

Selekcija i molekularna identifikacija bakterijskih izolata s kutikule slatkovodnih rakova koji inhibiraju rast micelija patogena *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906

Orlić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:846767>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Karla Orlić

**Selekcija i molekularna identifikacija
bakterijskih izolata s kutikule slatkovodnih
rakova koji inhibiraju rast micelija patogena
Aphanomyces astaci Schikora, 1906**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Karla Orlić

**Selection and molecular identification of
bacterial isolates from freshwater crayfish
cuticle which inhibit the mycelial growth of
pathogen *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906**

Master thesis

Zagreb, 2021.

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

Iskreno se zahvaljujem svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Ani Bielen i doc. dr. sc. Sandri Hudini na pomoći prilikom provedbe i izrade ovog diplomskog rada, ali i na potpori, savjetima i usmjeravanju na mom znanstvenom putovanju. Zahvaljujem i svim članovima račje ekipe na pomoći prilikom izvođenja ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima i sestrama Lauri i Simoni te Ivanu na vječitoj podršci i slušanju o mojim rakovima i bakterijama.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Selekcija i molekularna identifikacija bakterijskih izolata s kutikule slatkovodnih rakova koji inhibiraju rast micelija patogena *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906

Karla Orlić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Slatkovodni deseteronožni rakovi, ključne vrste slatkovodnih staništa, ugroženi su širenjem invazivnih stranih vrsta rakova i bolesti račje kuge, koju uzrokuje patogeni mikroorganizam *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906. Osim što patogen ugrožava prirodne populacije zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova, uzrokuje i velike štete u akvakulturi. Kemijski tretmani koji se trenutno koriste za kontrolu ovog patogena štetni su za rakove, ljude i ekosustav pa je potrebno razviti učinkovite i ekološki prihvatljive metode kontrole, poput biokontrole. Stoga je cilj ovoga istraživanja testiranje inhibicijskog potencijala bakterijskih izolata prisutnih na kutikuli dvije vrste rakova: uskoškarog raka - *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (zavičajna vrsta) i signalnog raka - *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (invazivna strana vrsta). Bakterijski izolati su identificirani masenom spektrometrijom MALDI-TOF i sekvenciranjem gena 16S rRNA. Većina sakupljenih izolata pripada koljenu Proteobacteria (69 %), zatim Bacteroidetes (17 %) i Firmicutes (8 %). Nadalje, testirana je sposobnost svakog izolata da uspori ili zaustavi rast micelija *A. astaci* koristeći *in vitro* testove inhibicije te su izolati razvrstani u dvije skupine: inhibitori (33 %) i ne-inhibitori (67 %). Više od polovice izolata inhibitora (56 %) pripadalo je rodu *Pseudomonas*. Ovo istraživanje je prvi korak u identifikaciji bakterijskih izolata koji bi mogli biti upotrijebljeni za biokontrolu patogena *A. astaci*.

(46 stranica, 11 slika, 6 tablica, 117 literaturnih navoda, 3 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biokontrola, račja kuga, epibionti, test inhibicije

Voditelj 1: izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

Voditelj 2: doc. dr. sc. Sandra Hudina

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Sandra Hudina

doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

doc. dr. sc. Luka Valožić

prof. dr. sc. Alan Moro

Rad prihvaćen: 24.06.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Selection and molecular identification of bacterial isolates from freshwater crayfish cuticle which inhibit the mycelial growth of pathogen *Aphanomyces astaci*

Schikora, 1906

Karla Orlić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Freshwater decapod crayfish are threatened by the spread of invasive crayfish species and crayfish plague. This disease is caused by the pathogen *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906, and has detrimental effects on native European crayfish populations and on astaciculture. Existing chemical treatments are toxic to crayfish, humans and the ecosystem, so the development of effective and environmentally friendly pathogen control methods is urgently needed. Therefore, the aim of this study was to test the *A. astaci*-inhibitory potential of bacterial isolates from the cuticle of two the narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (native species) and the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (invasive species). Identification by MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rRNA gene sequencing revealed that most of the isolates belonged to the phylum Proteobacteria (69 %), followed by Bacteroidetes (17 %) and Firmicutes (8 %). The isolates were tested for their ability to slow or stop the growth of *A. astaci* mycelium by *in vitro* plate assay and were classified as inhibitors (33%) or non-inhibitors (67 %). More than half of the identified inhibitors (56 %) belonged to the genus *Pseudomonas*. This study represents the first step towards the identification of bacterial isolates that could be used for biocontrol of *A. astaci*.

(46 pages, 11 figures, 6 tables, 117 references, 3 appendix, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: biocontrol, crayfish plague, epibionts, plate inhibition assay

Supervisor 1: Assoc. prof. Ana Bielen, PhD

Supervisor 2: Asst. prof. Sandra Hudina, PhD

Reviewers:

Asst. prof. Sandra Hudina, PhD

Asst. prof. Tomislav Ivanković, PhD

Asst. prof. Luka Valožić, PhD

Prof. Alan Moro

Thesis accepted: 24.06.2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Slatkovodni deseteronožni rakovi u Europi i Hrvatskoj.....	1
1.2. Račja kuga	2
1.3. Uzgoj rakova u Europi.....	4
1.4. Mogućnosti kontrole patogena <i>A. astaci</i> u astacikulturi.....	6
1.5. Biokontrola kao ekološki prihvatljiva mogućnost kontrole patogena	7
1.6. Ciljevi diplomskog rada.....	8
2. MATERIJALI I METODE	9
2.1. Uzorkovanje i uzgoj bakterijskih izolata	9
2.2. Taksonomska identifikacija bakterijskih izolata pomoću masene spektrometrije MALDI-TOF	11
2.3. Taksonomska identifikacija bakterijskih izolata pomoću sekvenciranja gena 16S rRNA 14	
2.4. Izrada filogenetskog stabla	16
2.5. Testovi inhibicije (engl. <i>plate inhibition assay</i>)	16
2.6. Statistička analiza	18
3. REZULTATI.....	19
3.1. Identifikacija bakterijskih izolata s kutikule rakova <i>P. leptodactylus</i> i <i>P. leniusculus</i> ...	19
3.2. Identifikacija bakterijskih izolata koji pokazuju potencijal za inhibiciju rasta micelija patogena <i>A. astaci</i>	21
4. RASPRAVA	29
5. ZAKLJUČAK	33
6. LITERATURA	34
7. PRILOZI	46
8. ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

1.1. Slatkovodni deseteronožni rakovi u Europi i Hrvatskoj

Deseteronožni rakovi ključne su vrste slatkovodnih ekosustava (engl. *keystone species*) jer predstavljaju značajnu komponentu hranidbenih mreža i utječu na stabilnost i raznolikost cijele slatkovodne zajednice (Reynolds i Souty-Grosset 2012). Tako važnu ulogu u slatkovodnim hranidbenim zajednicama imaju zbog relativno brzog rasta i velike biomase koju postižu, dugog životnog vijeka i omnivornog načina prehrane (Lodge i Hill 1994, Usio i Townsend 2002).

Na području Europe prisutno je pet zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae: *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) – riječni rak, *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) – uskoškari rak, *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803) – potočni rak, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) – bjelonogi rak i *Astacus pachypus* (Rathke, 1837) (Holdich 2002). Od toga na području Hrvatske dolaze četiri vrste: riječni, uskoškari, potočni i bjelonogi rak (Maguire i sur. 2011). U posljednjem desetljeću u Hrvatskoj je zabilježen značajan pad populacija deseteronožnih rakova: zabilježen je nestanak 55 % populacija vrste *A. astacus* i čak 67 % populacija vrste *A. pallipes* (Maguire i sur. 2018). Neki od razloga ugroženosti zavičajnih vrsta rakova su uništenje i fragmentacija staništa, prekomjerni izlov te onečišćenje staništa. Međutim glavni razlog smanjenja populacija zavičajnih rakova su invazivne strane vrste rakova i bolesti koje oni prenose (Holdich 2002). Stoga su bjelonogi, potočni i riječni rak zaštićeni i na međunarodnoj i na nacionalnoj razini.

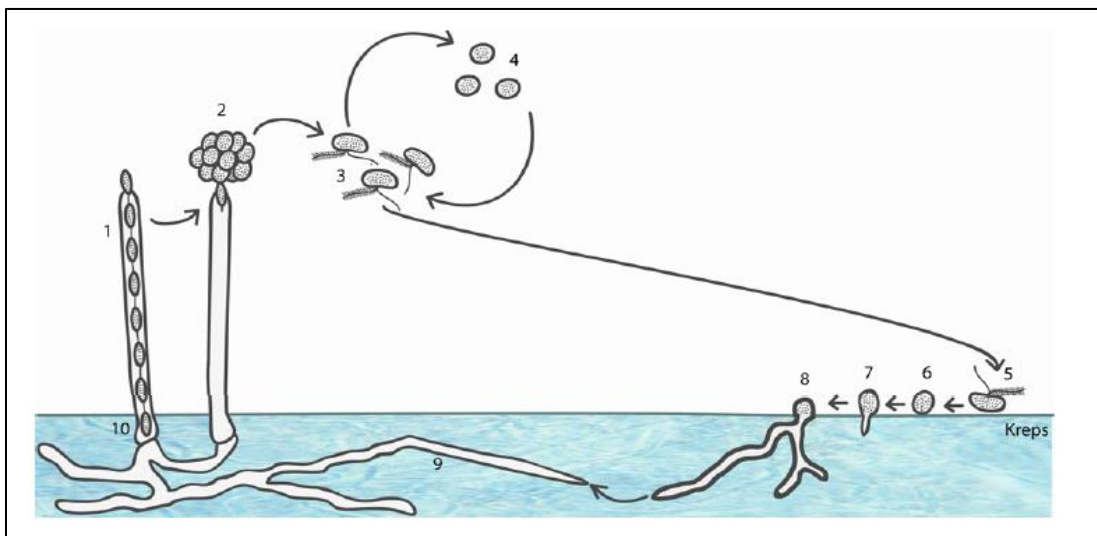
Prema Međunarodnom savezu za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (engl. *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*, IUCN) invazivne strane vrste su vrste koje su nenamjernim ili namjernim unošenjem od strane čovjeka dospjele izvan područja svoje prirodne rasprostranjenosti i na tim područjima uzrokuju ekološku, ekonomsku štetu i/ili štetu ljudskome zdravlju. Na području Europe prisutno je jedanaest invazivnih stranih vrsta slatkovodnih rakova koje su uspostavile svoje populacije u divljini (Souty-Grosset i sur. 2006, Holdich i sur. 2009, Kouba i sur. 2014). Tih jedanaest vrsta dijelimo na „stare invazivne strane vrste“ koje su uvezene prije 1975. godine većinom zbog obnove populacija rakova nakon pomora uzrokovanog račjom kugom i radi akvakulture, i „nove invazivne strane vrste“ koje su uvezene od 1980. godine većinom radi akvakulture. U „stare invazivne strane vrste“ pripadaju tri vrste podrijetlom iz

Sjeverne Amerike: *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) - bodljobradi rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – signalni rak i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). U „nove invazivne strane vrste“ pripadaju sjevernoameričke vrste: *Faxonius immunis* (Hagen, 1870), *Faxonius juvenilis* (Hagen, 1870), *Faxonius virilis* (Hagen, 1870), *Procambarus acutus* (Girard, 1852), *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) i *Procambarus alleni* (Faxon, 1884) i dvije australijske vrste: *Cherax destructor* Clark, 1936 i *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Holdich i sur. 2009, Kouba i sur. 2014).

U Hrvatskoj su do sada zabilježene tri invazivne strane vrste rakova: signalni rak, mramorni rak i bodljobradi rak (Maguire i sur. 2011, Samardžić i sur. 2014, Maguire i sur. 2018). Invazivne vrste rakova istiskuju zavičajne vrste rakova kroz direktnu kompeticiju zbog veće agresivnosti, ranijeg spolnog sazrijevanja i većeg fekunditeta (Holdich i sur. 2009). No najznačajnija posljedica širenja invazivnih stranih vrsta je širenje *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906), uzročnika bolesti račje kuge koju te vrste prenose (Becking i sur. 2015).

1.2. Račja kuga

Račja kuga je smrtonosna bolest koju uzrokuje patogen *A. astaci*, koji je zbog svojeg negativnog učinka na populacije zavičajnih europskih vrsta rakova svrstan među 100 najopasnijih invazivnih vrsta u svijetu (Lowe i sur. 2000). Ovaj patogen pripada vodenim plijesnima - razred Oomycetes, (OIE 2016), skupini u kojoj se nalaze i brojni drugi biljni i životinjski patogeni (Fisher i sur. 2012, Derevnina i sur. 2016).



Slika 1. Životni ciklus *Aphanoomyces astaci*. Sporangij (1) sa zoosporama (2) s bičevima koje se ispuštaju u vodu (3). Ukoliko kroz nekoliko dana ne nađu pogodnog domaćina, pretvaraju se u ciste (4). Ako pronauđu pogodnog domaćina (5) 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 proizvodnju sporangija i izbacivanje zoospora (10) (Vrålstad 2006).

U životnom ciklusu patogene *A. astaci* do sada je zabilježeno samo nespolno razmnožavanje (Slika 1) (Söderhall i Cerenius 1999, Oidtmann i sur. 2002, Diéguez-Urbeondo i sur. 2009). Ovaj patogen u prirodi dolazi u tri oblika: hife (micelij), zoospore i ciste. Nakon ili neposredno prije uginuća bolesnog raka, na površini kutikule izbijaju hife koje formiraju sporangije (Slika 1-1). Iz sporangija u vodu izlaze zoospore (Slika 1-2 i 1-3). Zoospore imaju dva biča koja im omogućuju plivanje. Ostaju vijabilne nekoliko dana, a ako tijekom tog vremena ne nađu pogodnog domaćina pretvorit će se u ciste (Slika 1-4) koje neće proklijati, već će se nakon nekog vremena ponovno pretvoriti u zoospore. Taj proces može se ponoviti tri puta, a ako ni tada ne pronauđu pogodnog domaćina nastat će nevjabilne ciste (Söderhall i Cerenius 1999). Ukoliko zoospore kemotaksijom pronauđe pogodnog domaćina, prijeći će u oblik ciste koja će početi klijati (Slika 1-7) (Cerenius i Söderhall 1984). Hife će prodrijeti kroz kutikulu raka (Slika 1-8) na mjestima gdje je kutikula mekša, kao što su zglobovi i područje ventralne abdominalne kutikule (Unestam i Weiss 1970). Kod jedinki podložnih infekciji hife će se granati i prodrijeti dublje u tijelo, do ostalih tkiva i organa, te će se

razviti bolest račja kuga. Simptomi bolesti su melanizacija kutikule (crne/smeđe točke na nogama i/ili abdomenu), dnevna aktivnost, nekoordinirano kretanje i paraliza (Unestam i Weiss 1970).

Račja kuga je većinom smrtonosna za zavičajne vrste rakova, dok invazivne sjevernoameričke vrste nakon kontakta s patogenom najčešće ne razvijaju bolest (Becking i sur. 2015). Djelovanjem imunosnog odgovora raka dolazi do melanizacije hifa što onemogućuje njihov daljnji rast i njihovo prodiranje u unutrašnjost organizma raka. Patogen je zato ograničen samo na kutikulu i tamo ostaje vijabilan što znači da je taj rak prenositelj patogena (Söderhäll i Cerenius 1998, Cerenius i sur. 2003). Za reakciju melanizacije odgovoran je sustav profenoloksidaze (engl. *prophenoloxidase system*, proPO). ProPO je enzim koji katalizira oksidaciju fenola u melanin. Smatra se da su invazivne strane vrste otporne na bolest jer je njihov proPO sustav stalno aktivan, dok kod zavičajnih vrsta treba više vremena da se on aktivira (Cerenius i sur. 2003). Međutim, važno je naglasiti da i invazivne strane vrste mogu razviti bolest ukoliko njihov imunosni odgovor oslabi, primjerice, zbog ozljeda, neposredno nakon presvlačenja, pod utjecajem stresa ili ako je jedinka oslabljena drugim infekcijama (Söderhäll i Cerenius 1992, Cerenius i sur. 2003, Edsman i sur. 2015).

Osim što je patogen prijetnja populacijama zavičajnih vrsta rakova, on uzrokuje velike štete i u astacikulturi (Evans i Edgerton 2001, Harlioglu 2008, Souty-Grosset i Reynolds 2009).

