

Molekularna identifikacija bakterija roda *Vibrio* iz uzgajališta školjkaša u istočnom Jadranu

Buha, Tonka

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:821214>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tonka Buha

**Molekularna identifikacija bakterija roda
Vibrio iz uzgajališta školjkaša u istočnom
Jadranu**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Tonka Buha

**Molecular identification of *Vibrio* genus
bacteria from bivalve aquaculture sites in
Eastern Adriatic**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Lorene Perić, te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Tomislava Ivankovića, doc. s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Najveće hvala mojoj mentorici dr. sc. Loreni Perić na trudu, strpljenju i dragocjenom vremenu te na odgovorima na sva moja pitanja i nejasnoće kao i na danj prilici za izradu diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Ireni Vardić Smrzlić i dr. sc. Anamariji Koldi što su me naučile novim vještinama te uvijek bile tu kada mi je trebala potpora, pomoć i savjet.

Zahvaljujem se i Joke Legrou na društvu i pomoći prilikom zajedničkog rada u laboratoriju. Također, zahvaljujem se i svim djelatnicima Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičnih organizama na pruženoj pomoći, savjetima i usmjeravanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i suvoditelju doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću na pokazanoj susretljivosti i pomoći.

Ovim putem se zahvaljujem ujaku, ujni te bratiću Svenu za svu danu podršku prilikom mog života u Zagrebu.

Zahvaljujem se prijateljima i dečku Krešimiru na pomoći, savjetima, bodrenju i slušanju mojih monologa. Hvala što ste obogatili i uljepšali moj studentski život.

Naposljetku, posebno hvala mojim roditeljima Sandi i Željku, baki Marti te sestri Ivi bez čije podrške ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Ovaj rad je u potpunosti financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta HRZZ IP-2019-04-1956 Osjetljivost komercijalno važnih školjkaša u akvakulturi istočnog dijela Jadrana na promjene okolišnih uvjeta - BEST ADRIA.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
rad

Diplomski

Molekularna identifikacija bakterija roda *Vibrio* iz uzgajališta školjkaša u istočnom Jadranu

Tonka Buha

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rod *Vibrio* sadrži važne patogene školjkaša i drugih beskralješnjaka, riba i ljudi. Kako bi se očuvalo njihovo zdravlje bitna je njihova identifikacija do razine vrste. Cilj ovog istraživanja je bio identificirati odabrane *Vibrio* uzorke do razine vrste, odrediti filogenetske odnose i utvrditi sličnosti, tj. razlike u strukturi zajednica *Vibrio* bakterija između akvakulture školjkaša Limskog kanala i Malostonskog zaljeva. Analizirani su uzorci morske vode, sedimenta kao i tkiva školjkaša mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*). Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) ciljane su različite kodirajuće regije šest konstitutivno eksprimiranih gena (engl. *housekeeping genes*) i 16S rRNA. Uzorci su poslani na sekvenciranje nakon čega je provedena metoda multilokusnog sravnjivanja sljedova (MLSA). Za filogenetsku analizu korištene su metode najveće vjerojatnosti i susjednog sparivanja. Eksperimentalni uzorci unutar *Harveyi* podskupine su se razlučili do razine vrste, a unutar *Splendidus* podskupine do razine grupacije. Na području uzgajališta školjkaša Limski kanal identificirano je šest vrsta te pet *Splendidus* grupacija, dok je na području uzgajališta školjkaša Malostonski zaljev identificirano pet vrsta i šest *Splendidus* grupacija. Dokazana je prisutnost više patogenih i uvjetno patogenih *Vibrio* vrsta za na području istočnog Jadrana.

(47 stranica, 9 slika, 7 tablica, 93 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: akvakultura, filogenija, Limski kanal, Malostonski zaljev, MLSA, *Vibrio*

Voditelj: dr. sc. Lorena Perić

Suvoditelj: doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Izv. Prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Doc. dr. sc. Ivan Šulc

Doc. dr. sc. Hana Fajković

Zamjena: Doc. dr. sc. Zorica Petrinec

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Thesis

Master

Molecular identification of *Vibrio* genus bacteria from bivalve aquaculture sites in Eastern Adriatic

Tonka Buha

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The genus *Vibrio* consists of important shellfish and other invertebrate, fish and human pathogens. In order to preserve their health, identification to species level is essential. The aim of this study was to identify selected *Vibrio* samples to species level, to determine phylogenetic relationships and to determine similarities and differences in the structure of the *Vibrio* community between the shellfish aquaculture of the Lim Bay and Mali Ston Bay. Samples of seawater, sediments, tissues of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and European flat oyster (*Ostrea edulis*) were analyzed. Different coding regions of six housekeeping genes and 16S rRNA were targeted by the polymerase chain reaction (PCR). Samples were sent for sequencing after which a multilocus sequence alignment (MLSA) was performed. For phylogenetic analysis two methods were used: Maximum likelihood and Neighbour-joining. Experimental samples within the *Harvey* clade were identified to the species level while experimental samples within the *Splendidus* clade to the grouping level. In Lim Bay, six species and five *Splendidus* groups have been identified, while five species and six *Splendidus* groups in Mali Ston Bay. The presence of several pathogenic and conditionally pathogenic *Vibrio* species in the eastern Adriatic has been proven.

(47 pages, 9 figures, 7 tables, 93 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: aquaculture, phylogeny, Lim Bay, Mali Ston Bay, MLSA, *Vibrio*

Supervisor: Lorena Perić, PhD

Co-supervisor: Asst. Prof. Tomislav Ivanković, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Dr. Tomislav Ivanković

Assoc. Prof. Dr. Jasna Lajtner

Asst. Prof. Dr. Ivan Šulc

Asst. Prof. Dr. Hana Fajković

Zamjena: Asst. Prof. Dr. Zorica Petrincec

Thesis accepted: 15.09.2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Akvakultura školjkaša u Hrvatskoj	1
1.2. Opće i ekološke značajke bakterija roda <i>Vibrio</i>	3
1.3. Mikrobna sistematika	4
1.3.1. Sistematika bakterija roda <i>Vibrio</i>	6
1.4. <i>Vibrio sp.</i> i akvakultura školjkaša	8
1.4.1. <i>Vibrio sp.</i> i porodica <i>Ostreidae</i>	10
1.4.2. <i>Vibrio sp.</i> i porodica <i>Mytilidae</i>	11
1.5. Cilj istraživanja	11
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Uzorci bakterija roda <i>Vibrio</i>	14
3.2. Rezultati fizikalno-kemijske analize vode	15
3.4. Izolacija DNA	15
3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	16
3.6. Automatsko sekvenciranje.....	18
3.7. Računalne analize nukleotidnih sekvenci.....	19
3.7.1. Uređivanje i sravnjivanje nukleotidnih sekvenci.....	19
3.7.2. Filogenetska analiza	19
4. REZULTATI	21
4.1. Molekularna identifikacija i filogenetski odnosi analiziranih <i>Vibrio</i> uzoraka	21
4.1.1. Podskupina <i>Splendidus</i>	21
4.1.2. Podskupina <i>Harveyi</i>	25
4.1.3. Analiza ostalih uzoraka	28
4.2. Rezultati iz oba uzgajališta.....	30
5. RASPRAVA	33
6. ZAKLJUČAK	38
7. LITERATURA	39
8. PRILOZI	47

POPIS KRATICA

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
MALDI TOF MS	spektrometrija matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom s vremenom preleta (engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>)
ML	metoda najveće vjerojatnosti (engl. <i>Maximum likelihood</i>)
MLSA	metoda multilokusnog sravnjivanja sljedova nukleotida (engl. <i>Multilocus Sequence Analysis</i>)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	metoda susjednog sparivanja (engl. <i>Neighbor-Joining</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polimerase chain reaction</i>)
RH	Republika Hrvatska
TAE	Tris-acetat EDTA pufer
TCBS	engl. <i>Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose</i>

1. UVOD

1.1. Akvakultura školjkaša u Hrvatskoj

Akvakultura je definirana kao: „uzgoj ili kultivacija vodenih organizama korištenjem tehnika osmišljenih da povećaju proizvodnju navedenih organizama preko prirodnog kapaciteta okoliša, gdje organizmi ostaju u vlasništvu fizičke ili pravne osobe tijekom faze uzgoja i proizvodnje, do i uključujući fazu izlova” (Uredba (EU) br. 1380/2013). Akvakulturu dijelimo na slatkovodnu i morsku, tj. marikulturu. U Republici Hrvatskoj (RH) marikultura uključuje uzgoj bijele ribe, plave ribe (tuna) i školjkaša (<https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=79>). U Europskoj Uniji se prakticiraju tri glavna načina uzgoja školjkaša: splavi i konopci za školjkaše, međuplimni uzgoj i pridneni uzgoj (Huntington i sur. 2006). U RH industrija školjkaša oslanja se na model ekstenzivne proizvodnje u košarama i okomitim visećim strukturama (lanternama, pergolarima) postavljenim na linijske plutajuće sustave, a kontinuirana se proizvodnja u potpunosti temelji na prihvatu divljih ličinki iz vodenog stupca na kolektore. S obzirom da većina komercijalnih vrsta školjkaša brzo raste, može se uzgajati u relativno visokoj gustoći i nema potrebe za dodatnim izvorom hrane, akvakultura školjkaša smatra se jednom od održivijih opcija zadovoljavanja sve veće potražnje za hranom (Shumway i sur. 2003; Cranford i sur. 2003). Osim kao održiva grana prehrambene industrije, akvakultura RH ima važan ekonomski značaj, jer osigurava zapošljavanje lokalnog stanovništva koji se u proizvodnju uključuju kroz male obiteljske tvrtke, likvidni novac, devizni prihod, potiče protok ljudi i kapitala te je značajan čimbenik programa ruralnog razvoja (Katavić 2003).

Akvakultura školjkaša duž hrvatske obale istočnog Jadrana temelji se na uzgoju mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) na koju otpada približno 90% udjela u proizvodnji. Autohtona europska plosnata kamenica (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758), također predstavlja važnu komercijalnu vrstu u akvakulturi RH. Staništa i uzgoj ove vrste kamenice diljem Europe uglavnom su devastirani nakon masovnog pomora 70-tih godina prošlog stoljeća uzrokovanog parazitskom infekcijom. Iz tog je razloga u europskoj akvakulturi ova autohtona vrsta kamenice uspješno zamijenjena alohtonom pacifičkom kamenicom (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) porijeklom sa Tihog oceana, koja je otpornija na parazitske bolesti i na koju otpada više od 90% proizvodnje kamenica u Europi. Autohtona *O. edulis* i dalje se smatra delikatesom te na tržištu postiže višu cijenu zbog velike potražnje koja

višestruko premašuje proizvodne kapacitete zbog čega je interes za njezinom proizvodnjom i dalje prisutan kod uzgajivača na istočnom Jadranu. Prema podacima iz Ministarstva poljoprivrede, 2019. godine proizvedeno je 947 tona mediteranskih dagnji i 61 tona europske plosnate kamenice (<https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=14>).

Osim mediteranske dagnje i plosnate kamenice, na području Jadrana nalazimo oko 200 vrsta školjkaša među kojima i veći broj jestivih poput brbavice (*Venus verrucosa* Linnaeus, 1758), kunjke (*Arca noae* Linnaeus, 1758), kućica (*Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758), jestive srčanke (*Cerastoderma edule* Linnaeus, 1758), jakobove kapice (*Pecten jacobaeus* Linnaeus, 1758) i prstaca (*Lithophaga lithophaga* Linnaeus, 1758) kojeg je zakonom zabranjeno izlovljavati i stavljati u promet (Mašić 2004, NN 86/2002).

Najraniji podaci o uzgoju školjkaša na području RH datiraju još iz 16. stoljeća i vezani su uz uzgoj kamenica u Malostonskom zaljevu (Zelić 2015). Danas, duž istočne obale Jadrana, postoji 14 uzgojnih područja za školjkaše: Savudrijska vala, Vabriga, Limski zaljev, Raški zaljev, Uvala Budava, Medulinski zaljev, Uvala Stara Povljana, Modrič – Seline, Novigradsko more, Pirovački zaljev, Ušće rijeke Krke, Marinski zaljev, Malostonski zaljev i Uvala Sobra na Mljetu (NN 13/2013).

Meso školjkaša je odličan izvor vitamina i minerala te se učestalo koristi u ljudskoj prehrani (Mašić 2004). Meso školjkaša se konzumira sirovo ili uz blagu termičku obradu što može dovesti do izlaganja različitim uzročnicima bolesti. Kako bi se izbjegao rizik po ljudsko zdravlje i pomor školjkaša, a time i velike ekološke i ekonomske štete, ključne su redovite i temeljite kontrole i sustavni monitoring potencijalnih patogena na područjima uzgoja školjkaša. U RH, uzgoj školjkaša podliježe zakonskim regulacijama i kontrolama. Uzorcima morske vode iz uzgojnih područja redovito se mjere temperatura, salinitet, otopljeni kisik i sastav fitoplanktonske zajednice, dok se uzorci mesa školjkaša testiraju na metale (As, Cd, Hg, Pb), organska zagađivala (klorirani ugljikovodici), biotoksini (PSP - *Paralytic Shellfish Poison*, DSP - *Diarrhetic Shellfish Poison*, ASP - *Amnesic Shellfish Poison*) i mikrobiološka kakvoća. Unutar proizvodnih područja određuju se područja različite kakvoće te se uzgajališta, u skladu s propisanim vrijednostima mikrobiološke kakvoće prema Pravilniku o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla, dijele u tri razreda, tj. zone (I, II i III) (NN 99/2007).

1.2. Opće i ekološke značajke bakterija roda *Vibrio*

Usljed procesa filtriranja morske vode u svrhu hranjenja i izmjene plinova uvjetovanog sesilnim načinom života, školjkaši akumuliraju u svojim tkivima bakterije različitih rodova koje se prirodno javljaju u vodenom stupcu, kao što su *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Photobacterium*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Micrococcus* i *Bacillus* (Romalde i sur. 2013). Stoga je značaj školjkaša kao spremnik bakterija iznimno velik, a naročito kad se radi o bakterijama roda *Vibrio* koje su globalno rasprostranjene i dominantne u morskoj bakterijskoj zajednici te imaju širok raspon domaćina i povezuju se s mortalitetom u akvakulturi i epidemijama.

Bakterije roda *Vibrio* su Gram-negativne, debljine od 0.3 do 1.0 μm i duljine od 1.0 do 3.5 μm te najčešće dolaze u obliku zarez, tj. vibriona, po čemu je i sam rod dobio ime. Mogu se pokretati polarnim bičem ili biti nepokretne. Sve bakterije unutar ovog roda su fakultativni anaerobi, kemoorganotrofni, ne proizvode spore i većina ih je pozitivna na oksidazu. Fermentiraju ugljikohidrate kao što su D-fruktoza, D-glukoza, maltoza, hitin i glicerol uz tvorbu kiselina (Walker i Colwell 1976). Pojedine se vrste roda *Vibrio* mogu razlikovati na temelju određivanja biokemijskih svojstava kao što su rast na kompleksnoj čvrstoj podlozi, tvorba enzima arginin dihidrolaze, sposobnost redukcije nitrata u nitrite, Voges-Proskauer reakcija (tvorba acetoina), rast pri 40°C, korištenje saharoze, L-arabinoze i D-sorbita (Zrnčić 1999). Većina vrsta roda *Vibrio* dobro raste na podlogama s morskom vodom kao što je selektivna podloga TCBS (engl. *Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose*) zbog stimulirajućeg učinka iona natrija na njihov rast. *Vibrio* bakterijama odgovara topla voda u rasponu od 17 do 40 °C te najbolje rastu u lužnatim uvjetima (Percival i Williams 2014). Posjeduju visoki potencijal kolonizacije djelomično zbog njihove metaboličke svestranosti i genetske varijabilnosti (Le Roux i sur. 2016).

Vibrio bakterije su sveprisutne u okolišu te se nalaze u vodenim, ponajprije morskim, staništima (Percival i Williams 2014). U okolišu, bakterije roda *Vibrio* imaju važnu ulogu u ciklusu ugljika i osmoregulacije (Zhang i sur. 2018; Johnson 2013). Osim vodenog stupca i sedimenta, posebno su brojne u zajednici sa morskim organizmima poput školjkaša, riba i koralja (Destoumieux-Garzón i sur. 2020; Ina-Salwany i sur. 2019; Munn 2015). Pojavnost, raznolikost i brojnost vibrija uvjetovani su mnogobrojnim faktorima kao što su temperatura, salinitet, domadar, količina nutrijenata i njihove međusobne interakcije. Bakterije roda *Vibrio* su najčešći uzročnici bolesti akvatičnih životinja. Virulencija je raširena pojava unutar roda *Vibrio* koja nije u potpunosti razjašnjena, a ovisi o mnogobrojnim čimbenicima kao što su

temperatura, svojstva domaćina poput vrste, kondicija i životne faze, soju *Vibrio* bakterije te o ostaloj mikrobioti (Le Roux i sur. 2015; Travers i sur. 2009; Zanella i sur. 2017). Bolest uzrokovana patogenim *Vibrio* vrstama zove se vibrioza.

Nedavna ekološka istraživanja pokazala su da postoji korelacija između sezonske promjene temperature vode i raznolikosti, virulencije i brojnosti različitih *Vibrio* vrsta (Alfaro i sur. 2018; Jug-Dujaković i sur. 2019; Chen i sur. 2020). Na području Jadrana, točnije Venecijanske lagune u Italiji, provedeno je istraživanje unutar kojeg je zabilježena sezonska razlika u brojnosti pojedinih *Vibrio* vrsta kao što su *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. diabolicus* i *V. splendidus* koje su primarno izolirane u zimskim, dok su vrste *V. mediterranei*, *V. shilonii*, *V. chagasii*, *V. brasiliensis* i *V. orientalis* primarno izolirane u ljetnim mjesecima. Vrste *V. parahaemolyticus* i vrste iz *Harveyi* skupine pronađene su za vrijeme cijele godine (Rahman i sur. 2014). U ostalim istraživanjima na Mediteranu, utvrđeno je da je *V. splendidus* dominantan tijekom zime i proljeća, a *V. harveyi* tijekom toplijih mjeseci (Arias i sur. 1999; Pujalte i sur. 1999). Generalni trend povećanja brojnosti *Vibrio* populacija s povećanjem temperature potkrijepljen je i sve većim brojem zabilježenih vibrioza kod ljudi i masovnih pomora beskralješnjaka (Vezzulli i sur. 2012; Le Roux i sur. 2015). Zbog navedenog utjecaja povećanja temperature mora, tj. utjecaja klimatskih promjena, povećava se prijetnja koju predstavljaju *Vibrio* bakterije u akvakulturi riba i školjkaša (Vezzulli i sur. 2016; Baker-Austin i sur. 2017). Nadalje, istraživanja ukazuju na to da sediment služi kao svojevrsni zimski rezervoar nekih patogenih vrsta vibrija, koji se resuspendira uslijed proljetnog pojačanog gibanja vodenih masa, uzrokujući tako značajno povećanje brojnosti vibrija u vodenom stupcu (Randa i sur. 2004).

