

# Bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* kao inhibitori rasta micelija slatkovodnih patogenih mikroorganizama iz skupine Oomycota

---

Majerčak-Škorlić, Matilda

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:413069>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



# **PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ**

**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Matilda Majerčak-Škorlić**  
0058219739

**Bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* kao inhibitori  
rasta micelija slatkovodnih patogenih mikroorganizama iz  
skupine Oomycota**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc, UIP-2017-05-6267)

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

Zagreb, godina 2023.  
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* kao inhibitori rasta micelija slatkovodnih patogenih mikroorganizama iz skupine Oomycota**  
**Matilda Majerčak-Škorlić, 0058219739**

**Sažetak:**

Patogeni mikroorganizmi *Aphanomyces astaci* i *Saprolegnia parasitica* uzrokuju gubitke u slatkovodnoj akvakulturi rakova i riba te je potrebno razviti ekološki prihvatljive metode njihove kontrole. Cilj ovog rada bio je istražiti inhibicijski potencijal 25 izolata roda *Pseudomonas* prema rastu micelija ovih patogena. Najprije je filogenetskom analizom gena koji kodira za 16S rRNA izvršena identifikacija izolata, i to 7/25 izolata (28 %) do vrste, 4/25 izolata (16 %) do podgrupe te 11/25 (44 %) do grupe unutar roda *Pseudomonas*. Nadalje, *in vitro* testovima inhibicije je utvrđeno da je čak 44 % izolata snažno inhibiralo rast micelija *A. astaci* te su se najjačima istaknuli izolati grupe *fluorescens*. Inhibicija patogena *S. parasitica* bila je znatno slabija, ali ipak primjetna kod nekih izolata iz grupa *fluorescens* i *lutea*. Zaključno, rezultati ovog rada ukazuju na moguću primjenu bakterija iz roda *Pseudomonas* u svrhu biokontrole patogena *A. astaci* i *S. parasitica* u akvakulturi.

**Ključne riječi:** akvakultura, biokontrola, 16S rRNA, testovi inhibicije, filogenetsko stablo

**Rad sadrži:** 32 stranice, 10 slika, 4 tablice, 50 literaturnih navoda

**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

**Datum obrane:** 15. lipnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

**Bacterial isolates from the genus *Pseudomonas* as inhibitors of mycelial growth of freshwater oomycete pathogens**

**Matilda Majerčak-Škorlić, 0058219739**

### Abstract:

The pathogenic microorganisms *Aphanomyces astaci* and *Saprolegnia parasitica* cause losses in freshwater aquaculture and it is necessary to develop environmentally acceptable methods of their control. The aim of this study was to investigate the inhibitory potential of 25 isolates of the genus *Pseudomonas* against their mycelial growth. First, the phylogenetic analysis of the gene that encodes 16S rRNA was applied to identify the isolates, namely 7/25 isolates (28%) were classified to the species level, 4/25 isolates (16%) to the subgroup, and 11/25 (44%) to the group within the genus *Pseudomonas*. Furthermore, *in vitro* inhibition tests showed that 44% of the isolates strongly inhibited the growth of *A. astaci* mycelia, mostly the isolates from the *fluorescens* group. Inhibition of the pathogen *S. parasitica* was significantly weaker but still noticeable for some isolates from the *fluorescens* and *lutea* groups. In conclusion, the results of this work indicate the possible use of bacteria of the genus *Pseudomonas* for *A. astaci* and *S. parasitica* biocontrol in aquaculture.

**Keywords:** aquaculture, biocontrol, 16S rRNA, inhibition tests, phylogenetic tree

**Thesis contains:** 32 pages, 10 figures, 4 tables, 50 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ana Bielen, PhD, Associate professor

**Thesis defended:** June 15, 2023

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Vodene plijesni (Oomycota) kao uzročnici bolesti slatkovodnih životinja .....	2
2.2. Kemijska sredstva za kontrolu bolesti uzrokovanih vodenim plijesnima u akvakul- turi.....	5
2.3. Biokontrola kao ekološki prihvatljiv način kontrole bolesti uzgojno važnih vrsta biljaka i životinja.....	6
2.3.1. Biokontrola u akvakulturi .....	7
2.4. Bakterijski inhibitori patogenih vodenih plijesni.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	10
3.1. Korišteni mikroorganizmi .....	10
3.2. Umnažanje fragmenta gena koji kodira za <i>16S</i> rRNA lančanom reakcijom polime- razom.....	11
3.3. Elektroforeza.....	13
3.4. Sekvenciranje .....	15
3.5. Izrada filogenetskog stabla i molekularna identifikacija izolata.....	15
3.6. Testovi inhibicije rasta micelija patogena <i>A. astaci</i> i <i>S. parasitica</i> .....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
4.1. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata .....	17
4.2. Selekcija bakterijskih izolata koji mogu inhibirati rast patogena <i>A. astaci</i> i <i>S. para- sitica</i> .....	21
5. ZAKLJUČCI.....	24
6. POPIS LITERATURE .....	25

## 1. UVOD

Patogene vodene plijesni (Oomycota) prepoznate su kao rastuća globalna prijetnja nizu životinjskih i biljnih vrsta (Derevnina i sur., 2016). U slatkovodnim ekosustavima, uključujući akvakulturu, njihovi su štetni učinci značajni, ali nedovoljno istraženi. Uzročnik račje kuge, *Aphanomyces astaci*, uvršten je među 100 svjetskih najgorih invazivnih stranih vrsta zbog brzog širenja i štetnog utjecaja na zavičajne europske populacije rakova (Holdich i sur., 2009). Još jedna vrsta vodenih plijesni sa značajnim negativnim učinkom u slatkim vodama je *Saprolegnia parasitica* koja uzrokuje saprolegniozu kod svih razvojnih stadija salmonidnih riba i drugih akvatičkih životinja. Ova bolest predstavlja veliki problem u salmonidnoj akvakulturi diljem svijeta. Vrste iz roda *Saprolegnia* u prosjeku su uzrok 10 % ukupnih ekonomskih gubitaka u slatkovodnoj akvakulturi, a ponekad i do 50 % (Torto-Alalibo i sur., 2005).

Unatoč brojnim znanstvenim istraživanjima u svrhu pronalaska učinkovite metode za kontrolu bolesti uzrokovanih vodenim plijesnima, trenutačno ne postoje odgovarajuće i održive mjere njihove kontrole (Souty-Grosset i Reynolds, 2009). Neke od učinkovitih metoda kontrole su zabranjene (poput malahitnog zelenila koje ima dokazano kancerogeno i teratogeno djelovanje), a za neke se, poput formaldehida, pretpostavlja da će uskoro biti zabranjene zbog toksičnosti za ljude i okoliš (Caruana i sur., 2012). Stoga su potrebna istraživanja s ciljem razvoja novih, ekološki prihvatljivih metoda kontrole.

Iako u akvakulturi i dalje prevladava primjena kemijskih metoda (Pedersen i sur., 2010) primjena bakterija u svrhu biološke kontrole bolesti sve se više prepoznaje kao održiva alternativa (Wagner i sur., 2018; Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011; Lategan i sur., 2006). Rezultati nedavno provedenog istraživanja na ovu temu pokazali su da su mnogi bakterijski izolati s kutikule signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* i uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus* snažno inhibirali rast micelija *A. astaci* te je više od polovice identificiranih inhibitora pripadalo rodu *Pseudomonas* (Orlić i sur., 2021). Stoga je cilj ovog rada bio proširiti ranije spoznaje te analizirati sposobnost bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* izoliranih iz različitih tkiva i organa zdravih riba i rakova da inhibiraju rast micelija patogena *A. astaci* i *S. parasitica*.

