

Detekcija bakterija u hemolimfi rakova lančanom reakcijom polimerazom

Doskočil, Bruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:795871>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Bruno Doskočil

7745/N

**Detekcija bakterija u hemolimfi rakova lančanom
reakcijom polimerazom**

Završni rad

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Uspostavni istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc) (voditeljica: izv. prof. dr. sc. Ana Bielen)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikoorganizama**

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

**Detekcija bakterija u hemolimfi rakova lančanom reakcijom polimerazom
*Bruno Doskočil, 0058214732***

Sažetak: Iako su deseteronožni rakovi ključne vrste slatkovodnih ekosustava, brojni aspekti njihove biologije su slabo istraženi, uključujući bakterijske zajednice prirodno prisutne u hemolimfi. Cilj ovog rada bio je po prvi puta pokušati detektirati bakterije u hemolimfi zdravih jedinki uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus* (zavičajna vrsta) i signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* (invazivna vrsta) lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Na nekoliko lokacija na rijeci Korani uhvaćene su 34 jedinke uskoškarogi 69 jedinki signalnog raka. Nakon izolacije ukupne DNA iz hemolimfe, provedena je amplifikacija gena koji kodira za bakterijsku 16S *rRNA*. Bakterije su detektirane u 45 % uzoraka hemolimfe uskoškarog raka te samo u 15,7 % uzoraka signalnog raka. Najveći broj pozitivnih uzoraka obje vrste bio je s lokacije Belajske Poljice.

Ključne riječi: invazivni rakovi, mikrobne zajednice, *Pacifastacus leniusculus*, *Pontastacus leptodactylus*, zavičajni rakovi

Rad sadrži: 35 stranica, 9 slika, 3 tablice, 64 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Ana Bielen*

Pomoć pri izradi: *Anđela Miljanović, mag. ing.*

Datum obrane: 15.7.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor
thesis**

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study of Nutrition
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Detection of bacteria in crayfish hemolymph by polymerase chain reaction
Bruno Doskočil, 7745/N

Abstract: Although crayfish are keystone species of freshwater ecosystems, many aspects of their biology remain understudied, including analyses of bacterial communities naturally occurring in the hemolymph. The objective of this study was to detect, for the first time, bacteria in the hemolymph of healthy narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (native species) and signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (invasive species) using polymerase chain reaction (PCR). Thirty-four individuals of narrow-clawed crayfish and 69 of the signal crayfish were captured at multiple sites in Korana River. After extraction of total DNA from hemolymph, amplification of the gene encoding bacterial 16S rRNA was performed. Bacteria were detected in 45% of the narrow-clawed crayfish hemolymph samples and in 15.7% of samples from signal crayfish. The largest number of positive samples of both species came from the site Belajske Poljice.

Keywords: invasive crayfish, microbial communities, native crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, *Pontastacus leptodactylus*

Thesis contains: 35 pages, 9 figures, 3 tables, 64 references, 1 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ana Bielen, PhD

Technical support and assistance: Anđela Miljanović, mag.ing.

Defence date: 15.7.2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Deseteronožni rakovi	2
2.2. Mikrobne zajednice višestaničnih organizama s fokusom na slatkovodne deseteronožne rakove kao domaćine.....	5
2.3. Mikrobne zajednice hemolimfe deseteronožnih rakova.....	7
3. Materijali i metode	9
3.1. Uzorkovanje.....	9
3.2. Uzimanje hemolimfe	11
3.3. Izolacija DNA	12
3.4. Lančana reakcija polimerazom.....	14
3.5. Elektroforeza u agaroznom gelu.....	15
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. LITERATURA	23
8. PRILOG.....	29

1. UVOD

Deseteronožni rakovi (red Decapoda) ključne su vrste slatkovodnih ekosustava, ali mnogi aspekti njihove biologije nisu dovoljno istraženi. Primjerice, za hemolimfu zdravih rakova, odnosno tekućinu koja ispunjava njihov otvoreni optjecajni sustav, ranije se smatralo da je sterilna, odnosno bez ikakvih mikroorganizama (Bang, 1970; Lee i Pfeifer, 1975; Johnson, 1976). Ova je pretpostavka temeljena na neuspjelim pokušajima kultivacije mikroorganizama iz hemolimfe na hranjivim podlogama. Međutim, u kasnijim su istraživanjima uspješno uzgojene bakterije iz hemolimfe zdravih jedinki mnogih vrsta rakova (Cornick i Stewart, 1966; Amborski i Amborski, 1974; Haskell i sur., 1975; Dragičević i sur., 2020) te je danas većina postojećih istraživanja mikrobni zajednica hemolimfe rakova temeljena na uzgoju izolata na hranjivim podlogama (Ooi i sur., 2019). Međutim, tim je pristupom moguće izolirati i kultivirati samo one mikroorganizme koji imaju sposobnost rasta na određenoj hranjivoj podlozi, a pretpostavlja se da je to 1 ili manje % od ukupnog broja bakterijskih vrsta prisutnih u većini uzoraka iz okoliša (Turroni, 2008). Stoga se danas daje prednost istraživanjima sastava mikrobni zajednica preko izolacije DNA iz okoliša i sekvenciranja određenih marker gena, kojadaju uvid u cjelokupnu mikrobnu zajednicu, uključujući i njezin dio koji se ne može uzgojiti na hranjivim podlogama (Yuan i sur., 2012). Međutim, takva istraživanja hemolimfe rakova su malobrojna (Ooi i sur., 2019), a za vrste koje dolaze u Hrvatskoj, bilo invazivne bilo zavičajne, do danas ne postoje. Stoga je cilj ovog rada bio po prvi puta detektirati bakterije u hemolimfiuskoškarg raka *Pontastacus leptodactylus* (zavičajna vrsta) i signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* (invazivna vrsta) lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). Rezultati ovog rada biti će temelj za nastavak istraživanja u kojem će se bakterijske zajednice hemolimfe rakova analizirati sekvenciranjem fragmenta gena koji kodiraju 16S rRNA.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Deseteronožni rakovi

Slatkovodni deseteronožni rakovi spadaju u koljeno člankonožaca (Arthropoda), pododjeljak rakova (Crustacea), razred viših rakova (Malacostraca) i red deseteronožaca (Decapoda) (Šargač, 2015). Red Decapoda obuhvaća oko 15 000 različitih vrsta, no njih tek nešto više od 300 dolazi isključivo u slatkovodnim staništima. Do danas je u svijetu opisano oko 600 vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova iz podreda Astacida, podijeljenih u dvije nadporodice (Astacoidea i Parastacoidea) i tri porodice (Astacidae, Cambaridae i Parastacidae) (Holdich, 2002; De Grave i sur., 2009).

Deseteronožni rakovi spadaju među najveće i najdugovječnije slatkovodne beskralježnjake i često čine glavni dio bentoske biomase u slatkovodnim ekosustavima. Smatraju se inženjerima ekosustava jer mogu utjecati na brzinu obrade štetnih tvari, a također i ključnim potrošačima zbog omnivornog načina prehrane (Galib i sur., 2020). Uz to, oni su bioindikator životnih zajednica ili staništa i ključni regulatori hranidbenih lanaca (Parvulescu i sur., 2011)

Na području Europe zabilježeno je pet zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae: riječni rak - *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), uskoškari rak - *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), potočni rak - *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803), bjelonogi rak - *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) i *Astacus pachypus* (Rathke, 1837). Od toga u Hrvatskoj dolaze četiri vrste: riječni rak, uskoškari rak, potočni rak i bjelonogi rak, od kojih su čak tri zaštićene na nacionalnoj i međunarodnoj razini: *A. astacus*, *A. pallipes* i *A. torrentium* (Maguire i sur., 2011).

Pontastacus leptodactylus ili uskoškari rak zavičajna je europska vrsta koja se može naći u slatkovodnim i bočatim staništima. Jedina je hrvatska vrsta deseteronožnih rakova koja nije zaštićena zakonom. Najčešće je dug do 15 cm, ali može narasti i do 30 cm. Boja tijela s leđne strane je raznolika, od žutosmeđe do maslinastozelene, a trbušna strana je svijetle, gotovo bijele boje (Slika 1A) (Mužić, 2013). Ima komercijalni značaj za ribarstvo i akvakulturu na europskoj razini (u Hrvatskoj astacikultura danas ne postoji). Vrsta je vrlo širokog rasprostranjenja: na istoku se prostire do istočne Rusije i Bliskog istoka, a na zapadu duž čitave Europe izuzev Iberskog i Baltičkog poluotoka (Holdich, 2002). U Hrvatskoj je zabilježen u rijekama savskog i dravskog slijeva (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).



Slika 1. Vrste rakova obuhvaćene ovim istraživanjem: A) Zavičajni uskoškari rak, *Pontastacus leptodactylus*, B) Invazivni signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (Foto: Anđela Miljanović).