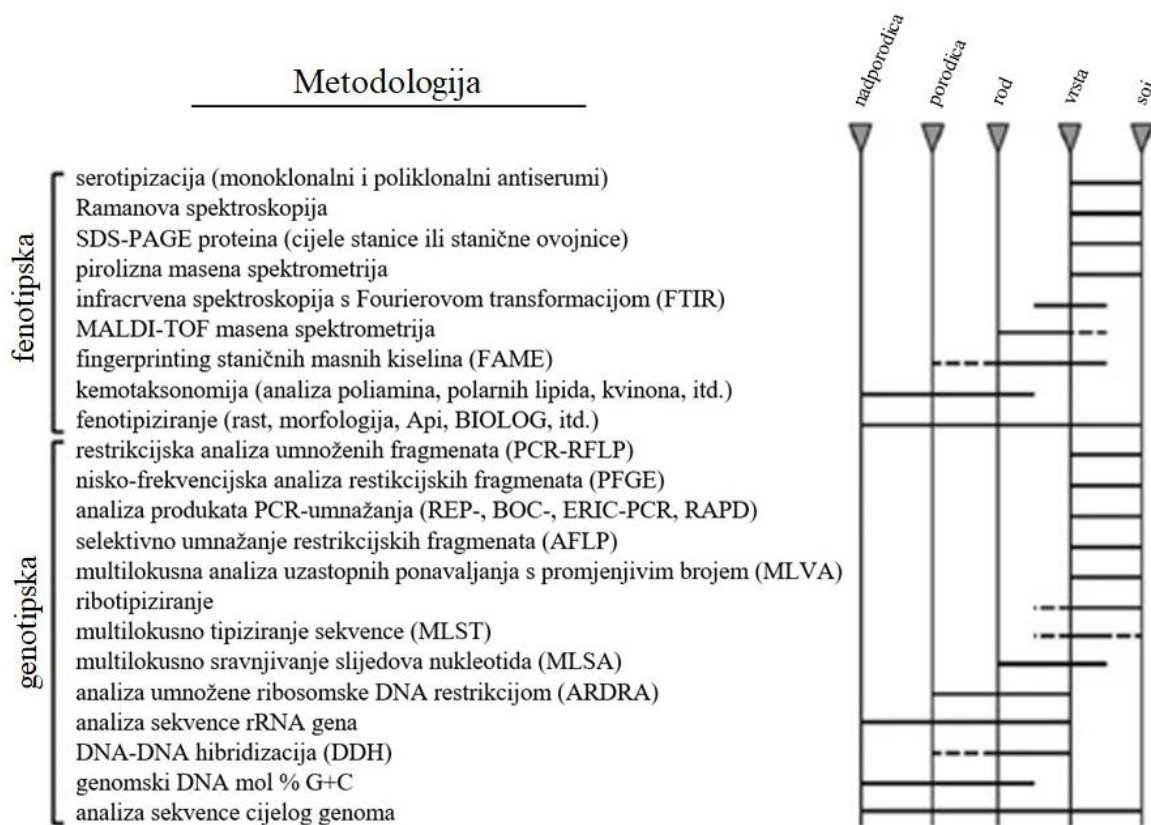
1.3. Mikrobna sistematika

Sistematika je znanstvena disciplina koja istražuje raznovrsnost organizama i njihove međusobne veze. Taksonomija je dio sistematike koji izučava klasifikaciju organizama baziranu na filogenetskim odnosima. Taksonomija se sastoji od tri odvojena, ali međusobno povezana područja: klasifikacija, nomenklatura i identifikacija. Klasifikacija bakterija je razvrstavanje bakterija u taksonomske grupe prema sličnim osobinama i njihovom povezanosti. Razlikujemo klasičnu klasifikaciju (po Davidu Bergeyu), numeričku, biokemijsku te klasifikaciju na temelju DNK analiza. Osnovna i najvažnija taksonomska skupina u mikrobnoj sistematici je vrsta. Pojam bakterijske vrste, za razliku od vrsta viših

organizama, nije strogo definiran te je još uvijek temelj brojnih rasprava unutar znanstvene zajednice. Pojam "vrsta" koji se primjenjuje na bakterije definiran je kao posebna skupina sojeva koji imaju određene razlike i koje općenito slične jedna drugoj u bitnijim značajkama biološke organizacije (Staley 2006).

Nomenklatura je davanje imena organizmu prema međunarodnim propisima u skladu sa njihovim osobinama. Najpoznatija je binomna nomenklatura u kojoj je prvi dio imena izveden iz naziva roda dok je drugi dio vezan za nekakvu bližu karakteristiku same vrste.

Klasifikacija i identifikacija bakterija zahtijeva poznavanje njihovih morfoloških, biokemijskih, fizioloških i genetskih karakteristika. Nova saznanja često zahtijevaju promjene u taksonomiji, što često rezultira promjenom postojeće klasifikacije, nomenklature i kriterija za identifikaciju. U identifikaciji i opisivanju bakterija razlikujemo tri skupine metoda: fenotipske, genotipske i filogenetske (Slika 1.). Fenotipskim analizama ispituju se morfološke, metaboličke, fiziološke i kemijske karakteristike bakterija. Genotipske metode temelje se na karakteristikama genoma te su ključne u određivanju bakterije do razine vrste. Fenotipske i genotipske analize grupiraju organizme na temelju sličnosti i nadopunjuju se filogenetskim metodama koje smještaju organizam u evolucijski okvir.



Slika 1. Metodologije za karakterizaciju prokariota i približne odgovarajuće taksonomske razine razlučivosti. Preuzeto i prilagođeno prema: Moore i sur. (2010).

1.3.1. Sistematika bakterija roda *Vibrio*

Rod *Vibrio* spada u koljeno *Proteobacteria*, razred *Gammaproteobacteria*, red *Vibrionales* i porodicu *Vibrionaceae*. Porodica *Vibrionaceae*, osim roda *Vibrio* obuhvaća i rodove: *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Echinimonas* i *Aliivibrio* (Gil-Gomez i sur. 2014). Prva opisana bakterija roda *Vibrio* bila je uzročnik bolesti kolere, *Vibrio cholerae*, a prvi ju je opisao Filippo Pacini 1854. godine. Determinacija vrste (identifikacija) pomoću fenotipskih metoda pokazuje stanovita ograničenja poput primjerice metaboličkih zahtjeva i uvjeta kulture (npr. izvor hrane, temperatura i generacijsko vrijeme) za velik broj *Vibrio* vrsta.

Jedna od češće korištenih fenotipskih metoda u identifikaciji bakterija roda *Vibrio* je masena spektrometrija matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom s vremenom preleta (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry*; MALDI TOF MS). Ova se brza i jednostavna metoda temelji na analizi karakterističnih spektara masa proteina dobivenih iz čiste kulture mikroorganizama uzgojenih na ploči koji se uspoređuju sa referentnim spektrima pohranjenima u referentnoj biblioteci. Iako se ova metoda identifikacije vrste mikroorganizama uspješno primjenjuje u medicini i veterini, kada je riječ o bakterijama roda *Vibrio* u okolišnim uzorcima, pokazala se pouzdanom tek za utvrđivanje identiteta do razine roda, podskupine (filogrupe) i samo za određene bakterije do razine vrste. Naime, učinkovitost metode MALDI TOF MS za određivanje vrste roda *Vibrio* još uvijek je značajno ograničena nedovoljnom popunjenošću biblioteke spektara masa ovih bakterija. Ipak, korisna je za brzi pregled velikog broja uzorka koji se obično prikupe nakon terenskog istraživanja, kako bi se za daljnju analizu izdvojili uzorci roda *Vibrio* i utvrdila njihova podskupina (Culot i sur. 2021).

Determinacija zasnovana na molekularnim metodama, a naročito sekvenciranju određenih gena - filogenetskih markera omogućilo je prevladavanje većine prethodno navedenih problema (Lokmer i Wegner 2015; Lokmer i sur. 2016a, 2016b). Tako se sekvenciranje 16S rRNA gena smatra „zlatnim standardom“ kod identifikacije i klasifikacije bakterija, no pokazao se neučinkovitim kad je riječ o blisko srodnim bakterijskim vrstama, kao što je to slučaj s bakterijama roda *Vibrio*. Naime, iako ovaj rod karakterizira velika heterogenost vrsta, njihova identifikacija sekvenciranjem 16S rRNA gena zbog izražene međusobne sličnosti (više od 90%) ne daje dovoljnu razlučivost (Sawabe i sur. 2013; Gomez-Gil i sur. 2014).

Iako je svrstavanje bakterija u prirodni klasifikacijski sustav otežano nedostatkom jasno primjenjivog koncepta bakterijske vrste, uvođenje naprednijih molekularnih metoda poput metode multilokusnog sravnjivanja sljedova nukleotida (engl. *Multilocus Sequence Analysis*, MLSA) pružilo je mnogo veću razlučivost za mikrobiološku identifikaciju i taksonomiju bakterija (Gevers i sur. 2005), između ostaloga i roda *Vibrio*. Ova se metoda temelji na sekvenciranju univerzalnog seta konstitutivno eksprimiranih gena (engl. *housekeeping genes*). Navedena metoda često je korištena za identifikaciju *Vibrio* vrsta (Thompson i sur. 2007; Pascual i sur. 2010; Sawabe i sur. 2013). Do danas je zahvaljujući usavršavanju molekularnih metoda opisano više od 100 *Vibrio* vrsta (Baker-Austin i sur. 2018) grupiranih s obzirom na iznimno izraženu fenotipsku i genotipsku sličnost u više klastera ili podskupina koje se neprestano nadopunjuju i ažuriraju (Tablica 1.). Monofiletske podskupine *Harveyi* i *Splendidus* su najbrojnije i najprisutnije skupine roda *Vibrio* na području Mediterana te uključuju neke od važnijih patogenih vrsta za akvakulturu školjkaša, no njihovo razlučivanje i identificiranje je otežano zbog brojnosti vrsta unutar grupa i velike međusobne sličnosti genoma. Izbor filogenetskih markera u MLS analizi od velike je važnosti s obzirom da nisu svi dovoljno informativni za svaku podskupinu roda *Vibrio*, osobito ako analizirani sojevi pripadaju usko povezanim vrstama. Primjerice, geni koji su se pokazali dobrim markerima za razlučivanje unutar podskupine *Harveyi* su *rpoD*, *toxR* i *rctB*, a unutar podskupine *Splendidus* *rpoD*, *mreB* i *gyrB* (Pascual i sur. 2010; Sawabe i sur. 2013; Pérez-Cataluña 2016).

Tablica 1. Podskupine unutar roda *Vibrio* s primjerima vrsta. (Sawabe i sur. 2013; Urbanczyk i sur. 2013; Prado i sur. 2014; Thompson i sur. 2003; Travers i sur. 2015).

PODSKUPINA	VRSTE
<i>Anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. aestuarianus</i> , <i>V. ordalii</i>
<i>Cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. furnissii</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. mimicus</i> , <i>V. parilis</i>
<i>Coralliilyticus</i>	<i>V. coralliilyticus</i> , <i>V. neptunis</i> , <i>V. ostreicida</i>
<i>Diazotrophicus</i>	<i>V. diazotrophicus</i> , <i>V. hispanicus</i>
<i>Gazogenes</i>	<i>V. aerogenes</i> , <i>V. gazogenes</i> , <i>V. rhizosphaerae</i> , <i>V. ruber</i>
<i>Halioticoli</i>	<i>V. breoganii</i> , <i>V. ezurae</i> , <i>V. gallicus</i> , <i>V. halioticoli</i> , <i>V. inusitatus</i> , <i>V. neonatus</i> , <i>V. superstes</i>

Harveyi	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. azureus</i> , <i>V. campbellii</i> , <i>V. communis</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. mytili</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. rotiferianus</i> , <i>V. sagamiensis</i> , <i>V. jasicida</i> , <i>V. owensii</i> , <i>V. diabolicus</i>
Mediterranei	<i>V. mediterranei</i> / <i>V. shilonii</i> , <i>V. maritimus</i> , <i>V. variabilis</i>
Nereis	<i>V. nereis</i> , <i>V. xuiixuii</i>
Nigripulchritudo	<i>V. nigripulchritudo</i> i <i>V. penaeicida</i>
Orientalis	<i>V. brasiliensis</i> , <i>V. hepatarius</i> , <i>V. orientalis</i> , <i>V. sinaloensis</i> , <i>V. tubiashii</i>
Pectenocida	<i>V. caribbeanicus</i> i <i>V. pectenocida</i>
Porteresiae	<i>V. porteresiae</i> , <i>V. tritonius sp. nov.</i>
Proteolyticus	<i>V. proteolyticus</i>
Rumoiensis	<i>V. litoralis</i> , <i>V. rumoiensis</i>
Scophthalmi	<i>V. ichthyoenteri</i> , <i>V. ponticus</i> , <i>V. scophthalmi</i>
Splendidus	<i>V. chagasii</i> , <i>V. crassostrea</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> , <i>V. fortis</i> , <i>V. gigantis</i> , <i>V. kanaloae</i> , <i>V. lentus</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. pomeroyi</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. tasmaniensis</i> , <i>V. artaborum</i> <i>V. atlanticus</i> , <i>V. celticus</i> , <i>V. gallaecicus</i> , <i>V. hemicentroti</i> , <i>V. toranzoniae</i>
Tapetis	<i>V. tapetis</i>
Vulnificus	<i>V. navarrensis</i> i <i>V. vulnificus</i>

1.4. Rod *Vibrio* i akvakultura školjkaša

Vibrio bakterije su sastavni dio mikroflore školjkaša gdje mogu dosegnuti koncentracije oko 100 puta veće od onih u okolnoj morskoj vodi (Shen i sur. 2009). Školjkaši kroz proces filtriranja mogu velikom brzinom uzimati *Vibrio* bakterije iz okoliša zbog čega su *Vibrio* populacije koje ih koloniziraju često odraz onih iz okolne morske vode. Mehanička, kemijska i stanična selektivnost mogu utjecati na akumulaciju pojedinih *Vibrio* populacija u tkivima školjkaša zbog čega školjkaši mogu predstavljati rezervoare određenih bakterijskih vrsta (Zanella 2017; Bruto i sur. 2016).

Do danas su opisani raznovrsni odnosi između školjkaša i *Vibrio* vrsta koji sežu od probiotičkih, mutualističkih i neturalnih sve do patogenih. Najčešće *Vibrio* bakterije vezane za školjkaše na području Europe su vrste koje pripadaju monofiletskim podskupinama *Splendidus*

i *Harveyi* (Romalde i sur. 2013; Le Roux i sur. 2016). *Vibrio* vrste povezane s ljudskim bolestima vezanim uz konzumaciju školjkaša te izloženosti otvorenih rana morskoj vodi su *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* i *V. fluvialis* koji, iako najčešće ne utječu na zdravlje školjkaša, mogu uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kod ljudi poput gastroenteritisa i sepse (Baker-Austin i sur. 2018). Među *Vibrio* bakterijama patogenim za školjkaše značajne su vrste koje pripadaju *Splendidus* podskupini poput *V. crassostreae*, *V. splendidus*, *V. celticus*, *V. cyclitrophicus*, *V. tasmaniensis*, *Harveyi* podskupini poput *V. alginolyticus*, te vrste iz drugih *Vibrio* podskupina poput *V. aestuarianus*, *V. tubiashii*, *V. ostreicida*, *V. neptunis*, *V. coralliilyticus*, *V. aesturianus*, *V. europaeus*, *V. neptunius*, *V. pectenocida*, *V. bivalvicida* i *V. tapetis* (Travers i sur. 2015; Dubert i sur. 2017). U akvakulturi školjkaša najvažniju ulogu imaju primarno i uvjetno patogene *Vibrio* vrste koje mogu ugroziti ličinački, juvenilni i odrasli životni stadij. U juvenilnim i odraslim stadijima školjkaša vibrioza može uzrokovati abnormalnosti u ljušturi i probavnom traktu te ugibanje (Elston i Leibovitz 1980). Poznata pojava kod juvenilnih stadija kamenica uzrokovana bakterijama roda *Vibrio* je ljetna smrtnost (engl. *summer mortality*) (EFSA Panel on AHAW 2010). Bolest „smeđeg prstena“ (engl. *brown ring disease*) uzrokovana je vrstom *V. tapetis* te primarno zahvaća odrasle stadije školjkaša iz roda *Ruditapes* gdje uzrokuje ozbiljne fiziološke poremećaje i smrt (Paillard 2004).

Školjkaši u uzgoju, za razliku od onih u prirodi, zbog gustoće populacije i drugih neprirodnih uvjeta, posebno su izloženi brzom širenju bolesti. Smrtnost školjkaša, ponajprije ličinačkih stadija u mrijestilištima prvi je puta opisana prije više od 60 godina (Guillard 1959). Tijekom posljednjeg desetljeća broj pomora školjkaša i zabilježenih slučajeva vibrioze kod ljudi kontinuirano raste (Le Roux i sur. 2015). Poznavanje *Vibrio* populacija je neophodno kako bi se izbjegle visoke stope smrtnosti i brzi gubitak proizvodnih serija uzrokovanih vibriozom kao i očuvalo ljudsko zdravlje. Vibrioza se može suzbijati raznim antibioticima, ali je najrašireniji postupak suzbijanja bolesti u mrijestilištima prilagodba tehnoloških postupaka za suzbijanje stresa, odnosno provođenje pojačanih higijenskih mjera i redukcija dnevnog obroka. Zbog nemogućnosti primjene antibiotika i kontrole okolišnih uvjeta, suzbijanje bolesti kod uzgoja školjkaša koje se u cjelosti odvija u prirodnoj sredini je otežano.

Istraživanja provedena tijekom zadnjeg desetljeća rezultirala su podacima o strukturi i prostorno-vremenskoj dinamici zajednice bakterija roda *Vibrio* u okolišnim uzorcima i akvakulturi riba (Gavrilović i sur. 2017; Kapetanović i sur. 2013, 2017a, 2017b; Kolda i sur.

2018). Suprotno tome istraživanja vezana za odnos bakterija roda *Vibrio* i akvakulture školjkaša u RH su sporadična i nedostatna (Topić-Popović i sur. 2010).

1.4.1. Rod *Vibrio* i porodica *Ostreidae*

Bakterije roda *Vibrio* su sastavni dio mikrobiote porodice *Ostreidae* (hrv. kamenice). Do danas su opisani brojni slučajevi bolesti i masovnih pomora kamenica svih životnih stadija povezani s bakterijama roda *Vibrio*. Vibriji povezani s bolestima, primarno ličinačkih stadija pacifičkih kamenica su vrste *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii*, *V. europaeus*, *V. ostreicida*, *V. coralliilyticus*, *V. neptunius*, *V. bivalvicida*. Među različitim patogenim vibrijima, funkcionalna jedinica patogeneze za kamenice može biti klon (npr. kod *V. aestuarianus*), populacija (npr. kod *V. crassostreae*) ili mikrobna zajednica više vibrija, što je dodatno zakomplicirano interakcijama s domaćinskom mikrobiotom (Le Roux i sur. 2016).