## 2. TEORIJSKI DIO

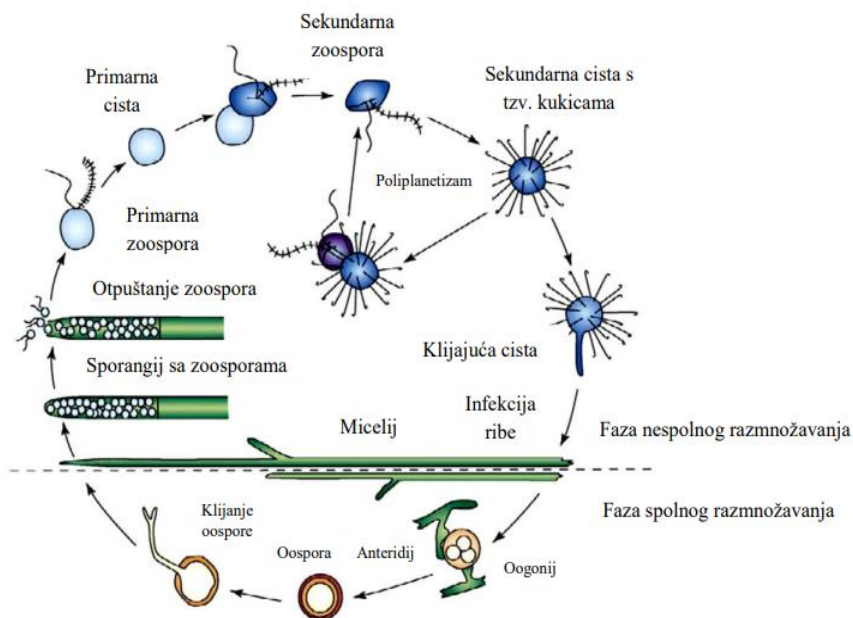
### 2.1. Vodene plijesni (Oomycota) kao uzročnici bolesti slatkovodnih životinja

Vodene plijesni (Oomycota) su mikroorganizmi iz skupine Pseudofungi u koje spadaju mnogi saprofiti i paraziti. Svrstani su u 12 redova među kojima su najvažniji Saprolegniales koji uključuje mnoge parazite životinja (uključujući patogene *Aphanomyces astaci* i *Saprolegnia parasitica*) te Peronosporales sa mnogim uzročnicima bolesti biljaka (Sekimoto i sur., 2012). Zbog filamentoznog rasta, prehrane apsorcijom i razmnožavanja putem spora, vodene plijesni su dugo smatrane nižim gljivama. Međutim, rastom razumijevanja evolucijskih odnosa utvrđeno je da ova skupina organizama nije povezana s pravim gljivama, što dokazuju njihove brojne karakteristike. Za razliku od gljiva, kod vodenih plijesni pregrade u hifama su rijetke, jezgre vegetativnih stanica tipično su diploidne, a stanična stijenka sastoji se od celuloze (Link i sur., 2002).

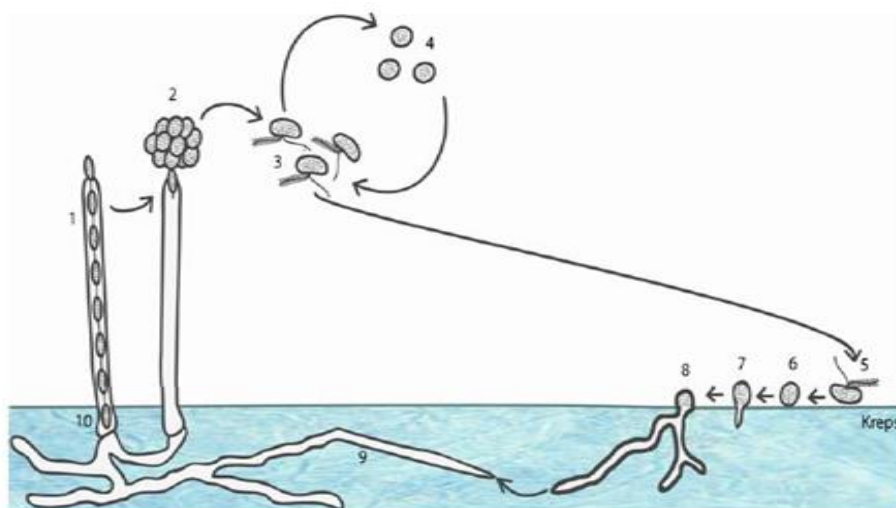
U životnom ciklusu vodenih plijesni najčešće se izmjenjuje spolno i nesporno razmnožavanje (Slika 1). Nesporno razmnožavanje započinje formiranjem sporangija koji nastaje u specijaliziranoj hifi, sporangioforu. Oblik sporangija, način klijanja i struktura sporangiofora razlikuju se ovisno o vrsti. U sporangiju se formiraju nespodne zoospore koje se kreću pomoću bičeva nejednake dužine te predstavljaju infektivni oblik patogena (Link i sur., 2002). Dolaskom na površinu pogodnu za klijanje (poput kože ribe ili kutikule raka) odbacuju bičeve i pretvore se u kratkoživuće strukture, ciste. Iz njih proključuju hife koje inficiraju domaćina i omogućuju apsorpciju potrebnih nutrijenata. Širenje micelija kroz unutrašnje organe domaćina uzrokuje (često letalnu) bolest.

Osim nespornog razmnožavanja, većina vrsta vodenih plijesni, poput vrste *Saprolegnia parasitica*, razmnožava se i spolno (Slika 1). Tijekom spolnog razmnožavanja dolazi do kontakta muškog anteridija i ženskog oogonija te kariogamije, tj. fuzije jezgara muške i ženske spolne stanice, nakon čega nastaje diploidna oospora. Oospore imaju čvrstu stijenku koja im omogućava preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Kod nekih vrsta, uključujući vrstu *A. astaci*, spolno razmnožavanje nije zabilježeno (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009).





Slika 1. Životni ciklus vrste *Saprolegnia parasitica* (Lone i Manohar, 2018).



Slika 2. Životni ciklus vrste *Aphanomyces astaci* (Vrålstad, 2006).

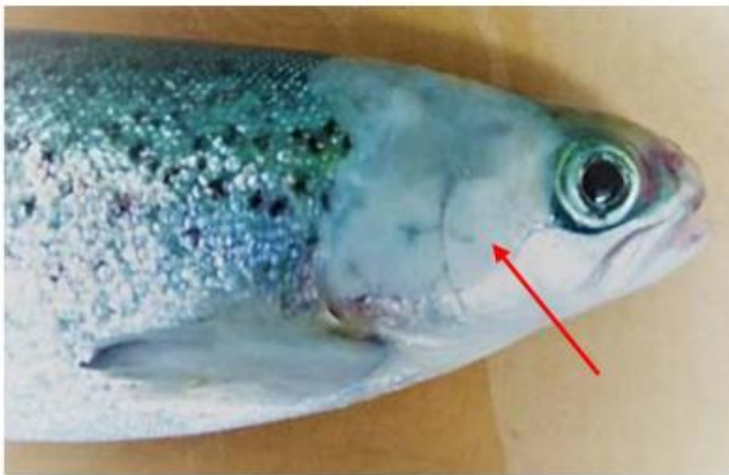
Sporangij (1) sa zoosporama (2) koje se ispuštaju u vodu (3). Ukoliko ne nađu pogodnog domaćina, pretvaraju se u ciste (4) koje se nakon nekog vremena ponovo pretvore u zoospore u procesu koji se naziva poliplanetizam. Nakon što zoospore pronađu pogodnog domaćina (5) prelaze u oblik ciste (6), počinju klijati (7) i prodiru kroz kutikulu domaćina (8). Micelij se širi u unutrašnjosti domaćina (9) dok ne dođe do njegove smrti koja je ujedno i poticaj za proizvodnju sporangija i izbacivanje nove generacije zoospora (10).