Europske zavičajne vrste deseteronožnih rakova (uključujući Hrvatsku) ugrožene su i smanjuje im se rasprostranjenost i brojnost, i to većinom zbog uništenja staništa (npr. regulacije vodenih tokova), prekomjernog izlova, onečišćenja, bolesti i kompeticije s invazivnim stranim vrstama rakova koje većinom potječu iz Sjeverne Amerike (Holdich i sur., 2009). Strane vrste rakova mogu znatno utjecati na vodene ekosustave u koje su unesene zbog svog brzog rasta i velike biomase koje postižu, dugog životnog vijeka, raznolikog načina prehrane, agresivnog ponašanja i velike plodnosti te se tako mogu vrlo lako proširiti u staništu. Strana vrsta je svaka vrsta koja određeni ekosustav ne nastanjuje prirodno, nego je u njega dospjela namjernim ili nenamjernim posredovanjem čovjeka. Ukoliko strana vrsta negativno utječe na bioraznolikost, usluge ekosustava, zdravlje ljudi ili uzrokuje ekonomsku štetu na području u koje je unesena, tada tu stranu vrstu smatramo invazivnom (Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, 2020). U „stare invazivne strane vrste” pripadaju tri vrste podrijetlom iz Sjeverne Amerike: *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) - bodljobrati rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – signalni rak i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). U „nove invazivne strane vrste” pripadaju sjevernoameričke vrste *Faxonius immunis* (Hagen, 1870), *Faxonius juvenilis* (Hagen, 1870), *Faxonius virilis* (Hagen, 1870), *Procambarus acutus* (Girard, 1852), *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) i *Procambarus alleni* (Faxon, 1884) i dvije australske vrste: *Cherax destructor* (Clark, 1936) i *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Holdich, 2009; Kouba i sur. 2014). U Hrvatskoj od navedenih vrsta dolaze signalni rak, bodljobrati rak te mramorni rak (Maguire

i Gottstein-Matočec, 2004; Maguire i sur., 2008; Samardžić i sur., 2015). Posljednjih su godina u Europi strane invazivne vrste rakova, koje su krajem 19. stoljeća unesene zbog uzgoja, brojčano nadmašile zavičajne vrste i to najviše zbog prijenosa patogena *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1903) (razred Oomycetes, red Saprolegniales) koji je uzročnik smrtonosne bolesti račje kuge i smatra se jednim od najgorih invazivnih vrsta na svijetu zbog svog brzog širenja i destruktivnog utjecaja na zavičajne populacije europskih rakova (Lowe i sur., 2000). Ovaj patogen se najčešće prenosi putem invazivnih vrsta koje su mnogo otpornije na infekciju nego zavičajne (Aydin i sur., 2014; Sandström i sur., 2014) te jedinke zavičajnih vrsta najčešće razviju bolest uslijed kontakta s prenositeljem račje kuge ili zoosporama patogena *A. astaci* (Unestam i Weiss 1970; Makkonen i sur., 2014; Becking i sur., 2015).

Signalni rak (Slika 1B), *Pacifastacus leniusculus*, je, u odnosu na zavičajne vrste, kompetitivniji i agresivniji, brže raste te ima visoku plodnost i rano spolno sazrijevanje (Kolarić, 2016). Nepovoljno utječe na slatkovodne ekosustave i to najviše na populacije velikih beskralježnjaka i riba. Prvi je puta zabilježen u Hrvatskoj 2008. godine u rijeci Muri, od kuda se dalje širio nizvodno do Drave brzinom 18 – 24,4 km/god, što je među najvišim zabilježenim stopama širenja u Europi (Hudina i sur., 2009). U rijeci Korani prvi se puta pojavio 2011. godine te se njegova rasprostranjenost od tada povećala 20 puta (Dragičević i sur., 2020). Tamo je invazivni areal signalnog raka povećan za ukupno 5 km u tri godine, a sada se proteže na ukupno 30 km dužine rijeke. Danas je signalni rak u Hrvatskoj rasprostranjen u cijelom kontinentalnom dijelu zemlje, u sustavima rijeka Save i Drave (Maguire i sur., 2018). Uz to, nedavno je utvrđeno da je mali udio (6 %) populacije signalnog raka u rijeci Korani pozitivan na prisutnost patogena *A. astaci* (Pavić i sur. 2018). Stoga, pored kompetitivne prednosti, rakovi su i prenosioči patogena, što je vjerojatno pridonijelo opaženom padu populacija zavičajne vrste *P. leptodactylus* u rijeci Korani.

2.2. Mikrobne zajednice višestaničnih organizama s fokusom na slatkovodne deseteronožne rakove kao domaćine

Istraživanja mikrobnih zajednica slatkovodnih deseteronožnih rakova tek su u začetku, iako je, većinom temeljem istraživanja na sisavcima, poznato da višestanični organizmi žive u simbiotskom odnosu sa svojim mikrobnim zajednicama i da taj odnos često ima višestruke koristi za domaćina.

Simbioza je udruženje dvije ili više različitih vrsta organizama koje može biti korisno, štetno ili neutralno za organizme koji u njemu sudjeluju (Paracer i Ahmadjian, 2000). Postoji više vrsta simbiotskih odnosa, a to su mutualizam, komenzalizam i parazitizam. Mutualizam je odnos u kojemu oba partnera u određenoj mjeri imaju korist. Komenzalizam je odnos u kojemu jedan partner ima korist dok je na drugoga utjecaj neutralan. Odnos u kojemu jedan partner ima korist na račun drugoga je parazitizam. Ipak, granice između ove tri kategorije nisu uvijek potpuno jasne i jedna vrsta odnosa može prelaziti u drugu (Paracer i Ahmadjian, 2000). Stoga mikrobne zajednice mogu povoljno utjecati na domaćina, no u slučaju neravnoteže mogu prevladati štetni pa i patogeni mikrobi.

Pri istraživanju sastava mikrobnih zajednica koriste se dva pristupa: tradicionalan koji se zasniva na uzgoju mikroorganizama na hranjivim podlogama (engl. *culture dependent approach*) i moderan koji se temelji na izolaciji DNA i analizi mikrobnih zajednica temeljem njihovih DNA-sekvenci (engl. *culture independent approach*). Tradicionalnom izolacijom i uzgojem mikroba u čistim kulturama dobiveni izolati mogu se identificirati na različite načine. Jedan od pristupa je upotreba biokemijskih testova pri kojem nasađivanje izolata na specifični hranjivi medij omogućuje identifikaciju onih mikroorganizama koji su sposobni rasti u tim uvjetima. Osim toga, izolati se mogu identificirati i masenom spektrometrijom MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) je brza i precizna proteomska metoda identifikacije mikroorganizama koja se temelji na usporedbi spektara ribosomalnih proteina nepoznatih izolata sa spektrima poznatih vrsta iz baza podataka. Na kraju, bakterijski izolati se mogu identificirati Sanger-sekvenciranjem ("sekvenciranje prve generacije") marker gena (za bakterije je to najčešće gen koji kodira za 16S *rRNA*). Ovaj postupak uključuje izolaciju genomske DNA, PCR-amplifikaciju regije od interesa te Sanger-sekvenciranje. Metoda se temelji na terminaciji elongacije lanca DNA korištenjem fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida (Sanger i sur., 1977). Sekvenciranje 16S rDNA trenutno predstavlja „zlatni standard“ u mikrobnoj molekularnoj taksonomiji zbog ogromnog i sve većeg broja 16S rDNA sekvenci u bazama podataka (Federhen, 2012;

McDonald i sur., 2012; Yarza i sur., 2014). Na primjer, „Baza podataka 16S ribosomske RNA bakterija i arheja“ na NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) trenutno sadrži preko 22 000 unosa.

Međutim, procjenjuje se da se standardnim tehnikama u laboratoriju može otkriti tek 1% ili manje bakterijske raznolikosti većine uzoraka iz okoliša (Turroni, 2008). Zato se u posljednje vrijeme za karakterizaciju sastava i funkcije mikrobnih zajednica sve više primjenjuju direktne analize njihovih DNA-sekvenci, preskačući korak uzgoja čistih kultura. U zadnjih 40 godina razvijene su metode sekvenciranja nove generacije. Sekvenceri druge generacije su 454 pirosekvenciranje, Illumina i AB SOLiD sustav, sekvenceri treće generacije su PacBio, Heliscope i Ion Torrent Personal Genome Machine, dok su sekvenceri četvrte generacije nanopore sekvenceri: Oxford Nanopore, „Solid-state“ sekvenciranje nanoporama (Slatko i sur., 2018). Pomoću ovih metoda može se istovremeno sekvencirati tisuće DNA fragmenata i to je podloga za analizu čitavih mikrobnih zajednica preko izoliranih uzoraka DNA.

Metagenomika i metode koje se zasnivaju na sekvenciranju taksonomskih marker gena dovele su do značajnih promjena u shvaćanju mikrobnih zajednica. Napredak u sekvenciranju DNA omogućio je da se bakterije identificiraju velikom razlučivošću i propusnošću čitanjem gena koji kodira za 16S ribosomsku RNA (*rRNA*). DNA svih bakterija u uzorku se ekstrahira, geni koji kodiraju za 16S *rRNA* se amplificiraju PCR-om, a ampliconi se očitavaju pomoću suvremenih instrumenata za sekvenciranje. Rezultat su sljedovi svih 16S *rRNA* gena u uzorku, a identifikacija se provodi pomoću taksonomske klasifikacije uspoređivanjem svakog nukleotidnog slijeda s bazom sekvenci poznatih bakterija (Handelsman, 2004).