Vrste iz podskupine *Splendidus* (*V. splendidus*, *V. tasmaniensis*, *V. cyclitrophicus* i *V. crassostreae*) su uzastopno izolirane iz juvenilnih primjeraka kamenice *C. gigas* zahvaćenih sindromom smrtnosti pacifičke kamenice (engl. *Pacific Oyster Mortality Syndrome*, POMS). 2019. godine u uzgajalištu pacifičke kamenice u Kini *V. alginolyticus* je uzrokovao smrtnost od 60% (Yang i sur. 2021). *Vibrio aestuarianus* je uzrokovao masovni pomor odraslih *C. gigas* u Francuskoj od 2001. te od 2011. u Irskoj, Škotskoj i Španjolskoj (Garnier i sur. 2008; EFSA Panel on AHAW 2010; Travers i sur. 2017).

U 2006. i 2007. godini vrsta *V. tubiashii* se smatra uzročnikom za visoke smrtnosti ličinke pacifičkih kamenica i kamenica Kumamoto (*Crassostrea sikame* Amemiya, 1928) u akvakulturi školjkaša na Zapadnoj obali SAD-a, gdje je zabilježen gubitak proizvodnje od 59% (Elston i sur. 2008). Nadalje, poznati patogen koralja, *V. coralliilyticus*, u eksperimentalnim je uvjetima bio izrazito patogen za istočnu kamenicu (*Crassostrea virginica* Gmeil, 1971), te je u višim koncentracijama uzrokovao 100% smrtnošću ličinki (Richards i sur. 2014). S obzirom na genetičku sličnost *V. tubiashii* i *V. coralliilyticus*, neki od do sada opisanih događaja masovnih pomora kamenica su pogrešno pripisani vrsti *V. tubiashii* umjesto *V. coralliilyticus* (Richards i sur. 2014).

1.4.2. Rod *Vibrio* i porodica *Mytilidae*

Za razliku od kamenica, malo se zna o međusobnim interakcijama između školjkaša porodice *Mytilidae* (hrv. dagnje) i bakterija roda *Vibrio*. Iako dagnje, kao i kamenice, mogu koncentrirati vibrije u svojim tkivima zbog svojeg proteinskog sastava hemolimfe, smatraju se osobito otpornima na mikrobne infekcije (Stabili i sur. 2005). Za razliku od kamenica, hemocite dagnji učinkovito internaliziraju *V. aestuarianus* 01/032 bez izazivanja stresnih stanja i poticanja oslobađanja hidrolitičkih enzima (Balbi i sur. 2013; Pezzati i sur. 2015).

Kao odgovor na toplinski stres, razmnožavanje oportunističkih patogena, poput roda *Vibrio* može povećati osjetljivost domaćina na bolesti i pridonijeti masovnoj smrtnosti u akvakulturi dagnji (Li i sur. 2019). Među rijetkim prijavljenim slučajevima vibrioze u odraslim jedinkama *Mytilus edulis*, izolirani su sojevi povezani sa *Splendidus* skupinom te su ti sojevi prilikom inficiranja dagnji u eksperimentalnim uvjetima izazvali smrtnost (Ben Cheikh i sur. 2017). Također, dokazano je da i druge *Vibrio* vrste poput *V. coralliilyticus* mogu predstavljati potencijalnu opasnost za akvakulturu dagnji (Balbi i sur. 2013).

1.5. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog rada su:

- identificirati prikupljene *Vibrio* uzorke s područja akvakulture školjkaša istočnog Jadrana do razine vrste,
- odrediti filogenetske odnose identificiranih *Vibrio* vrsta,
- usporediti strukture zajednica *Vibrio* bakterija između akvakulture školjkaša sjevernog (Limski kanal) i južnog Jadrana (Malostonski zaljev).

2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Područje istraživanje se nalazi na dvije lokacije istočnog Jadrana.

Jadransko more je najsjeverniji i najizoliraniji dio Sredozemnog mora te ujedno i njegov najplići dio. Smješteno je između Apeninskog poluotoka sa zapadne strane i Balkanskog poluotoka s istočne strane. Ljetne temperature Jadrana variraju između 22 i 26 °C, a zimske između 10 °C na jugu i do 2 °C na sjeveru. Protok morske vode u istočnom Jadranu pod utjecajem je Istočnojadranske struje koja donosi topliju i slaniju vodu iz istočnog Sredozemlja i Jonskog mora. Istočna obala je građena od vapnenca i dolomita te je za razliku od zapadne obale vrlo razvedena i sastoji se od brojnih otoka i poluotoka.

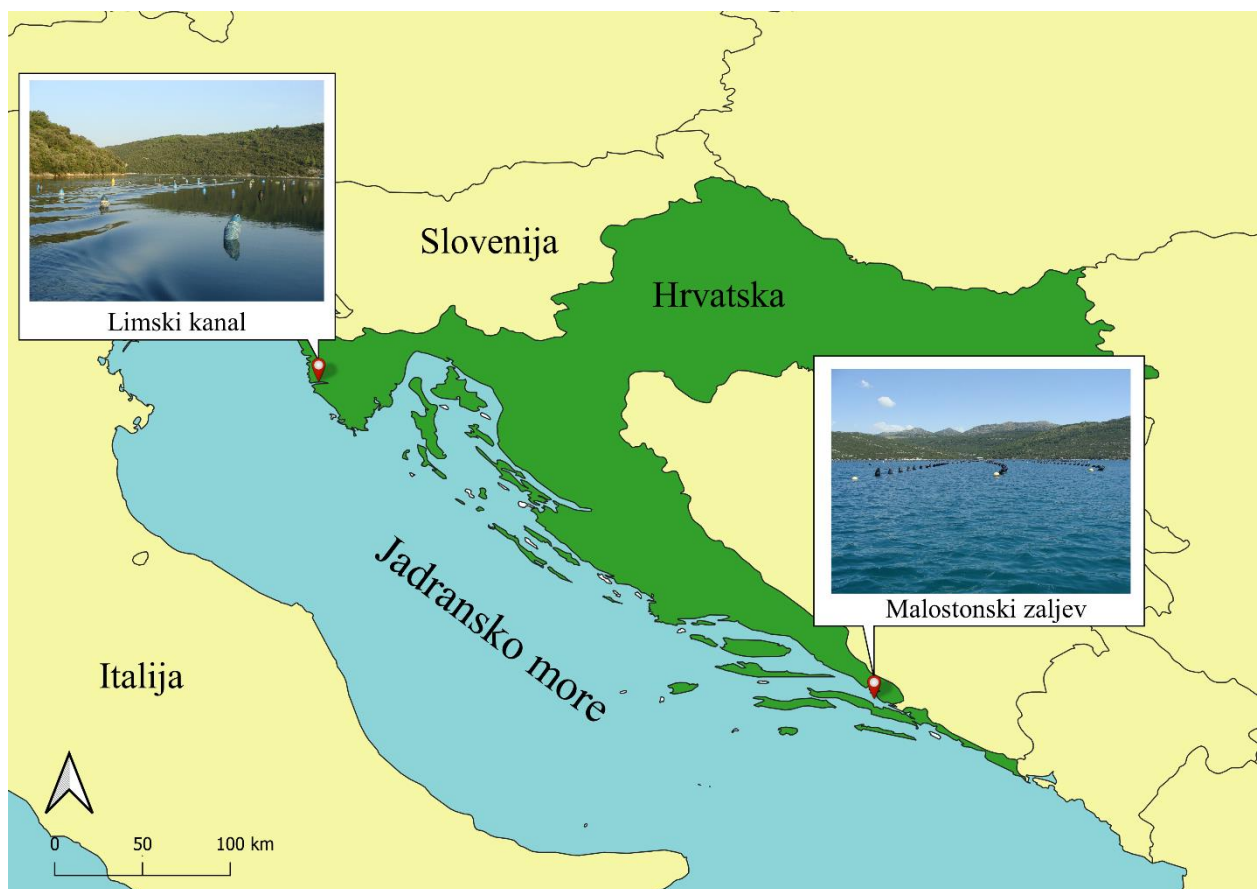
U svrhu ovog istraživanja uzorci tkiva školjkaša, morske vode i sedimenta prikupljeni su s područja dva uzgajališta školjkaša na istočnoj obali Jadrana: Limski kanal i Malostonski zaljev (Slika 2.).

Limski kanal se nalazi na području Sjevernog Jadrana i pod stalnim je više ili manje izraženim utjecajem dotoka slatkih voda i nutrijenata sa kopna te pripada umjereno eutrofnim područjima. Kanal je uzak (prosječno 600 m širine) i duboko usječen u zapadnu obalu Istarskog poluotoka (duljina oko 11 000 m). Najplići je na krajnjem kopnenom dijelu gdje mu dubina iznosi svega nekoliko metara dok mu je najdublji dio na samom ulazu gdje doseže do 33 m. Zbog svojih specifičnih biocenoza Limski kanal je 1979. godine proglašen posebnim rezervatom.

Limski kanal je primarno poznat po uzgoju dagnji koji je na tom području započeo 1888. godine. Uz dagnje, od školjkaša se na području Lima još uzgajaju i europske plosnate kamenice. Uzorci korišteni u ovom istraživanju prikupljeni su iz tvrtke Istrida d.o.o. na čijim su instalacijama i uzgajani.

Malostonski zaljev se nalazi na području južnog Jadrana i račva se u nekoliko manjih zaljeva i uvala. Dužina zaljeva je 28 km s najvećom dubinom 29 m. Ukupna površina Malostonskog zaljeva iznosi 760 ha, a ukupna je produktivna površina koja dolazi u obzir za uzgoj školjkaša 460 ha (Šimunović 2004). Na zaljev utječu podvodni izvori slatke vode kao i rijeka Neretva te se zaljev, kao i u slučaju Limskog kanala, svrstava u umjereno eutrofno područje.

Malostonski zaljev je najvažnije uzgojno područje za akvakulturu školjkaša čija tradicija uzgoja datira još iz doba antike dok su prvi pismeni dokazi o uzgoju iz 16. st. Od školjkaša, na području Malostonskog zaljeva uzgajaju se mediteranske dagnje, europske plosnate kamenice te jakobove kapice. U Malostonskom zaljevu, korišteni školjkaši su otkupljeni od malog lokalnog obrta: “Tims obrt za uzgoj školjaka”. Otkupljene školjke su uzgajane na instalacijama na području za kojeg koncesiju ima Institut za more i priobalje Sveučilista u Dubrovniku.

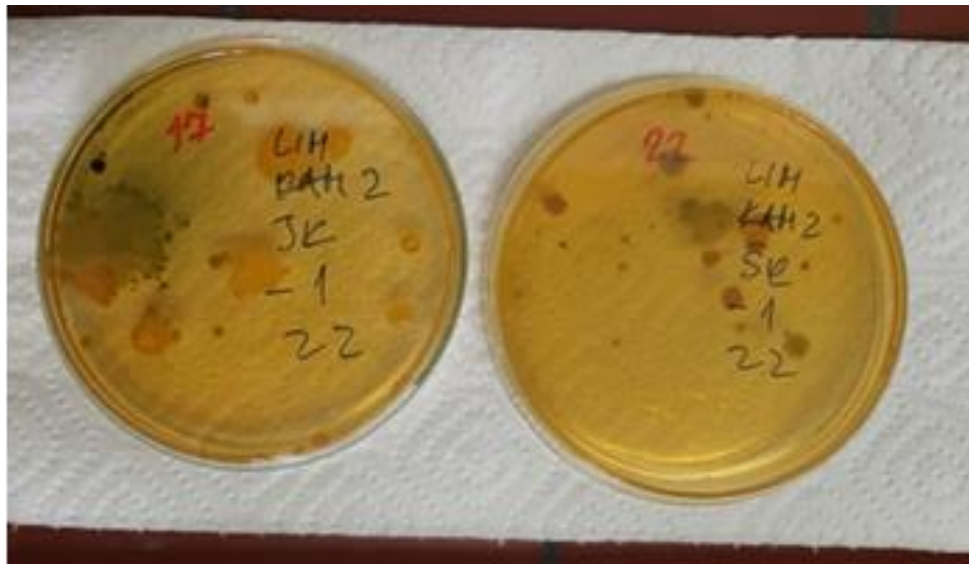


Slika 2. Karta s označenim lokacijama uzorkovanja. Izvor kartografskih podloga: Natural Earth.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci bakterija roda *Vibrio*

U ovom istraživanju koristili su se *Vibrio* uzorci dobiveni iz uzoraka morske vode, sedimenta te tkiva školjkaša mediteranske dagnje i europske plosnate kamenice sakupljeni na dvije lokacije istočnog Jadrana: Limski kanal i Malostonski zaljev. Dobiveni uzorci serijski su razrijeđeni sa sterilnom PBS otopinom (Merck). Metodom širenja po podlozi 1 mL svakog uzorka je inokuliran na selektivnoj podlozi Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) (Difco™, BD) tijekom 24 sata na 22 ili 35 °C (Slika 3.). Pomoću sterilne ušice (eze), kolonije izrasle na TCBS podlozi su nasumično precijepljene na neselektivnu hranjivu podlogu Trypticase soy agar (TSA) (Difco™, BD). Na svim analiziranim uzorcima u sklopu prethodnih istraživanja unutar projekta BEST Adria napravljena je MALDI TOF MS čiji su rezultati služili kao orijentir za odabir početnica unutar ovog istraživanja (Perić i sur. 2021). Tablica s korištenim uzorcima zajedno s lokacijama, opisom uzorkovanja, MALDI TOF MS rezultatima te uvjetima kultivacije navedena je u Prilogu 1.



Slika 3. Selektivna podloga Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) (Difco™, BD) s izraslim kolonijama

3.2. Rezultati fizikalno-kemijske analize vode

U ovom istraživanju korišteni su podaci mjerenja fizikalno-kemijskih parametara morske vode prikupljeni prilikom uzorkovanja u studenom 2020. i siječnju 2021. godine. Na uzgajalištu Linski kanal mjerenja su izvođena na dvije postaje pri površini i 8 metara te uz samo dno. Za uzgajalište u Malostonskom zaljevu mjerenja su izvođena pri površini, 5 metara te uz dno. Na svakoj od navedenih postaja mjerilo se šest fizikalno-kemijskih parametara: temperatura, salinitet, pH, zasićenje vode kisikom te ukupan dušik i fosfor. Svi dobiveni rezultati fizikalno-kemijske analize vode za navedene mjesece i lokacije prikazani su u Prilogu 2.

3.4. Izolacija DNA

Izolacija ukupne genomske DNA bakterija napravljena je direktno iz kolonije pomoću komercijalnog seta reagensa *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma®) prema uputama proizvođača.

U mikropruvetu dodano je 180 µL otopine Lysis T, 20 µL proteinaze. Pomoću sterilne ušice (eze) dodane su i bakterijske kolonije. Mikropruveta je pomiješana pomoću tresilice (Vortex) i stavljena u uređaj Thermomixer 5350 (Eppendorf) na inkubaciju uz povremeno miješanje na 55 °C tijekom 2 do 4 sata. Nakon inkubacije u mikropruvetu je dodano 200 µL otopine Lysis T te je pomiješana na tresilici 15 sekundi nakon čega je slijedila još jedna inkubacija od 10 minuta na 70 °C. Nakon inkubacije uzorku je dodano 200 µL etanola te je promiješan na tresilici 5 do 10 sekundi.

Prethodno, kolonica (engl. *Binding Column*) je uklopljena u 2 mL mikropruvetu (engl. *Collection Tube*). Kako bi se kolonica pripremila za vezanje, u nju je dodano 500 otopine Column Preparation te je centrifugirana jednu minutu na 12 000 x g nakon čega je tekućina izbačena iz mikropruvete.

Sav sadržaj iz mikropruvete s uzorkom je prebačen u mikropruvetu s kolonicom i jednu minutu centrifugiran na 6 500 x g. Izbačena je tekućina iz mikropruvete te je kolonica stavljena u novu mikropruvetu. Uslijedila su dva ispiranja s razrijeđenom otopinom Wash Solution. Prilikom prvog ispiranja, mikropruveta se centrifugirala jednu minutu na 6 500 x g dok se prilikom drugog centrifugirala tri minute na 12 000 – 16 000 x g. Nakon drugog ispiranja

kolonice je prebačena u novu mikroeprevetu. Kolonice je precizno dodano 200 μL otopine Elution nakon čega je uslijedila petominutna inkubacija. Nakon inkubacije uzorak je centrifuran jednu minutu na $\geq 6500 \times g$ i pohranjen na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Kako bi se umnožile ciljane regije koristila se metoda lančane reakcije polimerazom (PCR). Svaka reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 μL sadržavala je 25 μL EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara), 1 μL uzvodne početnice, 1 μL nizvodne početnice, 3 μL eluata te je ostatak volumena nadopunjen destiliranom vodom.

Tablica 2. Početnice korištene za amplifikaciju gena.

Gen	Početnice	Nukleotidni slijed
<i>gyrB</i>	up1E	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCNGGNGGNAARTTY-3'
	up2AR	5'AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC NACRTCNGCRTCNGYCAT-3'
<i>mreB</i>	VmreB12F	5'-ACTTCGTGGCATGTTT-3'
	VmreB999R	5'-CCGTGCATATCGATCATT-3'
<i>rpoD</i>	70F	5'ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT-3'
	70R	5'-ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTT-3'
<i>rctB</i>	rtcBs	5'-ATHGARTTYACNGAYTTYCARYTNC-3'
	rtcBas	5'-YTTNCTYTGHATNGGYTCRAAYTCNCCR-3'
<i>toxR</i>	toxRs	5'-GANCARGGNTTYGARGTNGAYGAY-3'
	toxRas	5'-TTDKKTTGNCCNCYNGTVGCDATN-3'
<i>16S</i>	27F	5'-AGAGTTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Ovisno o prethodno napravljenoj identifikaciji podskupa analiziranih *Vibrio* uzoraka pomoću MALDI-TOF MS, prilikom PCR-a ciljale su se različite kodirajuće regije konstitutivno eksprimiranih gena (engl. *housekeeping genes*) (Tablica 2.). Pomoću specifičnih početnica za te regije, uzorcima iz podskupine *Splendidus* ciljani su *gyrB*, *mreB* i *rpoD*, dok uzorcima iz *Harveyi* podskupine *rpoD*, *rctB* i *toxR* geni. Zbog dovoljne razlučivosti, za dokazivanje uzoraka iz podskupine *Anguillarum* korištena je samo regija *gyrB* gena, a za podskupinu *Mediterranei* 16S rRNA regija. Za uzorke van navedenih podskupina, ciljane su regije sukladno podacima iz baze gena i dostupnoj literaturi.