Vodene plijesni paraziti su brojnih životinjskih i biljnih vrsta (Derevnina i sur., 2016). Vodene plijesni patogene za biljke, uglavnom predstavnici roda *Phytophthora*, važni su uzročnici bolesti u poljoprivredi. Uzrokuju trulež korijena, stabljike i drugih dijelova biljaka te posljedično i smrt inficirane biljke. Na primjer, *P. infestans* uzrokuje plamenjaču krumpira, bolest koja dovodi do velikih gubitaka usjeva krumpira diljem svijeta i predstavlja prijetnju sigurnosti hrane (Kamoun i sur., 2016). Oomicetni patogeni životinja manje su istraženi, iako su njihovi razorni učinci u slatkovodnim ekosustavima dobro poznati (Sekimoto i sur., 2012). Najpoznatiji predstavnici su *Saprolegnia parasitica* koja uzrokuje bolest saprolegniozu kod širokog raspona domaćina, uglavnom riba, te *Aphanomyces astaci* koji kod slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae uzrokuje bolest račju kugu.

Patogeni mikroorganizam *Aphanomyces astaci* štetno utječe na zavičajne europske populacije rakova. Unesen je u Europu preko invazivnih sjevernoameričkih alohtonih rakova koji djeluju kao vektori njegovog širenja (Holdich i sur., 2009). Prvi simptomi račje kuge su pojava tamnih mrlja na kutikuli raka, a kako se bolest razvija javljaju se i drugi simptomi, poput nekoordiniranog kretanja, gubitka udova i paralize, te na kraju smrti (Unestam, 1965). Osjetljivost rakova na infekciju ovim patogenom ovisi s jedne strane o snazi njihovog imunskog odgovora, a s druge strane o virulenciji samog patogena. Glavna komponenta imunskog odgovora rakova na ovog patogena je sustav profenoloksidaze (proPO). ProPO je zimogen koji se aktivira tako što ga serinska proteaza cijepa na očuvanom mjestu blizu N-kraja. Nastaje aktivna fenoloksidaza (PO) koja predstavlja ključni enzim urođenog imunskog odgovora rakova te su rezultat njezine aktivnosti različiti procesi, kao što su melanizacija, proizvodnja citotoksičnih molekula, enkapsulacija čestica, privlačenje hemocita i induciranje fagocitoze itd. (Cerenius i sur., 2003). Smatra se da su sjevernoamerički invazivni rakovi otporni na bolest jer je njihov proPO sustav stalno aktivan, dok se kod zavičajnih vrsta sporije aktivira pa je time i manje učinkovit (Cerenius i sur., 2003). Osjetljivost rakova na infekciju patogenom *A. astaci* ovisi i o virulenciji samog patogena, a poznato je da se genotipske grupe *A. astaci* razlikuju u virulenciji. Primjerice genotip B (PsI) je značajno virulentniji od genotipa A (As), na koji je imunski sustav zavičajnih rakova adaptiran (Jussila i sur., 2014).

Drugi najvažniji predstavnik oomicetnih patogena slatkovodnih životinja je *S. parasitica*. *Saprolegnia* je jedini rod patogenih oomiceta koji ne sadrži patogene biljaka, već samo patogene vodenih životinja poput rakova i riba, uzročnike smrtonosne bolesti saprolegnioze. Bolest zahvaća sve razvojne stadije ribe, od jaja, preko mlađi, do odraslih jedinki. Na površini inficiranih domaćina pojavljuje se bijelo ili sivo obojen filamentozni micelij (Torto-Alalibo i sur., 2005), kao što je prikazano na Slici 3. Bolest najčešće počne na mjestu gdje se nalazi neka

rana i širi se u unutrašnjost tijela, na mišiće i druge organe, u konačnici uzrokujući smrt (Lone i Manohar, 2018). Što se tiče jaja, micelij patogena najprije zahvaća mrtva jaja, a zatim se širi i na zdrava, što predstavlja veliki problem u akvakulturi (Link i sur., 2002). Za razliku od patogena *A. astaci*, koji uzrokuje bolest kod slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae odnosno kod relativno uskog raspona domaćina, raspon domaćina vrste *S. parasitica* je puno širi te ta vrsta može uzrokovati bolest kod riba, rakova i vodozemaca (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009). Saprolegnioza uzrokuje veliku smrtnost mnogih vrsta riba značajnih za slatkovodnu akvakulturu poput atlantskog lososa, *Salmo salar* i kalifornijske pastrve, *Oncorhynchus mykiss* te niza vrsta divljih riba poput europskog grgeča, *Perca fluviatilis* i atlantske jesetre, *Acipenser sturio*. U posljednje vrijeme gubici u salmonidnoj akvakulturi uzrokovani saprolegniozom postaju sve veći zbog nedostatnih mjera kontrole bolesti, ali i loših uvjeta uzgoja.



**Slika 3.** Jedinka vrste *Salmo salar* zaražena saprolegniozom. Crvenom strelicom označen je micelij patogena (Frenken i sur., 2019).

## **2.2. Kemijska sredstva za kontrolu bolesti uzrokovanih vodenim plijesnima u akvakulturi**

Metode za kontrolu vodenih plijesni u akvakulturi vrlo su ograničene i imaju razne štetne nuspojave (Souty-Grosset i Reynolds, 2009). Fizikalne metode kontrole uključuju rotacijske čistače bazena, uređaje za isisavanje vode kao način uklanjanja mogućih spora i UV-sterilizatore vode (Shinn i sur., 2009). U usporedbi s tim, kemijske metode kontrole su se

pokazale učinkovitijima pa su i češće u uporabi. Najučinkovitijim sredstvom za suzbijanje oomicetnih patogena, posebice *A. astaci*, pokazalo se malahitno zelenilo, no njegovo korištenje zabranjeno je početkom 21. stoljeća zbog dokazanog kancerogenog i teratogenog učinka. Za mnoge druge kemikalije se također očekuje da će biti zabranjene zbog toksičnosti za ljude i okoliš (Caruana i sur., 2012). Trenutno se od kemikalija najčešće koriste formalin, bronopol i bakrov sulfat (Pedersen i sur., 2010). Formalin je već dugi niz godina poznat kao učinkovita metoda kontrole u akvakulturi, ali predstavlja rizik za radnike koji njime rukuju jer već i male koncentracije formalina mogu uzrokovati iritaciju sluznice i nastanak čira na probavnom traktu (Sun i sur., 2014; Pedersen i sur., 2010). Bronopol je toksičan za fitoplankton i zooplankton (González i sur., 2011) zbog čega je potrebno jako razrijediti sredstva koja ga sadrže prije odbacivanja što značajno povećava troškove korištenja (Tedesco i sur., 2018). Isto tako, u vodi se brzo razgrađuje hidrolizom čime nastaju stabilniji produkti 2-bromo-2-nitroetanol (BNE) i bromonitrometan (BNM) koji zbog mutagenog i kancerogenog učinka predstavljaju rizik za okoliš (Cui i sur., 2011). Bakrov sulfat se koristi u kontroli oomiceta u akvakulturi jer inhibira rast micelija i otpuštanje primarnih zoospora vrste *Saprolegnia parasitica* (Sun i sur., 2014), ali toksičan je za beskralježnjake i alge. Osim toga, zbog široko rasprostranjene primjene u poljoprivredi njegova upotreba u akvakulturi može pridonijeti povećanju akumulacije bakra u tlu. Dezinfekcijska sredstva na bazi peroctene kiseline (engl. *peracetic acid*, PAA) pokazala su se prikladnima za dezinfekciju opreme za lov rakova, ali koncentracije potrebne kako bi metoda učinkovito suzbila širenje *A. astaci* mogu biti toksične za vodene životinje (Jussila i sur., 2014). Zbog svega navedenog potrebno je što prije razviti ekološki prihvatljive načine kontrole oomicetnih bolesti u akvakulturi koje bi zamijenile postojeće metode.