1.3. Uzgoj rakova u Europi

Akvakultura je uzgoj, iskorištavanje i razmnožavanje vodenih organizama u kontroliranim uvjetima. Uzgoj rakova naziva se i astacikultura. Akvakultura se u zadnjih par desetljeća ubrzano razvija zbog iscrpljivanja zaliha divljih populacija vodenih organizama, povećanja ljudske populacije, povećanja potražnje za ribljom hranom i razvijanja međunarodne trgovine. To ju je učinilo najbrže rastućim sektorom proizvodnje životinjske hrane (FAO 2020). Prema podacima Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO), 2018. godine je udio ribarstva iznosio 54 %, a akvakulture 46 %. Trend pokazuje da se udio ribarstva polako smanjuje, a akvakultura sve više dobiva na važnosti. U akvakulturi, 2018. godine je udio morske akvakulture je iznosio 62,5 %, dok je udio slatkovodne akvakulture iznosio 37,5 %. Azija dominantno predvodi

akvakulturom s 88,7 % ukupne proizvodnje, zatim Sjeverna i Južna Amerika (4,6 %), Europa (3,8 %), Afrika (2,7 %) i Oceanija (0,2 %) (FAO 2020).

Važno je naglasiti da, iako akvakultura rješava probleme izlovljavanja divljih populacija i sigurnosti opskrbe hranom, postoje i problemi koje ona uzrokuje. Primjerice, otpadne vode iz akvakulturnih pogona mogu uzrokovati zagađenje okolnog tla i voda otrovnim i/ili štetnim kemikalijama, širenje patogena na okolna područja i eutrofikaciju okolnih voda (WHO 1989).

Slatkovodni rakovi iz natporodica Astacoidea i Parastacoidea su 2018. godine bili 13. grupa vrsta u akvakulturi s proizvedenih 1 711 635 tona, odnosno 1,49 % od ukupne proizvodnje u akvakulturi. Iako je to mali postotak, zabilježen je porast proizvodnje od čak 43 % između 2017. i 2018. godine, a FAO predviđa i daljnji rast. Međutim, ova skupina je bila četvrta prema vrijednosti u akvakulturi s 5,49 % vrijednosti svjetske akvakulture. U akvakulturi slatkovodnih rakova su predvodile Kina (95,74 %) i Sjedinjene Američke Države (4,25 %) što je očekivano jer je vrsta slatkovodnih rakova koja se najviše iskorištavala bila *P. clarkii* (99,89 %) (FAO 2020), vrsta koja je zavičajna na području Amerike, ali je 1929. godine unesena u Aziju za potrebe uzgoja (Wang i sur. 2018). Ta vrsta je također uvezena u Europu odnosno Španjolsku 1973. godine radi komercijalnog uzgoja, ali je ubrzo postala invazivna (Habsburgo-Lorena 1979, Holdich i sur. 2009).

Na području Europe uzgajaju se dvije vrste rakova: plemeniti rak i uskoškari rak (FAO 2020), a europske države koje se bave astacikulturom su Austrija, Ujedinjeno Kraljevstvo, Danska, Finska, Francuska, Njemačka, Irska, Italija, Litva, Norveška, Rusija, Španjolska, Švedska i Turska (Köksal 1988, Holdich 1993). U prošlosti su se pokušavale uvesti sjevernoameričke vrste poput signalnog raka, bodljibradog raka ili *P. clarkii* radi uzgoja, no posljedica toga je bio bijeg tih vrsta i njihovo širenje u prirodi te širenje patogena *A. astaci* (Alderman i Polglase 1988, Alderman 1996, Skurdal 1999, Souty-Grosset i sur. 2006, Holdich i Black 2007). To predstavlja veliki problem jer se za potrebe astacikulture uzimaju rakovi iz divljih populacija koji prethodno mogu biti zaraženi račjom kugom (Harlioglu 2008, Souty-Grosset i Reynolds 2009). Primjerice, u Finskoj je astacikultura kao gospodarska grana aktivna preko 150 godina te se jedno vrijeme uzgajalo i oko 20 milijuna rakova godišnje, no dolaskom bolesti račje kuge u finske vodotokove, uzgoj rakova je pao na svega 2 – 5 milijuna rakova godišnje (Jussila i Mannonen 2004).

1.4. Mogućnosti kontrole patogena *A. astaci* u astacikulturi

Osim šteta koje patogen *A. astaci* uzrokuje račjim populacijama u prirodi, račja kuga često uzrokuje masovne pomore rakova i značajne ekonomske gubitke u astacikulturi (Evans i Edgerton 2001, Harlioglu 2008, Souty-Grosset i Reynolds 2009). U uzgajalištima rakova zbog velike gustoće jedinki na malome području i često loše kvalitete vode životinje mogu biti pod stresom pa je olakšano širenje bolesti (Kautsky i sur. 2000). Također do izbijanja bolesti može doći zbog unosa zaraženih jedinki iz prirode ili korištenja kontaminirane, nedezinficirane opreme (Oidtmann i sur. 2002, Jussila i Mannonen 2004).

Iako patogen *A. astaci* može uzrokovati značajne štete, trenutno dostupni tretmani za kontrolu oomicetnih patogena u astacikulturi temelje se na primjeni kemikalija koje imaju dokazano toksične učinke za ljude, životinje i okoliš te njihovo korištenje nije dugoročno održivo (Srivastava i sur. 2004, Gieseke i sur. 2006). Primjerice, malahitno zelenilo koje je najučinkovitije za kontrolu patogena *A. astaci* (Alderman i Polglase 1984) zabranjeno je za korištenje u zemljama Europske Unije (EC 1990, EFSA 2016) zbog svog teratogenog i kancerogenog učinka (Meyer i Jorgenson 1983, Panandiker i sur. 1992, Srivastava i sur. 2004). Kemikalije koje su trenutno u upotrebi, poput formalina, bronopola i bakrovog sulfata, također se smatraju toksičnima i stoga nisu dugoročno održive. Primjerice, formalin se pokazao toksičnim za zaposlenike uzgajališta u Americi koja su koristila koncentracije niže od maksimalno dopuštenih (Wooster i sur. 2005), a koncentracije formalina koje se se mogu naći u mesu riba, školjkaša i rakova su se pokazale kao potencijalno štetne za potrošače jer mogu uzrokovati toksične učinke poput iritacije sluznice i čira na probavnom traktu (Norliana i sur. 2009). Bronopol, iako se smatra manje toksičnim, se također pokazao problematičnim jer se lako razgrađuje hidrolizom ili fotolizom čime nastaju produkti koji su toksični za vodenu biotu i mogu se akumulirati u okolišu (Cui i sur. 2011). Nadalje, bakrov sulfat se pokazao toksičnim za zooplankton, što posljedično može dovesti do promjena sastava zooplanktona u onečišćenom staništu (Jacob i sur. 2016). Dezinficijensi na bazi peroctene kiseline (engl. *peracetic acid*, PAA), iako su učinkoviti pri dezinfekciji ribičke opreme i opreme za lov rakova od zoospora patogena *A. astaci*, u koncentracijama potrebnim za dezinfekciju (10 mg/L PAA) mogu imati toksične učinke na vodene životinje poput riba (Jussila i sur. 2014).

Temeljem svega navedenoga je jasno da je hitno potreban razvoj inovativnih i ekološki prihvatljivih metoda za kontrolu račje kuge u astacikulturi.

1.5. Biokontrola kao ekološki prihvatljiva mogućnost kontrole patogena

Biokontrola je metoda kontrole patogena ili bolesti putem živućih organizama. Kod biokontrola razlikujemo tri pristupa: klasičnu, augmentacijsku i konzervacijsku biokontrolu. Klasična biokontrola obuhvaća unos strane vrste koja je prirodni neprijatelj vrsti koju je potrebno kontrolirati, dok se augmentacijska biokontrola odnosi na dodatno ispuštanje zavičajne vrste koja je prirodni neprijatelj vrsti koju je potrebno kontrolirati, i već je prisutna na tom području, ali u manjoj brojnosti. Konzervacijska biokontrola odnosi se na zaštitu prirodnog neprijatelja koji je već prisutan na tom području što dovodi do povećanja brojnosti njegove populacije koja predacijom i kompeticijom smanjuje populaciju vrste koju je potrebno kontrolirati (Bajer i sur. 2019). Korištenje stranih vrsta kao metode biokontrola u prošlosti se pokazalo kao nepouzđano i često je izazvalo više problema nego koristi, stoga je vrlo bitno korištenje vrsta koje su prirodno prisutne na određenom staništu, odnosno primjena augmentacijske i/ili konzervacijske strategije biokontrola (Simberloff 2012).

U novijim se istraživanjima sve više istražuje primjena bakterijskih izolata, prirodno prisutnih na organizmu domaćina, u biokontroli patogena tih domaćina (Carbajal-González i sur. 2011, Caruana i sur. 2012, Chen i sur. 2016, Bruissson i sur. 2019). Naime, istraživanja pokazuju kako simbiotske mikrobne zajednice imaju značajan učinak na interakciju patogena i domaćina (Unestam i Weiss 1970, Souty-Grosset i sur. 2006, Haine 2008), odnosno mogu biti korisne za domaćina, nudeći mu dodatnu zaštitu od patogena. U zadnjih desetak godina sve su brojniji primjeri bakterija izoliranih s površine domaćina koje pokazuju svojstva inhibicije prema (oomicetnim) patogenima. Na primjer, bakterije s kože nekih vodozemaca i riba mogu zaštititi domaćina od fungalnih i oomicetnih patogena (Bly i sur. 1997, Harris i sur. 2006, Carbajal-González i sur. 2011, Liu i sur. 2015, Lowrey i sur. 2015). Carbajal-González i suradnici (2011) izolirali su bakterije s kože dvije vrste pastrva te testirali njihovu sposobnost da inhibiraju rast micelija i klijanje cista oomicetnog patogena *Saprolegnia parasitica*. Izolati koji su pokazali inhibicijsku sposobnost pripadali su vrstama *Aeromonas piscicola*, *A. sobria*, *Pantoea agglomerans* i *Pseudomonas fluorescens*. Mehanizmi kojima simbioti mogu štititi svoga domaćina od prirodnih neprijatelja su različiti. Primjerice, sojevi roda *Pseudomonas* izlučuju hlapljive organske spojeve kojima je pripisan demonstrirani inhibicijski učinak na oomicetne patogene (De Vrieze i sur. 2015, Hunziker i sur. 2015). Osim

toga, postojeća istraživanja ukazuju na važnost različitih sekundarnih metabolita koje bakterije proizvode i izlučuju u medij, a imaju inhibicijski učinak na oomicetne patogene (De Vrieze i sur. 2015, Hunziker i sur. 2015, Liu i sur. 2015).

1.6. Ciljevi diplomskog rada

Unatoč sve većem broju istraživanja koja pokazuju važnost simbiotskih mikrobnih zajednica domaćina u obrani od oomicetnih patogena, učinak bakterija s kutikule rakova na patogene *A. astaci* potpuno je nepoznat. Prilikom dolaska zoospora na kutikulu rakova one se susreću s bakterijama koje tamo obitavaju te stupaju s njima u različite ekološke interakcije, uključujući antagonizam. Hipoteza ovog istraživanja bila je kako među bakterijama koje se prirodno nalaze na površini kutikule rakova postoje vrste koje imaju sposobnost inhibirati rast micelija patogena *A. astaci*.

Ciljevi istraživanja su bili:

- uzgojiti čiste kulture bakterija s kutikule dvije vrste rakova prisutnih u Hrvatskoj: signalnog raka i uskoškarog raka;
- odrediti taksonomsku pripadnost izolata korištenjem dvije molekularne metode: masenom spektrometrijom MALDI-TOF i sekvenciranjem gena *16S rRNA*;
- testirati potencijal izolata da uspore rast micelija patogena *A. astaci*;
- utvrditi popis bakterijskih izolata s kutikule raka koji inhibiraju rast patogena *A. astaci*.

2. MATERIJALI I METODE

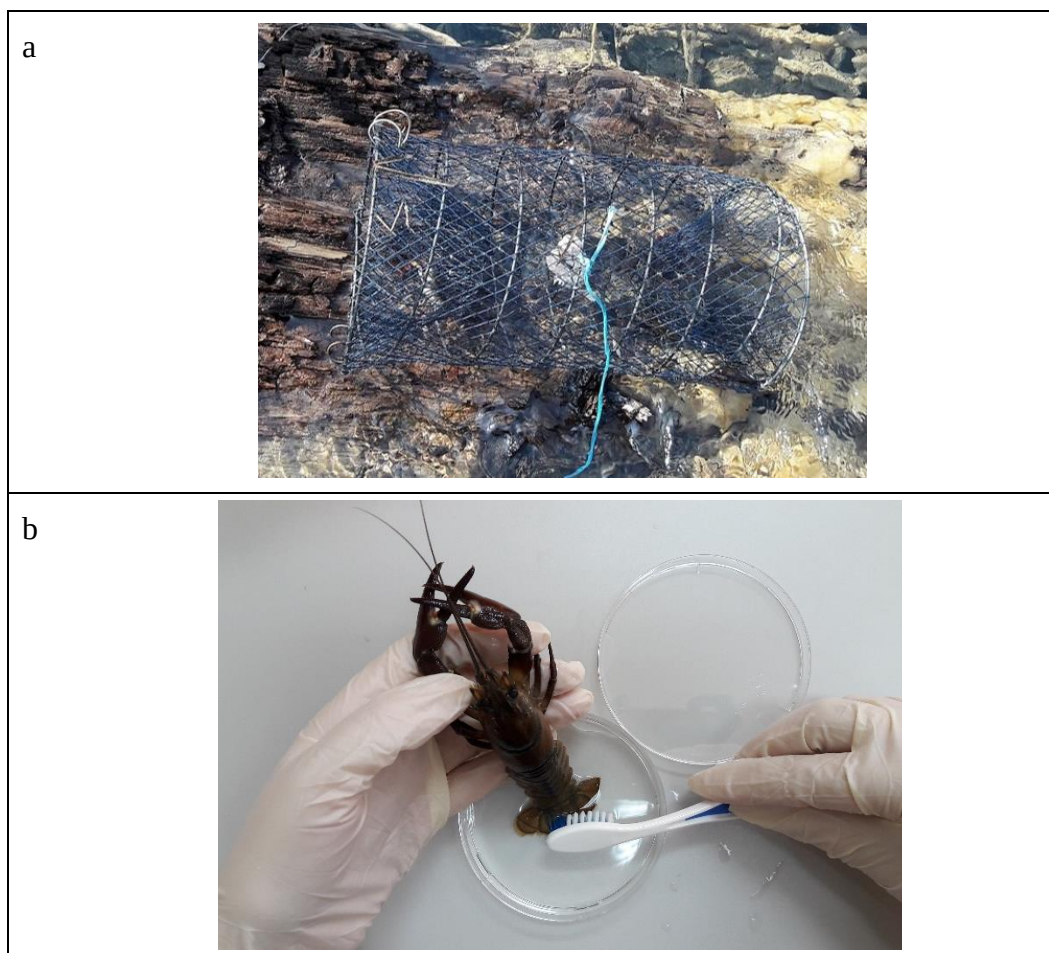
2.1. Uzorkovanje i uzgoj bakterijskih izolata

U istraživanju koristila sam dvije vrste rakova česte u akvakulturi: signalni rak (*P. leniusculus*) i uskoškari rak (*P. leptodactylus*) (Harlioglu 2008, Valipour i sur. 2017, Zahmatkesh i sur. 2019). Budući da uzgoj rakova u Hrvatskoj ne postoji, rakove sam uhvatila u prirodi koristeći Li-Ni vrše za lov rakova (Westman i sur. 1978) (Slika 2a). Izabrala sam zdrave jedinke bez vidljivih znakova bolesti: pet jedinki *P. leptodactylus* iz rijeke Mrežnice, Hrvatska (45°26'34.1"N 15°30'23.2"E) i pet jedinki *P. leniusculus* iz rijeke Korane, Hrvatska (45°24'32.9"N 15°36'41.2"E, Tablica 1). Svakoj sam jedinki izmjerila ukupnu dužina tijela i odredila spol (Tablica 1).

Tablica 1. Životinje korištene u istraživanju. M – mužjak, Ž – ženka.