Reakcija umnožavanja DNA odvijala se prema dva programa ovisno o korištenim početnicama u PCR uređaju Eppendorf® Mastercycler Personal (Tablica 3., Tablica 4.).

Tablica 3. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje gena: *gyrB*, *mreB*, *rpoD*, *rctB* i *toxR* (Yamamoto i sur. 2000).

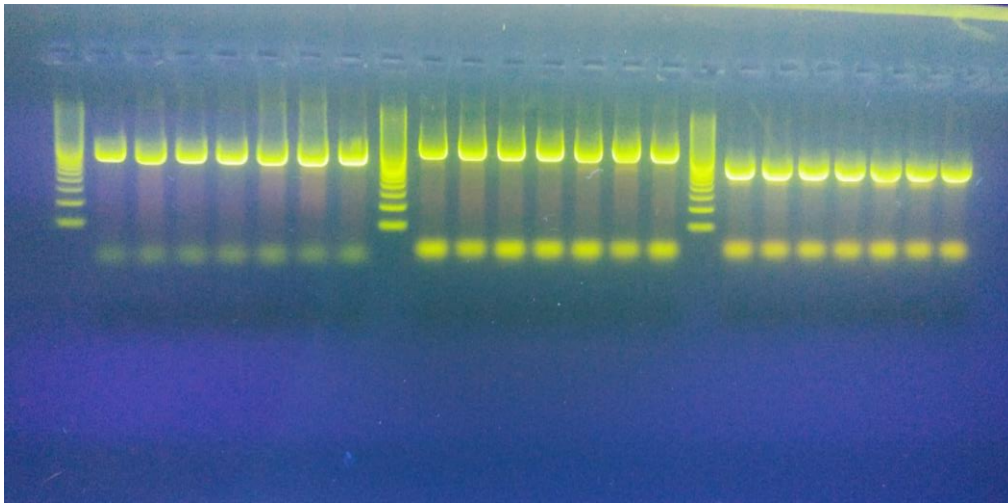
	Broj ciklusa	Temperatura(°C)	Vrijeme
1. Aktivacija polimeraze	1	95	5 min
2. Denaturacija	30	95	30 s
3. Prijanjanje početnica		55	1 min 15 s
4. Produženje lanca		72	1 min 15 s
5. Završno produženje	1	72	10 min

Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje gena 16S rRNA (Mougin i sur. 2020).

	Broj ciklusa	Temperatura(°C)	Vrijeme
1. Aktivacija polimeraze	1	95	5 min
2. Denaturacija	35	95	30 s
3. Prijanjanje početnica		56	45 s
4. Produženje lanca		72	1 min
5. Završno produženje	1	72	7 min

Dobiveni PCR produkti provjerali su se elektroforezom. Za potrebe ovog rada koristio se 1,5%-tni agarozni gel napravljen otapanje agaroze (Sigma) u TAE puferu (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) u omjeru 3:2 uz dodatak 5 µL fluorescirajuće boje GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza). U jažice skrutnutog gela nanosilo se 2-3 µL PCR uzorka s time da se u prvu jažicu unosilo 5 µL biljega DNA (Takara). Elektroforeza se provodila u 1 X TAE puferu pri 110 V, u trajanju 30 do 40 minuta. Nakon toga slijedila je vizualizacije gela pomoću UV transiluminatora (BioRad) te njegovo fotografiranje (Slika 4.). Debljina i sjaj trake DNA na

gelu korišteni su kao pokazatelj uspješnosti umnažanja te se na temelju toga donijela odluka o sekvenciranju ili nesekvenciranju PCR uzorka.



Slika 4. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu.

3.6. Automatsko sekvenciranje

Dobiveni PCR produkti zajedno s početnicama koje su se koristile prilikom umnažanje poslani su na pročišćavanje i sekvenciranje u komercijalni servis Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska).

3.7. Računalne analize nukleotidnih sekvenci

3.7.1. Uređivanje i sravnjivanje nukleotidnih sekvenci

Sve eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence uspoređene su sa sljedovima iz banke podataka GenBank pomoću alata za sravnjivanje BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Engine*, Altschul i sur. 1990). Usporedbom eksperimentalno dobivenih sekvenci s već postojećim sekvencama dostupnima u bazi NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Dobivene sekvence uređene su u programima Geneious Prime i MEGAX (<https://www.geneious.com>; Kumar i sur. 2018). Uređivanje je uključivalo uklanjanje loše očitanih početaka i krajeva sekvenci te analizu polimorfnihi mjesta. Sve prekratke sekvence ili sekvence loše kvalitete izbačene su iz daljnjih analiza. Uz sekvencirane uzorke, za daljnju analizu i usporedbu su se koristili i uzorci preuzeti iz banke gena navedeni u Prilogu 3. ([ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Za *Splendidus* podskupinu, izvršeno je spajanje (engl. *concatenation*) gena po redu navođenja: *gyrB*, *mreB* i *rpoD*. Dobivene sekvence sravnjene su sa sekvencama iz *Splendidus* podskupine preuzetim iz banke gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pomoću ClustalW višestrukog sravnjivanja (Larkin i sur. 2007; Prilog 3.). Jednak postupak primijenjen za *Harveyi* podskupinu gdje su spojeni geni po redu navođenja: *rpoD*, *rctB* i *toxR* te sravnjeni zajedno sa preuzetim referentnim sekvencama (Prilog 3.). Dobivene sekvence u FASTA formatu prebačene su u MEGA format pomoću programa MEGAX radi daljnje filogenetske analize (Kumar i sur. 2018).

3.7.2. Filogenetska analiza

Za filogenetske analize i izradu filogenetskih stabla u ovom istraživanju korištene su dvije metode: metoda najveće vjerojatnosti (engl. *Maximum Likelihood Method*, ML) i metoda susjednog sparivanja (engl. *Neighbor-Joining Method*, NJ). Najbolji evolucijski model za navedene metode je izračunat pomoću programa MEGAX i odabran prema Bayesovom informacijskom kriteriju (engl. *Bayesian information criterion*, BIC), Akaikeovom informacijskom kriteriju (engl. *Akaike information criterion*, AIC) te broju parametara (Kumar

i sur. 2018). Za analizu *Splendidus* podskupine korišten je evolucijski model GTR G+I, za *Harveyi* podskupinu T92 G+I dok je samo za umnoženu *gyrB* regiju korišten model T92 G+I. Pomoću programa MEGAX su također konstruirana filogenetska stabla prema navedenim modelima te su izračunate međuvrsne i unutarvrsne nekorigirane udvojene genetske udaljenosti (engl. *uncorrected pairwise distance*, p-distance) za *Splendidus* i *Harveyi* podskupine (Kumar i sur. 2018). Stablo *Splendidus* podskupine je ukorijenjeno pomoću vanjskih skupina (engl. *outgroup*), u ovom slučaju vrsta *V. cholerae* i *V. diazotrophicus*, dok je stablo *Harveyi* podskupine ukorijenjeno pomoću vrste *V. cholerae*. Pouzdanost filogenetskog stabla analizirana je pomoću bootstrap metode na temelju 1000 poduzoraka (Felsenstein 1985).

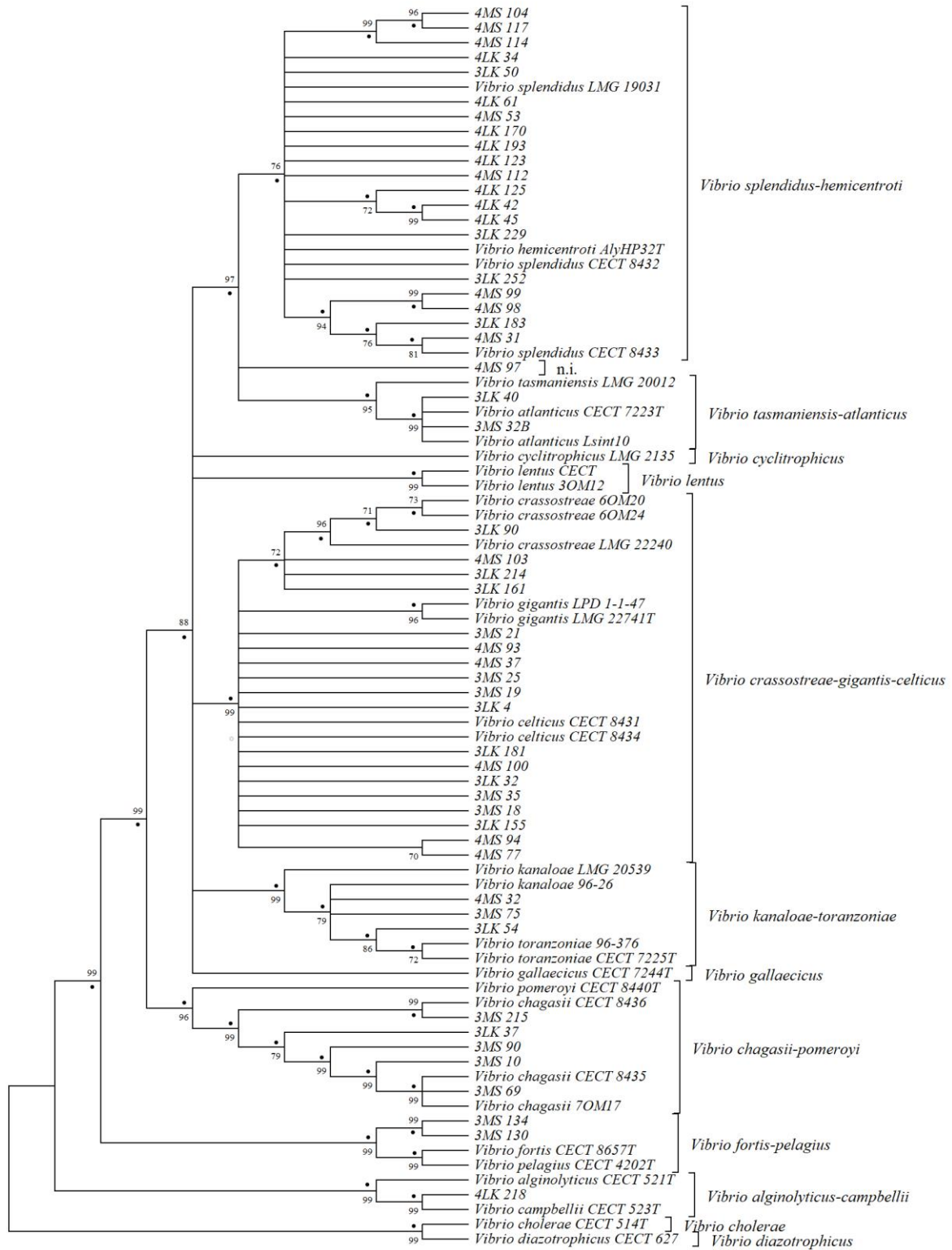
4. REZULTATI

4.1. Molekularna identifikacija i filogenetski odnosi analiziranih *Vibrio* uzoraka

4.1.1. Podskupina *Splendidus*

Ukupno 52 eksperimentalna izolata za koje je prethodno MALDI TOF MS metodom utvrđeno da pripadaju monofiletskoj podskupini *Splendidus*, odabrana su za MLS analizu umnožavanjem gena *gyrB*, *mreB* i *rpoD* (Tablica 2.). Nakon uređivanja, sekvence triju pojedinačnih regija su spojene u sekvencu duljine 2437 nukleotida te su one korištene za daljnje analize. Zajedno sa 33 referentna uzorka iz banke gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) odabranih prema radu Pérez-Cataluña i sur. (2016) (Prilog 3.) unutar kojih su sastavne vrste podskupine *Splendidus* (*V. splendidus*, *V. hemicentroti*, *V. tasmaniensis*, *V. atlanticus*, *V. cyclotrophicus*, *V. lentus*, *V. crassostreae*, *V. gigantis*, *V. celticus*, *V. kanaloae*, *V. toranzoniae*, *V. gallaecicus*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. fortis* i *V. pelagius*), dva referentna soja monofiletske skupine *Harveyi* (*V. alginolyticus*, *V. campbellii*) i dvije „outgrup“ vrste (*V. cholerae*, *V. diazotrophicus*) ukupno je analizirano 84 uzoraka. Na Slici 5. prikazano je konstruirano filogenetsko stablo koje je razgranato, ali se u njemu ističu dvije visoko podržane grane (bootstrap vrijednost 99%). Iz prve, najbrojnije i mješovite grane izdvaja se jedna velika podskupina koja se uz visoku podršku (bootstrap vrijednost 97%) razvija u jedan veći klaster okupljen oko referentnih uzoraka *V. splendidus* i *V. hemicentroti* i drugi, manji, oko referentnih izolata *V. tasmaniensis* i *V. atlanticus*. Ovdje se uočava i izdvajanje eksperimentalnog uzoraka 4MS 97. Druga velika podskupina prve glavne grane predstavlja relativno veliki mješoviti klaster oko referentnih izolata *V. celticus*, iz kojeg se ipak uz visoku podršku (bootstrap vrijednost 99%) izdvaja jedna manja skupina uz referentne izolate *V. crassostreae*. Dva su se referentna uzorka *V. gigantis* dodatno izdvojila unutar ovog klastera. Treća podskupina prve glavne grane sadrži izolate grupirane oko referentnih spojeva *V. kanaloae* i *V. toranzoniae*. Uz ove tri skupine, izdvojio se i jedan mali klaster referentnih uzoraka *V. lentus* i jedan referentni soj *V. cyclotrophicus*. Zadnja podskupina prve glavne grane se uz visoku podršku (bootstrap vrijednost 99%) razdvaja na nekoliko manjih ogranaka, koji uz eksperimentalne izolate obuhvaćaju i referentne sojeve *V. pomeroyi* i *V. chagasii*. Drugu glavnu granu obuhvaćaju dva eksperimentalna izolata uz referentne izolate *V. fortis* i *V. pelagius*. Dodatno, eksperimentalni izolat 4LK 218 jasno se razlučio od okosnice filogenetskog stabla, grupirajući se sa referentnim izolatima *V. alginolyticus* i *V. campbellii*.

Na temelju topologije dobivenog ML stabla, definirano je 10 podskupina monofiletske skupine *Splendidus* (Slika 5.): *V. crassostreae-gigantis-celticus*, *V. splendidus-hemicentroti*, *V. tasmaniensis-atlanticus*, *V. lentus* (samo referentni izolati), *V. chagasii-pomeroyi*, *V. cyclotrophicus* (samo referentni izolati), *V. gallaecicus* (samo referentni izolati), *V. kanaloae-toranzoniae*, *V. alginolyticus-campbellii*, *V. fortis-pelagius*, uz *V. cholerae* i *V. diazotrophicus* („outgroup“). Uzorak 4MS 97 se nije grupirao unutar niti jedne od definiranih grupacija već se u filogenetskom stablu smjestio između grupa *V. splendidus-hemicentrotus* i *V. tasmaniensis-atlanticus* i smatra se nerazvrstanim, neidentificiranim uzrokom. Najveća i najbrojnija grupacija bila je *V. splendidus-hemicentroti* unutar koje se od ukupno 52 smjestilo 20 uzoraka te *V. crassostreae-gigantis-celticus* unutar koje se smjestilo 18 uzoraka. Prosječne vrijednosti međugrupnih nekorigiranih udvojenih genskih distanci za podskupine monofiletske skupine *Splendidus* iznosile su od 0.045 (*V. splendidus-hemicentroti* - *V. tasmaniensis-atlanticus*) do 0.1505 (*V. kanaloae-toranzoniae* - *V. fortis-pelagius*) (Tablica 5.). Za skupinu *V. alginolyticus-campbellii* u odnosu na ostale skupine ova je vrijednost bila viša od 0.017. Prosječne vrijednosti unutargrupnih genskih distanci bile su u rasponu od 0.0183 do 0.096.



Slika 5. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom konkateniranih sekvenci gena *gyrB*, *mreB* i *rpoD*. Na granama su označene ML bootstrap vrijednosti ($\geq 70\%$), dok su NJ bootstrap vrijednosti ($\geq 70\%$) označene simbolom “ • „.

Tablica 5. Prikaz prosječnih vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih udaljenosti za spojenu sekvencu *gyrB*, *mreb* i *rpoD*, unutar (■) i između (□) grupacija filogenetskog stabla za monofiletsku skupinu *Splendidus*. Dobivene grupacije su označene brojevima od 1-13: 1 - *V. crassostreae-gigantis-celticus*, 2 - *V. splendidus-hemicentroti*, 3 - *V. tasmaniensis-atlanticus*, 4 - *V. lentus*, 5 - *V. chagasio-pomeroyi*, 6 - *V. chagasio-pomeroyi*, 7 - 4MS 97*, 8 - *V. gallaecicus*, 9 - *V. kanaloae-toranzoniae*, 10 - *V. alginolyticus-campbelli*, 11 - *V. fortis-pelagius*, 12. - *V. cholerae*, 13. - *V. diazotrophicus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.0239												
2	0.0624	0.0190											
3	0.0641	0.0445	0.0181										
4	0.0642	0.0610	0.0522	0.0183									
5	0.0785	0.0975	0.0976	0.0906	0.0315								
6	0.0779	0.0731	0.0791	0.0783	0.1136	N.D.							
7	0.0905	0.0654	0.0676	0.0885	0.1241	0.1046	N.D.						
8	0.0963	0.1019	0.1000	0.0929	0.1221	0.0978	0.1267	N.D.					
9	0.0813	0.0823	0.0843	0.0827	0.1084	0.0976	0.1099	0.1114	0.0227				
10	0.1731	0.1784	0.1733	0.1750	0.1656	0.1745	0.1702	0.1887	0.1826	0.0960			
11	0.1387	0.1438	0.1372	0.1374	0.1220	0.1455	0.1387	0.1481	0.1502	0.1555	0.0611		
12	0.2310	0.2324	0.2315	0.2265	0.2280	0.2262	0.2345	0.2280	0.2332	0.2179	0.2221	N.D.	
13	0.2090	0.2106	0.2086	0.2075	0.2117	0.2024	0.2204	0.2061	0.2076	0.2071	0.2134	0.2018	N.D.