### **2.3. Biokontrola kao ekološki prihvatljiv način kontrole bolesti uzgojno važnih vrsta biljaka i životinja**

Biološka kontrola (biokontrola) je metoda suzbijanja patogena, parazita, invazivnih vrsta, korova i drugih štetnih organizama pomoću živih organizama (van Lenteren i sur., 2018). Poznata su četiri tipa biokontrole:

1. **Prirodna biokontrola** koja se odvija u svim ekosustavima bez ljudske intervencije što znači da se populacija štetnih organizama smanjuje aktivnošću prirodno prisutnih organizama (van Lenteren i sur., 2018).
2. **Konzervacijska biokontrola** podrazumijeva ljudsku intervenciju stimuliranjem aktivnosti prirodnih neprijatelja štetnika koji su već prisutni u prirodi. Usmjerena je na očuvanje prirodno

prisutnih neprijatelja stvaranjem staništa gdje oni mogu preživjeti i napredovati (van Lenteren i sur., 2018).

3. **Klasična biokontrola** odnosi se na prikupljanje i puštanje prirodnih neprijatelja u područje gdje se nalazi štetna vrsta, što onda rezultira smanjenjem brojnosti štetne vrste. Primjer je biokontrola agresivne fitopatogene gljive *Cryphonectria parasitica* koja uzrokuje rak kore pitomog kestena (*Castanea sativa*) pomoću hiperparazitskih virusa. Virus *Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1)* inficira gljivu *C. parasitica* te smanjuje njezinu virulenciju (što se naziva hipovirulencija) te tako omogućava biokontrolu raka kore pitomoga kestena. Uspjeh biološke kontrole hipovirulencijom ovisi o starosti gljive *C. parasitica*, tipu hipovirusa i uvjetima okoliša (Hibbet i sur., 2007).

4. Kod **augmentacijske biokontrole** prirodni neprijatelji se masovno uzgajaju i ispuštaju u velikom broju na područje gdje je potrebna kontrola (van Lenteren i sur., 2018). Najčešće se primjenjuje u poljoprivredi masovnim uzgojem korisnih kukaca s ciljem uspostavljanja ravnoteže između prirodnih neprijatelja i štetnika. U novije se vrijeme primjena simbiotskih bakterija u kontroli bolesti, kao oblik augmentacijske biokontrole, sve više prepoznaje kao održiva alternativa korištenju kemijskih sredstava za kontrolu bolesti u akvakulturi (Wagner i sur., 2018; Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011; Lategan i sur., 2006).

### 2.3.1. Biokontrola u akvakulturi

Biokontrola u akvakulturi uključuje primjenu različitih vrsta bakterija, bakteriofaga, mikroalgi i kvasaca. Probiotici se u novije vrijeme često primjenjuju kao dodaci prehrani u akvakulturi. Probiotici su korisne bakterije koje pomažu u uspostavljanju ravnoteže kod narušenog sastava crijevne mikroflore te pokazuju velik potencijal da postanu zamjena za antibiotike i druge kemikalije (Azimirad i sur., 2016). U nastavku teksta navedeni su primjeri istraživanja koji demonstriraju kako je biokontrola obećavajući pristup za prevenciju i suzbijanje bolesti u akvakulturi.

Do sada je u najviše studija s ciljem razvoja biokontrole u akvakulturi istraživan potencijal bakterija iz roda *Pseudomonas*, uključujući i kontrolu bolesti uzrokovanih vodenim plijesnima. Npr. bakterije *Pseudomonas fluorescens* dodavane su u hranu kako bi se poboljšala imunost kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss* i kozica *Penaeus latissulcatus* prema patogenim bakterijama iz roda *Vibrio* (van Hai i sur., 2009). Također je kupanjem u suspenziji s bakterijama roda *Pseudomonas* smanjena smrtnost atlantskog lososa *Salmo salar* nakon zaraze bakterijom *Aeromonas salmonicida*, a soj H6 iz roda *Pseudomonas* smanjio je smrtnost jaja

lososa uzrokovanu patogenom *S. diclina* (Liu i sur., 2015). Heikkinen i suradnici (2012) su pokazali moguću prevenciju zaraze jaja kalifornijske pastrve patogenom *Saprolegnia* sp. dodavanjem izolata *Pseudomonas* sp. M162 i *Pseudomonas* sp. M174 zajedno s patogenom u prethodno UV-ozračenu vodu.

Osim primjene bakterija iz roda *Pseudomonas*, postoje i mnogobrojni primjeri drugih bakterija koji djeluju kao učinkoviti probiotici. Npr. probiotičke bakterije mliječne kiseline poput *Brevibacillus brevis* prijanjaju uz epitel sluznice gastrointestinalnog trakta škampa *Litopenaeus vannamei* i štite od infekcije uzrokovane patogenom *Vibrio parahaemolyticus* (Luis-Villaseñor i sur., 2011). Nadalje, primjenom bakterije *Citricoccus inhibens* smanjen je mortalitet atlantskog lososa i kalifornijske pastrve uzrokovan patogenima *Aeromonas salmonicida* i *Vibrio ordalii* (Robertson i sur., 2000). Također je uočeno da bakterija *Lactiplantibacillus plantarum* izolirana iz crijevne sluznice kalifornijske pastrve može povećati otpornost na patogene *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* i *Aeromonas salmonicida*, a zabilježeno je i da probiotici pozitivno utječu na elemente urođene imunosti poput monocita i makrofaga i povećavaju njihovu brojnost (Aly i sur., 2008). Npr. nakon dodatka bakterije *Clostridium butyricum* u prehranu kalifornijske pastrve došlo je do povećane otpornosti na vibriozu zbog pozitivnog utjecaja probiotika na fagocitnu aktivnost leukocita (Sakai i sur., 1995). Također, učinkovitom se pokazala i kombinirana primjena više probiotika zajedno ili nekog probiotika s određenim tvarima. Primjerice, kombinirana primjena bakterija iz rodova *Bacillus* i *Vibrio* kod škampa *Litopenaeus setiferus* pokazala je pozitivne učinke na rast, preživljavanje i otpornost na patogenu bakteriju *Vibrio harveyi* (Antony i sur., 2011), a kombinirana primjena galaktooligosaharida i bakterije *Pediococcus acidilactici* poboljšala je imunosne parametre i otpornost na infekciju bakterijom *Streptococcus iniae* u mladim kalifornijskih pastrva (Aubin i sur., 2005). Nadalje, hranjenje školjkaša *Pinctada mazatlanica* mikroalgama u kombinaciji s kvascem (*Yarrowia lipolytica*) rezultiralo je poboljšanim rastom i preživljavanjem (Aguilar-Macias i sur., 2010).

Nadalje, potencijal kvasca kao probiotika za poboljšanje otpornosti na bolesti dokazan je u nekoliko istraživanja. Primjerice, prehrana tilapije *Sarotherodon galilaeus* s dodatkom pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* smanjila je smrtnost uzrokovanu patogenom *Aeromonas hydrophila* (Abdel-Tawwab i sur., 2008). Virusne bolesti također mogu uzrokovati masovnu smrtnost i posljedično ekonomske gubitke u akvakulturi, što je rezultiralo istraživanjima potencijala probiotika kao antivirusnih sredstava. Liu i sur. (2012) su zato testirali moguću zaštitu škarpine od iridovirusa primjenom *Bacillus subtilis* i uočili 50% veće preživljavanje od onog u kontrolnoj skupini koja nije uzimala probiotike.