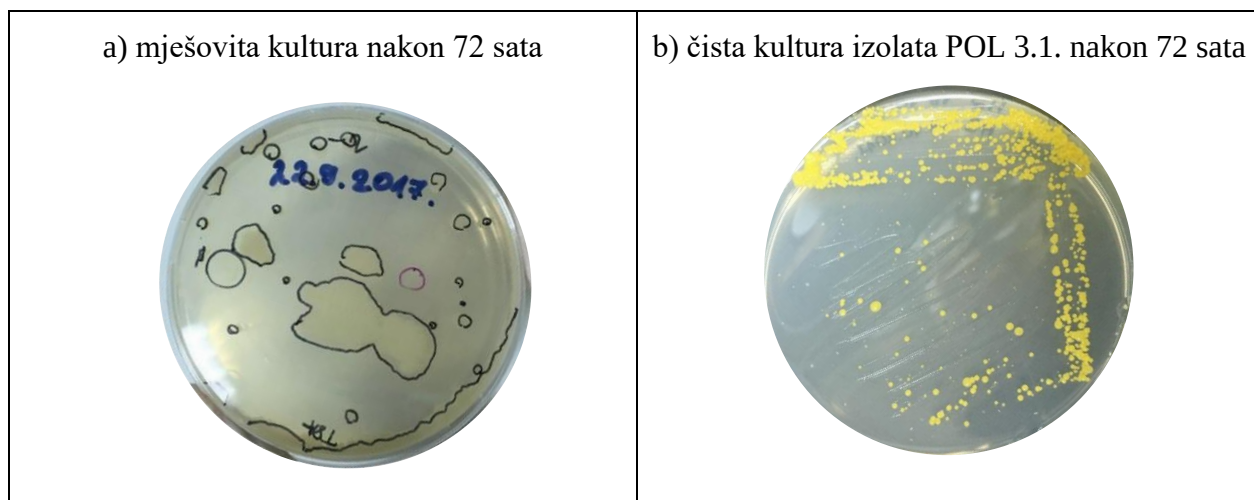
Šifra jedinke raka	Vrsta	Spol	Ukupna dužina tijela / mm
PAL1	<i>P. leniusculus</i>	Ž	93,5
PAL2		Ž	100,0
PAL3		Ž	80,0
PAL4		M	103,0
PAL5		M	98,0
POL1	<i>P. leptodactylus</i>	M	110,0
POL2		M	90,0
POL3		M	90,0
POL4		Ž	95,0
POL5		Ž	85,0

Zatim sam uzela uzorke epibiontske bakterijske zajednice s kutikule svake jedinke prema protokolu Pavić i suradnika (2020): rakove sam stavila u sterilnu Petrijevu zdjelicu, polila s 30 – 50 mL 0,1 % NaCl, 0,15 M otopine Tween i temeljito istrljala sterilnom četkicom umočenom u istu otopinu (Slika 2b).



Slika 2. Uzorkovanje jedinki: (a) terensko sakupljanje rakova Li-Ni vršama za lov rakova (Foto: I. Maguire), (b) uzimanje uzorka epibiotske bakterijske zajednice s kutikule u laboratoriju (Pavić i sur. 2020).

Pripremila sam serijska decimalna razrjeđenja dobivene suspenzije (10 x, 100 x i 1000 x) s fosfatnom puferiranom solnom otopinom (engl. *phosphate-buffer saline*, PBS) (140 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 3,81 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1,47 mM KH_2PO_4). Po 100 μL svakog razrjeđenja porijeklom od svake jedinke nacijepila sam na pojedinačnu peptonsko-glukoznu (engl. *peptone-glucose medium*, PG1) krutu hranjivu podlogu (Unestam 1965) koja je inkubirana na 18 °C. Nakon 48 sati i 72 sati, iz mješovitih kultura izabrala sam morfološki različite individualne kolonije i presađivala ih na svježe krute podloge sve dok nisam dobila čistu kulturu (Slika 3). Dobivene bakterijske izolate sastrugala sam s krute hranjive podloge, resuspendirala u 30 %-tnom glicerolu i pohranila na –20 °C do daljnjih analiza.



Slika 3. (a) primjer mješovite kulture nakon 72 sata i (b) primjer čiste kulture izolata POL 3.1. nakon 72 sata.

2.2. Taksonomska identifikacija bakterijskih izolata pomoću masene spektrometrije MALDI-TOF

Masena spektrometrija MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) brza je i pouzdana metoda za taksonomsku determinaciju pojedinačnih bakterijskih kolonija (Topić Popović i sur. 2016). MALDI-TOF MS detektira signale ribosomskih proteina bakterija koji su specifični za određenu vrstu ili rod (Lay 2001). Bakterije iz uzorka se identificiraju usporedbom dobivenih spektara s referentnim spektrima iz komercijalno dostupne baze podataka.

Za MALDI-TOF MS uzorke sam pripremila ekstrakcijom etanolom i mravljom kiselinom (Weisburg i sur. 1991). Ukratko, svježu bakterijsku koloniju svakog pojedinačnog izolata sam resuspendirala sterilnom čačalicom u 100 μ L 75 % etanola (GRAM-MOL) i centrifugirala pri 13000 x g kroz 2 min (Centrifuga Centric 200R, Domel). Nakon što sam supernatant uklonila, talog sam resuspendirala u 5 μ L 70 % mravlje kiseline (Fisher Chemical) te sam zatim dodala jednak volumen acetonitrila (Fisher Chemical). Otopinu sam centrifugirala pri 13000 x g kroz 2 min te sam 1 μ L supernatanta nanijela na pločicu za MALDI-TOF. Na svaku pločicu s uzorkom dodala sam 1 μ L MALDI matrice (10 mg/mL alfa-cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50 %-tnom

acetonitrilu i 2,5 %-tnoj trifluorooctenoj kiselini, Bruker Daltonik GmbH). Nakon još jednog sušenja na sobnoj temperaturi na zraku, snimila sam spektre svakog uzorka Microflex-om LT MALDI-TOF spektrometrom masa (Bruker Daltonics) Instituta Ruđer Bošković. Uređaj sam koristila prema uputama proizvođača, u rasponu masa od 2000 – 20000 Da. Snimljene masene spektre sam obradila MALDI Biotyper 3.0 softverom (Bruker Daltonics, Njemačka) te sam maseni spektar svakog izolata usporedila s referentnim spektrima iz baze.

Sličnost spektra izolata određenom referentnom spektru u bazi numerički se ocjenjuje u rasponu vrijednosti od 0,000 do 3,000 što nam govori kolika je vjerojatnost točne identifikacije izolata (Tablica 2). Rezultati su rangirani prema sličnosti s referentnim spektrima u bazi. Svakom izolatu dodjeljuje se jedna od kategorija pouzdanosti rezultata: A, B ili C. Kategorija A govori da je izolat određen do razine vrste te se dodjeljuje kada najbolje rangirana vrsta ima rezultat između 2,000 i 3,000 (++ ili +++, zelena vrijednost u tablici, Tablica 3). Kategorija B govori da je izolat točno određen do razine roda. Također izolat dobiva kategoriju B kada najbolje rangirana vrsta ima rezultat „zelene“ vrijednosti, ali se kod prva dva „zelena“ rezultata ne podudara vrsta već se samo podudara rod, što ukazuje da se izolat može odrediti samo do razine roda. Podudarnost na razini roda označena je žutom bojom u tablici (Tablica 3). Kategorija C upućuje na nepouzdan rezultat te se spektri izolata s referentnim spektrima ne podudaraju ni na razini vrste ni na razini roda (Tablica 3).

Tablica 2. Primjeri rezultata MALDI-TOF MS determinacije izolata POL 5.2. Rezultati upućuju na to da se radi o vrsti *Acinetobacter johnsonii* (kategorija pouzdanosti A).

Redoslijed	Podudaranje spektra	Vrijednost rezultata	NCBI identifikacijski broj
1(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> V773 MCRF	2,240	40214
2(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> LMG 1326 LMG	2,231	40214
3(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 10036669_102 USH	2,136	40214
4(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> DSM 6963T HAM	2,110	40214
5(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> LMG 983 LMG	2,079	40214
6(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> LMG 1005 LMG	2,063	40214
7(++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 2_1 TUB	2,050	40214
8(+)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 31 PIM	1,924	40214
9(+)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> DSM 6963T DSM	1,878	40214
10(-)	<i>Acinetobacter tandoii</i> DSM 14970T HAM	1,488	202954

Tablica 3. Značenje dodijeljenih vrijednosti za determinaciju izolata.

Vrijednost	Značenje vrijednosti	Oznaka
2,300 – 3,000	visoka vjerojatnost determinacije vrste	(+++)
2,000 – 2,299	determinacija roda, vjerojatna determinacija vrste	(++)
1,700 – 1,999	vjerojatna determinacija roda	(+)
0,000 – 1,699	nepouzdana determinacija	(-)

2.3. Taksonomska identifikacija bakterijskih izolata pomoću sekvenciranja gena 16S rRNA

Za determinaciju izolata sekvenciranjem gena 16S rRNA provodi se lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) kojom se umnoži fragment gena koji kodira za 16S rRNA. Dobivenom fragmentu DNA sekvenciranjem se odredi slijed nukleotida koji se uspoređuje sa nukleotidnim sljedovima poznatih mikroorganizama u javno-dostupnim bazama podataka.

Za sekvenciranje gena 16S rRNA, sterilnom čačalicom uzela sam malu količinu pojedinačne bakterijske kolonije, prenijela u 200 µL deionizirane vode (Lonza) te sam stanice termički lizirala 15 min pri 95 °C. Dobivenu otopinu koristila sam kao kalup u PCR reakciji u kojoj je umnožena gotovo cijela dužina 16S rRNA sekvence svakog bakterijskog izolata koristeći univerzalne bakterijske oligonukleotidne početnice (engl. *primers*) 27F i 1492R (Lane 1991).

Sastav reakcijske smjese naveden je u Tablici 4. Kao negativnu kontrolu koristila sam destiliranu vodu.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za PCR.

DNA kalup	1 µL
Reakcijska smjesa za PCR EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA)	12,5 µL
10 µM uzvodna početnica 27F (konačna koncentracija 0,2 µM)	1,25 µL
10 µM nizvodna početnica 1492R (konačna koncentracija 0,2 µM)	1,25 µL
dH ₂ O (Lonza)	9 µL
Ukupno	25 µL

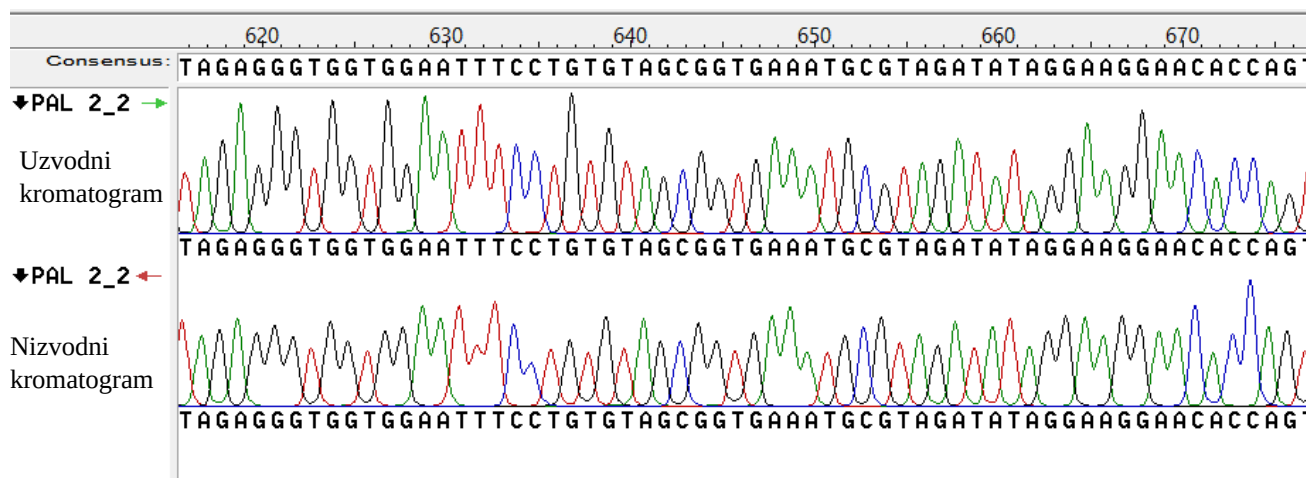
PCR reakciju sam prevela u uređaju Alpha Cycler 1 (PCRmax) u uvjetima navedenim u Tablici 5. Uspješnost PCR reakcije provjerila sam elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu. Elektroforeza u agaroznom gelu je metoda kojom se fragmenti nukleinskih kiselina razdvajaju prema veličini pod utjecajem istosmjernog električnog polja (Lee i sur. 2012). Agarozu (Sigma-

Aldrich) sam otopila u Tris-acetat-EDTA puferu (TAE) (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM etilen diamin tetraoctena kiselina, engl. *ethylene diamine tetraacetic acid*, EDTA) i dodala joj boju GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) da bi vizualizirala DNA fragmente. DNA molekule razdvojene su u električnom polju napona 100 V u TAE puferu kroz 45 minuta te sam ih nakon toga vizualizirala pod UV-svjetlom (UVIpure, UVITEC Cambridge) i fotografirala. Za provjeru veličine dobivenih fragmenata koristila sam molekularni biljeg DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich).

Tablica 5. Uvjeti provedene lančane reakcije polimerazom.

		Vrijeme	Temperatura
28 ciklusa	Početna denaturacija	5 min	96 °C
	Denaturacija lanaca	1 min	94 °C
	Vezanje početnica na kalup	1 min	55 °C
	Sinteza komplementarnih lanaca	1,5 min	72 °C
	Završno produživanje lanaca	10 min	72 °C

Pročišćavanje PCR produkata i određivanje njihove primarne strukture sekvenciranjem Sangerovom dideoksi metodom provedeno je u servisu Macrogen, Inc. (Švicarska) koristeći gore navedene početnice. Kromatograme sam analizirala i uredila u programu GeneStudio, Inc., uključujući uklanjanje manje kvalitetnih dijelova kromatograma te preklapanje uzvodnih i nizvodnih kromatograma istog izolata (Slika 4). Programom Blastn (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) usporedila sam sekvence svakog izolata s bazom podataka 16S rRNA sekvenci (Bacteria and Archea) koristeći zadane postavke. Sekvence gena 16S rRNA pohranila sam u GenBank bazu pod brojevima MN823086 - MN823133 (Prilog 1).



Slika 4. Primjer preklapanja dva kromatograma izolata PAL 2.2. u programu GeneStudio. U prvom redu se nalazi uzvodni kromatogram, a u drugom nizvodni.

2.4. Izrada filogenetskog stabla

Višestruko poravnanje sekvenci izradila sam u programu MAFFT (Katoh i Standley 2013), a zatim uredila u programima SeaView (Gouy i sur. 2010) i BioEdit (Hall i sur. 2011). Konačno višestruko poravnanje sekvenci bilo je dugo 1041 nukleotid. Upotrebom programa Mr. Bayes provela sam filogenetsku analizu metodom Bayesian-ovog zaključivanja s 1 000 000 iteracija (Ronquist i Huelsenbeck 2003), a dobiveno filogenetsko stablo grafički sam uredila uz pomoć programa iTOL (Letunic i Bork 2016).

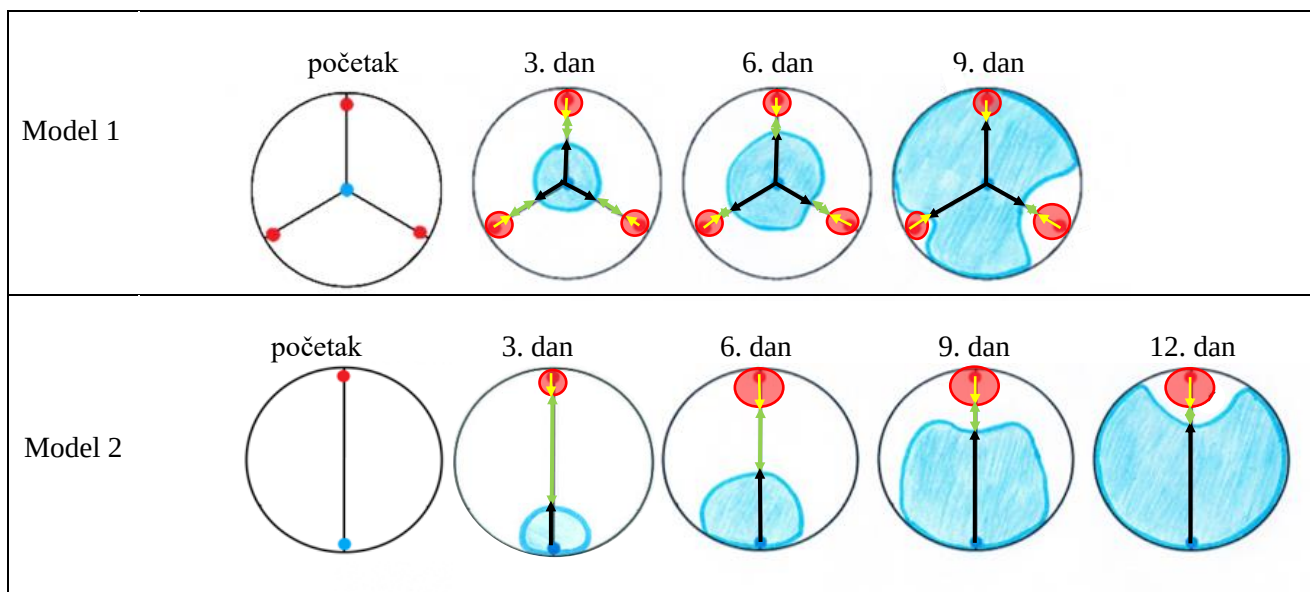
2.5. Testovi inhibicije (engl. *plate inhibition assay*)

Za utvrđivanje potencijala sakupljenih bakterijskih izolata da inhibiraju rast micelija *A. astaci*, koristila sam testove inhibicije *in vitro*, slijedeći ranije opisane protokole (Lawrence i sur. 2017, Buisson i sur. 2019), uz određene modifikacije. Ovisno o veličini kolonije različitih izolata, testove inhibicije provela sam u dvije varijacije. Za bakterije s manjom kolonijom istovremeno sam na Petrijevu zdjelicu s krutom hranjivom podlogom nacijepila tri izolata (Model 1), dok sam izolate s većom kolonijom (koja bi mogla ometati rast drugih izolata kad bi se nalazili na istoj ploči) nacijepila po jedan (Model 2) (Slika 5). Micelij *A. astaci* nacijepila sam na sredinu ploče kod Modela 1, odnosno na rub ploče kod Modela 2 (Slika 5). Dužina testa ovisila je o vremenu

potrebno da micelij patogena *A. astaci* dosegne vanjski rub Petrijeve zdjelice: 9 dana / 18 °C za Model 1, i 12 dana / 18 °C za Model 2 (Slika 5). Sve sam izolate testirala u triplikatima.