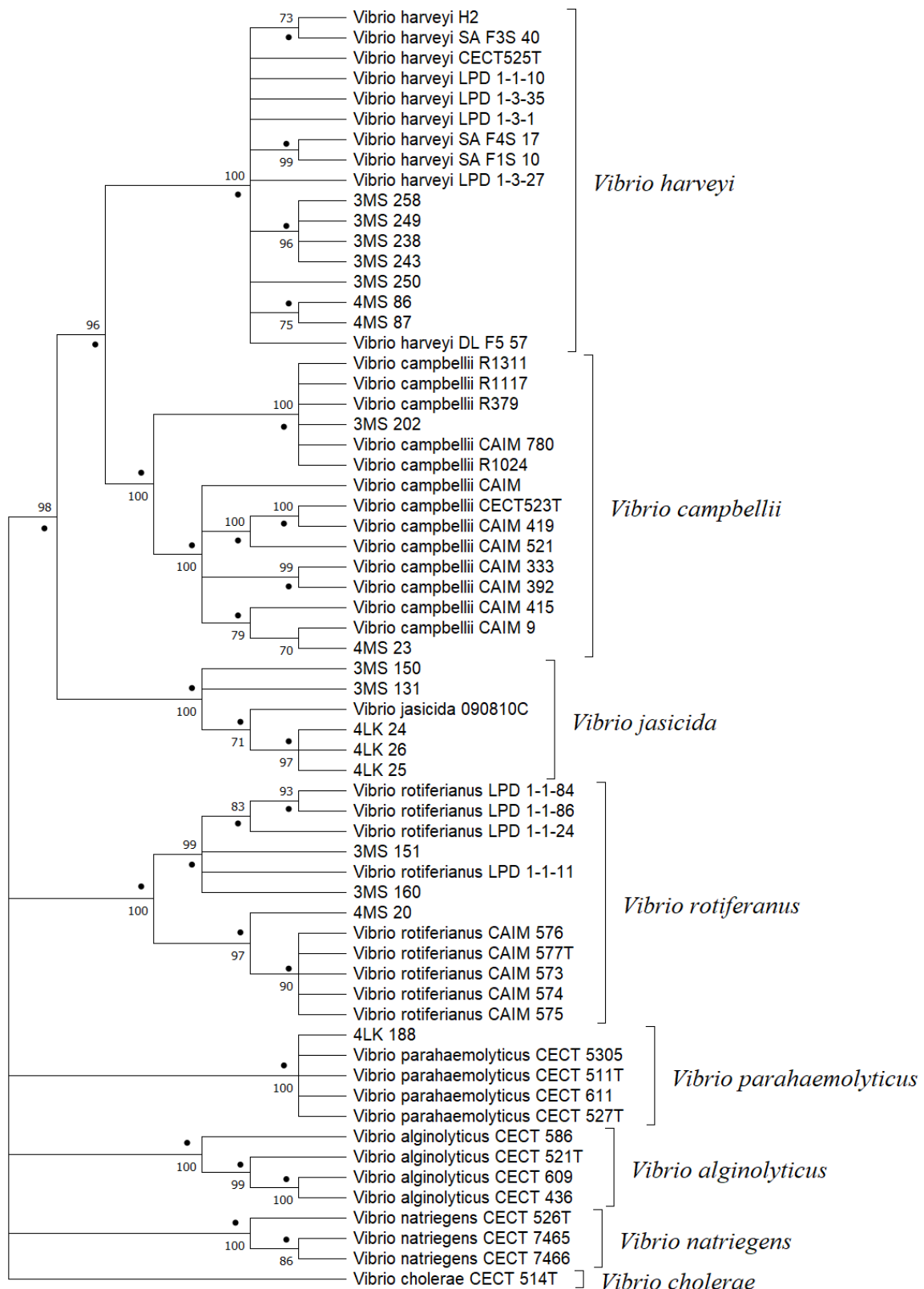
* -

eksperimentalni izolat, nije svrstan u niti jednu grupaciju.

4.1.2. Podskupina *Harveyi*

Regije gena *rpoD*, *rctB* i *toxR* umnožene su za ukupno 18 izolata, koji su prethodno MALDI TOF MS metodom identificirane kao vrste iz monofiletske podskupine *Harveyi*. Dobivene sekvence pojedinačnih regija spojene su u sekvencu ukupne duljine 1851 nukleotida po uzorku te je ona korištena za daljnje analize. Zajedno sa eksperimentalno dobivenim sekvencama, u izradu ML filogenetskog stabla uključeno je još 45 sekvenci referentnih sojeva *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. jasicida*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* i *V. natriegens*, uz „outgroup“ vrstu *V. cholerae*, iz banke gena odabranih prema radu Pascual i sur. (2010) (Prilog 3.) te je ukupan broj korištenih sekvenci za izradu filogenetskog stabla iznosio 63 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Prilog 3.). U rezultatima je prikazano filogenetsko stablo sa prikazanim vrijednostim bootstrap podrške na čvorovima/ograncima većim od 70% (Slika 6.). U topologiji filogenetskog stabla jasno se uz visoku podršku (bootstrap vrijednost 99%) izdvaja jedna glavna grana koja se dalje razvija u dvije podskupine. Prvu podskupinu karakteriziraju dva klastera, definirana referentnim sojevima *V. harveyi* i *V. campbellii*. Treći, relativno homogeni klaster koji se razvija iz prve grane čine eksperimentani izolati grupirani oko jednog referentnog soja *V. jasicida*. Za ove tri skupine vrijednosti međusobne genetičke udaljenosti iznose od 0.13 do 0.158 (Tablica 6.). Ostale četiri podskupine razlučuju se nešto dalje od glavne grane. Prva od njih razvija se uz visoku podršku (bootstrap vrijednost 100%) u dva bliska klastera, oba definirana referentnim spojevima *V. rotiferianus*. Drugi ogranak obuhvaća jedan eksperimentalni izolat i referentne sojeve *V. parahaemolyticus* i skupinu referentnih sojeva *V. alginolyticus* dok su se referentni sojevi *V. natriegens* sa kojima se nije svrstao niti jedan eksperimentalni izolat, jasno izdvojili kao zasebna grana u filogenetskom stablu.

Konačno, u topologiji dobivenog filogenetskog stabla uz *V. cholerae* kao „outgrup“ definirano je sedam dobro podržanih podskupina: *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. jasicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens* (samo referentni sojevi), *V. alginolyticus* i *V. rotiferianus*. Sedam eksperimentalnih izolata grupiralo se unutar *V. harveyi* skupine, dva unutar *V. campbellii*, pet unutar *V. jasicida*, jedan u *V. parahaemolyticus* te tri u *V. rotiferianus*.



Slika 6. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom konkateniranih sekvenci gena: *rpoD*, *toxR* i *rctB*. Na granama su označene bootstrap vrijednosti ($\geq 70\%$), dok su NJ bootstrap vrijednosti ($\geq 70\%$) označene simbolom “•”.

Prosječne vrijednosti unutargrupnih nekorigiranih udvojenih genetskih distanci (p-distance) za podskupine monofiletske skupine *Harveyi*, utvrđene su u rasponu od 0.003 – 0.056 (Tablica 6). Najviša vrijednost genetske udaljenosti od 0.056 zabilježena je unutar podskupine *V. alginolyticus*. Kada se isključi „outgroup“ *V. cholerae*, raspon prosječnih međugrupnih genetičkih distanci kreće se između 0.136 (*V. campbelli* - *V. harveyi*) do 0.241 (*V. rotiferanus* - *V. natriegens*).

Tablica 6. Prikaz prosječnih vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih udaljenosti za spoјenu sekvencu *rpoD*, *toxR* i *rctB*, unutar (■) i između (□) grupacija filogenetskog stabla za monofiletsku skupinu *Harveyi*.

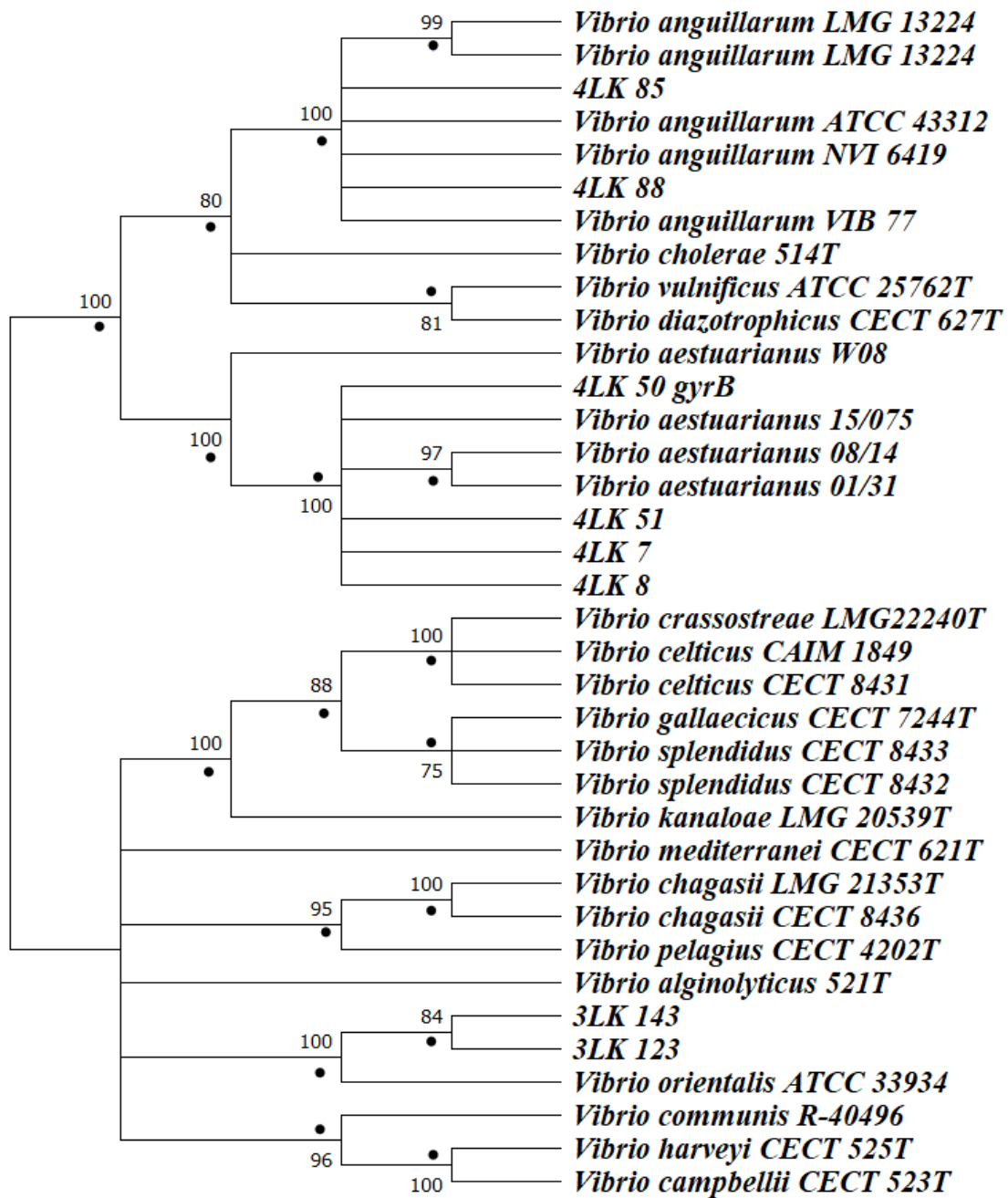
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>V. natriegens</i>	0.009							
2. <i>V. rotiferanus</i>	0.241	0.008						
3. <i>V. jasicida</i>	0.221	0.213	0.004					
4. <i>V. harveyi</i>	0.222	0.216	0.158	0.003				
5. <i>V. campbellii</i>	0.216	0.208	0.152	0.136	0.052			
6. <i>V. parahaemolyticus</i>	0.206	0.214	0.180	0.186	0.179	0.007		
7. <i>V. alginolyticus</i>	0.197	0.220	0.191	0.194	0.181	0.165	0.056	
8. <i>V. cholerae</i>	0.320	0.329	0.322	0.314	0.318	0.322	0.318	N.D.

4.1.3. Analiza ostalih uzoraka

Tablica 7. Rezultati molekularne identifikacije uzoraka umažanjem *gyrB* ili 16S rRNA regije.

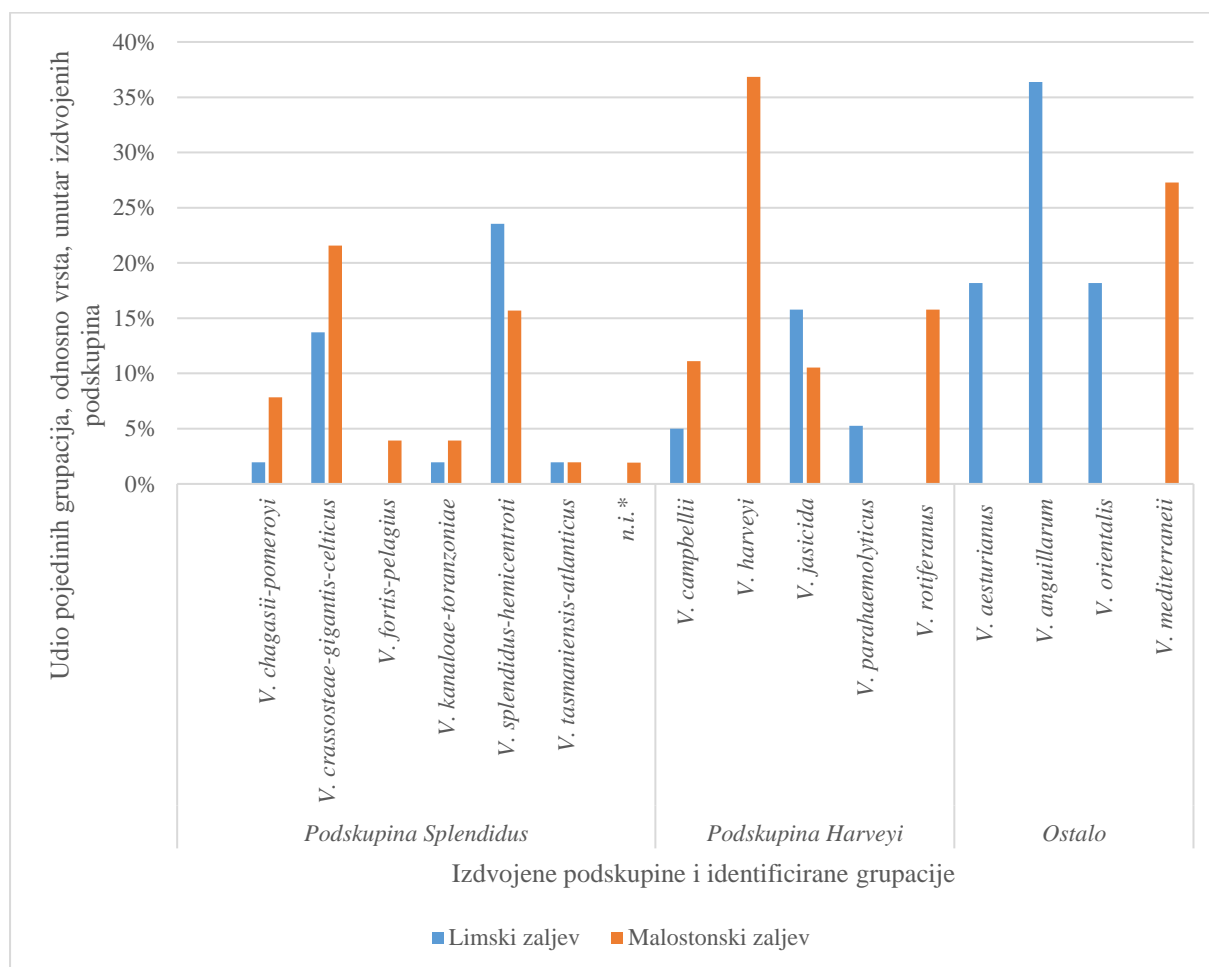
Uzorak	Gen	Vrsta
3LK 143	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio orientalis</i>
3LK 123	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio orientalis</i>
4LK 7	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>
4LK 8	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>
4LK 50	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>
4LK 51	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>
4LK 85	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
4LK 88	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
3MS 95	16S	<i>Vibrio mediterranei</i>
3MS 190	16S	<i>Vibrio mediterranei</i>
3MS 189	16S	<i>Vibrio mediterranei</i>

Ciljanjem jedne regije ukupno je analizirano 11 uzoraka. Dobivene su sekvence duljine 942 nukleotida nakon uređivanja. Uspoređene su sa sekvencama u banci gena (ncbi.nlm.nih.gov/) te su dobiveni rezultati s postotkom identičnosti većom ili jednakom 99%. Na temelju usporedbe sekvenci, identificirane su četiri vrste bakterija roda *Vibrio* prikazane u Tablici 7. Sve vrste osim *V. mediterranei*, koja je identificirana pomoću 16S rRNA, identificirane su pomoću *gyrB* gena. Srodstveni odnosi unutar 8 eksperimentalno dobivenih i 28 referentnih *gyrB* sekvenci prikazani su na Slici 7. Iz filogenetskog stabla jasno se izdvajaju dvije visoko podržane glavne grane (bootstrap vrijednost 100%). Prva glavna grana razvija se u dva visoko podržana klastera, od čega je prvi definira referentnim uzorcima *V. anguillarum*, uz nekoliko postranih linija koje čine referentni uzorci *V. cholerae*, *V. vulnificus* i *V. diazotrophicus*. Drugi je klaster homogeniji i čine ga eksperimentalni izolati okupljeni oko referentnih spojeva *V. aestuarianus*. Drugu glavnu granu čine nekoliko visoko podržanih klastera uglavnom definiranim referentnim sojevima (podskupina *Splendidus*, *Harveyi*), uz jednu manju skupinu eksperimentalnih izolata uz referentni soj *V. orientalis*.



Slika 7. ML filogenetsko stablo dobiveno analizom *gyrB* gena. Na granama su označene ML bootstrap vrijednosti ($\geq 70\%$), dok su NJ bootstrap vrijednosti ($\geq 70\%$) označene simbolom “ • ”.

4.2. Rezultati iz oba uzgajališta



Slika 8. Postotak identificiranih vrsta odnosno grupacija unutar monofiletskih podskupina *Splendidus*, *Harveyi* te ostalih uzoraka na području uzgajališta školjkaša Limski kanal i Malostonski zaljev.