## 2.4. Bakterijski inhibitori patogenih vodenih plijesni

Biokontrola oomicetnih bolesti bakterijskim inhibitorima još je u svojim začecima, odnosno provode se brojna laboratorijska istraživanja koja bi s vremenom mogla naći primjenu i u akvakulturnim postrojenjima. Većina istraživanja bakterijskih inhibitora patogena iz skupine Oomycota usmjerena je na inhibiciju biljnih patogena ove skupine, poput vrsta *Hyaloperonospora arabidopsidis* (uzročnik peronospore kod modelne biljke *Arabidopsis thaliana*), *Phytophthora infestans* (uzročnik plamenjače krumpira i rajčice) te *Plasmopara viticola* (uzročnik peronospore vinove loze) (Wagner i sur., 2018). Primjerice, bakterije iz rodova *Bacillus* i *Pantoea* izolirane iz sjemenki tikvica pokazale su inhibicijsko djelovanje prema biljnim oomicetnim patogenima *Phytophthora capsici* i *Pythium aphanidermatum* (Khalaf i Raizada, 2018), a drugi izolati roda *Bacillus* inhibirali su rast hifa *Aphanomyces euteiches*, uzročnika bolesti truleži korijena graška (Wakelin i sur., 2002).

Istraživanja bakterija s inhibitornim učinkom prema životinjskim oomicetnim patogenima slabije su zastupljena, a u objavljenim znanstvenim radovima se kao inhibitori najčešće spominju bakterijski izolati iz rodova *Aeromonas* i *Pseudomonas* (Orlić i sur., 2021; Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011). Primjerice, demonstriran je inhibicijski učinak soja A199 bakterije *Aeromonas media* s jegulje *Anguilla australis* prema rastu micelija *Saprolegnia* sp. *in vitro* i u akvarijskim pokusima *in vivo* (Lategan i sur., 2006) u kojem su se jegulje s uznapređovalom saprolegniozom u potpunosti oporavile nakon izlaganja temperaturom deaktiviranom soju A199, vjerojatno zahvaljujući proizvodnji indola kao inhibicijske molekule. Nadalje, pokazano je da neki izolati iz rodova *Aeromonas* i *Pantoea*, dobiveni s kože pastrva ili kutikule rakova, mogu inhibirati rast micelija *S. parasitica* i *A. astaci* u *in vitro* uvjetima (Orlić i sur., 2021; Carbajal-González i sur., 2011). Orlić i sur. su 2021. pokazali inhibiciju rasta micelija *A. astaci* *in vitro* bakterijskim izolatima iz rodova *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* i *Curtobacterium*. Izolati vrste *Pseudomonas fluorescens* pokazali su inhibicijsko djelovanje prema patogenima iz roda *Saprolegnia* u eksperimentima na somu, potočnoj i kalifornijskoj pastrvi (Carbajal-González i sur., 2011) te atlanskom lososu (Liu i sur., 2015). Do sada istraživani mehanizmi inhibicije izolata iz roda *Pseudomonas* temelje se na lučenju specifičnih lipopetidnih surfaktanata i hlapljivih organskih spojeva koji inhibiraju rast hifa, stvaranje i klijanje sporangija, te proizvodnju, pokretljivost i klijanje zoospora (Hunziker i sur., 2015). U istraživanjima dr. Bielen i suradnika u sklopu projekta InteractOomyc, koja su prethodila izradi ovog završnog rada, analizirana je inhibicijska aktivnost bakterijskih izolata s kože pastrve prema rastu micelija *S. parasitica*

(Barišić i Pirović, 2022) i bakterijskih izolata s kutikule rakova prema rastu micelija *A. astaci* (Vukšić, 2022). Utvrđeno je da među 170 ispitivanih bakterijskih izolata s kože potočne (*Salmo trutta*) i kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), među kojima je bilo samo četiri izolata iz roda *Pseudomonas*, nije pronađen niti jedan inhibitor patogena *S. parasitica*. Nasuprot tome, među 126 izolata s kutikule rakova nađeno je 19 inhibitora, među kojima su najzastupljeniji bili upravo izolati iz roda *Pseudomonas*. Zbog toga je odlučeno da se u sklopu ovog završnog rada istraži *in vitro* inhibicijski potencijal dodatnih izolata iz roda *Pseudomonas* prema rastu micelija patogenih oomiceta.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Korišteni mikroorganizmi

U ovom je istraživanju korišteno 25 izolata iz roda *Pseudomonas* porijeklom s različitih organa riba i rakova. Izolate je ustupio dr. sc. Tobia Pretto (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Venecija, Italija).

Nadalje, u istraživanju su korišteni izolati oomicetnih patogena *Saprolegnia parasitica* Coker CBS 223.65 sa sjeverne štuke (*Esox lucius*), dobiven od R. Galuppi (Università di Bologna, Bolonja, Italija) i *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) PEC8 genotip B, PsI, izoliran sa signalnog raka (*Pacifastacus leniusculus*), dobiven od F. Grandjeana (Université de Poitiers, Poitiers, Francuska).

Svi mikroorganizmi su uzgajani na PG1 krutoj hranjivoj podlozi (Tablica 1; Unestam, 1965) te precijepljivani u sterilnim uvjetima u laminaru. Bakterije su uzgajane pri 21 °C i čuvane u 30 %-tnom glicerolu pri -80 °C. Vodene plijesni su uzgajane pri 14 °C te čuvane pri 4 °C i precijepljivane svakih mjesec dana.

Za pripremu PG1 podloge (Unestam, 1965) pripremljeno je pet otopina sastava prikazanog u Tablici 1. Navedene otopine najprije su sterilizirane autoklaviranjem pri 121 °C tijekom 20 min. Nakon što su se ohladile pri približno 45 °C, pomiješane su točno određenim redosljedom kako ne bi došlo do zamučivanja i taloženja. U 600 mL sterilizirane otopine agara dodano je 100 mL fosfatnog pufera, zatim 100 mL otopine soli i 100 mL otopine glukoze te na kraju 100 mL otopine peptona. Na kraju je pripremljena podloga u sterilnim uvjetima izlivena u Petrijeve zdjelice.



**Tablica 1.** Sastav otopina potrebnih za pripremu PG1 krute hranjive podloge (Unestam, 1965)

Otopina	Priprema otopine	Volumen potreban za pripremu 1L podloge
Otopina peptona	Odvagati 3 g Bacto peptona (BD) i otopiti u 100 mL destilirane vode	100 mL
Otopina glukoze	Odvagati 6 g D (+) glukoza monohidrata (Merck) i otopiti u 100 mL destilirane vode	100 mL
Otopina soli	Odvagati 1,70 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (J. T. Baker), 1,45 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Merck), 0,20 g FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Merck), 3,70 g KCl (J. T. Baker) i 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctenekiseline (Merck) i otopiti u 1000 mL destilirane vode	100 mL
Fosfatni pufer, pH 7	Pripremiti otopine A; 9,5 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck) i B; 9,2 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (J. T. Baker); nakon sterilizacije pomiješati 611 mL otopine A i 389 mL otopine B	100 mL
Otopina agara	Odvagati 12 g agara i otopiti u 600 mL vode	600 mL

### 3.2. Umnažanje fragmenta gena koji kodira za 16S rRNA lančanom reakcijom polimerazom








S ciljem određivanja taksonomske pripadnosti izolata, svakome od 25 izolata je lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) umnožen fragment gena koji kodira za 16S rRNA.