Ukratko, 5 µL suspenzije bakterija u glicerolu inokulirala sam na sterilni kružni komadić filter papira (d = 5 mm) te sam filter papir postavila na krutu hranjivu podlogu PG1 u Petrijevoj zdjelici. Nakon tri ili četiri dana, kada je bakterijska kolonija prerasla disk filter papira dodala sam kružni komadić PG1 krute hranjive podloge obrasle micelijem patogena *A. astaci* (d = 5 mm). Koristila sam *A. astaci* Psi (UEF-T16B) izoliran sa signalnog raka iz jezera Tahoe, SAD (dobiven od Jenny Makkonen, Sveučilište Istočne Finske). Tijekom inkubacije svaka tri dana mjerila sam sljedeće varijable: (i) radijalni rast micelija *A. astaci* u mm (veličina micelija, engl. *mycelium size*, crna strelica na Slici 5), (ii) rast bakterijske kolonije u mm (veličina bakterije, engl. *bacterial size*, žuta strelica na Slici 5), (iii) udaljenost između bakterijskog izolata i ruba micelija *A. astaci* u mm (udaljenost, engl. *distance*, zelena strelica na Slici 5). Rezultate radijalnog rasta *A. astaci* u prisutnosti određenog izolata usporedila sam s vrijednostima negativne kontrole tj. brzinom radijalnog rasta micelija *A. astaci* bez bakterije prisutne na ploči.

Temeljem ovih mjerenja, bakterijske izolate sam klasificirala s obzirom na njihov potencijal da uspore rast micelija *A. astaci* u dvije kategorije: 1) inhibitori i 2) ne-inhibitori. Razvijenu klasifikacijsku proceduru opisala sam u poglavlju 3.2. Rezultata.



Slika 5. Shema Modela 1 i Modela 2 testova inhibicije. Mjeren je radijalni rast micelija *Aphanomyces astaci* (plavo područje) u mm (veličina micelija, engl. *mycelium size*, crne strelice), rast bakterijske kolonije (crveno područje) u mm (veličina bakterije, engl. *bacterial size*, žute strelice) kao i udaljenost između bakterijskog izolata i ruba micelija patogena *A. astaci* u mm (udaljenost, engl. *distance*, zelene strelice) nakon 3, 6, 9 (Model 1) i 12 (Model 2) dana na 18 °C.

2.6. Statistička analiza

Razlike u sastavu izolata sakupljenih s rakova *P. leptodactylus* i *P. leniusculus* (tj. razlike u broju izolata unutar svakog pronađenog bakterijskog roda za *P. leptodactylus* i *P. leniusculus*) sam analizirala, s obzirom da dobiveni podaci nisu imali normalnu distribuciju, korištenjem ne-parametrijskog Mann-Whitney U testa u programu Statistica 13.3 (StatSoft).

Kako bi odredila značaj svake mjerene varijable tj. rasta micelija *A. astaci*, rasta bakterijskog izolata i udaljenosti između micelija *A. astaci* i bakterijske kolonije, na odvajanje kategorija inhibitora i ne-inhibitora, koristila sam metodu glavnih komponenta (engl. *principal components analysis*, PCA). PCA je vrsta linearne transformacije izvornog skupa podataka s mnogo varijabli, pri čemu se izvorne varijable pretvaraju u manji broj glavnih komponenti (engl. *principal components*, PC). Linearnom transformacijom izvorni skup podataka se transformira u novi koordinatni sustav na takav način da prva koordinata objašnjava najviše varijance, dok svaka sljedeća koordinata objašnjava sve manji postotak varijance. Glavne komponente nadalje postaju

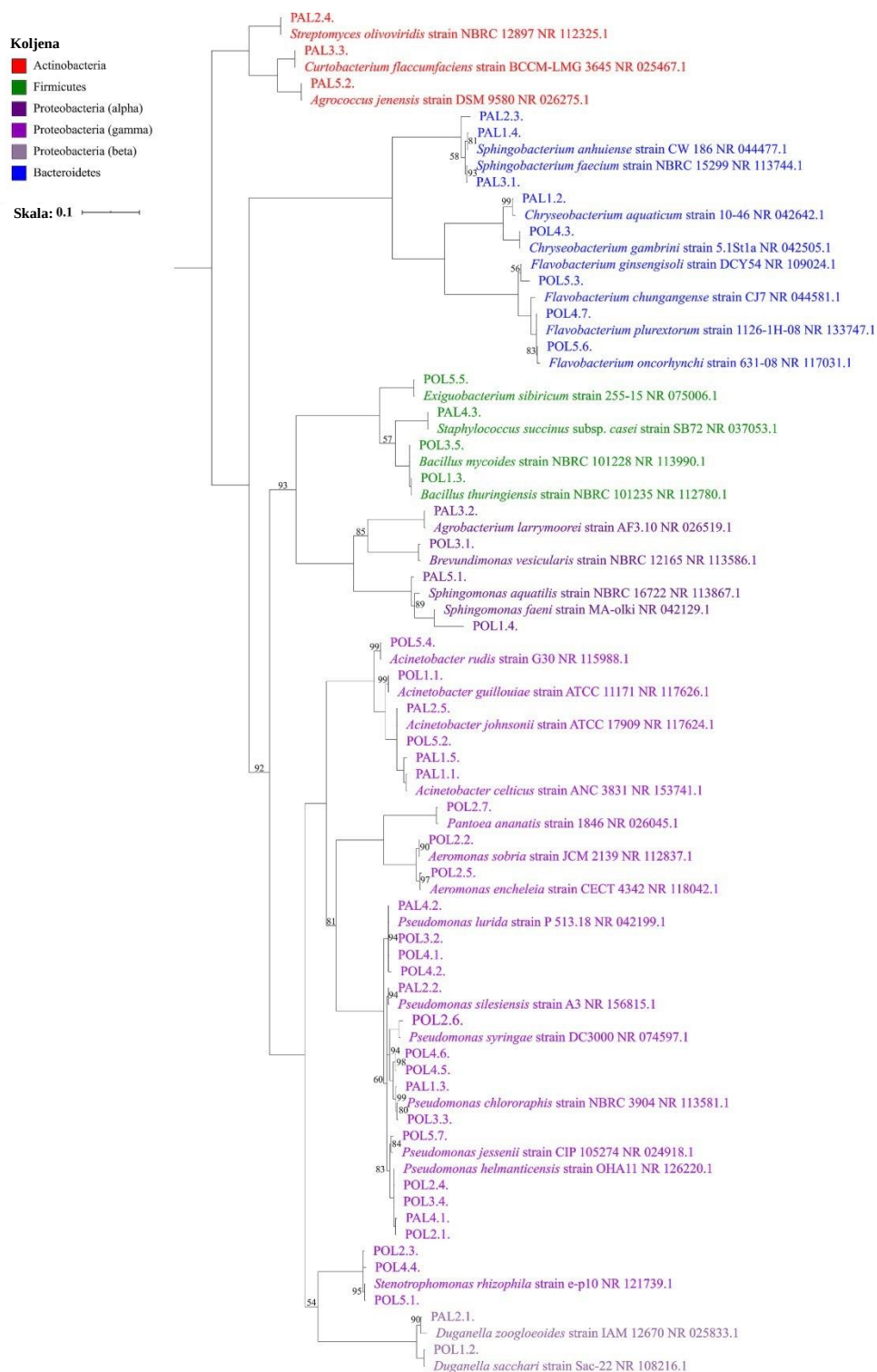
temeljna struktura podataka povećavajući preciznost klasifikacijskog modela i projicirajući razdvajanje grupa unutar podataka (Jolliffe 2002). PCA analizu sam provela koristeći vrijednosti medijana replika za svaki izolat ($n \geq 3$) za sljedeće varijable: (i) radijus micelija *A. astaci* na zadnji dan testa u mm (veličina micelija) (ii) radijus bakterijskih izolata na zadnji dan testa u mm (veličina bakterije), i (iii) udaljenosti između bakterijskog izolata i ruba micelija *A. astaci* na zadnji dan testa u mm (udaljenost) (vrijednosti medijana za svaku varijablu svakog izolata dostupni su u Prilogu 1). PCA sam provela odvojeno za Model 1 i Model 2 zbog razlike u njihovom trajanju (9, odnosno 12 dana). Analizu sam provela koristeći statistički paket R v. 3.2.0 (R Core team 2017). Za grafički prikaz rezultata koristila sam “ggbiplot” paket (Vu 2011). Kako bi bila testirana značajnost utjecaja svake varijable na razdvajanje izolata na inhibitore i ne-inhibitore, na PCA rezultatima koristila sam generalizirani linearni model (engl. *generalized linear model*, glm) s aov() funkcijom (koristeći osnovni R paket). Rezultat je smatran statistički značajnim ukoliko je $p < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Identifikacija bakterijskih izolata s kutikule rakova *P. leptodactylus* i *P. leniusculus*

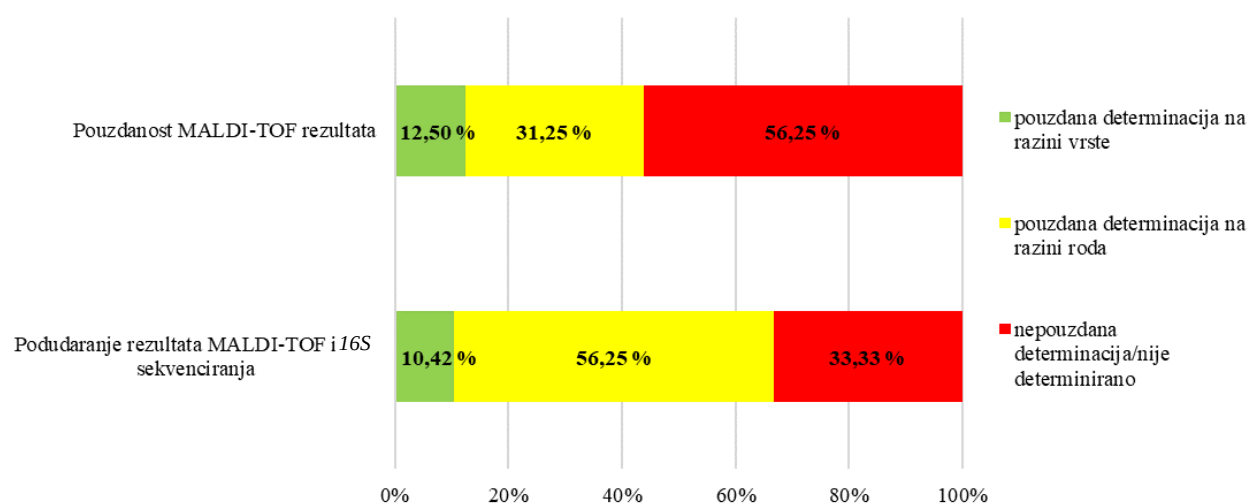
U ovom je istraživanju izolirano ukupno 48 izolata iz uzoraka epibiotskih bakterijskih zajednica kutikule s ukupno pet jedinki *P. leptodactylus* i pet jedinki *P. leniusculus*. Od toga je 30 izolata bilo s vrste *P. leptodactylus* i 18 s *P. leniusculus*. Taksonomska identifikacija izolata, provedena sekvenciranjem gena 16S rRNA s naknadnom filogenetskom analizom (Slika 6), pokazala je da su sakupljeni izolati pripadali koljenima Proteobacteria (33/48 izolata, 68,75 %), Bacteroidetes (8/48 izolata, 16,70 %), Firmicutes (4/48 izolata, 8,30 %) i Actinobacteria (3/48 izolata, 6,25 %). Najčešći rodovi nađeni na obje vrste raka bili su *Pseudomonas* (14/48 izolata, 29,17 %), *Acinetobacter* (6/48 izolata, 12,50 %) i *Flavobacterium* (4/48 izolata, 8,34 %, Tablica 6, Prilog 1).

Uspoređen je broj izolata unutar detektiranih bakterijskih rodova između zavičajne vrste *P. leptodactylus* i invazivne vrste *P. leniusculus*, ali nije nađena statistički značajna razlika ($U = 145,5$, $N_1 = 18$, $N_2 = 30$, $p > 0,05$).



Slika 6. Filogenetsko stablo bakterijskih izolata s kutikule *Pontastacus leptodactylus* (POL) i *Pacifastacus leniusculus* (PAL) te referentnim 16S rRNA sekvencama sojeva iz baze podataka NCBI. Podrške grananjima u obliku Bayesovih posteriornih vjerojatnosti prikazane su na ograncima ako su bile niže od 100 %.

Identifikacija izolata masenom spektrometrijom MALDI-TOF pokazala se znatno lošija nego identifikacija sekvenciranjem gena *16S* rRNA. Naime, niti jedan izolat nije dobio MALDI-TOF MS vrijednost $> 2,30$ (*pouzdana* identifikacija do razine vrste), dok je samo 6/48 (12,5 %) dobilo MALDI-TOF MS vrijednosti između 2,00 i 2,29 (*vjerojatna* identifikacija na razini vrste) (Slika 7, Prilog 1). Većina izolata dobila je vrijednost između 1,70 i 1,99 (*vjerojatna* determinacija na razini roda: 15/48, 31,25 %) ili vrijednost $< 1,70$ (*nepouzdana* determinacija: 27/48, 56,25 %) (Slika 7). Usprkos tome, u 68,75 % slučajeva identifikacija s obje metode se podudarala na razini vrste ili roda. (Slika 7).



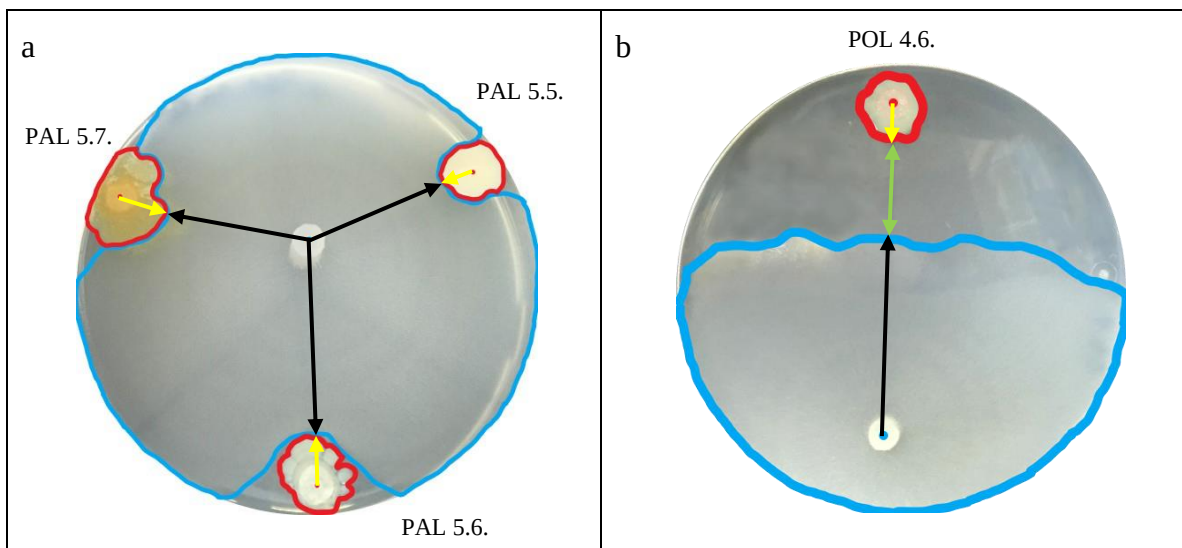
Slika 7. Rezultati identifikacije izolata s račje kutikule masenom spektrometrijom MALDI-TOF (gornji red) i usporedba s identifikacijom *16S* rRNA sekvenciranjem (donji red).