Ovakvom metodologijom su u posljednje vrijeme masovno analizirane mikrobne zajednice iz raznih sustava pa tako i one vezane uz višestanične organizme. Mikrobne zajednice sisavaca, uključujući ljude, su najistraženije. Možemo ih pronaći na koži, u ustima, nosu, ušima, rodnicij probavnog trakta, a svako stanište ima svoja obilježja i svoje mikrobe (Ross i sur., 2019). U usporedbi s tim, mikrobne zajednice drugih skupina životinja su mnogo manje istražene, uključujući i mikrobne zajednice deseteronožnih rakova. Neka od postojećih istraživanja mikrobnih zajednica deseteronožnih rakova temeljena su na uzgoju mikroorganizama na hranjivim podlogama. Tako je pokazano da brojni izolati s kutikule i ostalih tkiva signalnog, uskoškarog i riječnog raka pripadaju rodu *Pseudomonas* te da mnogi od njih mogu inhibirati rast micelija patogena *A. astaci*, uzročnika račje kuge (Topić Popović i sur., 2014; Orlić i sur., 2021), što doprinosi saznanjima o pozitivnoj ulozi bakterijskih zajednica u zaštiti domaćina od patogena. Nadalje, u većini novijih istraživanja mikrobnih zajednica rakova korišteno je sekvenciranje druge generacije te je najčešće analiziran mikrobiom probavila akvakulturno

važnih vrsta rakova, poput vrste *Procambarus clarkii* (Zhang i sur., 2019; Nguyen i sur., 2021; Zhang i sur., 2021; Dragičević i sur., 2021). Tako je pokazano da nasastav mikrobnih zajednica probavila rakova utječe način prehrane (Nguyen i sur., 2021), kao i antropogeno onečišćenje vode, primjerice lijekovima (Zhang i sur., 2019) i teškim metalima (Zhang i sur., 2021). Naposljetku, u Hrvatskoj je nedavno provedeno prvo istraživanje mikrobnih zajednica rakova sekvenciranjem nove generacije (Dragičević i sur., 2021). Provedena je analiza mikrobioma kutikule i različitih tkiva (hemolimfa, hepatopankreas i crijevo) signalnog raka *P. leniusculus* sekvenciranjem 16S rDNA-amplikona Illumina MiSeq tehnologijom. Analizirani mikrobiomi prikupljeni su s četiri različite lokacije duž područja invazije signalnih rakova u rijeci Korani i uspoređeni s mikrobiomima prisutnim u okolišu - u vodi i u sedimentu. Mikrobne zajednice kutikule bile su najraznolikije i najsličnije okolišu, odnosno mikrobnim zajednicama sedimenta. Nadalje, mikrobiom kutikule, hepatopankreasa i probavila se mijenjao ovisno o tome s koje su lokacije uzorci uzeti: iz središta invazivnog areala gdje je vrlo visoka gustoća jedinki, ili s fronti invazivnog areala, gdje je gustoća populacije manja. Sastav mikrobnih zajednica hemolimfe značajno se razlikovao od mikrobnih zajednica ostalih tkiva, ali je bio i ovisan o uvjetima abiotskog okoliša koji su vjerojatno utjecali na imunosni status jedinki.

2.3. Mikrobne zajednice hemolimfe deseteronožnih rakova

Optjecajni sustav deseteronožnih rakova je otvoren te kroz njega protječe hemolimfa koja sadrži mikroorganizme. Sastav hemolimfe, koja se sastoji od plazme i hemocita, mijenja se ovisno o fiziološkom stanju životinje, ciklusu presvlačenja i ovisno o uvjetima okoliša. Plazmu čine voda, ioni (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i Cl^-), ugljikohidrati, lipidi i proteini. Hemocijanin, koji čini 80 - 95 % ukupnih proteina u hemolimfi rakova, je respiratorni pigment rakova koji se nalazi slobodan u hemolimfi. Količina mu ovisi o ciklusu presvlačenja, hranidbenom statusu, stresu i zdravstvenom stanju. Hemociti su stanice hemolimfe koje imaju mnoštvo uloga kao što su zarastanje rana, koagulacija, fagocitoza, inkapsulacija (oblikovanje vezivne kapsule oko nekog patološkog procesa u tkivu) i učvršćenje oklopa. Broj hemocita ovisi o fiziološkom te zdravstvenom stanju životinje (Čolak, 2011). Primjerice, broj hemocita kod vrste *Carcinus maenas* poveća se za 100 % neposredno nakon presvlačenja (Maynard, 1960).

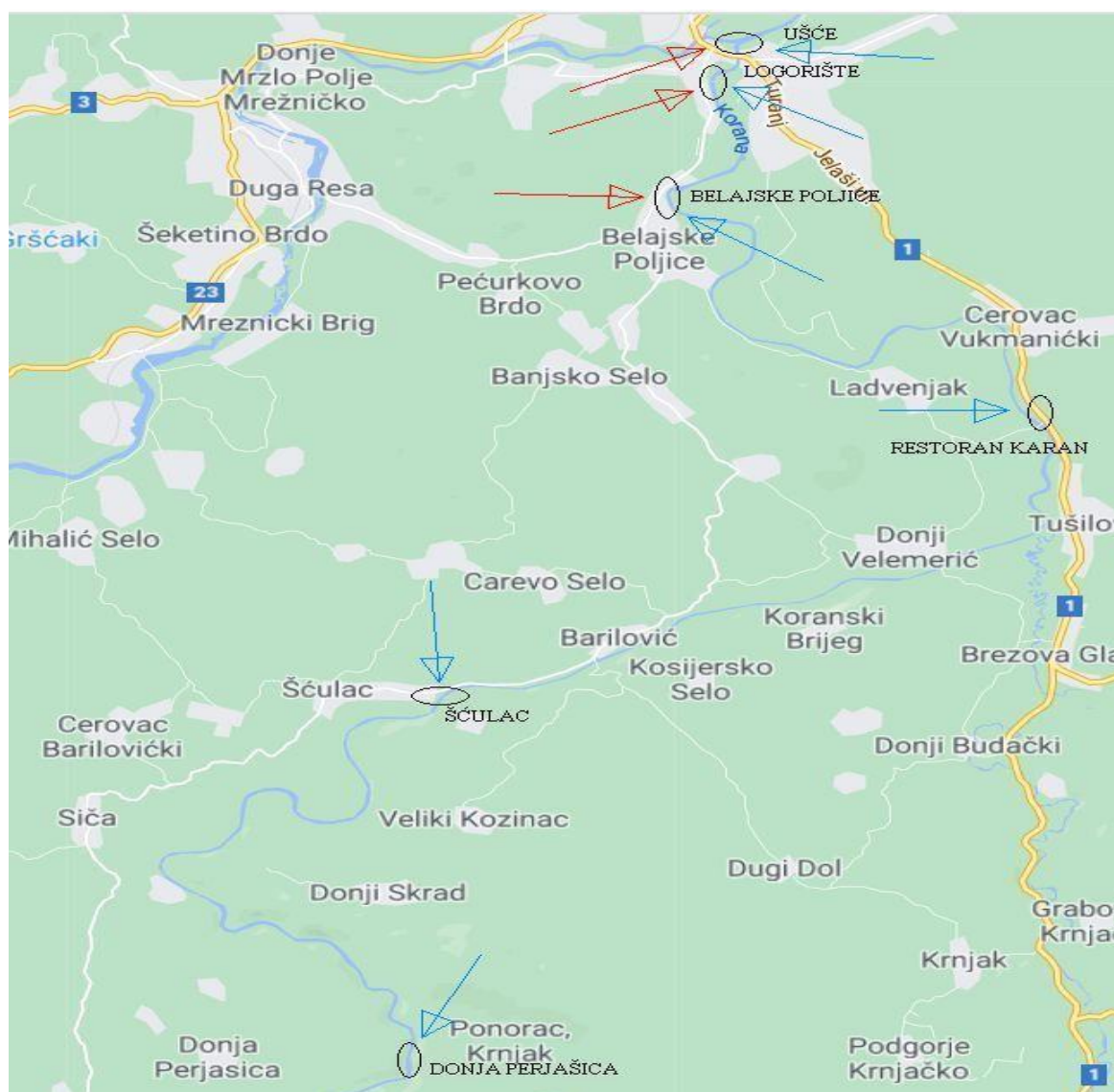
Ranije se, temeljem neuspješnih pokušaja kultivacije bakterija iz hemolimfe, smatralo da bi hemolimfa zdravih rakova trebala biti sterilna i da je prisutnost bakterija u njoj posljedica stresa ili bolesti (Bang, 1970; Lee i Pfeifer, 1975; Johnson, 1976). Međutim, danas je poznato da su

u hemolimfi zdravih rakova prisutne bakterije mnogih rodova i to bez ikakve štete za domaćina (Cornick i Stewart, 1966; Amborski i Amborski, 1974; Haskell i sur., 1975; Scott i sur. 1986; Bii sur., 2008; Jiravanichpaisal i sur., 2009; Davidson i sur., 2010; Ambas i sur., 2015). Štoviše, bakterije u hemolimfi rakova mogu pozitivno utjecati na zdravlje domaćina modulirajući imunosni odgovor, proizvodeći antimikrobne tvari i kompeticijom s patogenima (Wang i sur., 2015). S druge strane, u hemolimfi su također zabilježeni rodovi za čije je pojedine predstavnike potvrđena patogenost (*Bacillus*, *Citrobacter*, *Spiroplasma* i *Pseudomonas*) (Dragičević i sur., 2021). Novija istraživanja provedene posljednjih godina NGS-metodologijom donose nova saznanja o mikrobnim zajednicama hemolimfe rakova (Ooi i sur., 2019; Dragičević i sur., 2021). Primjerice, kod raka *Panulirus ornatus* otkriveno je da je raznolikost, brojnost i funkcionalni profil bakterijskih zajednica hemolimfe ovisan o temperaturi vode (Ooi i sur., 2019). Nadalje, hemolimfa raka *Pacifastacus leniusculus* je imala najujednačeniji mikrobiom u usporedbi s drugim tkivima (hepatopankreas, probavilo, kutikula), odnosno najmanje se mijenjala ovisno o uvjetima okoliša. Ipak, utvrđene su razlike u sastavu mikrobnih zajednica hemolimfe kod rakova s uzvodnih (ruralnih) i nizvodnih (gradskih) dijelova rijeke što ukazuje na to da se sastav mikrobnih zajednica hemolimfe ipak mijenja u ovisnosti o okolišu u kojem rakovi žive. Glavna bakterijska skupina u hemolimfi bila je Proteobacteria (82,9 %), s dominantnim porodicama Sphingomonadaceae i Pseudomonadaceae (Dragičević i sur., 2021). Još ne postoje istraživanja hemolimfe zavičajnih europskih vrsta rakova, niti istraživanja u kojima bi se uspoređivao mikrobiom hemolimfe različitih vrsta rakova (npr. koliko je on uvjetovan vrstom raka, koliko fiziološkim statusom jedinke, a koliko utječe okoliš).