Postupak je započet tako da je sterilnom čačalicom mala količina pojedinačne bakterijske kolonije prenesena u 200 µL deionizirane vode te su stanice termički lizirane 15 min pri 95 °C u uređaju Alpha Cycler 1 (PCRmax). Dobivena otopina korištena je kao kalup u PCR-reakciji

u kojoj je umnožena gotovo cijela duljina *16S* rRNA sekvence bakterijskih izolata koristeći univerzalne bakterijske oligonukleotidne početnice 27F i 1492R (Lane, 1991). Za izolate kod kojih umnažanje *16S* rRNA sekvence gore opisanom metodom (engl. *colony PCR*) nije uspjelo, izolirana je ukupna genomska DNA komercijalnim kompletom NucleoSpin Microbial DNA Mini kit for DNA from microorganisms (Macherey Nagel), slijedeći upute proizvođača (Slika 4), te je ovako dobiven uzorak DNA korišten kao kalup u PCR-reakciji. Kao pozitivna kontrola korištena je genomska DNA bakterije iz roda *Streptomyces*, a kao negativna destilirana voda. Korišteni program naveden je u Tablici 2., a sastav reakcijske smjese za PCR u Tablici 3.

### Genomic DNA from microorganisms

#### Protocol-at-a-glance (Rev. 02)

NucleoSpin® Microbial DNA		
<b>1 Prepare sample</b>		< 40 mg microbial pellet (wet weight) 100 µL BE
<b>2 Lyse sample</b>		Transfer sample in NucleoSpin® Bead Tube Type B 40 µL Buffer MG 10 µL Liquid Proteinase K Agitate on a swing mill or similar device 4–12 min 11,000 x g, 30 s
<b>3 Adjust binding conditions</b>		600 µL Buffer MG Vortex 3 s 11,000 x g, 30 s
<b>4 Bind DNA</b>		Load 500–600 µL sample on NucleoSpin® Microbial DNA Column 11,000 x g, 30 s
<b>5 Wash silica membrane</b>		<b>1<sup>st</sup></b> 500 µL BW      11,000 x g, 30 s <b>2<sup>nd</sup></b> 500 µL B5      11,000 x g, 30 s
<b>6 Dry silica membrane</b>		11,000 x g, 30 s
<b>7 Elute DNA</b>		100 µL BE RT, 1 min 11,000 x g, 30 s

**Slika 4.** Postupak izolacije ukupne genomske DNA komercijalnim kompletom NucleoSpin Microbial DNA Mini kit for DNA from microorganisms (Macherey Nagel) za brzo pročišćavanje vrlo čiste genomske DNA iz mikroorganizama.

**Tablica 2.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom

	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	
Početna denaturacija	5	96	
28 x {	Denaturacija lanaca	1	94
	Vežanje početnica na kalup	1	55
	Sinteza komplementarnih lanaca	1,5	72
	Završno produživanje lanaca	10	72

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese za PCR

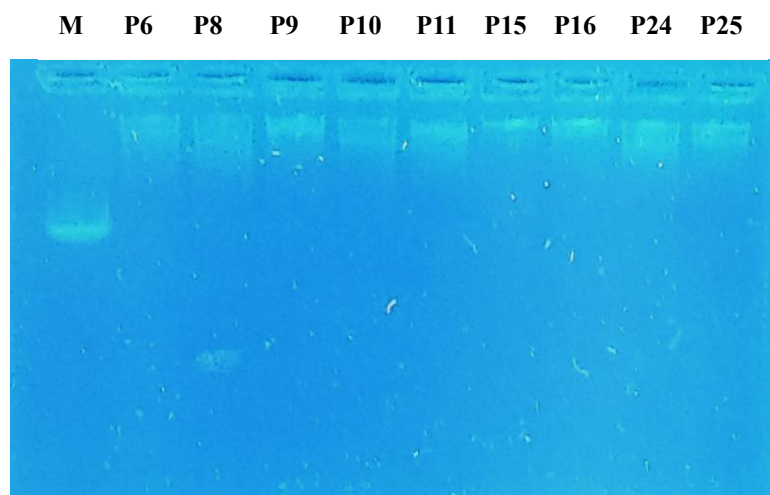
DNA-kalup	1 $\mu$ L
Reakcijska smjesa za PCR EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA)	12,5 $\mu$ L
10 $\mu$ M uzvodna početnica 27F (konačna koncentracija 0,2 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ L
10 $\mu$ M nizvodna početnica 1492R (konačna koncentracija 0,2 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O (Lonza)	9 $\mu$ L
ukupno	25 $\mu$ L

### 3.3. Elektroforeza

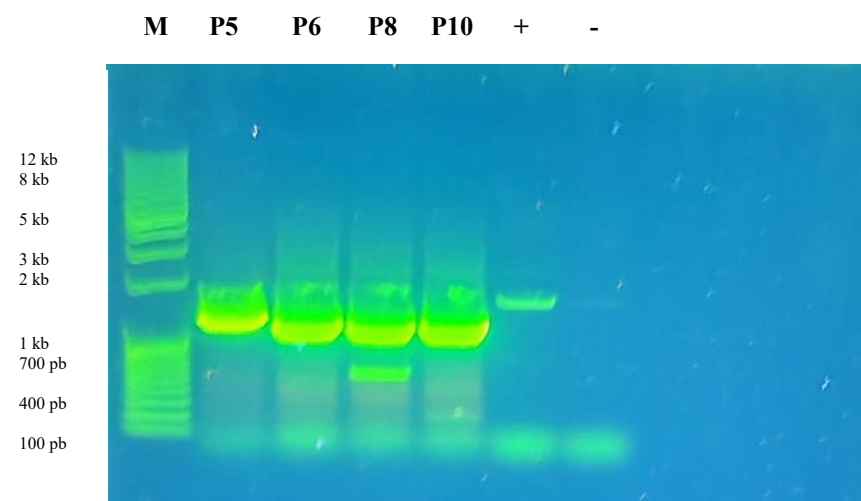
Uspješnost izolacije genomske DNA, kao i uspješnost PCR-reakcija (odnosno amplifikacija fragmenta očekivane dužine od oko 1500 parova baza) za svih 25 izolata provjerena je elektroforezom. Kako bi se pripremio 1%-tni agarozni gel, 0,8 g agaroze (Sigma-Aldrich) otopljeno je u 80 mL TAE-pufere (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM etilen diamin tetraoctena kiselina, engl. *ethylene diamine tetraacetic acid*, EDTA). Smjesa je zagrijana do vrenja kako bi se agaroz otopila te joj nakon hlađenja pri oko 60 °C dodana boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza). Ova fluorescetna boja služi za vizualizaciju fragmenata DNA

te ima visoku osjetljivost s granicom detekcije od 20 pg dvolančane DNA.

Za kontrolu veličine DNA molekula u uzorcima korišten je molekularni biljeg SimplyLoad Tandem DNA ladder. Molekule DNA razdvojene su u električnom polju pri naponu od 100 V u TAE-puferu tijekom 45 minuta koristeći aparaturu za elektroforezu te su potom vizualizirane na transiluminatoru pod UV-svjetlom (UVIpure, UVITEC Cambridge) i fotografirane. Primjeri izolacije genomske DNA, odnosno rezultata amplifikacije *16S* rRNA regije, prikazani su na Slikama 5, odnosno 6.



**Slika 5.** Primjer rezultata uspješne izolacije genomske DNA. M označava molekularni biljeg (SimplyLoad Tandem DNA ladder).

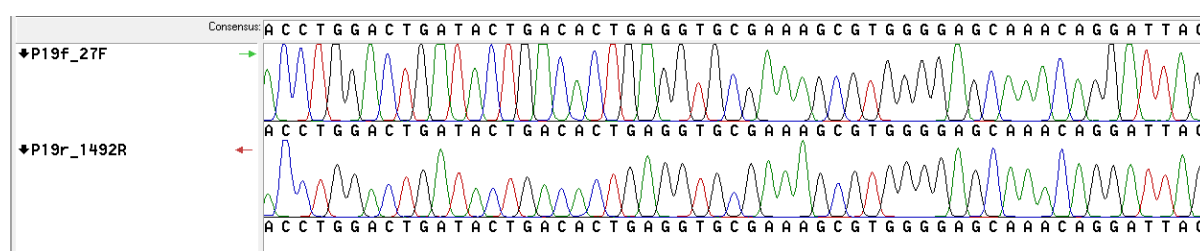


**Slika 6.** Primjer rezultata amplifikacije *16S* rRNA regije. M označava molekularni biljeg (SimplyLoad Tandem DNA ladder), “+” označava pozitivnu kontrolu (genomska DNA bakterije iz roda *Streptomyces*), a “-” negativnu kontrolu (deionizirana voda). Kod svih PCR-

produkata (P5 – P10) vidljiva je elektroforetska pruga na duljini od približno 1500 pb, što odgovara očekivanoj duljini PCR-amplikona za *16S* rRNA regiju dobivenih uz pomoć početnica 27F i 1492R.