3.2. Identifikacija bakterijskih izolata koji pokazuju potencijal za inhibiciju rasta micelija patogena *A. astaci*

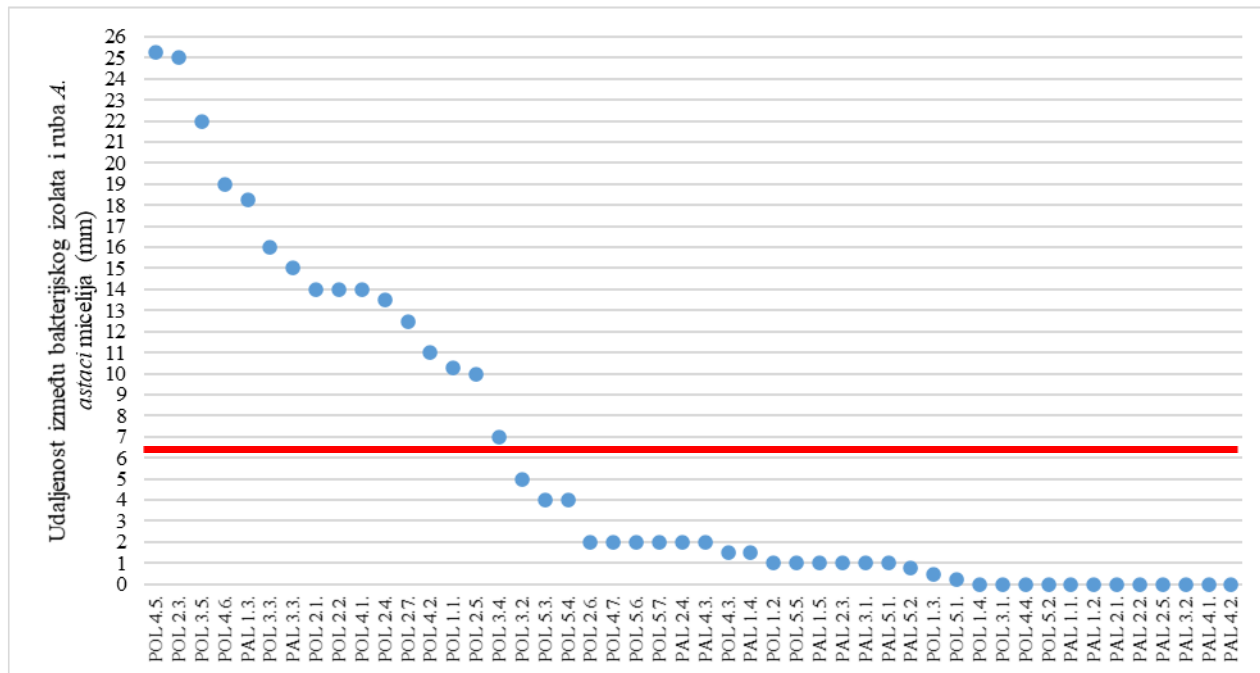
Korištenjem testova inhibicije testiran je potencijal svih 48 bakterijskih izolata s kutikule rakova za inhibiciju rasta patogena *A. astaci* te je utvrđeno da se u prisutnosti nekih izolata rast micelija patogena *A. astaci* usporio ili zaustavio (16 od ukupno 48 izolata, Slika 8, Tablica 6).

Dobiveni rezultati testova inhibicije omogućili su grupiranje bakterijskih izolata s obzirom na njihov potencijal zaustavljanja ili usporavanja rasta micelija *A. astaci*. Bakterijski izolati razvrstani su u dvije skupine dobivene na temelju udaljenosti između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija patogena *A. astaci* na zadnji dan testa: i) inhibitori – udaljenost > 6 mm i ii) ne-inhibitori –

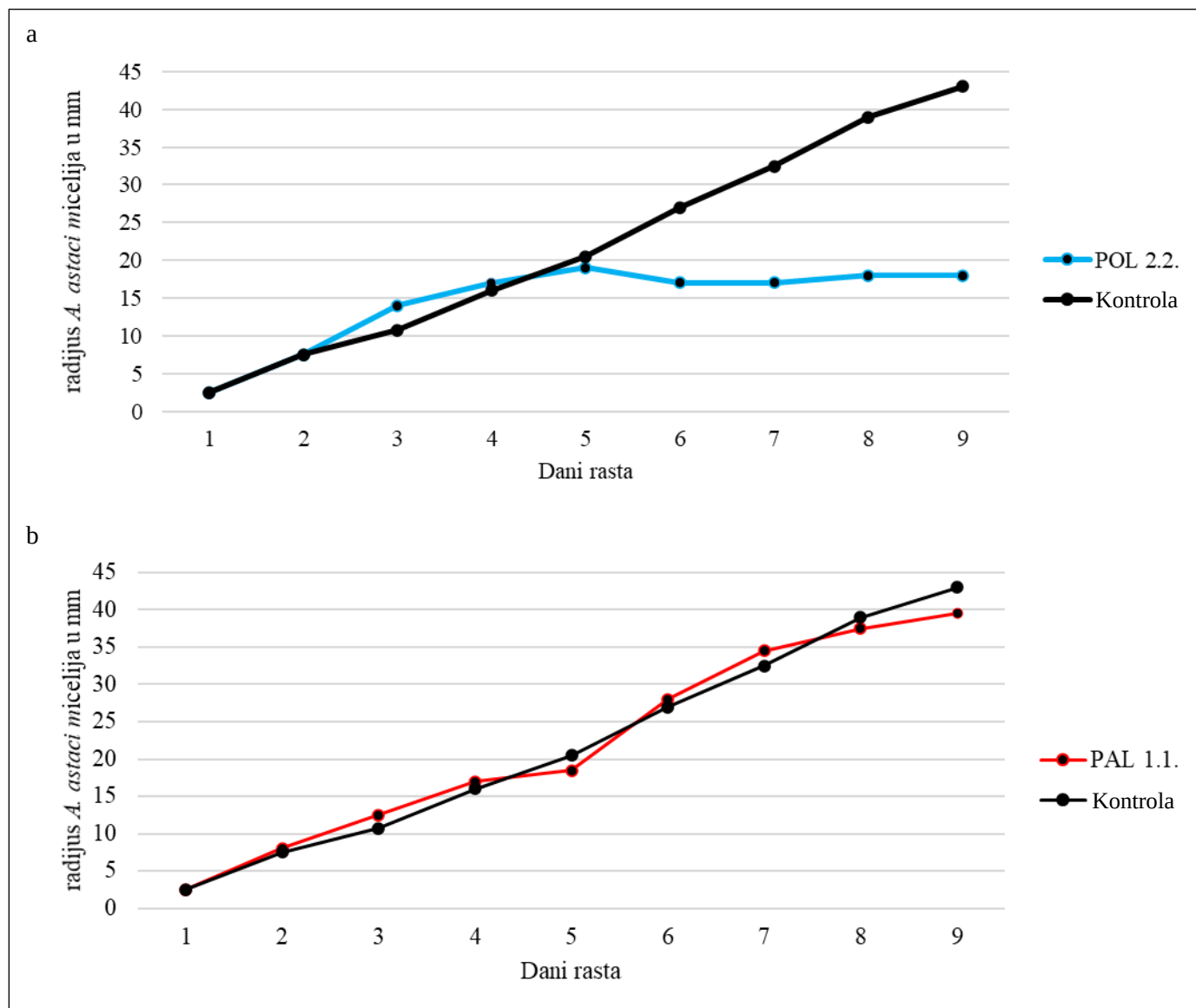
udaljenost < 6 mm (Slike 8 i 9). Primjerice, u prisutnosti izolata *Aeromonas sobria* POL 2.2 rast micelija *A. astaci* potpuno je prestao petog dana testa inhibicije što ukazuje da je izolat inhibitor (Slika 10a), dok kod izolata *Acinetobacter celticus* PAL 1.1. rast micelija nije bio ometan niti usporen što ukazuje da izolat nije inhibitor (Slika 10b). Prestanak rasta micelija devetog dana testa posljedica je direktnog kontakta micelija patogena i ruba bakterijske kolonije.



Slika 8. Primjeri testova inhibicije zadnjeg dana mjerenja za: (a) Model 1 (ne-inhibitori: PAL 5.5., PAL 5.6. i PAL 5.7.) i (b) Model 2 (inhibitor: POL 4.6.). Na slici je označen radijalni rast micelija *Aphanomyces astaci* (plavo područje), mjeren u mm duž crnih strelica (veličina micelija), rast bakterijske kolonije (crveno područje), mjeren u mm duž žutih strelica (veličina bakterije), kao i udaljenost između bakterijskog izolata i ruba *A. astaci* micelija, mjeren u mm duž zelenih strelica (udaljenost).



Slika 9. Udaljenost između bakterijskog izolata i ruba micelija *Aphanomyces astaci* nakon što je rast micelija stao. Crvena linija, postavljena na vrijednost udaljenosti od 6 mm, pokazuje razdvajanje između dvije grupe izolata: inhibitori (udaljenost > 6 mm) i ne-inhibitori (udaljenost < 6 mm). Rezultati su prikazani kao medijani vrijednosti udaljenosti ($n \geq 3$).



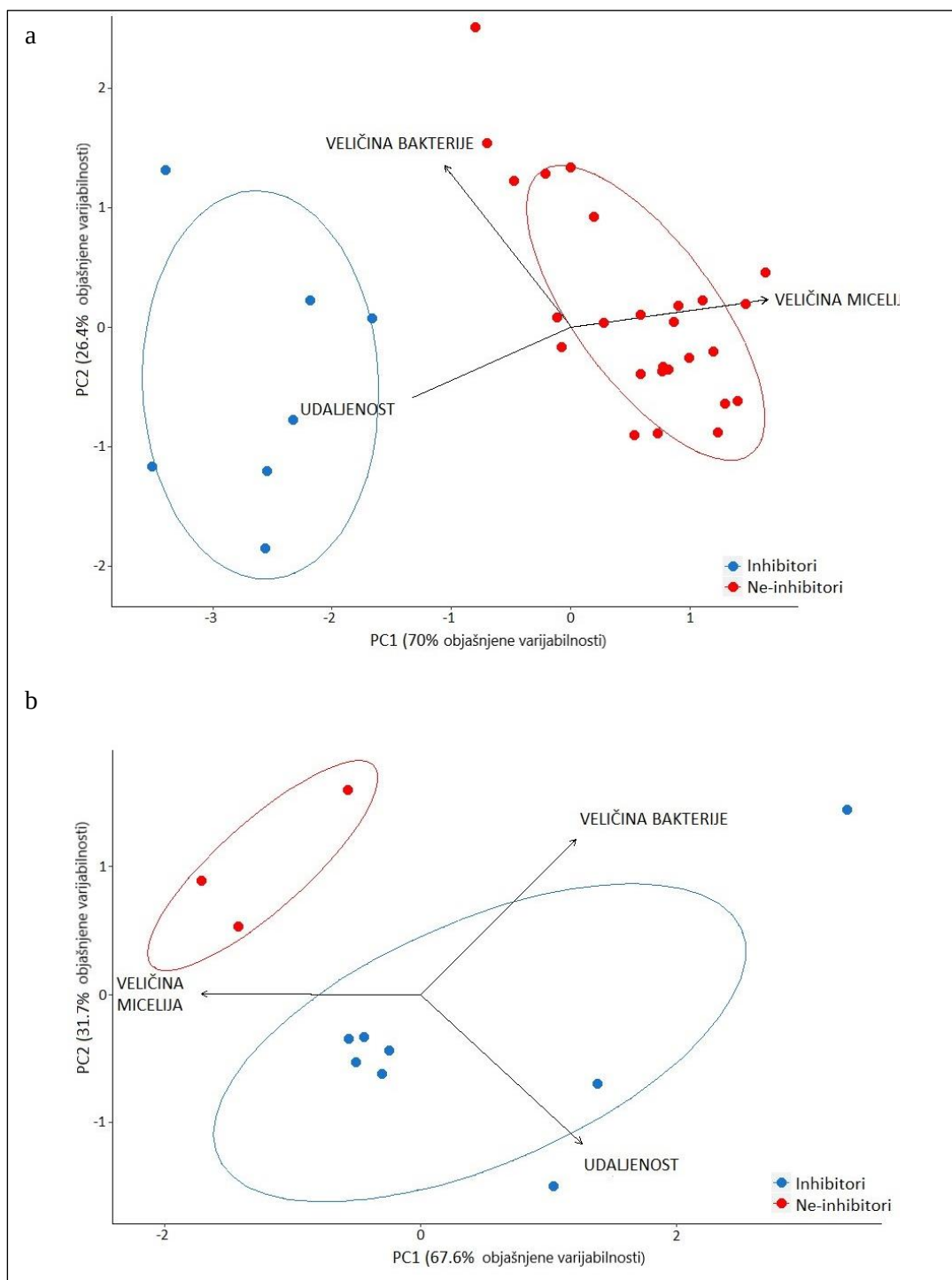
Slika 10. Primjeri rasta micelija patogena *Aphanomyces astaci* u prisutnosti bakterijskih inhibitora i ne-inhibitora porijeklom s račje kutikule korištenjem Modela 1: *Aeromonas sobria* izolat POL 2.2. s kutikule uskoškarog raka, *Pontastacus leptodactylus* – inhibitor (a), *Acinetobacter celticus* izolat PAL 1.1. s kutikule signalnog raka, *Pacifastacus leniusculus* – ne-inhibitor (b). Kontrola – rast micelija patogena *A. astaci* u odsutnosti bakterijske kolonije. Točke na grafu predstavljaju medijan radijusa micelija *A. astaci* ($n \geq 3$). ▲ dan kada je micelij *A. astaci* prestao rasti; ◆ dan kada su bakterijski izolat i micelij *A. astaci* došli u kontakt.

Koristeći razvijenu klasifikaciju, 33,33 % (16/48) izolata svrstano je u skupinu inhibitora, a 66,67 % (32/48) u skupinu ne-inhibitora (Tablica 6). Većina izolata iz skupine inhibitora pripada rodu *Pseudomonas* (9 od 16 izolata inhibitora, 56,25 %), zatim *Aeromonas* (2 od 16 izolata inhibitora, 12,50 %), dok su rodovi *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Curtobacterium* i *Pantoea* bili jednako zastupljeni (1 od 16 inhibitora, 6,25 % svaki, Tablica 6). Neki od najjačih inhibitora (odnosno onih čija je udaljenost od ruba micelija *A. astaci* bila najveća) bili su *Pseudomonas chlororaphis* POL 4.5., *Curtobacterium flaccumfaciens* PAL 3.3. i *Aeromonas sobria* POL 2.2. (medijan udaljenosti 25,25 mm, 15 mm i 14 mm). U nekim slučajevima (primjerice *Pseudomonas helmanticensis*, *P. lurida*, *Stenotrophomonas rhizophila*), izolati identificirani kao ista vrsta 16S rRNA metodom pokazali su različit inhibicijski potencijal (Tablica 6, Prilog 1).

Tablica 6. Bakterijski izolati sakupljeni s kutikula rakova *Pontastacus leptodactylus* (POL) i *Pacifastacus leniusculus* (PAL) i klasificirani prema njihovoj taksonomskoj pripadnosti i potencijalu da inhibiraju micelij patogena *Aphanomyces astaci* (inhibitori i ne-inhibitori).