* eksperimentalni izolat 4MS 97, nije svrstan u niti jednu grupaciju

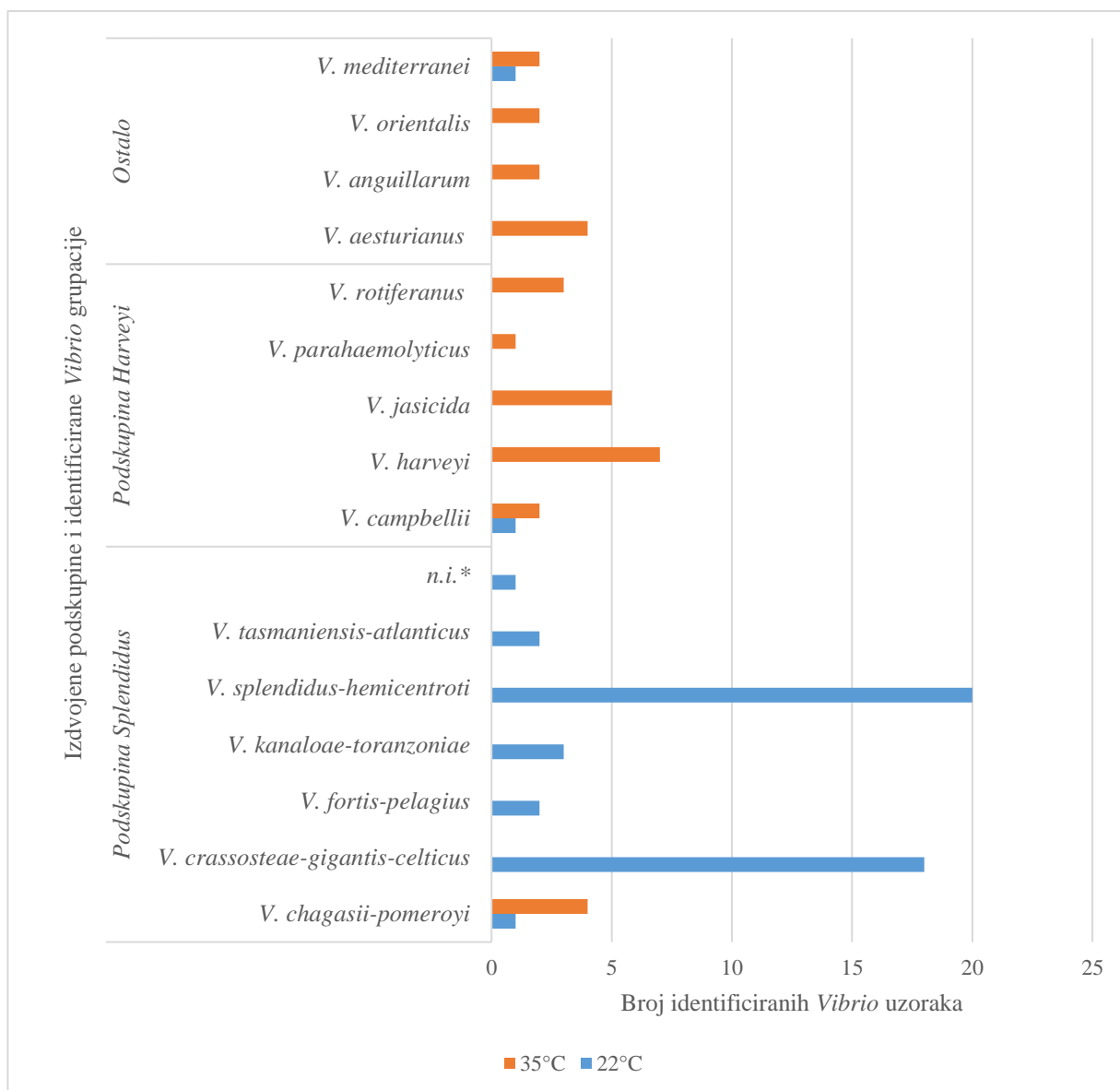
Rezultati analize 35 uzoraka s područja Limskog kanala i 46 s područja Malostonskog zaljeva raspoređeni su s obzirom na korištene početnice na 3 grupe: podskupinu *Splendidus*, podskupinu *Harveyi* te grupu *Ostalo* unutar koje su smješteni uzorci identificirani umnažanjem samo jednog gena (Slika 8).

Analizirana su 22 uzorka s područja Limskog kanala i 29 uzoraka s Malostonskog zaljeva unutar *Splendidus* podskupine. Na oba uzgajališta su dominirale su grupacije *V. splendidus-hemicentrotus* (39%) te *V. crassostreae-gigantis-celticus* (35%). Samo na području Malostonskog zaljeva identificirana grupacija *V. fortis-pelagius* (4%) te pronađen jedan neidentificirani uzorak.

Od ukupno 19 analiziranih uzoraka *Harveyi* podskupine samo četiri su bila s područja Linskog kanala dok su preostali uzorci bili iz Malostonskog zaljeva. Identificirane grupacije unutar dva uzgajališta su se preklapale samo u grupacijama *V. jasicida* i *V. campbellii* dok su ostale identificirane grupacije bile specifične za jedno od dva uzgajališta. Samo na području Linskog kanala identificiran je uzorak unutar grupacije *V. parahaemolyticus*, a samo na području Malostonskog zaljeva grupacije: *V. harveyi* (37%) i *V. rotiferanus* (16%).

Unutar 11 uzoraka analiziranih umnažanjem jedne regije (*gyrB* ili 16S rRNA) osam ih je bilo iz Linskog kanala te tri iz Malostonskog zaljeva. Grupacije *V. aestuarianus* (18%), *V. anguillarum* (26%) i *V. orientalis* (18%) su identificirane na području Linskog kanala dok je na području Malostonskog zaljeva pronađena samo jedna grupacija *V. mediterranei* (27%).

Od 81 analiziranog uzorka 31 ih je kultivirano na temperaturi inkubacije od 35°C, dok je preostalih 50 inkubirano na 22°C (Slika 9.). Među uzorcima inkubiranim na 35°C stupnjeva identificirano je deset grupacija, a među uzorcima inkubiranim na 22°C devet grupacija. Svi uzorci identificirani unutar podskupine *Harveyi* izrasli su na 35°C osim uzorka 4LK 218. Uzorci iz podskupine *Splendidus* izrasli su na 22 °C. Iznimka je grupacija *V. chagasii-pomeroi* unutar koje su uzorci izrasli na obje temperature. Od uzoraka analiziranih umnažanjem samo jednog gena svi su izrasli na 35°C dok su uzorci identificirani kao *V. mediterranei* izrasli na obje temperature.



Slika 9. Identificirane *Vibrio* grupacije, odnosno vrste, na području uzgajališta školjkaša Limski kanal i Malostonski zaljev s prikazanom temperaturom inkubacije.

* eksperimentalni izolat 4MS 97, nije svrstan u niti jednu grupaciju

5. RASPRAVA

Limski kanal i Malostonski zaljev, zaštićena su područja od velike ekonomske važnosti za školjkarstvo RH. No, zajednica bakterija roda *Vibrio* nije pobliže istražena na ovom području iako sadrži patogene beskralješnjaka i riba, a čak i ljudi. Prva istraživanja provedena na izolatima roda *Vibrio* pomoću MALDI TOF MS iz uzoraka sedimenta, morske vode i tkiva školjkaša prikupljenih tijekom jeseni 2020. i zime 2021., pokazala su da najveći udio *Vibrio* sp. vrsta na području Limskog kanala i Malostonskog zaljeva otpada na vrste iz monofiletskih podskupina *Splendidus* (70%) i *Harveyi* (10%), dok je udio ostalih vrsta značajno manji (Perić i sur. 2021). S obzirom da MALDI TOF MS ima stanovita ograničenja, u ovom je radu za identifikaciju bakterija roda *Vibrio* do razine vrste korištena MLSA metoda koja je još jednom potvrdila zamršene srodstvene odnose unutar bakterija roda *Vibrio* (Gomez-Gil i sur. 2014).

Unutar roda *Vibrio* na temelju MLS analize definirano je barem 14 monofiletskih skupina (kladova), od kojeg svakog čini određeni broj genetički vrlo sličnih sojeva (Sawabe i sur. 2007; 2013). Monofiletska podskupina-klad kojeg definira vrsta *V. splendidus*, najbrojnija je i sastoji se od najmanje dvanaest vrsta, koji su dalje dodatno klasificirani unutar skupine (Oden i sur. 2016; Pérez-Cataluña i sur. 2016). Takva klasifikacija unutar monofiletske podskupine *Splendidus*, vidljiva je i iz filogenetskog stabla dobivenog u ovom istraživanju nakon MLS analize spojene sekvence gena *gyrB*, *mreB* i *rpoD* eksperimentalnih *Vibrio* izolata iz morske vode, sedimenta i tkiva školjkaša iz Limskog kanala i Malostonskog zaljeva. Pritom se prva, velika i relativno heterogena grana filogenetskog stabla razvila u nekoliko visoko podržanih podgrupa, od kojih se naročito jasno izdvojio set eksperimentalnih uzoraka okupljenih oko referentnih izolata inače teško razlučivih vrsta *V. splendidus* i *V. hemicentroti*, što je vidljivo i iz vrlo niske prosječne unutargrupne genetičke udaljenosti. Infekcija *V. splendidus* vrlo često dovodi do izbijanja bolesti kod različitih morskih organizama, iako postoje naznake da se u nekim slučajevima radilo o nepreciznoj identifikaciji s obzirom na veliku genetičku sličnost. Bliskim filogenetskim odnosom, kao i niskom prosječnom međugrupnom udaljenošću potvrđena je izrazita genetička sličnost skupina *V. splendidus-hemicentroti* i *V. tasmaniensis-V. atlanticus* (Oden i sur. 2016, Perez-Cataluña i sur. 2016). Naime, sojevi *V. tasmaniensis* i *V. atlanticus* su teško razlučivi i uobičajeno se u filogenetskom stablu izdvajaju kao zasebna skupina. Pritom se *V. tasmaniensis*, koja je poznati patogen školjkaša, ranije često identificirao kao *V. splendidus* ili srodni *V. splendidus*, dok vrsti *V. atlanticus* nisu utvrđena patogena svojstva.

Vrste *V. crassostreae*, *V. celticus* i *V. gigantis* smatraju se visokosrodnim i za njih je karakteristično da se vrlo teško razlučuju u filogenetskom stablu upotrebom do sada korištenih filogenetskih markera (Oden i sur. 2016; Perez-Cataluña i sur. 2016). U skladu s time, brojni eksperimentalni izolati koji su se svrstali u ovaj vrlo raznoliki i visoko podržani klaster nisu se mogli jasno diferencirati. To je bio slučaj i za grupu definiranu referentnim spojevima *V. kanaloae* i *V. toranzoniae*. Niska vrijednost unutargrupne genetičke udaljenosti za skupinu u koju su uključene ove dvije vrste zabilježena je i u radu Perez-Cataluña i sur. (2016).

Kako je i u ovom radu druga glavna grana, koju čini referentni soj *V. pomeroyi*, smještena u bliskom susjedstvu skupine eksperimentalnih izolata oko referentnih sojeva *V. chagasii* (Perez-Cataluña i sur. 2016), ove se vrste smatraju jedinstvenom i donekle genetički udaljenijom skupinom *V. pomeroyi-chagasii*. U skladu s prethodnim istraživanjima, treća glavna grana filogenetskog stabla definirana parom referentnih sojeva *V. pelagius* i *V. fortis* značajno je udaljena od ostalih podskupina unutar *Splendidus* monofiletske podskupine, što se jasno vidi i iz više vrijednosti međugrupne genetičke udaljenosti u odnosu na druge podskupine (Oden i sur. 2016, Perez-Cataluña i sur. 2016). Ove su vrste za sada izolirane jedino na području Mediterana.

Zbog izrazite genetičke sličnosti u podlozi nerazlučenih srodstvenih odnosa pojedinih vrsta unutar monofiletske podskupine *Splendidus* nije bilo moguće na temelju konkatenirane sekvence gena *gyrB*, *mreB* i *rpoD* odrediti točan identitet eksperimentalnih izolata. To upućuje na potrebu uključivanja više filogenetskih markera sa boljom razlučivošću. No, istraživanje koje su proveli Pérez-Cataluña i sur. (2016) uz primjenu MLSA sheme koja je uključivala još dva filogenetska markera *recA* i *pyrH* također je pokazalo nedovoljnu moć razlučivanja pojedinih vrsta. Za identifikaciju do razine vrste unutar gore navedenih grupacija, tj. vrsta unutar *Splendidus* podskupine, potrebno bi bilo koristiti kompleksnije MLSA sheme ili se osloniti na preciznije metode identifikacije vrsta poput DNA – DNA hibridizacije (engl. *DNA-DNA hybridization*, DDH).

Unutar podskupine *Splendidus*, dominacija vrsta unutar grupacije *V. splendidus* – *hemicentroti*, već je ranije uočena i unutar drugih morskih staništa na Mediteranu (Arias i sur. 1999; Pujalte i sur. 1999; Sitjà-Bobadilla i sur. 2007). Također je dominantno prisutna i grupacija *V. crassostreae-gigantis-celticus*, što ne čudi s obzirom da su ove vrste osim kod nekih morskih beskralješnjaka (Beleneva i Kukhlevsii 2010; Gomez-Gil i sur. 2010; Stabili i sur. 2014), najčešće izolirane sa uzgajališta školjkaša, pa je tako poznato da su vrste *V.*

crassotreae i *V. gigantis* po prvi put identificirane upravo kod kamenica (Pérez-Cataluña i sur. 2016). Relativno nizak udio ostalih grupacija se može objasniti sezonalnim promjenama u distribuciji vrsta unutar same podskupine *Splendidus*, ali je za potvrdu ove hipoteze potrebno provesti dodatne analize uzoraka sakupljenih u toplijim mjesecima (Pérez-Cataluña i sur. 2016).

Srodstveni odnosi analiziranih *Vibrio* vrsta iz *Harveyi* podskupine odgovaraju podacima dobivenima u prethodnim istraživanjima te je identifikacija uzoraka do razine vrste bila jasna (Pascual i sur. 2010). Monofiletska skupina *Harveyi*, poznata i pod imenom “centralni klad”, sastoji se od više vrlo sličnih vrsta (Sawabe i sur. 2007) koje su se u ovom radu jasno razlučile u filogenetskom stablu na temelju MLSA analiza konkateniranih sekvenci *rpoD*, *toxR* i *rctB* uz relativno visoke vrijednosti međugrupne genetičke udaljenosti koje odgovaraju ranije objavljenim podacima (Pascual i sur. 2010). Vrste *V. harveyi* i *V. campbelli* očekivano su smještene blisko u filogenetskom stablu, a u ovom radu bilo je moguće uočiti i njihovu povezanost sa vrstom *V. jasicida*. Bliska povezanost vrsta *V. rotiferianus*, *V. harveyi* i *V. campbelli*, zbog čega neki autori ove tri vrste smatraju zasebnom pod-skupinom unutar monofiletskog klada *Harveyi* slabije je izražena. Položaj vrsta *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* i *V. natriegens* u filogenetskom stablu je u skladu s prethodnim istraživanjem nešto udaljeniji od ostalih skupina (Pascual i sur. 2010).

Izdvajanje eksperimentalnih uzoraka *V. anguillarum* i *V. aestuarianus* u jednu zasebnu visoko podržanu granu filogenetskog stabla, očekivano je jer se ove dvije vrste smatraju pripadnicima monofiletskog klada *Anguillarum* (Sawabe i sur. 2013). Ove su se dvije vrste već na temelju jednog filogenetskog markera jasno odijelile međusobno i od ostalih referentnih sojeva. Skupina *V. orientalis* smjestila se uz vrste koje spadaju u monofiletsku podskupinu *Harveyi* (*V. alginolyticus*, *V. harveyi* i *V. campbellii*) u skladu s ranijim istraživanjem Pérez-Cataluña i sur. (2016).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na određene razlike u strukturi populacije bakterija roda *Vibrio* između lokacija u Limskom kanalu i Malostonskog zaljeva naročito kad je riječ o skupini *Harveyi* i *Anguillarum*. Najbrojnija vrsta *V. harveyi*, kao i umjereno zastupljena vrsta *V. rotiferianus*, detektirane su jedino kod izolata iz Malostonskog zaljeva dok su jedino na postaji u Limskom kanalu zabilježene vrste *V. aestuarianus* i *V. anguillarum*. Ova razlika upućuje na određene specifičnosti dva uzgajališta, no za precizniji opis ovog obrasca, iznimno je važno analizirati uzorke sakupljene u toplijim sezonama, koji u ovome radu nisu analizirani.

Naime, za vrste iz skupine *Harveyi*, tipično je da dominiraju zajednicom bakterija *Vibrio* u ljetnim mjesecima (Rahman i sur. 2014; Arias i sur. 1999; Pujalte i sur., 1999). S time u vezi je i utjecaj temperature inkubacije na kultivaciju pojedinih *Vibrio* vrsta. Naime, svi analizirani uzorci iz podskupine *Harveyi* izrasli su na temperaturi inkubacije od 35 °C, dok je velika većina eksperimentalnih izolata podskupine *Splendidus* izrasla na 22 °C.

Kao što je već navedeno, na strukturu *Vibrio* populacija utječu okolišni čimbenici, primarno temperatura (Alfaro i sur. 2018; Jug-Dujaković i sur. 2019; Chen i sur. 2020). Kako bi se utvrdio potencijalni uzrok razlike između *Vibrio* populacija na Lirskom kanalu i Malostonskom zaljevu proučeni su rezultati fizikalno-kemijske analize vode dobivene za sezone uzorkovanja. Temperaturne razlike na obje lokacije uzorkovanja se nisu značajno razlikovale i temperaturne vrijednosti nisu prelazile 20 °C. Nešto niži salinitet, koji također može utjecati na pojavnost i brojnost vibrija (Matteucci i sur. 2015; Siboni i sur. 2016) zabilježen je na području Malostonskog zaljeva. Ipak, za cjelovitiju sliku o sezonalnim obrascima unutar istraživanih područja, koji bi eventualno mogli biti utjecati na strukturu *Vibrio* populacija, trebati uzeti u obzir mjerenja provedena kroz dulje vremensko razdoblje.

Ovim istraživanjem dokazana je prisutnost patogenih i uvjetno patogenih vrsta u zajednici bakterija roda *Vibrio* na području akvakulture školjkaša istočnog Jadrana. Među identificiranim ljudskim patogenima pronađen je *V. parahaemolyticus* izoliran iz tkiva mediteranske dagnje s područja Lirskog kanala. Od patogenih *Vibrio* vrsta za školjkaše identificirane su vrste *V. aestuarianus* i *V. orientalis* te uvjetno *V. crassostreae*, *V. celticus*, *V. splendidus*, *V. tasmaniensis*. Identificiran je i poznati riblji patogen *V. anguillarum* (Hickey i Lee 2017). Osim navedenih, u Malostonskom zaljevu identificirana je i vrsta *V. mediterranei* kojoj se pripisuje uloga u izazivanju velike smrtnosti školjkaša plemenite periske (*Pinna nobilis* Linnaeus, 1758) (Lattos i sur. 2021).

Kako je pojavnost i brojnost bakterija *Vibrio* u morskim staništima uvjetovana okolišnim čimbenicima, a naročito temperaturom, očekuje se da će na zajednicu ovih bakterija već u bliskoj budućnosti utjecati globalno zatopljenje i povišenje temperature mora. To su pokazale laboratorijske simulacije toplinskog vala, a već je utvrđena značajna uzročno-posljedična veza pojavnosti bakterija *Vibrio* i porasta površinske temperature mora tijekom zadnjih 50 godina (Vezzulli i sur. 2012; Green i sur. 2019). Samim time rastu i prijetnje akvakulturi školjkaša, posebno kad je riječ o relativno plitkom bazenu Jadrana koji predstavlja jedno od najugroženijih morskih staništa kad je riječ o klimatskim promjenama. Ovo istraživanje

pokazuje da su i u području akvakulture školjkaša istočnog Jadrana prisutne brojne patogene vrste roda *Vibrio* kao sastavni dio okoliša i mikrobiote školjkaša. Kako promjene uvjeta unutar uzgajališta poput okolišnih parametara učestalo izazivaju mortalitet školjkaša uzrokovan nekim vrstama roda *Vibrio*, primjena molekularnih metoda i njihovo daljnje usavršavanje razvojem novih filogenetskih markera za bolje razlučivanje do razine vrste jedan je od ključnih preduvjeta pravovremenog prepoznavanja rizika za akvakulturu školjkaša i ostalih morskih organizama te neposredno time i zdravlje ljudi.