3. Materijali i metode

3.1. Uzorkovanje

Terensko prikupljanje invazivnih signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) te zavičajnih uskoškarih rakova (*Pontastacus leptodactylus*) provedeno je na nekoliko lokacija na rijeci Korani od mjeseca kolovoza do studenog 2020. godine (Slika 2, Tablica 1). Lokacije su odabrane prema nedavnom istraživanju deseteronožnih rakova u rijeci Korani (Dragičević, 2020.).



Slika 2. Prikaz lokacija uzorkovanja na rijeci Korani. Crvene strelice označuju mjesta uzorkovanja vrste *Pontastacus leptodactylus*, a plave *Pacifastacus leniusculus* (slika preuzeta s Google Maps-a i modificirana)

Tablica 1. Lokacije i datum uzorkovanja te broj ulovljenih rakova po spolu i vrsti uz navedene prosječne dužine te mase.

Lokacija	Datum uzorkovanja	Broj uhvaćenih jedinki vrste <i>Pacifastacus leniusculus</i> (Prosječna dužina/mm i prosječna masa/g)			Broj uhvaćenih jedinki vrste <i>Pontastacus leptodactylus</i> (Prosječna dužina/mm i prosječna masa/g)		
		Mužjaci	Ženke	Ukupno	Mužjaci	Ženke	Ukupno
Ušće	11.9.2020.	4	2	6	14	4	18
	14.9.2020.						
	10.10.2020.	117,99 mm	94,16 mm	106,08 mm	95,88 mm	87,78 mm	91,83 mm
	21.10.2020.	70,05 g	26,8 g	48,43 g	27,22 g	17,69 g	22,46 g
Logorište	11.9.2020.	3	9	12	5	3	8
	14.9.2020.						
	10.10.2020.	95,24 mm	103,21 mm	99,23 mm	110,27 mm	98,37 mm	104,32 mm
		27,77 g	37,05 g	32,41 g	42,16 g	24,46 g	33,31 g
Belajske Poljice	10.10.2020.	5	7	12	4	2	6
	21.10.2020.						
	23.10.2020.	98,6 mm	103,86 mm	101,23 mm	108,75 mm	71,5 mm	90,13 mm
		41,08 g	38,3 g	39,69 g	41,45 g	10,5 g	25,98 g
Restoran Karan	16.9.2020.	8	4	12	-	-	-
		106,63 mm	100,25 mm	103,44 mm			
		43,46 g	30,63 g	37,05 g			
Donja Perjašica	25.9.2020.	6	6	12	-	-	-
		117,84 mm	119,31 mm	118,58 mm			
		64,10 g	54,92 g	59,51 g			
Šćulac	30.9.2020.	7	6	13	-	-	-
		106 mm	113,5 mm	109,75 mm			
		40,9 g	43,85 g	42,38 g			
Ukupno		33	34	67	23	9	32

Rakovi su lovljeni pomoću vrša za lov rakova (LiNi vrše, Slika 3) koje su s mamcima (hrenovke) ostavljene preko noći u vodotoku (Pavić, 2018.). Nakon vađenja vrša iz vode, svaki je rak stavljen u zasebnu posudu sa svježom travom i tako transportiran do laboratorija. Po dolasku u laboratorij, rakovima je izvađena hemolimfa (Slika 4, Poglavlje 3.2) te tehničkom vagom izmjerena masa odnosno pomičnom mjerkom duljina tijela.



Slika 3. LiNi vrša za hvatanje rakova. (Foto: Bruno Doskočil)

3.2. Uzimanje hemolimfe

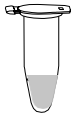
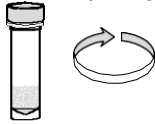
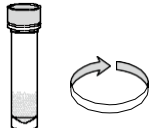
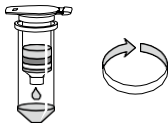
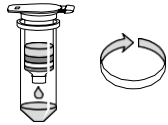
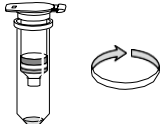
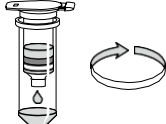
Svakom raku noga je obrisana 96%-tnim etanolom te je špricom volumena 1 mL s iglom uzet uzorak hemolimfe iz baze noge (Slika 4) te prenesen u mikroepruvetu volumena 2 mL. Hemolimfi je odmah dodan dvostruki volumen antikoagulansa (0,49 M natrijev klorid (NaCl), 30 mM trinatrijev citrat, 10 mM etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA) kako ne bi došlo do zgrušavanja, nakon čega je uzorak ostavljen u frižideru na 4 °C do centrifugiranja. Uzorci su centrifugirani 30 sekundi pri 10 000 x g i temperaturi 4 °C (centrifuga Centric 200R, Domel, Slovenija). Uklonjen je supernatant te zatim talog stanica smrznut u zamrzivaču na -20 °C do izolacije DNA.



Slika 4. Uzimanje hemolimfe. (Foto: Bruno Doskočil)

3.3. Izolacija DNA

DNA je iz hemolimfe rakova izolirana kompletom NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka), prateći standardni protokol uz nekoliko modifikacija. Kratki pregled protokola prikazan je na Slici 5. Izolati DNA pohranjeni su u zamrzivaču pri -20°C .

1. Priprema uzorka		< 40 mg taloga resuspendirati u 100 µL pufera za eluciju
2. Razbijanje stanica		premjestiti uzorak u tubicu s NucleoSpin kuglicama (engl. <i>beads</i>) dodati 40 µL pufera MG i 10 µL otopine proteinaze K <i>vorteksirati (Corning, Mexico, 230V), 30 min</i> centrifuga: 11 000 x g, 30 s
3. Prilagođavanje uvjeta za vezanje		dodati 600 µL pufera MG vorteksirati 3 s centrifuga: 11 000 x g, 30 s
4. Vezanje DNA		500-600 µL supernatanta prebaciti na NucleoSpin Microbial DNA kolonu centrifuga: 11 000 x g, 30 s
5. Ispiranje silica-membrane		1st 500 µL BW centrifuga: 11 000 x g, 30 s 2nd 500 µL B5 centrifuga: 11 000 x g, 30 s
6. Sušenje silica-membrane		centrifuga: 11 000 x g, 30 s
7. Eluiranje DNA		prebaciti kolonicu u epruvetu volumena 1,5 mL 100 µL pufera za eluciju inkubirati 1 min pri 21 °C centrifuga: 11 000 x g, 30 s <i>isprati kolonicu sa 100 µL eluata</i>

Slika 5. Protokol kompleta NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka) koji je korišten za izolaciju DNA iz hemolimfe rakova. Izmjene u odnosu na standardni protokol označene su plavom bojom.

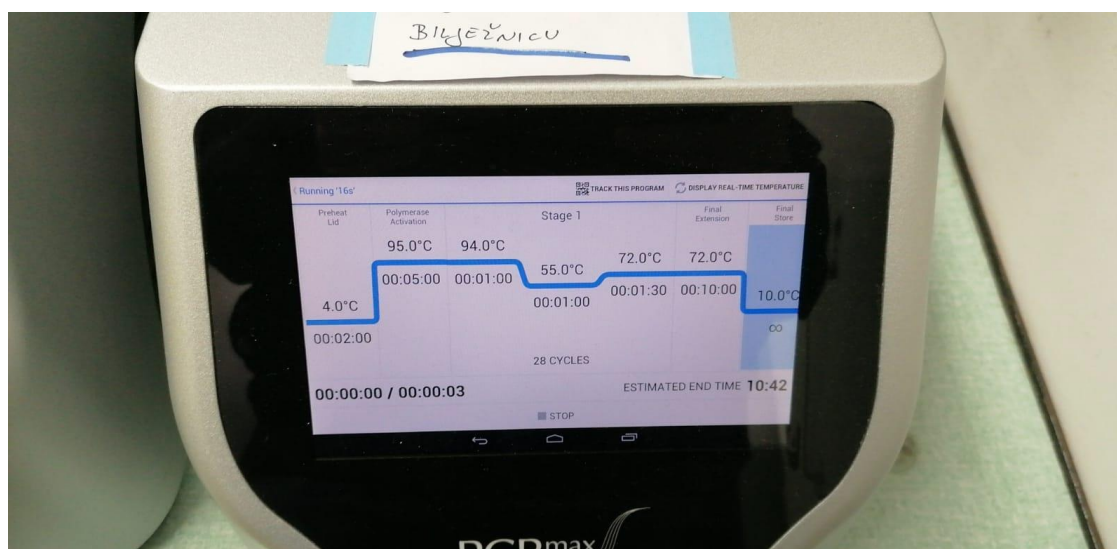
3.4. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda koja se koristi za amplifikaciju velikog broja kopija određenog fragmenta DNA. Sastoji se od tri koraka: denaturacija dvolančane DNA (odnosno razdvajanje komplementarnih lanaca), vezanje početnica (engl. *primer*) na komplementarne dijelove DNA kalupa te na kraju sinteza željenih segmenata DNA djelovanjem DNA-polimeraze (Ambriović i sur., 2007) (Slika 6).