Rod	Vrsta (16S rRNA identifikacija)	Vrsta raka	Broj inhibitora	Broj ne- inhibitora	Broj inhibitora / ukupan broj izolata
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. chlororaphis</i>	POL, PAL	3	0	9/14 (64 %)
	<i>P. helmanticensis</i>	POL, PAL	4	1	
	<i>P. jessenii</i>	POL	0	1	
	<i>P. lurida</i>	POL	2	1	
	<i>P. silesiensis</i>	PAL	0	1	
	<i>P. syringae</i>	POL	0	1	
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. celticus</i>	PAL	0	2	1/6 (17 %)
	<i>A. guillouiae</i>	POL	1	0	
	<i>A. johnsonii</i>	POL, PAL	0	2	
	<i>A. rudis</i>	POL	0	1	
<i>Flavobacterium</i>	<i>F. chungangense</i>	PAL	0	1	0/4 (0 %)
	<i>F. ginsengiterrae</i>	POL	0	1	
	<i>F. oncorhynchi</i>	POL	0	1	
	<i>F. plurextorum</i>	POL	0	1	
<i>Sphingobacterium</i>	<i>S. kitahiroshimense</i>	PAL	0	1	0/3 (0 %)
	<i>S. faecium</i>	PAL	0	2	
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. rhizophila</i>	POL	1	2	1/3 (33 %)
<i>Chryseobacterium</i>	<i>C. aquaticum</i>	PAL	0	1	0/2 (0 %)
	<i>C. gambrini</i>	POL	0	1	
<i>Duganella</i>	<i>D. sacchari</i>	POL	0	1	0/2 (0 %)
	<i>D. zoogloeoides</i>	PAL	0	1	
<i>Sphingomonas</i>	<i>S. aquatilis</i>	PAL	0	1	0/2 (0 %)
	<i>S. faeni</i>	POL	0	1	
<i>Bacillus</i>	<i>B. mycoides</i>	POL	1	0	1/2 (50 %)
	<i>B. thuringiensis</i>	POL	0	1	
<i>Aeromonas</i>	<i>A. encheleia</i>	POL	1	0	2/2 (100 %)
	<i>A. sobria</i>	POL	1	0	
<i>Streptomyces</i>	<i>S. olivoviridis</i>	PAL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. larrymoorei</i>	PAL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Curtobacterium</i>	<i>C. flaccumfaciens</i>	PAL	1	0	1/1 (100 %)
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. succinus</i>	PAL	0	1	0/1 (100 %)
<i>Agrococcus</i>	<i>A. jenensis</i>	PAL	0	1	0/1 (100 %)
<i>Pantoea</i>	<i>P. ananatis</i>	POL	1	0	1/1 (100 %)
<i>Brevundimonas</i>	<i>B. vesicularis</i>	POL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. sibiricum</i>	POL	0	1	0/1 (0 %)
Ukupno			16	32	48

Nadalje, za bolje razumijevanje razdvajanja izolata u skupine inhibitora i ne-inhibitora primijenjena je PCA analiza (Slika 11). Rezultati PCA analize za Model 1 i Model 2 bili su slični. PCA rezultati za Model 1 pokazali su da dvije glavne komponente cjelokupnog seta podataka objašnjavaju 96,4 % ukupne varijabilnosti, prva objašnjava 70 % , a druga 26,4%. PCA analiza za Model 2 pokazuje da dvije glavne komponente cjelokupnog seta podataka objašnjavaju 99,3 % ukupne varijabilnosti, prva komponenta objašnjava 67,6 %, a druga 31,7 %. Uz to, vektori komponentata (Prilog 2) na oba modela pokazali su da su sve tri analizirane varijable, odnosno veličina micelija (engl. *mycelium size*), veličina bakterije (engl. *bacterial size*) i udaljenost (engl. *distance*), podjednako doprinijele razdvajanju na inhibitore i ne-inhitore (grafički prikazano crnim strelicama na Slici 11). Shodno tome, rezultati glm analize (generalizirani linearni model), provedenim na oba modela (Prilog 3), pokazali su značajnu razliku između skupine inhibitora i ne-inhibitora ($p < 0,05$) prema sve tri varijable osim prema radijusu bakterijskih izolata u Modelu 2. Očekivano, u prisustvu snažnijih inhibitora radijus micelija patogena *A. astaci* bio je manji, a udaljenost između bakterijskog izolata i ruba micelija *A. astaci* veća, nego u prisustvu bakterijskih izolata iz kategorije ne-inhibitora. Također, jači inhibitori su u pravilu imali veće kolonije, ali te razlike nisu bile značajne u Modelu 2.



Slika 11. PCA analiza bakterijskih izolata za Model 1 (a) i Model 2 (b) pokazuje kako tri promatrane varijable, odnosno veličina micelija, veličina bakterije i udaljenost, utječu na razdvajanje izolata u skupine inhibitora (plave točke) i ne-inhibitora (crvene točke). Varijable su prikazane crnim strelicama čija dužina ukazuje na utjecaj određene varijable. Oko klastera inhibitora odnosno ne-inhibitora naznačene su elipse 95 %-tne pouzdanost.

4. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje koje je identificiralo bakterijske izolate s kutikule slatkovodnih deseteronožnih rakova koji pokazuju inhibicijski potencijal prema oomicetnom patogenu *A. astaci*, koji izrazito negativno utječe na populacije europskih zavičajnih rakova i astacikulturu (Evans i Edgerton 2001, Harlioglu 2008, Souty-Grosset i Reynolds 2009). Postojeća istraživanja bakterija koje pokazuju antagonističku aktivnost prema oomicetnim patogenima većinom su bila fokusirana na biljne patogene oomicete važne u poljoprivredi iz rodova *Phytophthora* (Timmusk i sur. 2009, Axel i sur. 2012, De Vrieze i sur. 2015, Hunziker i sur. 2015, Chen i sur. 2016, Khalaf i Raizada 2018, Wagner i sur. 2018), *Plasmopara* (Compant i sur. 2013) i *Pythium* (Timmusk i sur. 2009, Cawoy i sur. 2014, Ossowicki i sur. 2017, Khalaf i Raizada 2018, Wagner i sur. 2018). Što se tiče životinjskih oomicetnih patogena, u nekoliko su istraživanja identificirane bakterije koje inhibiraju rast patogena iz roda *Saprolegnia* koji uzrokuje velike gubitke u populacijama riba i vodozemaca (Bly i sur. 1997, Lategan i Gibson 2003, Carbajal-González i sur. 2011, Liu i sur. 2014, Liu i sur. 2015).

Istraživanja bakterijskih zajednica kutikule slatkovodnih deseteronožnih rakova su malobrojna (Topić Popović i sur. 2014, Skelton i sur. 2017) pa ovo istraživanje predstavlja vrijedan doprinos u tom području. U jedinom postojećem istraživanju u kojem su uzgojeni bakterijski izolati podrijetlom s kutikule rakova *P. leptodactylus* i *A. astacus* (ali i s područja usta, škrga, želuca, hepatopankreasa i iz crijeva) korištena je masena spektrometrija MALDI-TOF za identifikaciju izolata (Topić Popović i sur. 2014). Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio identificirati bakterijske izolate, osim sekvenciranjem gena *16S* rRNA kao zlatnim standardom u identifikaciji bakterija, i MALDI-TOF MS metodom (Yarza i sur. 2008). MALDI-TOF MS bazira se na usporedbi spektara ribosomskih proteina izolata i referentnih uzoraka u bazi podataka (Lavigne i sur. 2013, Singhal i sur. 2015). Ako se odgovarajuće reference nalaze u bazi podataka, MALDI-TOF MS ima prednosti nad sekvenciranjem gena *16S* rRNA jer je brži, jeftiniji i ima bolju taksonomsku razlučivost. Međutim, veliki nedostatak ove metode je činjenica da je referentna baza podataka vrlo ograničena, posebice za okolišne bakterije (Böhme i sur. 2013, Topić Popović i sur. 2014, Santos i sur. 2016, Timperio i sur. 2017), što su pokazali i rezultati ovog istraživanja. U čak 56,25 % slučajeva ovom metodom nije bilo moguće identificirati izolat, a samo 12,5 % izolata je uspješno identificirano do razine vrste. U skladu s tim, u istraživanju Topić Popović i suradnika (2014) samo je jedan od ukupno 23 analizirana izolata (4 %) sa rakova *P. leptodactylus* i *A. astacus* bio pouzdano

identificiran do razine vrste. U drugim istraživanjima dobiveni su bolji rezultati identifikacije okolišnih bakterija masenom spektrometrijom MALDI-TOF (Lamy i sur. 2011, Böhme i sur. 2013, Topić Popović i sur. 2015). Primjerice, 36 % (16/45) bakterija porijeklom iz Arktičkog oceana bilo je uspješno identificirano do razine vrste (Timperio i sur. 2017). Lošiji rezultati identifikacije izolata masenom spektrometrijom MALDI-TOF dobiveni u ovom istraživanju (12,5 % izolata identificiranih do razine vrste) vjerojatno su uzrokovani ograničenjima referentne baze podataka tj. razlikama u zastupljenosti različitih rodova u bazi podataka. Primjerice, Timperio i suradnici (2017) su primijetili da je kod roda *Pseudomonas* malena podudarnost između identifikacije MALDI-TOF MS metodom i metodom sekvenciranja gena 16S rRNA, a to je bio najčešći rod u ovome istraživanju (29,17 % izolata). Stoga, iako MALDI-TOF MS metoda ima određene prednosti, referentna baza podataka trebala bi biti proširena dodavanjem spektara većeg broja različitih okolišnih izolata da bi bila primjenjivija u okolišnim istraživanjima poput ovoga.

Ovo je prvo istraživanje koje je analiziralo epibiotske bakterije s kutikule signalnog raka, *P. leniusculus* te se dobiveni rezultati većinom podudaraju s istraživanjem bakterijskih zajednica s kutikule i drugih organa rakova *A. astacus* i *P. leptodactylus*, gdje je skoro polovica izolata (48 %) bila iz roda *Pseudomonas* (Topić Popović i sur. 2014). To se može objasniti sličnostima u pristupu uzgoja bakterija jer su u ovom istraživanju i u istraživanju Topić Popović i suradnika (2014) korišteni bogati neselektivni hranjivi mediji za uzgoj bakterija (PG1 i TSA kruta hranjiva podloga). Takvi mediji za uzgoj pogodniji su za izolaciju brzorastućih bakterija, kao što su vrste iz roda *Pseudomonas* (Vartoukian i sur. 2010). Nadalje, u ovome istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika između bakterijskih zajednica porijeklom s dvije različite vrste rakova (*P. leptodactylus* i *P. leniusculus*) što se može objasniti sljedećim: i) ograničen broj uzoraka (5 jedinki po vrsti raka), ii) uzgoj na bogatom hranjivom mediju koji selekcioniра brzorastuće bakterije, i/ili iii) sličnost mikrobnih zajednica kutikule između dvije populacije rakova na sličnim staništima (Mrežnica i Korana su obje krške rijeke sa sličnim hidromorfologijom te je ušće Mrežnice u Koranu vrlo blizu lokacije sakupljanja rakova).

Nakon taksonomske analize bakterijskih izolata, testiran je njihov potencijal da inhibiraju rast micelija patogena *A. astaci*, uzročnika bolesti račje kuge. Iako se patogen uglavnom prenosi invazivnim stranim rakovima koji su većinom imuni na bolest, nedavna istraživanja pokazuju da i neke zavičajne europske vrste rakova mogu pokazivati otpornost na račju kugu, čak i na izuzetno

virulentne genotipove (poput korištenog genotipa PsI) (Martín-Torrijos i sur. 2017, Kokko i sur. 2018, Pacioglu i sur. 2020). Stoga je pretpostavka ovog istraživanja bila da mikrobní izolati koji potječu s kutikule rakova, kako zavičajnih vrsta tako i invazivnih stranih vrsta, mogu igrati važnu ulogu u zaštiti domaćina od infekcije patogenom *A. astaci*. Testovima inhibicije identificirano je 16 izolata (33 %) koji su pokazali inhibiciju rasta micelija. Bakterije iz roda *Pseudomonas* (*P. chlororaphis*, *P. helmanticensis* i *P. lurida*) pokazale su se kao najbolji inhibitori, što se podudara s ranijim istraživanjima koja su pokazala inhibicijski efekt bakterija iz roda *Pseudomonas* na oomicetne patogene (Bly i sur. 1997, De Vrieze i sur. 2015, Hunziker i sur. 2015, Liu i sur. 2015, Ossowicki i sur. 2017, Wagner i sur. 2018). Primjerice, neki sojevi bakterija iz roda *Pseudomonas* inhibirali su rast hifa i klijanje cista patogena iz roda *Saprolegnia in vitro* (Bly i sur. 1997, Carbajal-González i sur. 2011, Liu i sur. 2015). Takav anatagonizam bakterija iz roda *Pseudomonas* prema oomicetnim patogenima bio je češći kod bakterijskih izolata porijeklom iz vodenih ekosustava nego kod izolata porijeklom iz kopnenih staništa (Wagner i sur. 2018). Poznato je da vrste iz roda *Pseudomonas* mogu inhibirati rast micelija oomiceta lučenjem specifičnih lipopeptida (Liu i sur. 2015). Osim toga, neki izlučuju hlapljive organske spojeve koji također mogu inhibirati rast hifa, ali i proizvodnju i klijanje sporangija kao i proizvodnju, klijanje i pokretljivost zoospora (De Vrieze i sur. 2015, Hunziker i sur. 2015).

Osim vrsta iz roda *Pseudomonas*, ostali inhibirajući izolati pripadali su rodovima *Acinetobacter* (*A. guillouiae*), *Aeromonas* (*A. encheleia*, *A. sobria*), *Bacillus* (*B. mycoides*), *Curtobacterium* (*C. flaccumfaciens*), *Pantoea* (*P. ananatis*) i *Stenotrophomonas* (*S. rhizophila*). Za neke od njih je već ranije pokazan inhibirajući učinak prema oomicetnim patogenima *in vitro* i *in vivo*. Primjerice, jedan soj vrste *Aeromonas media* luči spoj nalik bakteriocinu koji može inhibirati rast hifa i klijanje cista patogena *Saprolegnia* sp. u *in vitro* uvjetima (Lategan i Gibson 2003). Također, endosimbionti iz rodova *Bacillus* i *Pantoea* koji su izolirani iz sjemenki tikvica pokazali su antagonizam prema biljnim oomicetnim patogenima *Phytophthora capsici* i *Pythium aphanidermatum* (Khalaf i Raizada 2018). Osim toga, bakterija *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* inhibirala je rast hifa patogena *P. aphanidermatum* (Cawoy i sur. 2014), dok su drugi izolati roda *Bacillus* uključujući *B. mycoides*, čiji je izolat identificiran kao inhibitor i u ovome istraživanju, inhibirali rast hifa *Aphanomyces euteiches*, uzročnika bolesti truleži korijena graška (Wakelin i sur. 2002). Dakle, inhibicijski potencijal izolata iz roda *Bacillus* prema oomicetnim patogenima dokazan je u više slučajeva, ali je ovdje prvi put dokazano njihovo inhibicijsko djelovanje prema patogenu *A. astaci*.

U slučajevima izolata koji su pripadali vrstama *Pseudomonas helmanticensis*, *P. lurida* i *Stenotrophomonas rhizophila*, izolati iste vrste pokazali su različit inhibicijski potencijal. Objašnjenje za tu pojavu može biti to da je bakterijska vrsta relativno široka te su unutar nje česte fenotipske varijacije (Lan i Reeves 2000, Staley 2006, Wiedenbeck i Cohan 2011). Ranije su utvrđene varijacije u inhibicijskom potencijalu unutar iste vrste iz roda *Pseudomonas* prema oomicetnom biljnom patogenu *Phytophthora infestans* (Hunziker i sur. 2015). Primjerice, rast patogena *P. infestans* smanjen je između 15 % i 62 % u prisutnosti različitih izolata vrste *P. frederiksbergensis*. Objašnjenje ove pojave moglo bi biti da su geni koji sudjeluju u proizvodnji anti-oomicetnih sekundarnih metabolita smješteni na mobilnim genetskim elementima što bi bakterijama omogućilo brzo stjecanje tih gena horizontalnim prijenosom, ali i njihovu brzu deleciju.

U budućnosti bi trebalo detaljno istražiti kemijske i biološke mehanizme primjećених inhibicijskih učinaka, posebno za bakterijske vrste koje su prvi put utvrđene kao inhibitori oomiceta (tj. *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pseudomonas helmanticensis*, *Pseudomonas lurida*, *Aeromonas encheleia*, *Acinetobacter guillouiae*, *Stenotrophomonas rhizophila*). Nadalje, inhibitori identificirani u ovom istraživanju mogli bi se koristiti za razvijanje održivih i okolišno prihvatljivih metoda za sprječavanje i tretman infekcije patogenom *A. astaci* u akvakulturi, ali je prije toga je potrebno provesti *in vivo* pokuse u kojima bi se testirala primjena bakterijskih inokuluma u akvakulturi. Postojeća istraživanja ukazuju na to da korištenje odabranih sojeva inhibitora može biti korisno u biokontroli oomicetnih patogena i to je dokazano za neke bakterijske vrste koje su identificirane kao inhibitori *A. astaci* i u ovome istraživanju (*Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus mycoides*). Primjerice, svakodnevno dodavanje bakterija *Aeromonas media* u akvarij s bolesnim jeguljama *Anguilla australis* pospješilo je njihov oporavak od bolesti saprolegnioze (Lategan i Gibson 2003, Lategan i sur. 2004), a različite varijacije pripravaka s bakterijom *Bacillus mycoides* povećale su urod graška koji je prethodno zaražen oomicetnim patogenom *A. euteiches* (Wakelin i sur. 2002). Također, soj H6 bakterije iz roda *Pseudomonas* smanjio je smrtnost jaja lososa uzrokovanu patogenom *S. diclina* u *in vivo* testovima (Liu i sur. 2015). Primjenjivost odabranih izolata koji su pokazali snažnu inhibiciju prema patogenu *A. astaci* u ovome istraživanju trebalo bi testirati *in vivo* dodajući bakterijske inokulume u hranu kao probiotik ili kupanjem životinja u bakterijskoj suspenziji (Balcázar i sur. 2006, Chauhan i Singh 2019). Prethodno je dokazano da je korištenje hrane s dodatkom vrsta iz roda *Pseudomonas*, odnosno probioticima,

poboljšalo zdravlje i imunitet kozica *Penaeus latisulcatus* (Van Hai i sur. 2009), a inokulum bakterija *Pseudomonas fluorescens* koji je stavljen u hranu smanjio je smrtnost kalifornijske pastrve od patogena *Vibrio anguillarum* (Gram i sur. 1999). Također, kupanje atlantskog lososa u suspenziji bakterija roda *Pseudomonas* smanjilo je smrtnost nakon zaraze bakterijom *Aeromonas salmonicida* (Smith i Davey 1993). Takvi će eksperimenti, kao nastavak ovog istraživanja, otvoriti nove mogućnosti za razvoj biokontrole *A. astaci* koja je hitno potrebna u astacikulturi.