### 3.4. Sekvenciranje

Određivanje primarne strukture pročišćenih PCR-produkata sekvenciranjem Sangerovom dideoksi metodom provedeno je u servisu Microsynth (Austrija) koristeći već navedene početnice 27F i 1492R. Analiza i uređivanje kromatograma provedeno je u programu GeneStudio, Inc. Suwanee, Georgia, SAD (Slika 7).



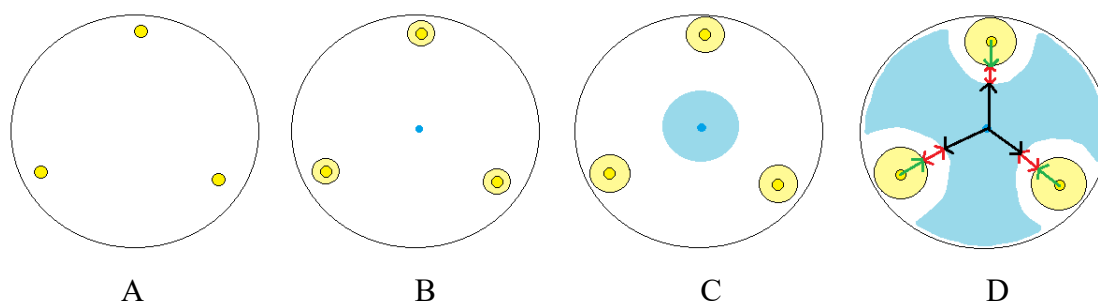
**Slika 7.** Primjer preklapanja dvaju kromatograma izolata P19 u programu GeneStudio.

### 3.5. Izrada filogenetskog stabla i molekularna identifikacija izolata

Kao početni korak filogenetske analize konstruirano je višestruko poravnanje svih prikupljenih sekvenci *16S* rRNA regije (engl. *multiple sequence alignment*) s odabranim referentnim sekvencama koristeći program MAFFT v.7., RIMD (Kato i Standley, 2013). Referentne sekvence (31), odnosno nukleotidni slijedovi referentnih pripadnika grupa, podgrupa i vrsta unutar roda *Pseudomonas*, odabrane su prema publikaciji Lalucat i sur. (2020) i preuzete iz javno dostupne baze podataka NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Višestruko poravnanje je uređeno u programu MEGA v.10.2.4. (Kumar i sur., 2018) tako da su uklonjeni stršeci dijelovi sekvenci na početku i kraju višestrukog poravnanja. Konačno poravnanje je imalo 56 sekvenci i 1239 stupaca te je korišteno za izradu filogenetskog stabla, također u programu MEGA v.10.2.4. (Kumar i sur., 2018), metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*). Za analizu je korišten parametarni model supstitucije Kimura-2 (K2+G+I). Podrška za grananja unutar filogenetskog stabla određena je na temelju 1000 *bootstrap* ponavljanja. Na temelju dobivenog stabla bakterijski izolati su identificirani do roda, grupe, podgrupe ili, ako je bilo moguće, do vrste.

### 3.6. Testovi inhibicije rasta micelija patogena *A. astaci* i *S. parasitica*

Testovi inhibicije provedeni su kako je ranije opisano (Orlić i sur., 2021) te je postupak prikazan na Slici 8. Na krutu hranjivu podlogu PG1 inokuliran je triplikat istog bakterijskog izolata i to tako da je na pojedini sterilni disk od filter papira promjera 5 mm naneseo 5  $\mu$ L glicerolske suspenzije određenog izolata (Slika 8A). Nakon što su bakterijske kolonije porasle (2 do 3 dana pri 21 °C), na sredinu krute hranjive podloge naci jepljen je i komadić PG1 podloge promjera 5 mm (Slika 8B) obrastao svježim oomicetnim micelijem (uzet s ruba svježije oomicetne kolonije). Radi kontrole brzine rasta micelija oomicetnih patogena, naci jepljene su još tri podloge PG1 na koje nisu inokulirani bakterijski izolati (negativna kontrola). Trajanje testa određeno je vremenom potrebnim da micelij naraste do ruba hranjive podloge kada bakterije nisu inokulirane, tj. 12 dana pri 14 °C za *A. astaci* i 4 dana pri 14 °C za *S. parasitica*.



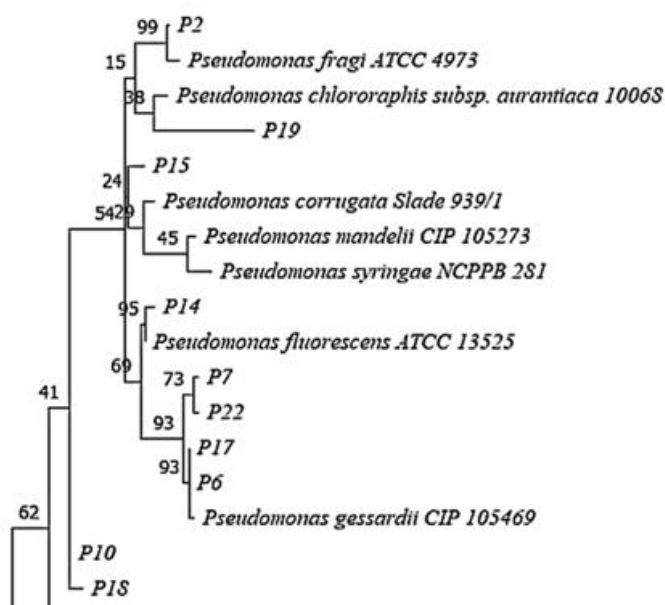
**Slika 8.** Shema testova inhibicije. Početak testa: bakterijski izolat je naci jepljen u triplikatu (A). Bakterijski izolat je porastao te je naci jepljen izolat oomiceta na sredinu krute hranjive podloge (B). Rast bakterijskog i oomicetnog izolata (C) i kraj testa (D). Žuto područje predstavlja rast bakterijskih kolonija, a plavo radijalni rast micelija oomicetnih patogena. Na kraju testa izmjerena je zona rasta micelija oomiceta u mm (crne strelice), zona rasta bakterijskih kolonija u mm (zelene strelice) i zona inhibicije, odnosno udaljenost između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija u mm (crvene strelice) (Vukšić, 2021).

Na kraju testa ploče su skenirane i programom Tracker v.6.1.3., OSP su izmjerene tri varijable (u mm): zona radijalnog rasta oomicetnog micelija, zona rasta bakterijskih kolonija i zona inhibicije, kako je prikazano na Slici 8D. Za svako mjerenje izračunata je srednja vrijednost i s obzirom na prosječnu dužinu zone inhibicije bakterijski izolati svrstani su u inhibitore (zona inhibicije  $\geq$  6 mm) ili ne-inhibitore (zona inhibicije  $<$  6 mm) rasta micelija oomiceta, prema ranijoj klasifikaciji Orlić i suradnika (2021).