6. ZAKLJUČAK

- MLS analizom podskupine *Splendidus* temeljenom na *gyrB*, *mreB* i *rpoD* genima, nije moguće odrediti točan identitet do razine vrste eksperimentalnih izolata. Utvrđeni su izrazito bliski filogenetski odnosi pojedinih *Vibrio* vrsta unutar *Splendidus* podskupine koje su zajedno tvorile 10 grupacija. Zbog navedenog, determinacija uzoraka pomoću ove MLSA sheme moguća je samo do razine grupacije.
- MLS analizom podskupine *Harveyi* temeljenom na *rpoD*, *rctB* i *toxR* genima identifikacija eksperimentalno dobivenih izolata do razine vrste te je unutar njih identificirano šest vrsta.
- Analizom podskupine *Anguillarum* i *Orientalis* pomoću *gyrB* gena te podskupine *Mediterranei* pomoću 16S rRNA jasno su se definirale četiri vrste.
- Na području uzgajališta školjkaša Limski kanal identificirano je šest vrsta te pet grupacija podskupine *Splendidus*, dok je na području uzgajališta školjkaša Malostonski zaljev identificirano pet vrsta i šest grupacija podskupine *Splendidus*.
- Vrste *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. aesturianus*, *V. anguillarum* i *V. orientalis* identificirane su samo na području uzgajališta školjkaša Limski kanal, dok su vrste *V. harveyi*, *V. rotiferianus* i *V. mediterranei* te grupacija *V. fortis-pelagius* pronađene samo na području Malostonskog zaljeva.
- Na području uzgajališta školjkaša Limski kanal najveći udio su imale grupacije unutar *Splendidus* podskupine: *V. splendidus-hemicentroti* i *V. crassostreae-gigantis-celticus*, dok je na području Malostonskog zaljeva najveći udio imala vrsta *V. harveyi* te unutar *Splendidus* podskupine grupacija *V. crassostreae-gigantis-celticus*.
- Dokazana je prisutnost patogenih i uvjetno patogenih *Vibrio* vrsta na području akvakulture školjkaša istočnog Jadrana. Od patogenih *Vibrio* vrsta za školjkaše identificirane su vrste: *V. aestuarianus*, *V. orientalis* te uvjetno *V. splendidus*, *V. crassostreae*, *V. celticus*, *V. tasmaniensis*. Među identificiranim ljudskim patogenima pronađena je vrsta *V. parahaemolyticus*. Identificirana je i vrsta *V. anguillarum*, poznati patogen riba.
- Vrste unutar *Splendidus* podskupine bolje su izrasle na temperaturi inkubacije od 22 °C, dok su vrste unutar *Harveyi* podskupine na temperaturi inkubacije od 35°C.

7. LITERATURA

- Alfaro, A. C., Nguyen, T. V., Merien, F. (2018): The complex interactions of *Ostreid herpesvirus 1*, *Vibrio* bacteria, environment and host factors in mass mortality outbreaks of *Crassostrea gigas*. *Reviews in Aquaculture* 11(4): 1148-1168.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Arias, C. R., Macián, M. C., Aznar, R., Garay, E., Pujalte, M. J. (1999): Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *Journal of Applied Microbiology* 86: 125-134.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Quadri, F., Martinez-Urtaza, J. (2018): *Vibrio spp.* infections. *Nature Reviews Disease* 4: 1–19.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J., Gonzalez-Escalona, N., Martinez-Urtaza, J. (2017): Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends in microbiology* 25(1): 76–84.
- Balbi, T., Fabbri, R., Cortese, K., Smerilli, A., Ciacci, C., Grande, C., Vezzulli, L., Pruzzo, C., Canesi, L. (2013): Interactions between *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and the bivalve pathogens *Vibrio aestuarianus* 01/032 and *Vibrio splendidus* LGP32. *Fish & shellfish immunology* 35(6): 1906–1915.
- Ben Cheikh, Y., Travers, M. A., Le Foll, F. (2017): Infection dynamics of a *V. splendidus* strain pathogenic to *Mytilus edulis*: in vivo and in vitro interactions with hemocytes. *Fish Shellfish Immunology* 70: 515–523.
- Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivresse, S., Alunno-Bruscia, M., Polz, M. F., Le Roux, F. (2016): *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME journal* 11: 1043–1052.
- Ceccarelli, D., Amaro, C., Romalde, J. L., Suffredini, E., Vezzulli, L. (2019): *Vibrio* species. U: Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., Hill, C. (ur). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 5. izdanje. American Society for Microbiology. str. 347-388.
- Chen, X., Zhao, H., Jiang, G., Tang, J., Xu, Q., Huang, L., Chen, S., Zou, S., Dong, K., Li, N. (2020): Responses of free-living *Vibrio* community to seasonal environmental variation in a subtropical inland bay. *Frontiers in microbiology* 11: 610974.
- Cranford, P., Dowd, M., Grant, J., Hargrave, B., McGladdery, S. (2003): Ecosystem level effects of marine bivalve aquaculture. Fisheries and Oceans Canada, Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2450: ix + 131 p.
- Culot, A., Grosset, N., Bruey, Q., Auzou, M., Giard, J. C., Favard, B., Wakatsuki, A., Baron, S., Frouel, S., Techer, C., Gautier, M. (2021): Isolation of Harveyi clade *Vibrio spp.* collected in aquaculture farms: How can the identification issue be addressed?. *Journal of microbiological methods* 180: 106106.
- Destoumieux-Garzón, D., Canesi, L., Oyanedel, D., Travers, M., Charrière, G., Pruzzo, C., Vezzulli, L. (2020): *Vibrio*-bivalve interactions in health and disease. *Environmental microbiology* 22(10): 4323-4341.
- Dubert, J., Barja, J. L., Romalde, J. L. (2017): New Insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects. *Frontiers in microbiology* 8: 762.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) (2010): Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). European Food Safety Agency Journal 8(11): 1894.

Elston, R. A., Hasegawa, H., Humphrey, K. L., Polyak, I. K., Haese, C. C. (2008): Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. Diseases of Aquatic Organisms 82: 119-134.

Elston, R., Leibovitz, L. (1980): Pathogenesis of Experimental Vibriosis in Larval American Oysters, *Crassostrea virginica*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37(6): 964-978.

Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39(4): 783-791.

Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J. L. (2008): Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus subsp. francensis subsp. nov.*, a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. Systematic and applied microbiology 31(5): 358–365.

Gavrilović, A., Pikelj, K., Kolda, A., Žunić, J., Jug- Dujaković, J., Vardić Smrzlić, I., Valić, D., Perić, L., Vukić Lušić, D., Kapetanović, D. (2017): Assessment of environmental impact of marine fish farming on water quality and sediment in the eastern Adriatic sea. Aquaculture Europe 17. U: Myrseth, Bjorn (ur.). Oostende, Belgium. European Aquaculture Society 426-427.

Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., Swings, J. (2005): Re-evaluating prokaryotic species. Nature reviews microbiology 3: 733–739.

Gomez-Gil, B., Thompson, C. C., Matsumura, Y., Sawabe, T., Iida, T., Christen, R., Thompson, F. (2014): Family *Vibrionaceae*. U: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Thompson, F. L., Lory, S., Stackebrandt, E. (ur). The Prokaryotes, 4. izdanje. Springer, New York. str. 88.

Green, T. J., Siboni, N., King, W. L., Labbate, M., Seymour, J. R., Raftos, D. (2019): Simulated Marine Heat Wave Alters Abundance and Structure of *Vibrio* Populations Associated with the Pacific Oyster Resulting in a Mass Mortality Event. Microbial Ecology 77(3): 736-747.

Guillard, R. L. (1959): Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. The biological bulletin 117(2).

Hickey, M.E., Lee, J. (2017): A comprehensive review of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*: ecology, pathology and prevention. Reviews in Aquaculture 30: 356-367.

Huntington, T. C., Roberts, H., Cousins, N., Pitta, V., Marchesi, N., Sanmamed, A., Hunter-Rowe, T., Fernandes, T. F., Tett, P., McCue, J., Brockie, N. (2006): Some aspects of the environmental impact of aquaculture in sensitive areas. Izvještaj DG Fish and Maritime Affairs of the European Commission. Broj izvještaja: 221-EC/R/02/B. Poseidon Aquatic Resource Management Ltd, Windrush, Warborne Lane, Portmore, Lymington, Hampshire SO41 5RJ, UK.

Ina-Salwany, M. Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M.N.A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., Zamri-Saad, M. (2018): Vibriosis in Fish: A review on disease development and prevention. Journal of Aquatic Animal Health 31(1): 3-22.

- Johnson, C. N. (2013): Fitness Factors in Vibrios: A Mini-review. *Microbial Ecology* 65:826–851.
- Jug-Dujaković, J., Kapetanović, D., Kazazić, S., Kolda, A., Vukić Lušić, D., Gavrilović, A. (2019): Seasonal variations in the abundance of *Vibrio sp.* in the marine cage farm area of Mali Ston Bay, Eastern Adriatic. *Aquaculture Europe* 19: 640-641.
- Kapetanović, D., Kolda, A., Pikelj, K., Gavrilović, A., Vukić Lušić, D., Valić, D., Žunić, J., Perić, L., Vardić Smrzlić, I., Jug-Dujaković, J.(2017b): Occurrence and distribution of bacterial indicators for the assessment of the impact of mariculture in the Adriatic Sea. 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology. Gligora Udović, M., Orlić, S., Šolić, M., (Eds). Zagreb, Ruđer Bošković Institute.153-153.
- Kapetanović, D., Smrzlić, I.V., Valić, D., Teskeredžić, Z., Teskeredžić, E., Figueras, A.(2017a): Culturable microbiota associated with farmed Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Aquatic Living Resources* 30.
- Kapetanović, D., Vardić, S., Valić, D., Teskeredžić Emin, E.(2013): Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 75 (1-2), 46-52.
- Katavić, I. (2003): Učinci kaveznih uzgajališta riba duž istočne obale Jadrana na morski okoliš. *Croatian Journal of Fisheries* 61(4): 175-194.
- Kolda, A., Kazazić Snježana, Gavrilović, A., Vardić Smrzlić, I., Jug Dujaković, J., Žunić, J., Perić, L. & Kapetanović, D. (2018) Microbiological assessment of Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) farmed in the Adriatic Sea (Croatia). U: Kovačević Ganić, K. (ur.)Book of Abstracts.
- Kueh, C.S. and Chan, K. (1985): Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology* 59: 41-47.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lattos, A., Bitchava, K., Giantsis, I. A., Theodorou, J. A., Batargias, C., Michaelidis, B. (2021): The Implication of *Vibrio* Bacteria in the Winter Mortalities of the Critically Endangered *Pinna nobilis*. *Microorganisms* 9: 922.
- Le Roux, F., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., Ritchie, J. M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C. C., Strauch, E., Kirschner, A., Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Frontiers in microbiology* 6: 830.
- Le Roux, F., Wegner, K. M., Polz, M. F. (2016): Oysters and vibrios as a model for disease dynamics in wild animals. *Trends in Microbiology* 24(7): 568-580.
- Li, Y. F., Chen, Y. W., Xu, J. K., Ding, W. Y., Shao, A. Q., Zhu, Y. T., Wang, C., Liang, X., Yang, J. L. (2019): Temperature elevation and *Vibrio cyclitrophicus* infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel *Mytilus coruscus*. *Scientific reports* 9(1): 16391.

- Lokmer, A., Goedknecht, M. A., Thielges, D. W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J. F., Wegner, K. M. (2016a): Spatial and temporal dynamics of Pacific Oyster hemolymph microbiota across multiple scales. *Frontiers in microbiology* 7: 1367.
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J. F., Wegner, K. M. (2016b): The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental microbiology* 18(3): 970–987.
- Lokmer, A., Wegner, K. M. (2015): Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME journal* 9(3): 670–682.
- Mašić, M. (2004): Higijena i tehnologija prerade školjaka. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* 6(4): 40-45.
- Matteucci, G., Schippa, S., Di Lallo, G., Migliore, L., Thaller, M.C. 2015. Species diversity, spatial distribution, and virulence associated genes of culturable vibrios in a brackish coastal Mediterranean environment. *Annals of Microbiology* 65 (4), 2311-2321.
- Moore, E. R., Mihaylova, S. A., Vandamme, P., Krichevsky, M. I., Dijkshoorn, L. (2010): Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Research in microbiology* 161(6): 430–438.
- Mougin, J., Flahaut, C., Roquigny, R., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T., Le Bris, C. (2020): Rapid Identification of *Vibrio* Species of the *Harveyi* Clade Using MALDI-TOF MS Profiling With Main Spectral Profile Database Implemented With an In-House Database: Luvibase. *Frontiers in Microbiology* 11: 586536
- Munn, C. B. (2015): The role of vibrios in diseases of corals. *Microbiology spectrum* 3(4).
- Murchelano, R., Brown, C. (1970): Heterotrophic bacteria in Long Island Sound. *Marine biology* 7: 1-6.
- Narodne novine, broj 13/13. Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.
- Narodne novine, broj 86/02. Pravilnik o zaštiti prstaca (*Lithophaga lithophaga*). Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja.
- Narodne novine, broj 99/07. Pravilnik o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva.
- Oden, E., Burioli, E.A.V, Trancart, S., Pitel, P.H., Houssin, M. (2016): Multilocus sequence analysis of *Vibrio splendidus* related-strains isolated from blue mussel *Mytilus sp.* during mortality events. *Aquaculture* 464: 420-427,
- Paillard, C. (2004): A short review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17: 467–475.
- Pascual, J., Macián, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., Pujalte, M. J. (2010): Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60(1): 154–165.
- Percival, S., Williams, D. (2014): *Vibrio*. U: Percival, S., Williams, D., Gray, N., Yates, M., Chalmers, R. (ur.) *Microbiology of Waterborne Diseases*. Academic Press. str. 237-248.

- Pérez-Cataluña, A., Lucena, T., Tarazona, E., Arahal, D. R., Macián, M., Pujalte, M. J. (2016): An MLSA approach for the taxonomic update of the *Splendidus* clade. A lineage containing several fish and shellfish pathogens *Vibrio spp.* Systematic and Applied Microbiology 39(6): 361-369.
- Perić, L., Kazazić, S., Kapetanović, D., Vardić-Smrzlić, I., Legrou, J., Buha, T., Kolda, A., Bolotin, J., Kožul, V., Nerlović, V., Bobanović-Čolić, S. Barac F. (2021): Diversity of *Vibrio* species in Croatian bivalve aquaculture. European Aquaculture Society – Aquaculture Europe
- Pezzati, E., Canesi, L., Damonte, G., Salis, A., Marsano, F., Grande, C., Vezzulli, L., Pruzzo, C. (2015): Susceptibility of *Vibrio aestuarianus* 01/032 to the antibacterial activity of *Mytilus haemolymp*: identification of a serum opsonin involved in mannose-sensitive interactions. Environmental microbiology 17(11): 4271–4279.
- Pierce, M. L., Ward, J. E. (2019): Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) and the Blue Mussel (*Mytilus edulis*): Temporal Variation and the Influence of Marine Aggregate-Associated Microbial Communities. mSphere 4(6): e00730-19.
- Prado, S., Dubert, J., Romalde, J. L., Toranzo, A. E., Barja, J. L. (2014): *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae. International journal of systematic and evolutionary microbiology 64(5): 1641–1646.
- Pujalte, M. J., Ortigosa, M., Macián, M. C., Garay, E. (1999): Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology 2(4): 259–266.
- Rahman, M. S., Martino, M. E., Cardazzo, B., Facco, P., Bordin, P., Mioni, R., Novelli, E., Fasolato, L. (2014): *Vibrio* trends in the ecology of the Venice Lagoon. Applied and environmental microbiology 80(8): 2372-2380.
- Randa, M. A., Polz, M. F., Lim, E. (2004): Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. Applied and environmental microbiology 70(9): 5469–5476.
- Richards, G. P., Bono, J. L., Watson, M. A., Needleman, D. S. (2014): Complete genome sequence for the shellfish pathogen *Vibrio coralliilyticus* RE98 isolated from a shellfish hatchery. Genome announcements 2(6): e01253-14.
- Romalde, J. L., Dieguez, A. L., Lasa, A., Balboa, S. (2013): New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. Frontiers in Microbiology 4: 413.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., Thompson, F. (2007): Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. Journal of Bacteriology 189(21): 7932-6.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., Hayashi, T. (2013): Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. Frontiers in microbiology 4: 414.
- Shen, X., Cai, Y., Liu, C., Liu, W., Hui, Y., Su, Y. (2009): Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). International journal of food microbiology 136(1): 129-132.

Shumway, S. E., Davis, C., Downey, R., Karney, R., Kraeuter, J., Parsons, J., Rheault, R., Wikfors, G. (2003): Shellfish aquaculture – in praise of sustainable economies and environments. *World aquaculture* 34: 8-10.

Šimunović, A. (2004): MALOSTONSKI ZALJEV - BISER JADRANA. *NAŠE MORE* 51 (1-2), 12-16.

Siboni, N., Balaraju, V., Carney, R., Labbate, M., Seymour, J.R. 2016. Spatiotemporal dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney Harbour estuary. *Frontiers in Microbiology* 7 (APR), art. no. 460.

Stabili, L., Acquaviva, M. I., Cavallo, R. A. (2005): *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water research* 39(2-3): 469–477.

Staley, J. T. (2006): The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1475), 1899–1909.

Stauder, M., Vezzulli, L., Pezzati, E., Repetto, B., Pruzzo, C. (2010): Temperature affects *Vibrio cholerae* O1 El Tor persistence in the aquatic environment via and enhanced expression of *GbpA* and *MSHA* adhesins, *Environmental microbiology reports* 2(1): 140-144.

Themptander, K. (2005): Detection and characterisation of *Vibrio harveyi* isolates. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Uppsali.

Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A. T. R., Sawabe, T. (2007): Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* form distinct species. *Applied and environmental microbiology* 73: 4279–4285.

Thompson, F. L., Iida, T., Swings, J. (2004): Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews* 68(3): 403–431.

Thompson, F. L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M., Sorgeloos, P., Swings, J. (2003): *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53(1): 245–252.

Topić Popović, N., Skukan, A. B., Džidara, P., Čož-Rakovac, R., Strunjak-Perović, I., Kozačinski, L., Jadan, M., Brlek-Gorski, D. (2010): Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Veterinarni Medicina* 55 (5): 233-241.

Travers, M. A., Boettcher Miller, K., Roque, A., Friedman, C. S. (2015): Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of invertebrate pathology* 131: 11–31.