5. ZAKLJUČAK

U ovom su istraživanju analizirane mikrobne zajednice s kutikule dvije vrste akvakulturno važnih slatkovodnih deseteronožnih rakova, *P. leptodactylus* i *P. leniusculus* te je prvi put pokazan njihov potencijal da inhibiraju rast micelija patogena *A. astaci*, uzročnika bolesti račje kuge. Glavi zaključci ovog istraživanja su:

- među bakterijskim izolatima s kutikule rakova *P. leniusculus* i *P. leptodactylus* prevladavali su izolati iz roda *Pseudomonas* (56,25 %);
- od ukupno 48 bakterijskih izolata, njih 16 je pokazivalo inhibicijski potencijal - inhibitori (33,33 %), a 32 izolata nije pokazivalo inhibicijski potencijal - ne-inhibitori (66,67 %);
- neki od najjačih inhibitora, odnosno onih čija je udaljenost bakterijske kolonije od ruba micelija *A. astaci* bila najveća, bili su *Pseudomonas chlororaphis* POL 4.5., *Curtobacterium flaccumfaciens* PAL 3.3. i *Aeromonas sobria* POL 2.2.

Rezultati ovog istraživanja prvi su korak prema boljem razumijevanju interakcija između patogena *A. astaci* i epibiotskih bakterija na kutikuli rakova. Osim toga, dobiveni rezultati mogu biti korisni za razvijanje novih pristupa biokontrole oomicetnih patogena u račjoj akvakulturi poput probiotika ili bakterijskih kupki koji bi zdrave životinje obranili od potencijalne infekcije ili kao lijek za životinje već zaražene patogenom *A. astaci*.

6. LITERATURA

Alderman D. J., Polglase J. L. (1984): A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Transactions of the British Mycological Society 83: 313-318.

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-Office International des Epizooties 15: 603-632.

Axel C., Zannini E., Coffey A., Guo J., Waters D. M., Arendt E. K. (2012): Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 96: 37–48.

Bajer P. G., Ghosal R., Maselko M., Smanski M. J., Lechelt J. D., Hansen G., Kornis M. S. (2019): Biological control of invasive fish and aquatic invertebrates: a brief review with case studies. Management of Biological Invasions 10: 227.

Balcázar J. L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J. L. (2006): The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology 114: 173–186.

Becking T., Mrugała A., Delaunay C., Svoboda J., Raimond M., Viljamaa-Dirks S., Petrusek 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.

Bly J. E., Quiniou S. M. A., Lawson L. A., Clem L. W. (1997): Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Fish Diseases 20: 35–40.

Bruisson S., Zufferey M., L'Haridon F., Trutmann E., Anand A., Dutartre A., De Vrieze M., Weisskopf L. (2019): Endophytes and epiphytes from the grapevine leaf microbiome as potential biocontrol agents against phytopathogens. Frontiers in Microbiology 10: 2726.

- Böhme K., Fernández-No I. C., Pazos M., Gallardo J. M., Barros-Velázquez J., Cañas B., Calomata P. (2013): Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis* 34: 877-887.
- Carbajal-González M. T., Fregeneda-Grandes J. M., Suárez-Ramos S., Rodríguez Cadenas F., Aller-Gancedo J. M. (2011): Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 96: 125–135.
- Caruana S., Yoon G. H., Freeman M. A., Mackie J. A., Shinn A. P. (2012): The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoids in controlling infections of *Saprolegnia australis* (Saprolegniales; Oomycetes). *Aquaculture* 358–359: 146–154.
- Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J., Ongena M. (2014): Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 87–100.
- Cerenius L., Söderhäll K. (1984): Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *Journal of Invertebrate Pathology* 43: 278–281.
- 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.
- Chauhan A., Singh R. (2019): Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis* 77: 99–113.
- Chen Y., Chen P., Tsay T. (2016): The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biological Control* 98: 34-42.
- Compant S., Brader G., Muzammil S., Sessitsch A., Lebrihi A., Mathieu F. (2013): Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl* 58: 435–455.
- Cui N., Zhang X., Xie Q., Wang S., Chen J., Huang L., Qiao X., Li X., Cai X. (2011): Toxicity profile of labile preservative bronopol in water: the role of more persistent and toxic transformation products. *Environmental Pollution* 159: 609-615.

- De Vrieze M., Pandey P., Bucheli T. D., Varadarajan A. R., Ahrens C. H., Weisskopf L., Bailly A. (2015): Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. *Frontiers in Microbiology* 6: 1295.
- Derevnina L., Petre B., Kellner R., Dagdas Y. F., Sarowar M. N., Giannakopoulou A., De la Concepcion J. C., Chaparro-Garcia A., Pennington H. G., van West P., Kamoun S. (2016): Emerging oomycete threats to plants and animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371: 20150459.
- Diéguez-Urbeondo J., García M. A., Cerenius L., Kozubíková E., Ballesteros I., Windels C., Weiland J., Kator H., Söderhäll K., Martín M. P. (2009): Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* 46: 365–376.
- EC (1990): Council Regulation 2377/90/EEC of 26 June 1990 on laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities* L221: 8-28.
- 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.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2016): The 2016 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 16: e05348.
- Evans L. H., Edgerton B. F. (2001): Pathogens, parasites and commensals. U: Holdich D. M. (ur.) *Biology of freshwater crayfish*. London, Blackwell Science, str. 377–438.
- FAO (2020): The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. FAO, Rome.
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C., McCraw S. L., Gurr S. J. (2012): Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186–194.
- Gieseke C. M., Serfling S. G., Reimschuessel R. (2006): Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 253: 120–129.

- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010): SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-224.
- Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I., Nielsen T.F. (1999): Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 969–973.
- Habsburgo-Lorena A. S. (1979): Crayfish situation in Spain. *Crayfish News* 3: 1-2.
- Haine E. R. (2008): Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 353-361.
- Hall T., Biosciences I., Carlsbad C. A. (2011): BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* 2: 60-61.
- Harlioglu M. M. (2008): The harvest of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz in Turkey: harvest history, impact of crayfish plague, and present distribution of harvested populations. *Aquaculture International* 16: 351–360.
- Harris R. N., James T. Y., Lauer A., Simon M. A., Patel A. (2006): Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 3, 53–56.
- Holdich D. M. (1993): A review of astaciculture: freshwater crayfish farming. *Aquatic Living Resources* 6: 307-317.
- Holdich D. M. (2002): Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367: 611-650.
- Holdich D., Black J. (2007): The spiny-cheek crayfish, *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) [Crustacea: Decapoda: Cambaridae], digs into the UK. *Aquatic Invasions* 2: 1-15.
- 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.

- Hunziker L., Bönisch D., Groenhagen U., Bailly A., Schulz S., Weisskopf L. (2015): *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 821-830.
- Jacob A. P., Culver D. A., Lanno R. P., Voigt A. (2016): Ecological impacts of fluridone and copper sulphate in catfish aquaculture ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 1183-1194.
- Jolliffe I. (2002): *Principal Component Analysis*. Second edition. Springer, New York.
- Jussila J., Mannonen A. (2004): Crayfisheries in Finland, a short overview. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 372-373: 263-273.
- Jussila J., Toljamo A., Makkonen J., Kukkonen H., Kokko H. (2014): Practical disinfection chemicals for fishing and crayfishing gear against crayfish plague transfer. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 8.
- Katoh K., Standley D. M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kautsky N., Rönnbäck P., Tedengren M., Troell M. (2000): Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.
- Khalaf E. M., Raizada M. N. (2018): Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Frontiers in Microbiology* 9: 42.
- Kokko H., Harlioglu M. M., Aydin H., Makkonen J., Gökmen G., Aksu Ö., Jussila J. (2018): Observations of crayfish plague infections in commercially important narrow-clawed crayfish populations in Turkey. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 419: 10.
- Kouba A., Petrusek A., Kozák P. (2014): Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 5.
- Köksal G. (1988): *Astacus leptodactylus* in Europe. U: Holdich D. M., Lowery R. S. (ur.) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. London, Croom Helm Ltd., str. 365-400.

- Lamy B., Kodjo A., Laurent F., ColBVH Study Group (2011): Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71: 1–5.
- Lan R., Reeves P. R. (2000): Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends in Microbiology* 8: 396–401.
- Lane D. J. (1991) *16S/23S rRNA Sequencing*. U: Stackebrandt E., Goodfellow M. (ur.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. New York, John Wiley and Sons, str. 115-175.
- Lategan M. J., Gibson L. F. (2003): Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 26: 147–153.
- Lategan M. J., Torpy F. R., Gibson L. F. (2004): Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture* 240: 19–27.
- Lavigne J. P., Espinal P., Dunyach-Remy C., Messad N., Pantel A., Sotto A. (2013): Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51: 257–270.
- Lawrence S. A., Armstrong C. B., Patrick W. M., Gerth M. L. (2017): High-throughput chemical screening identifies compounds that inhibit different stages of the *Phytophthora agathidicida* and *Phytophthora cinnamomi* life cycles. *Frontiers in Microbiology* 8: 1340.
- Lay J. O. (2001): MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 172-194.
- 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: 3923.
- Letunic I., Bork P. (2016): Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* 44: W242–W245.
- Liu Y., de Bruijn I., Jack A. L., Drynan K., van den Berg A. H., Thoen E., Sandoval-Sierra V., Skaar I., van West P., Diéguez-Uribeondo J., van der Voort M., Mendes R., Mazzola M., Raaijmakers J. M. (2014): Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases. *The ISME Journal* 8: 2002–2014.

- Liu Y., Rzeszutek E., Van der Voort M., Wu C. H., Thoen E., Skaar I., Bulone V., Dorrestein P. C., Raaijmakers J. M., de Bruijn I. (2015): Diversity of aquatic *Pseudomonas* species and their activity against the fish pathogenic Oomycete *Saprolegnia*. PLoS One 10: e0136241.
- Lodge D. M., Hill A. M. (1994): Factors governing species composition, population size, and productivity of cool-water crayfishes. Nordic Journal of Freshwater Resources 69: 111–136.
- 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.
- Lowrey L., Woodhams C. D., Tacchi L., Salinas I. (2015): Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. Applied and Environmental Microbiology 81: 6915–6925.
- 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., 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.
- Martín-Torrijos L., Campos Llach M., Pou-Rovira Q., Diéguez-Urbeondo J. (2017): Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the endangered freshwater crayfish species, *Austropotamobius pallipes*. PLoS One 12: e0181226.
- Meyer F. P., Jorgenson T. A. (1983): Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Transactions of The American Fisheries Society 112: 818-824.
- Norliana S., Abdulamir A. S., Abu Bakar F., Salleh A. B. (2009): The health risk of formaldehyde to human beings. American Journal of Pharmacology and Toxicology 4: 98-106.
- Oidtmann B., Heitz E., Rogers D., Hoffmann R. W. (2002): Transmission of crayfish plague. Diseases of Aquatic Organisms 52: 159-167.
- OIE (2016): Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.

Ossowicki A., Jafra S., Garbeva P. (2017): The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. PLoS One 12: e0174362.

Pacioglu O., Theissinger K., Alexa A., Samoilă C., Sîrbu O. I., Schrimpf A., Zubrod J. P., Schulz R., Pîrvu M., Lele S. F., Jones J. I., Pârvulescu L. (2020): Multifaceted implications of the competition between native and invasive crayfish: a glimmer of hope for the native's long-term survival. Biological Invasions 22: 827–842.

Panandiker A., Fernandes C., Rao K. V. K. (1992): The cytotoxic properties of malachite green are associated with the increased demethylase, aryl hydrocarbon hydroxylase and lipid peroxidation in primary cultures of Syrian hamster embryo cells. Cancer Letters 67: 93-101.

Pavić D., Čanković M., Petrić I., Makkonen J., Hudina, S. Maguire I., Vladušić T., Šver L., Hrašćan, R. Orlić K., Dragičević P., Bielen A. (2020): Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. Journal of Invertebrate Pathology 169: 107274.

R Core Team (2017): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

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

Ronquist F., Huelsenbeck J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572–1574.

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.

Santos I. C., Hildenbrand Z. L., Schug K. A. (2016): Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. The Analyst 141: 2827-2837.

Simberloff D. (2012): Risks of biological control for conservation purposes. BioControl 57: 263–276.

Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S. (2015): MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology 6: 791.

- Skelton J., Geyer K. M., Lennon J. T., Creed R. P. (2017): Multi-scale ecological filters shape the crayfish microbiome. *Symbiosis* 72: 159–170.
- Skurdal J. (1999): Crayfish introductions in the Nordic and Baltic countries. *Crayfish in Europe as Alien Species* 193-219.
- Smith P. R., Davey S. (1993): Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases* 16: 521–524.
- Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noel P. Y., Reynolds J. D., Haffner P. (2006): *Atlas of Crayfish in Europe*. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Souty-Grosset C., Reynolds J. D. (2009): Current ideas on methodological approaches in European crayfish conservation and restocking procedures. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 1: 394-395.
- Söderhäll K., Cerenius L. (1992): Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 3–23.
- Söderhäll K., Cerenius L. (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10: 23–28.
- Söderhäll K., Cerenius L. (1999): The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshwater Crayfish* 12: 11-35.
- Srivastava S., Sinha R., Roy D. (2004): Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology* 66: 319–329.
- Staley J. T. (2006): The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361: 1899–1909.
- Timmusk S., van West P., Gow N. A., Huffstutler R. P. (2009): *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1473–1481.
- Timperio A. M., Gorrasi S., Zolla L., Fenice M. (2017): Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *PLoS One* 12: e0181860.

- Topić Popović N., Sauerborn Klobučar R., Maguire I., Strunjak-Perović I., Kazazić S., Barišić J., Jadan M., Klobučar G., Čož-Rakovac R. (2014): High-throughput discrimination of bacteria isolated from *Astacus astacus* and *A. leptodactylus*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 4.
- Topić Popović N., Kazazić S., Strunjak-Perović I., Barišić J., Sauerborn Klobučar R., Kepec S., Rakovac R. (2015): Detection and diversity of aeromonads from treated wastewater and fish inhabiting effluent and downstream waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 235-242.
- Topić Popović N., Kazazić S. P., Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R. (2016): Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environmental Research* 152: 7–16.
- Unestam T. (1965): Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*: I. Some Factors Affecting Growth *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 18: 483–506.
- Unestam T., Weiss D. W. (1970): The host-parasite interaction relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci* - responses to infection by susceptible and resistant species. *The Journal of General Microbiology* 60: 77–90.
- Usio N., Townsend C. R. (2002): Functional significance of crayfish in stream food webs: roles of omnivory, substrate heterogeneity and sex. *Oikos* 98: 512–522.
- Valipour A., Zahmatkesh A., Khanipour A. (2017): Freshwater crayfish as a suitable species for introducing to aquaculture of Iran. *Advanced Aquaculture Sciences Journal* 1: 73–87.
- Van Hai N., Buller N., Fotadar R. (2009): The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Fish and Shellfish Immunology* 27: 100–104.
- Vartoukian S. R., Palmer R. M., Wade W. G. (2010): Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 309: 1–7.
- Vu V. Q. (2011): A ggplot2 Based Biplot. R Package Version 0.55. URL. <http://github.com/vgv/ggbiplot>.

- 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.
- Wakelin S. A., Walter M., Jaspers M., Stewart A. (2002): Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria. Australasian Plant Pathology 31: 401–407.
- Wagner A., Norris S., Chatterjee P., Morris P. F., Wildschutte H. (2018): Aquatic Pseudomonads inhibit oomycete plant pathogens of *Glycine max*. Frontiers in Microbiology 9: 1007.
- Wang Q., Ding H., Tao Z., Ma D. (2018): Crayfish (*Procambarus clarkii*) Cultivation in China: A Decade of Unprecedented Development. U: Gui J. F., Tang Q., Li Z., Liu J., De Silva S. S. (ur.) Aquaculture in China: Success Stories and Modern Trends. New York, John Wiley and Sons, str. 363-377.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703.
- Westman K., Pursiainen M., Vilkinan R. (1978): A new folding trap model which prevents crayfish from escaping. Freshwater Crayfish 4: 235–242.
- World Health Organization (WHO) (1989): Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture: report of a WHO scientific group. World Health Organization technical report series 778: 1-74.
- Wiedenbeck J., Cohan F. M. (2011): Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. FEMS Microbiology Reviews 35: 957-976.
- Wooster G. A., Martinez C. M., Bowser P. R., O'Hara D. S. (2005): Human health risks associated with formalin treatments used in aquaculture: initial study. Journal of Aquaculture 67: 111-113.
- Yarza P., Richter M., Peplies J., Euzéby J., Amann R., Schleifer K. H., Ludwig W., Glöckner F. O., Rosselló-Móra R. (2008): The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Systematic and Applied Microbiology 31: 241-250.