Komponente smjese za PCR navedene su u Tablici 2. Korištene su uzvodna (engl. *forward*) početnica 27 F i nizvodna (engl. *reverse*) početnica 1492 R (Lane, 1991) koje umnažaju gotovo čitavu regiju gena koji kodira za bakterijsku 16S rRNA. PCR je proveden u uređaju Alpha Cyclor 1 (PCRmax, Ujedinjeno Kraljevstvo, Slika 6) provođenjem sljedećih koraka:

1. denaturacija DNA pri 95 °C kroz 5 min;
2. 28 ciklusa: 1 min pri 94 °C (denaturacija), 1 min pri 55 °C (sparivanje početnica), 1,5 min pri 72 °C (produljivanje lanaca);
3. završno produljivanje lanaca 10 min pri 72 °C.

Kao pozitivna kontrola korištena je genomska DNA bakterije *Streptomyces* sp., a kao negativna deionizirana voda. Uspješnost amplifikacije provjerena je gel-elektroforezom.



Slika 6. Prikaz programa PCR-uređaja (Foto: Bruno Doskočil)

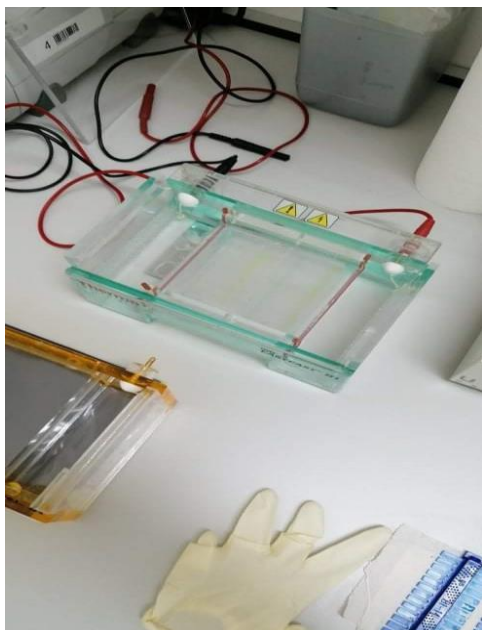
Tablica 2. Sastav smjese za PCR.

Smjesa za PCR	Količina (1X)
DNA-kalup (ukupna DNA izolirana iz hemolimfe)	1 - 4 μ L
2X EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara)	12,5 μ L
10 μ M uzvodna početnica 27 F	0,5 μ L
10 μ M nizvodna početnica 1492 R	0,5 μ L
Deionizirana voda	do ukupnog volumena 25 μ L

3.5. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza je metoda u kojoj se djelovanjem električnog polja razdvajaju fragmenti DNA u agaroznom gelu. Pokretljivost molekula DNA kroz gel ovisi o njihovoj dužini u parovima baza, masi i konformaciji molekule DNA, koncentraciji i tipu agaroze, jakosti napona te sastavu pufera za elektroforezu (Lee i sur., 2012). U ovom radu elektroforeza je korištena u svrhu određivanja kvalitete i koncentracije izolirane DNA iz hemolimfe te za vizualizaciju rezultata lančane reakcije polimerazom.

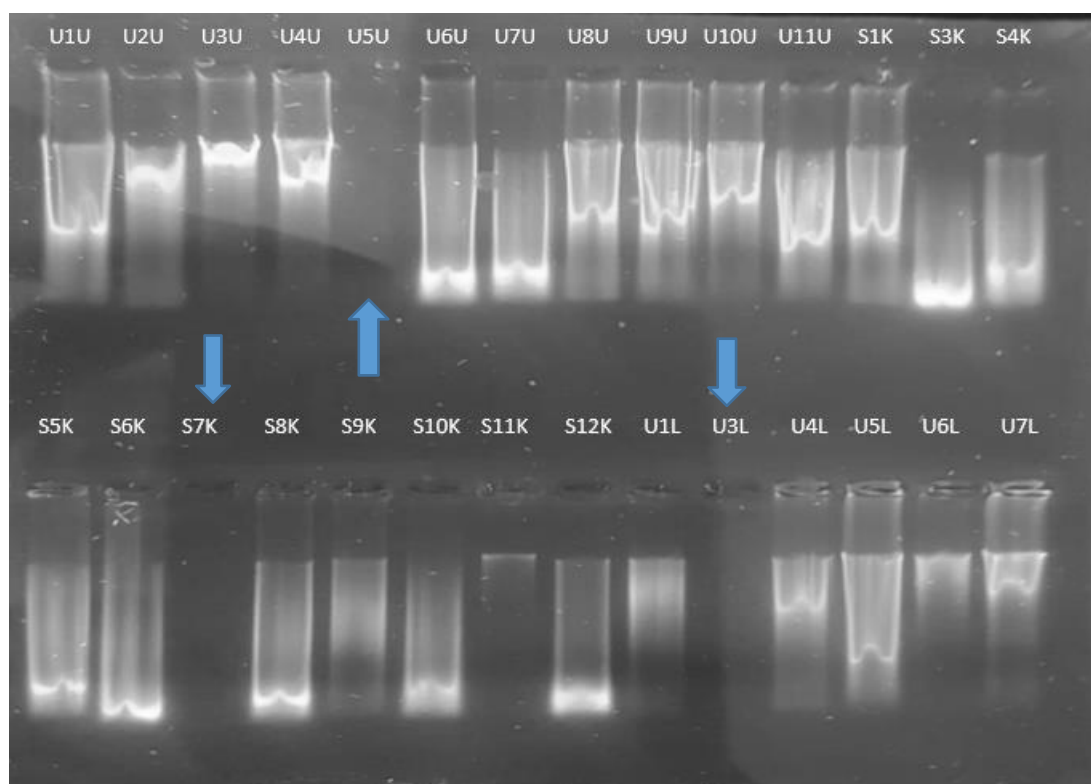
Gel (0,75 %) je pripremljen tako da je u 80 mL pufera 1xTAE (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1 mM EDTA) otopljeno 0,6 g agaroze. Nakon što se otopina agaroze ohladila na približno 60 °C dodano je 4 μ L boje za vizualizaciju DNA [GelStar™ NucleicAcid Gel Stain 10,000X (Lonza, Švicarska)] te je otopina ulivena u kadicu s češljicama kako bi se stvorile jažice dok se gel hladi. Za određivanje veličine fragmenata DNA prisutnih u uzorcima korištena je otopina fragmenata poznate veličine - molekularni biljeg Simply Load (Lonza, SAD) koji sadrži fragmente DNA u rasponu veličina od 100 parova baza (pb) do 12 kilobaza (kb). Prije nanošenja u jažice na gelu, uzorci su pomiješani s prikladnim volumenom boje za nanošenje (u omjeru 4 : 1). Sastav boje za nanošenje bio je 3 mL glicerola (30 %), 25 mg boje brom-fenol-plavo (0,25 %) te dH₂O do ukupnog volumena od 10 mL. Boja za nanošenje ima dvojaku funkciju: služi za povećanje gustoće uzoraka kako bi lakše pali na dno jažice (zahvaljujući dodatku glicerola) te za vizualizaciju migracije uzoraka kroz gel (zahvaljujući dodatku boje brom-fenol-plavo koja migrira brže od većine fragmenata DNA). Elektroforeza se provodila pri naponu od 100 V kroz 30 minuta koristeći aparaturu Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo scientific, SAD) (Slika 7).