Travers, M. A., Tourbiez, D., Parizadeh, L., Haffner, P., Kozic-Djellouli, A., Aboubaker, M., Koken, M., Dégremont, L., Lupo, C. (2017): Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Veterinary research* 48(1): 32.

Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, E, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., Paillard, C. (2009): Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global change biology* 15: 1365-1376.

Urbanczyk, H., Ogura, Y., Hayashi, T. (2013): Taxonomic revision of *Harveyi* clade bacteria (family *Vibrionaceae*) based on analysis of whole genome sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63(7): 2742–2751.

Uredba (EU) br. 1380/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 11. prosinca 2013. o zajedničkoj ribarstvenoj politici, izmjeni uredaba Vijeća (EZ) br. 1954/2003 i (EZ) br. 1224/2009 i stavljanju izvan snage uredaba (EZ) br. 2371/2002 i (EZ) br. 639/2004 i Odluke Vijeća 2004/585/EZ.

Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P. C., Colwell, R. R., Höfle, M. G., Pruzzo, C. (2012): Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME journal* 6(1): 21–30.

Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G., Pruzzo, C. (2012): Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: Evidence from the vibrios. *ISME Journal* 6 (1): 21-30.

Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., Brettar, I., Colwell, R. R., Pruzzo, C. (2016): Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34): E5062–E5071.

Walker, J. D., Colwell, R. R. (1976): Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and environmental microbiology* 31(2): 189-197.

Yamamoto, S., Kasai, H., Dawn, A. L., Jackson, R.W., Vivian, A., Harayama, S. (2000): Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146: 2385-2394.

Yang, B., Zhai, S., Li, X., Tian, J., Li, Q., Shan, H., Liu, S. (2021): Identification of *Vibrio alginolyticus* as a causative pathogen associated with mass summer mortality of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* 535: 736363.

Zannella, C., Mosca, F., Mariani, F., Franci, G., Folliero, V., Galdiero, M., Tiscar, P. G., Galdiero, M. (2017): Microbial diseases of bivalve mollusks: infections, immunology and antimicrobial defense. *Marine drugs* 15(6): 182.

Zelić, I. (2015): Uzgoj školjkaša. Završni rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Splitu.

Zhang, X., Lin, H., Wang, X., Austin, B. (2018): Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle – A review. *Science China Earth Sciences* 61: 1357-1368.

Zrnčić, S. (1999): Patomorfološka, epizootiološka i bakteriološka istraživanja vibrioze lubina (*Dicentrarchus labrax*) iz uzgoja u hrvatskom priobalju. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Internetski izvori

<https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=79> (Pristupljeno 7.7.2021.)

<https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=14> (Pristupljeno 7.7.2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Pristupljeno 10.08.2021)

<https://www.geneious.com/> (Pristupljeno 10.08.2021)

8. PRILOZI

Prilog 1. Prikaz korištenih *Vibrio* sp. uzoraka s pripadajućim rezultatima identifikacije MALDI TOF MS analize.

Prilog 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize morske vode na području uzgajališta školjkaša Limski kanal i Malostonski zaljev za mjeseci studeni i siječanj.

Prilog 3. Nukleotidne sekvence gena *gyrB*, *mreB*, *rpod*, *toxR*, *rctB* bakterija roda *Vibrio* preuzete iz baze GenBank, korištene u molekularno-filogenetičkim analiza.

Prilog 1.

Tablica 1. Prikaz korištenih *Vibrio sp.* uzoraka s pripadajućim rezultatima identifikacije MALDI TOF MS analize

MALDI TOF MS vrijednosti: ≥ 2.00 (■) – visoka vjerojatnost determinacije vrste; 1.70 – 2.00 (■) – vjerojatna determinacija roda; ≤ 1.70 (■) - nepouzdana determinacija.

Naziv uzorka	Lokacija uzorkovanja	Sezona uzorkovanja	Tip uzorka	Podloga	Temperatura inkubacije	MALDI TOF MS	
						Best match	Vrijednost
3LK 4	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	2.15
3LK 32	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. pomeroi</i>	2.12
3LK 37	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. pomeroi</i>	1.80
3LK 40	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.87
3LK 50	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.71
3LK 54	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.76
3LK 90	Limski kanal	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	MA	35°C	<i>V. gigantis</i>	1.86
3LK 123	Limski kanal	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	35°C	<i>V. orientalis</i>	1.94
3LK 143	Limski kanal	Studeni 2020.	Dno	TCBS	35°C	<i>V. orientalis</i>	1.79
3LK 155	Limski kanal	Studeni 2020.	Dno	TCBS	22°C	<i>V. pomeroi</i>	1.97
3LK 161	Limski kanal	Studeni 2020.	Dno	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.99
3LK 181	Limski kanal	Studeni 2020.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. pomeroi</i>	1.93
3LK 183	Limski kanal	Studeni 2020.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.93
3LK 214	Limski kanal	Studeni 2020.	Dno	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.88
3LK 229	Limski kanal	Studeni 2020.	8 m	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.65
3LK 252	Limski kanal	Studeni 2020.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	2.00
4LK 7	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. aestuarianus</i>	2.24
4LK 8	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. aestuarianus</i>	2.26
4LK 24	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.18
4LK 25	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	1.91
4LK 26	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.37
4LK 34	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.76

4LK 42	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.76
4LK 45	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.76
4LK 50	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	35°C	<i>V. aestuarianus</i>	2.31
4LK 51	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	35°C	<i>V. aestuarianus</i>	2.18
4LK 61	Limski kanal	Siječanj 2021.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.81
4LK 85	Limski kanal	Siječanj 2021.	0 m	TCBS	35°C	<i>V. anguillarum</i>	2.10
4LK 88	Limski kanal	Siječanj 2021.	0 m	TCBS	35°C	<i>V. anguillarum</i>	1.93
4LK 123	Limski kanal	Siječanj 2021.	0 m	MA	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.81
4LK 125	Limski kanal	Siječanj 2021.	0 m	MA	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	2.02
4LK 170	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	MA	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	2
4LK 188	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	MA	35°C	<i>V. paraahaemolyticus</i>	2.38
4LK 193	Limski kanal	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	MA	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.81
4LK 218	Limski kanal	Siječanj 2021.	Sediment	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	2.09
3MS 10	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	MA	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	1.84
3MS 18	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	2.04
3MS 19	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	2.04
3MS 21	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	2.06
3MS 25	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.93
3MS 32B	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.83
3MS 35	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	MA	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	2.08
3MS 69	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Dno	TCBS	22°C	<i>V. chagasii</i>	1.96
3MS 75	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	0 m	MA	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.96
3MS 90	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	5 m	TCBS	22°C	<i>V. chagasii</i>	2.00
3MS 95	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. mediterranei</i>	1.79
3MS 130	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	0 m	TCBS	35°C	<i>V. fortis</i>	2.32
3MS 131	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	0 m	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.32
3MS 134	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	0 m	TCBS	35°C	<i>V. fortis</i>	2.23
3MS 150	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.08
3MS 151	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	1.87

3MS 160	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	Sediment	MA	35°C	<i>V. harveyi</i>	1.60
3MS 189	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	35°C	<i>V. mediterranei</i>	1.81
3MS 190	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. mediterranei</i>	2.05
3MS 202	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	MA	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.17
3MS 215	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>M. galloprovincialis</i>	MA	35°C	<i>V. chagasii</i>	2.05
3MS 238	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	MA	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.14
3MS 243	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	MA	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.07
3MS 249	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	MA	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.19
3MS 250	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.08
3MS 258	Malostonski zaljev	Studeni 2020.	<i>O. edulis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.15
4MS 20	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	Sediment	TCBS	35°C	<i>V. rotiferianus</i>	2.02
4MS 23	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	Sediment	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.06
4MS 31	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	2.02
4MS 32	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.95
4MS 37	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	5 m	TCBS	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	2.09
4MS 53	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	0 m	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.77
4MS 77	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>O. edulis</i>	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	2.15
4MS 86	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.26
4MS 87	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	35°C	<i>V. harveyi</i>	2.11
4MS 93	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.94
4MS 94	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	2.05
4MS 97	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.89
4MS 98	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.54
4MS 99	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.84
4MS 100	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. pomeroyi</i>	2.12
4MS 103	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. gigantis</i>	1.99
4MS 104	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	2
4MS 112	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.76
4MS 114	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	2.0
4MS 117	Malostonski zaljev	Siječanj 2021.	<i>M. galloprovincialis</i>	TCBS	22°C	<i>V. tasmaniensis</i>	1.69

Prilog 2.

Tablica 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize morske vode na području uzgajališta školjkaša Limski kanal i Malostonski zaljev za mjesec studeni i siječanj. Na svakoj lokaciji su mjerenja izvedena na dvije postaje u tablici označene s P1 i P2.

Sezona uzorkovanja	Fizikalno kemijski parametar	Limski kanal (LK)						Malostonski zaljev (MS)					
		LK-P1			LK-P2			MS-P1			MS-P2		
		0 m	8 m	dno	0 m	8 m	dno	0 m	5 m	dno	0 m	5 m	dno
Studeni 2020.	T (°C)	17,3	17,4	17,2	16,8	17,3	17,2	15,9	17,2	20,1	15,7	17,6	20,6
	O ₂ (%)	91,3	93,6	93,4	92,1	90,7	91,9	97,3	86,4	83,4	98,5	94,7	77,2
	Salinitet (‰)	36,3	36,8	36,8	34,2	36,5	36,8	32,3	35,7	37,2	32,2	34,2	37,4
	pH	8,18	8,21	8,21	8,03	8,16	8,21	8,24	8,18	8,15	8,23	8,19	8,13
	N (mg/L)	0,1	0,08	0,07	0,3	0,15	0,13	0,05	0,05	0,03	0,1	0,09	0,09
	P (mg/L)	0,008	0,013	0,012	0,012	0,011	0,011	0,005	0,007	0,009	0,021	0,022	0,012
Siječanj 2021.	T (°C)	10,9	12,3	12,2	11,4	12,5	12,1	12,6	14,5	15,3	10,6	14,6	15,4
	O ₂ (%)	93,5	93,6	94,2	96,3	94	96,7	92,9	89	89,7	94,4	88,1	86,9
	Salinitet (‰)	34,2	37,5	37,7	37,4	37,2	37,4	29,4	33,7	36,8	23,7	33,8	36,3
	pH	8,08	8,34	8,27	8,25	8,26	8,25	8,06	8,19	8,21	8,01	8,13	8,19
	N (mg/L)	0,17	0,2	0,31	0,2	0,24	0,1	0,22	0,51	0,08	0,91	4,51	4,61
	P (mg/L)	0,004	0,003	0,001	0,003	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002

Prilog 3.

Tablica 3. Nukleotidne sekvence gena *gyrB*, *mreB*, *rpoD*, *toxR*, *rctB* bakterija roda *Vibrio* preuzete iz baze GenBank, korištene u molekularno-filogenetičkim analizama (Pascual i sur. 2010; Perez-Cataluña i sur. 2016).

Naziv sekvence	Pristupni broj				
	<i>gyrB</i>	<i>mreB</i>	<i>rpoD</i>	<i>rctB</i>	<i>toxR</i>
<i>V. alginolyticus</i> CECT 521 ^T	FM202620	DQ907405	FM202535		
<i>V. atlanticus</i> CECT 7223 ^T	KF666694	KF666715	FN582265		
<i>V. atlanticus</i> Lsint10	LN832868	LN832630	LN832690		
<i>V. campbellii</i> CECT 523 ^T	FM202593	DQ907408	FM202508		
<i>V. celticus</i> CECT 8431	LN832881*	LN832643	LN832703		
<i>V. celticus</i> CECT 8434	LN832882	LN832644	LN832704		
<i>V. chagasii</i> 7OM17	LN832886	LN832648	LN832708		
<i>V. chagasii</i> CECT 8435	LN832895	LN832657	LN832717		
<i>V. chagasii</i> CECT 8436	LN832896	LN832658	LN832718		
<i>V. cholerae</i> CECT 514 ^T	FM202624	CP001233	FM202539	FM202666	FM202719
<i>V. crassostreae</i> LMG 22240 ^T	AB298209	DQ481638	AY751351 ^a		
<i>V. crassostreae</i> 6OM20	LN832906	LN832668	LN832728		
<i>V. crassostreae</i> 6OM24	LN832907	LN832669	LN832729		
<i>V. cyclitrophicus</i> LMG 21359 ^T	AB298211	DQ481639	AY751371		
<i>V. diazotrophicus</i> CECT 627 ^T	AB298212	DQ907413	HE805633		
<i>V. fortis</i> CECT 8657 ^T	AB298216	DQ907417	LN713957		
<i>V. gallaecicus</i> CECT 7244 ^T	LN713963	LN713962	FN908850		
<i>V. gigantis</i> LMG 22741 ^T	AB298219	DQ979358	AY751347		
<i>V. gigantis</i> LPD 1-1-47	LN832917	LN832679	LN832739		
<i>V. hemicentroti</i> AlyHP32 ^T	JX455827	JX455828	JX455832		
<i>V. kanaloae</i> LMG 20539 ^T	AB298225	DQ481643	AY751352		
<i>V. kanaloae</i> 96-26	LN832918	LN832680	LN832740		
<i>V. lentus</i> CECT 5110 ^T	AB298226	LN713964	AY751358		
<i>V. lentus</i> 3OM12	LN832919	LN832681	LN832741		
<i>V. pelagius</i> CECT 4202 ^T	AB298241	DQ907442	LN713959		
<i>V. pomeroyi</i> CECT 8440 ^T	AB298242	LN713965	AY751353		
<i>V. splendidus</i> LMG 4042 ^T	AJ515292	DQ481647	AY751355		
<i>V. splendidus</i> CECT 8432	LN832922	LN832684	LN832744		
<i>V. splendidus</i> CECT 8433	LN832923	LN832685	LN832745		
<i>V. tasmaniensis</i> LMG 20012 ^T	AB298250	DQ481648	AY751354		
<i>V. toranzoniae</i> CECT 7225 ^T	KF666703	LN713966	HE820035		
<i>V. toranzoniae</i> 96-376	LN832927	LN832689	LN832749		
<i>V. alginolyticus</i> CECT 521 ^T			FM202535	FM202662	FM202715
<i>V. alginolyticus</i> CECT 436			FM202536	FM202663	FM202716
<i>V. alginolyticus</i> CECT 586			FM202537	FM202664	FM202717
<i>V. alginolyticus</i> CECT 609			FM202538	FM202665	FM202718
<i>V. campbellii</i> CECT 523 ^T			FM202508	FM202635	FM202688

<i>V. campbellii</i> CAIM 9			FM202509	FM202636	FM202689
<i>V. campbellii</i> CAIM 128			FM202510	FM202637	FM202690
<i>V. campbellii</i> CAIM 333			FM202511	FM202638	FM202691
<i>V. campbellii</i> CAIM 392			FM202512	FM202639	FM202692
<i>V. campbellii</i> CAIM 415			FM202513	FM202640	FM202693
<i>V. campbellii</i> CAIM 419			FM202514	FM202641	FM202694
<i>V. campbellii</i> CAIM 521			FM202515	FM202642	FM202695
<i>V. campbellii</i> CAIM 780			FM202516	FM202643	FM202696
<i>V. campbellii</i> R379			FM202518	FM202645	FM202698
<i>V. campbellii</i> R1024			FM202517	FM202644	FM202697
<i>V. campbellii</i> R1117			FM202519	FM202646	FM202699
<i>V. campbellii</i> R1311			FM202520	FM202647	FM202700
<i>V. harveyi</i> CECT 525 ^T	FM202583		FM202498	FM202625	FM202678
<i>V. harveyi</i> SA F3s 40			FM202499	FM202626	FM202679
<i>V. harveyi</i> H2			FM202500	FM202627	FM202680
<i>V. harveyi</i> DL F5 57			FM202501	FM202628	FM202681
<i>V. harveyi</i> SA F1s 10			FM202502	FM202629	FM202682
<i>V. harveyi</i> SA F4s 17			FM202503	FM202630	FM202683
<i>V. harveyi</i> LPD 1-1-10			FM202504	FM202631	FM202684
<i>V. harveyi</i> LPD 1-3-1			FM202505	FM202632	FM202685
<i>V. harveyi</i> LPD 1-3-27			FM202506	FM202633	FM202686
<i>V. harveyi</i> LPD 1-3-35			FM202507	FM202634	FM202687
<i>V. natriegens</i> CECT 526 ^T			FM202530	FM202657	FM202710
<i>V. natriegens</i> CECT 7465			FM999816	FM999820	FM999822
<i>V. natriegens</i> CECT 7466			FM999817	FM999821	FM999823
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 511 ^T			FM202531	FM202658	FM202711
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 5305			FM202532	FM202659	FM202712
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 5271			FM202533	FM202660	FM202713
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 611			FM202534	FM202661	FM202714
<i>V. rotiferianus</i> LPD 1-1-11			FM202526	FM202653	FM202706
<i>V. rotiferianus</i> LPD 1-1-24			FM202527	FM202654	FM202707
<i>V. rotiferianus</i> LPD 1-1-84			FM202528	FM202655	FM202708
<i>V. rotiferianus</i> LPD 1-1-86			FM202529	FM202656	FM202709
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 573			FM202521	FM202648	FM202701
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 574			FM202522	FM202649	FM202702
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 575			FM202523	FM202650	FM202703
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 576			FM202524	FM202651	FM202704
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 577 ^T			FM202525	FM202652	FM202705
<i>V. aestuarianus</i> 08/114	KY930548				
<i>V. aestuarianus</i> 15/075	MK315021				
<i>V. aestuarianus</i> 01/32	AJ582818				

<i>V. aestuarianus</i> W08	KM579641				
<i>V. anguillarum</i> VIB 77	KU755025				
<i>V. anguillarum</i> NVI 6419	KU755016				
<i>V. anguillarum</i> ATCC 43312	KU754933				
<i>V. anguillarum</i> LMG 13224	KU754950				
<i>V. anguillarum</i> LMG 13225	KU754951				
<i>V. celticus</i> CAIM 1849	KF666697				
<i>V. chagasii</i> LMG 21353T	AB298206				
<i>V. communis</i> R-40496	GU078680				
<i>V. mediterranei</i> CECT 621T	HF541982				
<i>V. orientalis</i> ATCC 33934	EF380260				
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562T	AB298252				

ŽIVOTOPIS

Školovanje:

2002.-2010. Osnovna škola Vladimira Nazora, Vrsar.

2011.-2014. Gimnazija i strukovnu školu Jurja Dobrile-GSŠJD, Pazin.

2014.-2019. Sveučilišni prvostupnik struke Znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Stručna i laboratorijska praksa:

2020.-2021. Geonatura d.o.o., Zagreb.

- grupa za istraživanje kopnenih ekosustava

2016.-2018. Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Odjel za znanstvena istraživanja, Zagreb.

- radila na: Ekološki faktori i prirodna infekcija sitnih glodavaca virusom krpeljnog meningoencefalitisa u Hrvatskoj

Fakultetski angažman:

2018.-2018. Demonstratorica za kolegij Alge i gljive, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.