Zahmatkesh A., Karimzadeh K., Valipour A. (2019): Growth pattern and body weight-length relationship of narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus*. Journal of Marine Science and Technology 13: 31–40.

7. PRILOZI

Prilog 1. Bakterijski izolati prikupljeni s kutikule rakova *Pontastacus leptodactylus* (POL) i *Pacifastacus leniusculus* (PAL), njihova taksonomska klasifikacija i parametri vezani uz potencijal inhibicije patogena *Aphanomyces astaci* (inhibitori ili ne-inhibitori). *vrijednost medijana na temelju najmanje 3 mjerenja. Legenda za MALDI-TOF MS se nalazi u Tablici 3.

Prilog 2. Rezultati metode osnovnih komponenti (PC1 i PC2) za varijable rasta. Tablica pokazuje standardnu devijaciju i udio varijance za prve dvije glavne komponente.

Prilog 3. Generalizirani linearni model s aov() funkcijom na varijablama povezanim s rastom micelija *A. astaci* i bakterijskih izolata. Df = stupnjevi slobode, Sum Sq = suma kvadrata, Mean Sq = srednji kvadrat. Vrijednosti za uspoređivanje grupa (inhibitor/ne-inhibitor) su značajne ako $p < 0,05$ i označene su s *.

Prilog 1. Bakterijski izolati prikupljeni s kutikule rakova *Pontastacus leptodactylus* (POL) i *Pacifastacus leniusculus* (PAL), njihova taksonomska klasifikacija i parametri vezani uz potencijal inhibicije patogena *Aphanomyces astaci* (inhibitori ili ne-inhibitori). *vrijednost medijana na temelju najmanje 3 mjerenja. Legenda za MALDI-TOF MS se nalazi u Tablici 3.

Ime izolata	Identifikacija bakterijskog izolata			PARAMETRI VEZANI UZ INHIBICIJSKI POTENCIJAL PREMA PATOGENU <i>A. astaci</i>				
	MALDI-TOF MS	Sekvenciranje 16S rRNA gena (najbolje podudaranje u programu blastn)	GenBank brojevi	Model	Radijus <i>A. astaci</i> micelija*	Radijus bakterijskog izolata*	Udaljenost između bakterijskog izolata i ruba <i>A. astaci</i> micelija*	Tip inhibicije
PAL 1.1.	<i>Acinetobacter</i> sp. (-)	<i>Acinetobacter celticus</i> soj ANC 3831 1331/1348 (99 %)	MN823086	MODEL 1	39,5	7,25	0,00	ne-inhibitor
PAL 1.2.	<i>Chryseobacterium</i> sp. (-)	<i>Chryseobacterium aquaticum</i> soj 10-46 1394/1402 (99 %)	MN823087	MODEL 1	37,00	6,75	0,00	ne-inhibitor
PAL 1.3.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (++)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> soj NBRC 3904 1114/1117 (99 %)	MN823088	MODEL 1	11,00	8,25	18,25	inhibitor
PAL 1.4.	<i>Sphingobacterium</i> sp. (-)	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> soj 10C 1126/1131 (99 %)	MN823089	MODEL 1	25,00	7,50	1,50	ne-inhibitor
PAL 1.5.	(-)	<i>Acinetobacter celticus</i> soj ANC 3831 1341/1362 (98 %)	MN823090	MODEL 1	30,00	6,00	1,00	ne-inhibitor
PAL 2.1.	(-)	<i>Duganella zoogloeoides</i> soj IAM 12670 1100/1110 (99 %)	MN823091	MODEL 1	33,00	5,00	0,00	ne-inhibitor
PAL 2.2.	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (+)	<i>Pseudomonas silesiensis</i> soj A3 1539/1539 (100 %)	MN823092	MODEL 1	28,50	6,00	0,00	ne-inhibitor
PAL 2.3.	(-)	<i>Sphingobacterium faecium</i> soj NBRC 15299 1084/1103 (98 %)	MN823093	MODEL 2	49,00	12,00	1,00	ne-inhibitor
PAL 2.4.	(-)	<i>Streptomyces olivoviridis</i> soj NBRC 12897 1475/1475 (100 %)	MN823094	MODEL 1	29,00	5,00	2,00	ne-inhibitor
PAL 2.5.	<i>Acinetobacter</i> sp. (-)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> soj ATCC 17909 1530/1530 (100 %)	MN823095	MODEL 2	31,00	6,00	0,00	ne-inhibitor
PAL 3.1.	(-)	<i>Sphingobacterium faecium</i> soj NBRC 15299 766/807 (95 %)	MN823096	MODEL 2	37,50	20,00	1,00	ne-inhibitor
PAL 3.2.	(-)	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> soj AF3.10 1437/1437 (100 %)	MN823097	MODEL 1	30,50	4,50	0,00	ne-inhibitor
PAL 3.3.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (+)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> soj BCCM/LMG 3645 1477/1477 (100 %)	MN823098	MODEL 2	37,00	9,00	15,00	inhibitor
PAL 4.1.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp. <i>chlororaphis</i> (+)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> soj OHA11 1302/1308 (99 %)	MN823099	MODEL 1	32,00	7,00	0,00	ne-inhibitor
PAL 4.2.	(-)	<i>Flavobacterium chungangense</i> soj CJ7 1065/1081 (99 %)	MN823100	MODEL 1	29,00	11,00	0,00	ne-inhibitor
PAL 4.3.	<i>Staphylococcus succinus</i> (+)	<i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>casei</i> soj SB72 1113/1114 (99 %)	MN823101	MODEL 1	32,00	6,00	2,00	ne-inhibitor
PAL 5.1.	(-)	<i>Sphingomonas aquatilis</i> soj NBRC 16722 1335/1360 (98 %)	MN823102	MODEL 1	31,00	5,00	1,00	ne-inhibitor
PAL 5.2.	<i>Agroccoccus jenensis</i> (+)	<i>Agroccoccus jenensis</i> soj DSM 9580 1084/1084 (100 %)	MN823103	MODEL 1	28,00	6,00	0,75	ne-inhibitor

Ime izolata	Identifikacija bakterijskog izolata			PARAMETRI VEZANI UZ INHIBICIJSKI POTENCIJAL PREMA PATOGENU <i>A. astaci</i>				
	MALDI-TOF MS	Sekvenciranje 16S rRNA gena (najbolje podudaranje u programu blastn)	GenBank brojevi	Model	Radius <i>A. astaci</i> micelija*	Radius bakterijskog izolata*	Udaljenost između bakterijskog izolata i ruba <i>A. astaci</i> micelija*	Tip inhibicije
POL 1.1.	<i>Acinetobacter</i> sp. (-)	<i>Acinetobacter guillouiae</i> soj ATCC 11171 1034/1047 (99 %)	MN823104	MODEL 1	18,50	12,00	10,25	inhibitor
POL 1.2.	(-)	<i>Duganella sacchari</i> soj Sac-22 1025/1033 (99 %)	MN823105	MODEL 1	32,00	7,00	1,00	ne-inhibitor
POL 1.3.	<i>Bacillus cereus</i> (+)	<i>Bacillus thuringiensis</i> soj NBRC 101235 1477/1477 (100 %)	MN823106	MODEL 1	28,00	12,00	0,50	ne-inhibitor
POL 1.4.	<i>Sphingomonas</i> (-)	<i>Sphingomonas faeni</i> soj MA-olki 1315/1349 (97 %)	MN823107	MODEL 1	32,00	5,00	0,00	ne-inhibitor
POL 2.1.	<i>Pseudomonas koreensis</i> (+)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> soj OHA11 1376/1379 (99 %)	MN823108	MODEL 2	36,00	10,00	14,00	inhibitor
POL 2.2.	<i>Aeromonas sobria</i> (++)	<i>Aeromonas sobria</i> soj JCM 2139 1336/1338 (99 %)	MN823109	MODEL 1	17,00	7,50	14,00	inhibitor
POL 2.3.	<i>Pseudomonas koreensis</i> (+)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> soj e-p10 1336/1339 (99 %)	MN823110	MODEL 2	25,00	9,00	25,00	inhibitor
POL 2.4.	<i>Pseudomonas</i> sp. (-)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> soj OHA11 1027/1031 (99 %)	MN823111	MODEL 2	41,50	10,50	13,50	inhibitor
POL 2.5.	<i>Aeromonas encheleia</i> (++)	<i>Aeromonas encheleia</i> soj CECT4342 1269/1272 (99 %)	MN823112	MODEL 1	18,00	10,00	10,00	inhibitor
POL 2.6.	<i>Pseudomonas</i> sp. (-)	<i>Pseudomonas syringae</i> soj DC3000 1392/1399 (99 %)	MN823113	MODEL 1	25,00	9,00	2,00	ne-inhibitor
POL 2.7.	<i>Pantoea ananatis</i> (++)	<i>Pantoea ananatis</i> soj 1846 1158/1164 (99 %)	MN823114	MODEL 2	37,50	9,75	12,50	inhibitor
POL 3.1.	(-)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> soj 12165 1314/1324 (99 %)	MN823115	MODEL 1	33,00	6,00	0,00	ne-inhibitor
POL 3.2.	<i>Pseudomonas extremorientalis</i> (+)	<i>Pseudomonas lurida</i> soj P 513/18 1271/1272 (99 %)	MN823116	MODEL 2	48,50	12,00	5,00	ne-inhibitor
POL 3.3.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (++)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> soj ATCC 13985 1121/1122 (99 %)	MN823117	MODEL 1	17,00	7,00	16,00	inhibitor
POL 3.4.	<i>Bacillus</i> sp. (-)	<i>Bacillus mycoides</i> soj NBRC 101228 1114/1115 (99 %)	MN823118	MODEL 1	19,50	9,00	7,00	inhibitor
POL 3.5.	<i>Pseudomonas koreensis</i> (+)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> soj OHA11 1099/1104 (99 %)	MN823119	MODEL 2	22,00	15,00	22,00	inhibitor
POL 4.1.	<i>Pseudomonas extremorientalis</i> (+)	<i>Pseudomonas lurida</i> soj P 513/18 1407/1410 (99 %)	MN823120	MODEL 2	39,50	9,00	14,00	inhibitor
POL 4.2.	<i>Pseudomonas extremorientalis</i> (+)	<i>Pseudomonas lurida</i> soj P 513/18 1377/1382 (99 %)	MN823121	MODEL 1	16,00	8,00	11,00	inhibitor
POL 4.3.	<i>Chryseobacterium</i> sp. (-)	<i>Chryseobacterium gambrii</i> soj 5-1St1a 1403/1403 (100 %)	MN823122	MODEL 1	26,50	5,00	1,50	ne-inhibitor
POL 4.4.	(-)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> soj e-p10 1407/1416 (99 %)	MN823123	MODEL 1	26,00	7,00	0,00	ne-inhibitor
POL 4.5.	<i>Pseudomonas</i> sp. (-)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> soj NBRC 3904 1348/1362 (99 %)	MN823124	MODEL 2	17,75	17,25	25,25	inhibitor
POL 4.6.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (+)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> soj OHA11 1379/1394 (99 %)	MN823125	MODEL 2	7,00	36,00	19,00	inhibitor
POL 4.7.	<i>Flavobacterium pectinovorum</i> (+)	<i>Flavobacterium plurextorum</i> soj 1126-1H-08 1097/1101 (99 %)	MN823126	MODEL 1	25,00	7,00	2,00	ne-inhibitor
POL 5.1.	(-)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> soj e-p10 1546/1546 (100 %)	MN823127	MODEL 1	30,50	6,75	0,25	ne-inhibitor
POL 5.2.	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (++)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> soj ATCC 17909 1369/1378 (99 %)	MN823128	MODEL 1	30,00	7,00	0,00	ne-inhibitor
POL 5.3.	(-)	<i>Flavobacterium ginsengiterrae</i> soj DCY55 1352/1382 (98 %)	MN823129	MODEL 1	25,00	10,00	4,00	ne-inhibitor
POL 5.4.	<i>Acinetobacter</i> sp. (-)	<i>Acinetobacter rudis</i> soj G30 1299/1305 (99 %)	MN823130	MODEL 1	25,00	8,00	4,00	ne-inhibitor
POL 5.5.	(-)	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> soj 255-15 1555/1555 (100 %)	MN823131	MODEL 1	31,00	6,00	1,00	ne-inhibitor
POL 5.6.	(-)	<i>Flavobacterium oncorhynchi</i> soj 631-08 1363/1369 (99 %)	MN823132	MODEL 1	26,00	9,50	2,00	ne-inhibitor
POL 5.7.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (+)	<i>Pseudomonas jessenii</i> soj CIP 105274 1390/1400 (99 %)	MN823133	MODEL 1	30,00	6,00	2,00	ne-inhibitor

Prilog 2. Rezultati metode osnovnih komponenti (PC1 i PC2) za varijable rasta. Tablica pokazuje standardnu devijaciju i udio varijance za prve dvije glavne komponente.

MODEL 1	PC1	PC2	MODEL 2	PC1	PC2
Standardna devijacija	1,45	0,89	Standardna devijacija	1,42	0,98
Udio varijance	0,70	0,26	Udio varijance	0,68	0,32
Ukupni udio	0,70	0,96	Ukupni udio	0,68	0,99
VELIČINA MICELIJA	0,66	0,15	VELIČINA MICELIJA	0,70	0,00
VELIČINA BAKTERIJE	-0,42	0,88	VELIČINA BAKTERIJE	0,50	0,72
UDALJENOST	-0,62	-0,45	UDALJENOST	0,51	-0,69

Prilog 3. Generalizirani linearni model s aov() funkcijom na varijablama povezanim s rastom micelija *A. astaci* i bakterijskih izolata. Df = stupnjevi slobode, Sum Sq = suma kvadrata, Mean Sq = srednji kvadrat. Vrijednosti za uspoređivanje grupa (inhibitor/ne-inhibitor) su značajne ako $p < 0,05$ i označene su s *.

MODEL 1	Df	Sum Sq	Mean Sq	F vrijednost	p vrijednost	MODEL 2	Df	Sum Sq	Mean Sq	F vrijednost	p vrijednost
UDALJENOST	1	770,2	770,2	286,2	<2e-16 ***	UDALJENOST	1	461,4	461,4	26,27	0,000624 ***
VELIČINA MICELIJA	1	946,8	946,8	88,74	5,26e-11 ***	VELIČINA MICELIJA	1	446,9	446,9	3,78	0,05 *
VELIČINA BAKTERIJE	1	19,68	19,68	4,67	0,04*	VELIČINA BAKTERIJE	1	2,8	2,8	0,018	0,85

8. ŽIVOTOPIS

Nakon završetka Osnovne škole Đure Deželića i Opće gimnazije Ivana Šveara u Ivanić-Gradu, 2014. godine upisala sam preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno–matematičkom fakultetu u Zagrebu kojeg sam završila radom „Komenzalne bakterije s kutikule rakova i njihov potencijalni značaj u biokontroli uzročnika račje kuge“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Sandre Hudine. Diplomski studij smjer Znanosti o okolišu upisala sam 2018. godine. 2015., 2017., 2018. i 2019. godine sudjelovala sam na manifestaciji Noć biologije na Zoologijskom zavodu PMF–a kao organizatorica radionica i edukator. Na znanstvenim i stručnim skupovima sudjelovala sam pasivno i aktivno s tri postera te pet usmenih izlaganja uz dobivene dvije stipendije. Sudjelovala sam na projektima „Kako će klimatske promjene utjecati na širenje račje kuge? – Prilagodba smjernica za zaštitu zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova u kontekstu klimatskih promjena“, (voditeljica projekta izv. prof. dr. sc. Ana Bielen) i „Promjene sastava patogena i imunološkog odgovora tijekom širenja areala uspješnih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova“ (voditeljica projekta doc. dr. sc. Sandra Hudina) te sam napisala i vodila projekt „Mramorni i bodljobrادي rak kao prijenosnici bolesti račje kuge u Hrvatskoj“. Jedna sam od autorica na dva znanstvena rada:

Orlić K., Šver L., Burić L., Kazazić S., Grbin D., Maguire I., Pavić D., Hrašćan R., Vladušić T., Hudina S., Bielen A. (2021): Cuticle-associated bacteria can inhibit crayfish pathogen *Aphanomyces astaci*: Opening the perspective of biocontrol in astaciculture. *Aquaculture* 533: 736112.

Pavić D., Čanković M., Petrić I., Makkonen J., Hudina S., Maguire I., Vladušić T., Šver L., Hrašćan R., Orlić K., Dragičević P., Bielen A. (2020): Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *Journal of Invertebrate Pathology* 169: 107274.