Slika 7. Aparatura za elektroforezu u agaroznom gelu (Foto: Bruno Doskočil)

4. REZULTATI

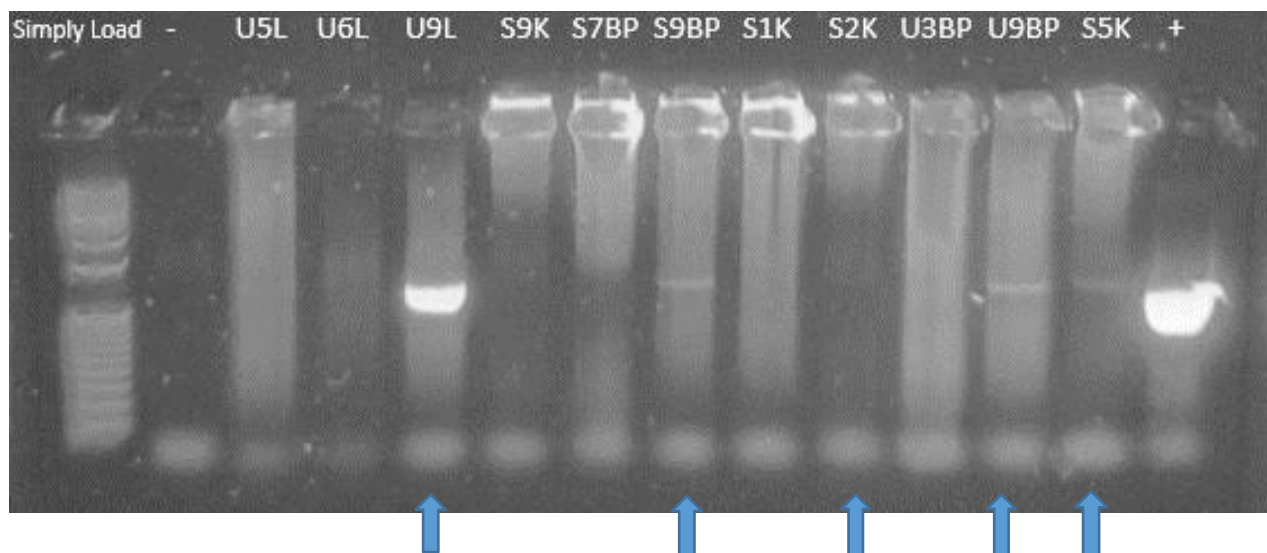
Uzorkovanje rakova vrste *Pontastacus leptodactylus* i *Pacifastacus leniusculus* provedeno je na sedam lokacija na rijeci Korani. Ukupno je ulovljeno 103 rakova, od čega 34 jedinke vrste *Pontastacus leptodactylus* (33 %) i 69 jedinki vrste *Pacifastacus leniusculus* (67 %) (Tablica 1). Nakon toga je svim rakovima uzorkovana hemolimfa i iz nje je izolirana ukupna DNA. Kvaliteta izolacije DNA provjerena je elektroforezom (Slika 8) te je utvrđeno da je izolacija DNA bila uspješna iz 88/103 uzoraka.



Slika 8. Primjer gel-elektroforeze metagenomske DNA izolirane iz hemolimfe rakova. Slovo prije broja označava vrstu raka, U - uskoškari rak (*Pontastacus leptodactylus*) i S - signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*), broj označava jedinku raka, a slovo nakon broja lokaciju: U - ušće, K - Restoran Karan, L - Logorište. Na gel je nanoseno 8 μ L uzoraka DNA. Strelicom su označeni uzorci kod kojih izolacija DNA nije bila uspješna.

Bakterije su uz pomoć PCR-testa detektirane u 24 od ukupno 88 uzoraka DNA iz hemolimfe (27 %) (Slika 9). Pregled rezultata detekcije bakterija u hemolimfi rakova lančanom reakcijom polimerazom dan je u Tablici 3, dok se detaljan popis svih jedinki i rezultata detekcije bakterija PCR-om nalazi u Prilogu 1. Rezultati detekcije bakterija ovisili su i o vrsti raka i o lokaciji. Vrste

Pacifastacus leniusculus imala je općenito manje PCR-pozitivnih uzoraka (prosječno 15,7 %, od 8 do 45 %, s 0 % na lokaciji Korana ušće), a vrsta *Pontastacus leptodactylus* više (prosječno 45 %, od 38 do 50 %). Što se tiče utjecaja lokacije, u obje vrste raka najveći udio PCR-pozitivnih jedinki utvrđen je na Belajskim Poljicama: 50 % u vrsti *Pontastacus leptodactylus* i 45 % u vrsti *Pacifastacus leniusculus*.



Slika 9. Primjer rezultata PCR-testa za detekciju bakterija u hemolimfi rakova. Slovo prije broja označava vrstu raka, U - uskoškari rak (*Pontastacus leptodactylus*) i S - signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*), broj označava jedinku raka, a slova nakon broja lokaciju: L - Logorište, BP – Belajske Poljice i K – Restoran Karan. Oznaka minus (–) označava negativnu kontrolu u kojoj je korištena deionizirana voda, a oznaka plus (+) označava pozitivnu kontrolu u kojoj je korištena genomska DNA aktinobakterije *Streptomyces* sp.. Na gel je nanoseno po 5 µL PCR-produkata. Strelicom su označeni uzorci hemolimfe u kojima je detektirana bakterijska DNA.

Tablica 3. Detekcija bakterija u hemolimfi rakova lančanom reakcijom polimerazom prema lokaciji i vrsti raka.

Vrsta raka	<i>Pontastacus leptodactylus</i>			<i>Pacifastacus leniusculus</i>		
Lokacija	Ukupno rakova	PCR-pozitivnih	% pozitivnih	Ukupno rakova	PCR-pozitivnih	% pozitivnih
Donja Perjašica	0	-	-	9	1	11
Šćulac	0	-	-	12	1	08
Karan	0	-	-	10	2	20
Belajske Poljice	6	3	50	11	5	45
Korana logorište	8	3	38	10	1	10
Korana ušće	17	8	47	5	0	00
UKUPNO	31	14	Prosječan postotak za vrstu: 45%	57	10	Prosječan postotak za vrstu: 15,7%

5. RASPRAVA

Mikrobne zajednice hemolimfe rakova vrlo su slabo istražene (Ooi i sur., 2019) te su u ovom istraživanju po prvi puta detektirane bakterije u hemolimfi uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus* i signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* lančanom reakcijom polimerazom.

Broj uhvaćenih jedinki zavičajnog uskoškarog raka (34) u ovom radu bio je značajno manji od broja jedinki invazivnog signalnog raka (69), te zavičajna vrsta uopće nije ulovljena na čak tri lokacije, a to su Šćulac, Donja Perjašica i Restoran Karan. Ovo je u skladu s literaturnim podacima o brzom širenju signalnog raka u rijeci Korani te potiskivanju native vrste različitim mehanizmima (Hudina i sur., 2013; Hudina i sur., 2017; Dragičević i sur., 2020). Invazivni signalni rak, *Pacifastacus leniusculus*, je prvi puta u rijeci Korani zabilježen 2011., nakon što je ilegalno unesen. Distribucija signalnih rakova u rijeci Korani tada je bila lokalizirana unutar 10 km donjeg toka rijeke, gdje je vrsta koegzistirala sa zavičajnom vrstom *Pontastacus leptodactylus* na uzvodnim i nizvodnim frontama invazije (Hudina i sur., 2013). Vrsta se širi uzvodno i nizvodno, te se od 2012. godine distribucija signalnih rakova u Korani povećala 20 puta i trenutno (prema podacima iz 2018. godine) pokriva 22,4 % cijelog vodotoka (Dragičević i sur., 2020). Brže se širi u uzvodnom smjeru, potencijalno zbog razlike u kompeticiji s populacijom zavičajnog uskoškarog raka, *Pontastacus leptodactylus*, čija je brojnost šest puta veća na nizvodnoj nego na uzvodnoj invazivnoj fronti (Dragičević i sur., 2020). Uspoređujući rezultate dobivene u ovom radu (uzorkovanje u jesen 2020.) s podacima iz ranije publikacije Dragičević i suradnika (2020) gdje se uzorkovanje provodilo 2018., pokazalo se kako se u dvije godine na lokaciji Korana ušće pojavio signalni rak, kojeg 2018. nije bilo. Na lokacijama Logorište i Belajske Poljice broj signalnih rakova nadmašio je broj uskoškarih (za razliku od 2018. godine gdje je situacija bila obratna), dok na preostalim lokacijama zavičajne vrste u 2020. godini nisu zabilježene (2018. je zabilježen još na lokaciji Donja Perjašica). Stoga rezultati ovog istraživanja potvrđuju ranije opaženi trend širenja signalnog raka u rijeci Korani (Hudina i sur., 2013; Hudina i sur., 2017; Dragičević i sur., 2020).

Detekciji bakterija PCR-om prethodila je izolacija DNA iz hemolimfe rakova. Izolacija DNA iz nekih rakova (14,56%) nije bila uspješna jer nije bilo moguće sakupiti dovoljno hemolimfe ili nije dovoljan brzo dodan antikoagulans. DNA je iz preostalih uzoraka uspješno izolirana, ali uz pojavu tzv. razmaza (engl. *smear*) koji je opažen tijekom analize uzoraka elektroforezom u agaroznom gelu. Pojava razmaza se odnosi na DNA koja se usitnjava u sve manje fragmente i zato razvlači po gelu u smjeru migracije. Može se pretpostaviti da razmaz sadrži većinom fragmentiranu DNA raka. S obzirom da je hemolimfa uzorak koji dominantno sadrži stanice

raka (hemociti), a udio bakterijske biomase je mnogo manji, može se također pretpostaviti da izolirana metagenomska DNA sadrži dominantno genomsku DNA raka te, u manjoj mjeri, mikrobnu DNA. Nadalje, pri izolaciji DNA iz uzoraka korišten je Microbial DNA komplet, odabran jer je namijenjen izolaciji mikrobne DNA. Stoga je, s obzirom da mikrobne stanice imaju staničnu stijenku, prvi korak protokola mehaničko razbijanje stanica s NucleoSpin kuglicama. Pri tome se može pretpostaviti da su se stanice hemolimfe raka pretjerano lizirale te je došlo do razgradnje prvenstveno račje DNA, dok je nerazgrađena genomska DNA većinom mikrobnog porijekla.

