	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	f	9,4	1,92	0,5	negativan	N.T.	N.T.
PR19	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	0,5	-1,07	0,02	negativan	N.T.	N.T.
PR20	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	25,5	1,96	0,93	negativan	N.T.	N.T.
PR21	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	1,1	-11,44	0,05	negativan	N.T.	N.T.
PR22	25.7.2017.	Prijeboj	<i>A. torrentium</i>	m	2,7	2,94	0,15	negativan	N.T.	N.T.
SAR 1	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,9	-3,46	0,02	negativan	N.T.	N.T.
SAR 2	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	1,3	4,34	0,08	negativan	N.T.	N.T.
SAR 3	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	f	1,1	-21,19	0,18	negativan	N.T.	N.T.
SAR 4	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,2	-2,67	0,02	negativan	N.T.	N.T.
SAR 5	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	4,3	-23,63	0,03	negativan	N.T.	N.T.
SAR 6	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,3	-7,19	0,03	negativan	N.T.	N.T.
SAR 7	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	f	0,7	-7,31	0,04	negativan	N.T.	N.T.
SAR 8	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,6	1,58	0,04	negativan	N.T.	N.T.
SAR 9	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	-0,2	0,35	-0,03	negativan	N.T.	N.T.
SAR 10	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,4	6,6	0,02	negativan	N.T.	N.T.
SAR 11	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	-0,3	0,62	-0,02	negativan	N.T.	N.T.
SAR 12	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,2	2,42	0,03	negativan	N.T.	N.T.
SAR 13	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	f	0,3	1,25	0,01	negativan	N.T.	N.T.
SAR 14	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	0,6	1,5	0,05	negativan	N.T.	N.T.
SAR 15	8.6.2017.	Sartuk	<i>A. torrentium</i>	m	1,9	-309,26	0,01	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 1	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	1,3	3,7	0,05	pozitivan	N.T.	N.T.
PŠ 2	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	3,4	1,99	0,13	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 3	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	4,7	2,09	0,36	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 4	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	0,5	5,69	0,03	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 5	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	2,8	2,23	0,22	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 6	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	1,4	2,85	0,07	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 7	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	3,1	1,75	0,17	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 8	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	m	2,3	3,45	0,18	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 9	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	f	1,5	4,63	0,1	negativan	N.T.	N.T.
PŠ 10	6.9.2017.	Prštavci	<i>A. astacus</i>	f	3,3	1,91	0,25	negativan	N.T.	N.T.