Lančana reakcija polimerazom je relativno jednostavna i široko korištena molekularno-biološka tehnika za otkrivanje i amplifikaciju sljedova DNA i RNA te je u ovom istraživanju korištena za detekciju bakterijske DNA u hemolimfi rakova. Sličan je pristup korišten i u nekim drugim istraživanjima. Primjerice, amplifikacija ukupne bakterijske DNA PCR-om korištena je i u kliničkim uzorcima kako bi se, nakon neuspješne kultivacije patogena, potvrdilo da li je uzorak zaista sterilan, ili ipak sadrži bakterije (Leo i sur., 2014). Osim toga, ukoliko se dizajniraju specifične početnice kojima se amplificira samo DNA određene ciljne vrste, PCR se može koristiti i za detekciju određenih vrsta u uzorku. Tako je primjerice razvijena metoda specifične PCR-detekcije uzročnika račje kuge *Aphanomyces astaci* u suspektnim uzorcima tkiva rakova (Oidtmann i sur., 2006). Prednost ovog pristupa je niska cijena i neovisnost o skupoj laboratorijskoj opremi te je zato PCR korišten i u ovom radu. Mana ovog pristupa je što je dobiveni rezultat kvalitativan odnosno govori nam da li je ciljna sekvenca u uzorku prisutna ili nije. U usporedbi s tim, kvantitativni PCR (engl. *quantitative PCR*, qPCR) je metoda koja se koristi za otkrivanje, karakterizaciju i kvantificiranje nukleinskih kiselina. Na primjeru detekcije patogena *A. astaci*, qPCR-testom je moguće odrediti koliko je patogena prisutno u uzorku tkiva raka, od razine A0 do razine A7 (Vralstad i sur., 2009), te je pokazano da je ovaj način detekcije značajno osjetljiviji od PCR-detekcije (Tuffs i Oidtmann, 2011). Stoga se može pretpostaviti kako su PCR-om u ovom istraživanju detektirane one jedinke koje imaju najveću količinu bakterija u hemolimfi, dok su ostale jedinke sadržavale manju količinu bakterijske DNA koja se nije mogla detektirati PCR-om, ali bi se mogla utvrditi drugim tehnikama, poput qPCR-a. Ipak, rezultati upućuju na varijabilnu količinu bakterijske DNA u hemolimfi različitih jedinki raka koja bi mogla biti uzrokovana razlikama u zdravstvenom/imunosnom statusu jedinke. Stoga bi se u nastavku istraživanja qPCR-om trebao utvrditi ukupni broj bakterija u hemolimfi te istražiti kako se on mijenja ovisno o vrsti raka i lokaciji (odnosno uvjetima u okolišu) te ovisno o zdravstvenom stanju raka.

Rezultati ovog rada biti će temelj za nastavak istraživanja u kojem će se bakterijske zajednice hemolimfe rakova analizirati sekvenciranjem fragmenta gena koji kodira 16S *rRNA*. Na taj će se način analizirati sastav bakterijskih zajednica hemolimfe ove dvije vrste raka te će se po prvi put utvrditi kako se on mijenja ovisno o vrsti raka (zavičajna/invazivna) i lokaciji (odnosno uvjetima u okolišu).

6. ZAKLJUČAK

U ovom su radu po prvi puta detektirane bakterije u hemolimfi uskoškaro raka *Pontastacus leptodactylus* (zavičajna vrsta) i signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* (invazivna vrsta) lančanom reakcijom polimerazom.

Na temelju dobivenih rezultata dobiveni su sljedeći zaključci:

- izolacija DNA bila je uspješna u 88 od 103 uzorka,
- bakterije su uz pomoć PCR-testa detektirane u 24 od ukupno 88 uzoraka DNA iz hemolimfe (27 %),
- rezultati detekcije bakterija ovisili su i o vrsti raka i o lokaciji,
- prosječan postotak uzoraka hemolimfe u kojima su PCR-om detektirane bakterije bio je 45 % za vrstu *Pontastacus leptodactylus* (zavičajna vrsta) i 15,7 % za vrstu *Pacifastacus leniusculus* (invazivna vrsta),
- najveći broj pozitivnih uzoraka obje vrste bio je s lokacije Belajske Poljice.

7. LITERATURA

- Ambas I., Buller N., Fotadar R. (2015) Isolation and screening of probiotic candidates from marron, *Cherax cainii* (Austin, 2002) gastrointestinal tract (GIT) and commercial probiotic products for the use in marron culture. *Journal of Fish Diseases* **38**: 467-476.
- Amborski R.L., Amborski G.F. (1974) Opportunistic pathogens and a bacterial disease of the Louisiana crayfish, *Procambarus clarkii*. U: *Proceedings of the Second Biennial Crustacean Health Workshop*, D.H. Lewis and J.K. Leong, ur., Texas A&M University Sea Grant College Program. str. 92-114.
- Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007) Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Aydin H., Kokko H., Makkonen J., Kortet R., Kukkonen H., Jussila J. (2014) The signal crayfish is vulnerable to both the As and the PsI-isolates of the crayfish plague. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**:03.
- Bang, F. B. (1970) Disease mechanisms in crustacean and marine arthropods. U: *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*, 5.izd., Sniezsko S.F., ur., American Fisheries Society. str. 383-404.
- Becking T., Mrugala A., Delaunay C., Svoboda J., Raimond M., Viljamaa-Dirks S., Petrusek A., Grandjean F., Braquart-Varnier C. (2015) Effect of experimental exposure to differently virulent *Aphanomyces astaci* strains on the immune response of the noble crayfish *Astacus astacus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**: 115-124.
- Bi K., Huang H., G, W., Wang J., Wang W. (2008) Phylogenetic analysis of Spiroplasmas from three freshwater crustaceans (*Eriocheir sinensis*, *Procambarus clarkia* and *Penaeus vannamei*) in China. *Journal of Invertebrate Pathology* **99(1)**: 57–65.
- Cornick J.W., Stewart J.E. (1966) Microorganisms isolated from the hemolymph of the lobster (*Homarus americanus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **23**:1451-1454.
- Čolak S. (2011) Biokemijski profil hemolimfe triju vrsta dekapodnih rakova. Disertacija. Agronomski fakultet, Zagreb.
- Davidson E. W., Snyder J., Lightner D., Ruthig G., Lucas J., Gilley J. (2010) Exploration of potential microbial control agents for the invasive crayfishm *Orconectesvirilis*. *Biocontrol Science and Technology* **20(3)**: 297–310.

- De Grave S., Pentcheff N.D., Ah Yong S.T., Chan T.-Y., Crandall K.A., Dworschak P.C., Felder D.L., Feldmann R.M., Fransen C.H.J.M., Goulding L.Y.D., Lemaitre R., Low M.E.Y., Martin J.W., Ng P.K.L., Schweitzer C.E., Tan S.H., Tshudy D., Wetzer R. (2009) A classification of Recent and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* **21**: 1-109.
- Dragičević P., Faller M., Kutleša P., Hudina S. (2020) Update on the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: a 10-year report. *BioInvasions Records* **9**: 793-807.
- Dragičević P., Bielen A., Petrić I., Vuk M., Žučko J., Hudina S. (2021) Microbiome of the successful freshwater invader, the signal crayfish, and its changes along the invasion range. *Microbiology Spectrum* (u procesu objavljivanja).
- Federhen S. (2012) The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research* **40**: 136-143.
- Galib S.M., Findlay J.S., Lucas M.C. (2020) Strong impacts of signal crayfish invasion on upland stream fish and invertebrate communities. *Freshwater Biology* **66(2)**: 223-240.
- Handelsman J. (2004) Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68(4)**: 669-685.
- Haskell S.T., Sizemore R.K., Colwell R.R. (1975) Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: most probable numbers. *Applied Microbiology* **29**: 388-392.
- Holdich D. M. (2002) Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin francais de la peche et de la pisciculture* **367**: 611-650.
- Holdich D. M., Reynolds J. D., Souty-Grosset C., Sibley P. J. (2009) A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **11**: 394-395.
- Hudina S, Faller M, Lucić A, Klobučar G, Maguire I (2009) Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava river basin, Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **394-395**: 1-11.
- Hudina S., Žganec K., Lucić A., Trgovčić K., Maguire I. (2013) Recent invasion of the karstic river system in Croatia through illegal introductions of the signal crayfish. *Freshwater Crayfish* **19(1)**: 21-27.
- Hudina S., Kutleša P., Trgovčević K., Duplić A. (2017) Dynamics of range expansion of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region in Croatia. *Aquatic Invasions* **12**: 67-75.

- Jiravanichpaisal P., Roos S., Edsman L., Liu H., Söderhäll K. (2009) A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Invertebrate Pathology **101(1)**: 56–66.
- Johnson P.T. (1976) Bacterial infection in the blue crab, *Callinectes sapidus*: course of infection and histopathology. Journal of Invertebrate Pathology **28**: 25–36.
- Kolarić P. (2016) Morfološke značajke invazivne vrste signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) u rijekama Muri i Korani. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Kouba A., Petrusek A., Kozák, P. (2014) Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems (**413**): 05.
- Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. U: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, Stackebrandt E., Goodfellow M., ur., John Wiley and Sons, str. 115-175.
- Lee J.S., Pfeifer D.K. (1975) Microbiological characteristics of dungeness crab (*Cancer magister*). Applied Microbiology **30**: 72–78.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Journal of Visualized Experiments **62**.
- Lleo M. M., Ghidini V., Tafi M. C., Castellani F., Trento I., Boaretti M. (2014) Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. FEMS Microbiology Letters **354(2)**: 153–160.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000) 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. http://www.issg.org/pdf/publications/worst_100/english_100_worst.pdf . <pristupljeno 20.6.2021.>.
- Maguire I., Gottstein-Matočec S. (2004) The Distribution Pattern of Freshwater Crayfish in Croatia. Crustaceana **77**: 25-47.
- Maguire I., Klobučar G., Marčić Z., Zanella D. (2008) The first record of *Pacifastacus leniusculus* in Croatia. Crustaceana **77**: 25-49.
- Maguire I., Jelić M., Klobučar G. (2011) Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems **401**: 31.

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

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

Maynard, D. M.(1960) Circulation and heart function. U: Waterman, T.H. (ur.) *The Physiology of Crustacea*, Academic Press, str. 161-226.

McDonald D., Price M. N., Goodrich J., Nawrocki E. P., Desantis T. Z., Probst A., Andersen G.L., Knight R., Hugenholtz P. (2012) An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal* **6**: 610–618.

Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. <https://mingor.gov.hr/>. < pristupljeno 24.5.2021.>.

Mužić M. (2013) Analiza kariotipa slatkovodnih rakova *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Nguyen T. T. T., Foysal J., Fotedar R., Gupta S.K. (2021) The Effect of Two Dietary Protein Sources on Water Quality and the Aquatic Microbial Communities in Marron (*Cherax cainii*) Culture. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01681-3> . < prisutpljeno 20.6.2021.>.

Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A. (2006) Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* **72(1)**:53-64.

Ooi M.C., Goulden E.F., Smith G.G., Bridle A.R. (2019) Haemolymph microbiome of the cultured spiny lobster *Panulirus ornatus* at different temperatures. *Scientific Reports* **9**: 1677.

Orlić K., Šver L., Burić L., Kazazić S., Grbin D., Maguire I., Pavić D., Hrašćan R., Vladušić T., Hudina S., Bielen, A. (2020) Cuticle-associated bacteria can inhibit crayfish pathogen *Aphanomyces astaci*. Opening the perspective of biocontrol in astaciculture. *Aquaculture* **533**.

Paracer S., Ahmadjian V. (2000) *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations* 2nd Edition, Oxford University Press, Oxford.

Pârvulescu L., Pacioglu O., Hamchevici C. (2011) The assessment of the habitat and water quality requirements of the stonecrayfish (*Austropotamobius torrentium*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) species in the rivers from the Anina Mountains (SW Romania). Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems **401**: 03.

Pavić D. (2018) Praćenje stanja bolesti račje kuge u Nacionalnom parku Plitvička jezera. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Popović N. T., Kazazić S. P., Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R. (2017) Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. Environmental Research **152**: 7–16.

Ross B. D., Verster A. J., Radey M. C., Schmidtke D. T., Pope C. E., Hoffman L. R., Hajjar A.M., Peterson S.B., Borenstein E., Mougous J. D. (2019) Human gut bacteria contain acquired interbacterial defence systems. Nature **575**: 224–228.

Sagner F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74(12)**: 5463-5467.

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

Sandström A., Andersson M., Asp A., Bohman P., Edsman L., Engdahl F., Nyström P., Stenberg M., Hertonsson P., Vralstad T., Granéli W. (2014) Population collapses in introduced non-indigenous crayfish. Biological Invasions **16(9)**: 1961-1977.

Scott J. R., Thune R. L. (1986) Bacterial flora of hemolymph from red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard), from commercial ponds. Aquaculture **58**: 161–165.

Slatko B. E., Gardner A. F., Ausubel F. M. (2018) Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. Current Protocols in Molecular Biology **122(1)**: e59.

Šargač Z. (2015) Utjecaj alohtonih deseteronožnih vrsta rakova na slatkovodne ekosustave u Hrvatskoj s posebnim osvrtom na mramornog raka (*Procambarus fallax f. virginalis*). Završni rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Topić Popović N., Sauerborn Klobučar R., Maguire I., Strunjak-Perov, I., Kazazić, S., Barišić J., Jadan M., Klobučar G., Čož-Rakovac R. (2014) High-throughput discrimination of bacteria isolated from *Astacus astacus* and *A. leptodactylus*. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems **(413)**: 04.

Turrone F., Ribbera A., Foroni E., van Sinderen D., Ventura M. (2008) Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek* **94(1)**: 35–50.

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

Wang X.W., Wang J.X. (2015) Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Molecular Immunology* **68(2)**: 404-411.

Yarza P., Yilmaz P., Priesse E., Glöckner F. O., Ludwig W., Schleifer K.-H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* **12(9)**: 635–645.

Yuan S., Cohen D. B., Ravel J., Abdo Z., Forney L. J. (2012) Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome. *PLoS ONE* **7(3)**: e33865.

Zhang Y., Li Z., Kholodkevich S., Sharov A., Chen C., Feng Y., Ren N., Sun, K. (2019) Effects of cadmium on intestinal histology and microbiota in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). *Chemosphere* **242**.

Zhang Y., Sun K., Li Z., Chai X., Fu X., Kholodkevich S., Kuznetsova T., Chen C., Ren N. (2021) Effects of acute diclofenac exposure on intestinal histology, antioxidant defense, and microbiota in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). *Chemosphere* **263**.

8. PRILOG

Prilog 1. Tablica s popisom rakova i rezultatima detekcije bakterija u hemolimfi PCR-om. POL - *Pontastacus leptodactylus*, PAL - *Pacifastacus leniusculus*; Oznake: + (izolacija ili PCR uspješan), – (izolacija ili PCR neuspješan).

oznaka	Datum uzorkovanja	Lokacija uzorkovanja	vrsta	spol	Izolacija DNA (hemolimfa)	PCR
U1U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U2U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U3U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	+
U4U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U5U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	-	-
U6U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U7U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U8U	14.9.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	+
U9U	14.9.2020.	Ušće (Korana)	POL	F	+	+
U10U*	14.9.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	+
U11U*	14.9.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U12U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U13U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	+
U14U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	F	+	+
U15U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	F	+	+
U16U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U17U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	M	+	-
U18U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	POL	F	+	+
U1 L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	POL	F	+	-
U2L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	POL	F	Nema hemolimfe	-
U3L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	-	-
U4L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	+	-
U5L	14.9.2020.	Logorište (Korana)	POL	F	+	-
U6L	14.9.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	+	-
U7L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	+	+
U8L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	-	+
U9L	10.10.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	+	+
U10L	10.10.2020.	Logorište (Korana)	POL	M	+	-
U1BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	POL	M	+	-
U2BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	POL	M	+	+
U3BP	21.10.2020	Belajske poljice (Korana)	POL	M	+	-
U4BP	23.10.2020	Belajske poljice (Korana)	POL	F	+	+
U7BP	23.10.2020	Belajske poljice (Korana)	POL	M	+	-
U9BP	23.10.2020	Belajske poljice (Korana)	POL	F	+	+
S1U	11.09.2020.	Ušće (Korana)	PAL	M	+	-

S2U*	14.9.2020.	Ušće (Korana)	PAL	F	+	-
S3U*	14.9.2020.	Ušće (Korana)	PAL	F	Nema hemolimfe	-
S4U*	14.9.2020.	Ušće (Korana)	PAL	M	+	-
S5U	10.10.2020.	Ušće (Korana)	PAL	M	+	-
S6U	21.10.2020.	Ušće (Korana)	PAL	M	+	-
S1L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	Nema hemolimfe	-
S2L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+/-	-
S3L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	Nema hemolimfe	-
S4L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	PAL	M	-	+
S5L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	-	-
S6L	11.09.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	Nema hemolimfe	-
S7L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+	-
S8L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+	-
S9L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+	-
S10L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+	-
S11L*	14.9.2020.	Logorište (Korana)	PAL	M	+	-
S12L	10.10.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+	-
S13L	10.10.2020.	Logorište (Korana)	PAL	F	+	-
S14L	10.10.2020.	Logorište (Korana)	PAL	M	+	-
S1K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+	-
S2K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	Nema hemolimfe	+
S3K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	F	+	-
S4K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+	-
S5K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	F	+	+
S6K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+	-
S7K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	F	-	-
S8K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+	-
S9K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+	-
S10K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	F	+	-
S11K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+/-	-
S12K	16.9.2020.	Restoran Karan (Korana)	PAL	M	+	-
S1DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	M	+	-
S2DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	M	+	-
S3DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	M	+	-
S4DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	F	+	-
S5DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	M	+	-

S6DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	F	-	-
S7DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	F	-	-
S8DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	M	+	-
S9DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	M	+	-
S10DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	F	+	-
S11DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	F	+	-
S12DP	25.9.2020.	Donja Perjasica (Korana)	PAL	F	+	+
SŠ1	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	-
SŠ2	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	F	-	-
SŠ3	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	F	+/-	-
SŠ4	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	-
SŠ5	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	F	+	-
SŠ6	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	-
SŠ7	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	+
SŠ8	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	F	+	-
SŠ9	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	-
SŠ10	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	-
SŠ11	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	F	+	-
SŠ12	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	F	+	-
SŠ13	30.9.2020.	Šćulac (Korana)	PAL	M	+	-
S1BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	+
S2BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	-
S3BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	M	+	+
S4BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	-
S5BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	+
S6BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	+
S7BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	-
S8BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	M	+	-
S9BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	M	+	+
S11BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	F	+	-
S12BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	M	+	-
S13BP	10.10.2020.	Belajske poljice (Korana)	PAL	M	-	-

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima/ osim onih koji su u njemu navedeni.

Bruno Đoković | _____

ime i prezime studenta