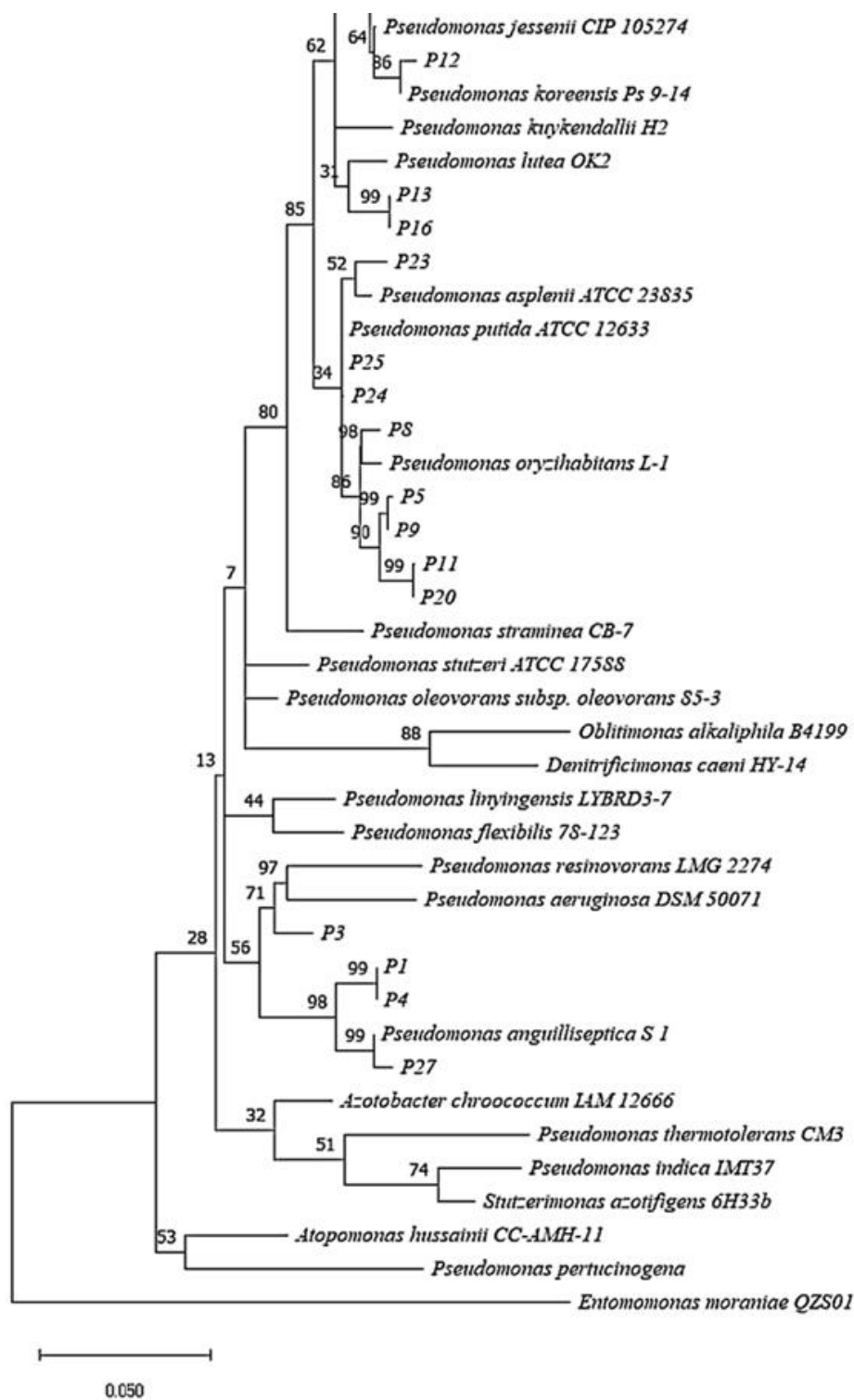
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata

Filogenetska analiza *16S* rRNA sekvenci 25 bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* prikazana je na Slici 9. Temeljem grupiranja sekvenci izolata s referentnim sekvencama čija je taksonomska pripadnost ranije utvrđena genomskim analizama (Lalucat i sur., 2020) 7/25 izolata (28 %) je uspješno identificirano do razine vrste, 4/25 (16 %) do podgrupe, 11/25 (44 %) do grupe te preostalih 3/25 (12 %) do razine roda (Tablica 4). Pokazano je da najveći udio analiziranih izolata pripada grupi *fluorescens* (12/25 izolata, 48 %) te nakon toga grupi *oryzihabitans* (5/25 izolata, 20 %), zatim *anguilliseptica* (3/25 izolata, 12 %) te *lutea* (2/25 izolata, 8 %). Unutar grupe *fluorescens* najviše izolata pripadalo je podgrupi *gessardii* (4/12 izolata, 33 %), a po jedan je izolat (1/12 izolata, 8 %) pripadao podgrupama *asplenii*, *chlororaphis*, *fluorescens*, *fragi* i *koreensis*.



**Slika 9.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci *16S* rRNA gena 25 bakterijskih izolata analiziranih u ovom radu i referentnih izolata iz baze podataka NCBI konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti.



**Slika 9.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci 16S rRNA gena 25 bakterijskih izolata analiziranih u ovom radu i referentnih izolata iz baze podataka NCBI konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. - nastavak



Budući da *16S* rRNA-gen kodira za RNA-komponentu male podjedinice ribosoma, prisutan je u svim bakterijskim genomima te je pogodan marker za identifikaciju bakterija. Osim toga, s obzirom na njegovu esencijalnu funkciju u bakterijskoj stanici, sekvenca mu je vrlo očuvana i sporo se mijenja. Zato je usporedba sekvenci *16S* rRNA regije standardna metoda u taksonomskoj identifikaciji bakterijskih izolata iz različitih okoliša. Danas je u javno dostupnim bazama podataka (poput NCBI baze) pohranjen veliki broj *16S* rRNA sekvenci različitih bakterijskih vrsta i izolata. Međutim, klasifikacija do razine vrste na temelju usporedbe *16S* rRNA sekvenci je za neke bakterijske rodove otežana, uključujući rod *Pseudomonas* (Khosravi i sur., 2015). Pripadnici roda *Pseudomonas* su na razini *16S* gena vrlo slični, odnosno razlike između sekvenci su vrlo male ili ne postoje. Zbog toga su pouzdanosti nekih grananja na izrađenom filogenetskom stablu niske (Slika 9), a udio izolata kojima je sa sigurnošću određena vrsta relativno mali. Za poboljšanje identifikacije izolata iz takvih rodova u analizu se mogu uključiti i dodatni marker-geni, primjerice geni *rpoB* i *rpoD* koji kodiraju za podjedinice bakterijske RNA-polimeraze (Lauritsen i sur., 2021; Khosravi i sur., 2015), a moguća je i identifikacija bakterija na temelju usporedbe cijelih genoma (Lalucat i sur., 2020). Unatoč opisanim manjkavostima *16S* rRNA regije kao markera za identifikaciju bakterija iz roda *Pseudomonas*, u ovom su radu izolati većinom uspješno svrstani u ranije opisane grupe unutar tog roda (Lalucat i sur., 2020). Izolati iz roda *Pseudomonas* analizirani u ovom radu bili su porijeklom s raznih riba i kutikule jednog raka, *Austropotamobius pallipes* (Tablica 4). Najviše izolata (9/25 izolata, 36 %) uzeto je s kože i iz bubrega kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss*. Dominantne grupe unutar roda *Pseudomonas* u koje su svrstani izolati u ovom radu bile su *fluorescens* i *oryzihabitans*. Ovakvi su rezultati u skladu s literaturom. U dostupnim istraživanjima bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* s površine i unutrašnjosti organizma rakova (Vukšić, 2022; Orlić i sur., 2021) te različitih slatkovodnih riba (Duman i sur., 2021) također su dominantno izolirane bakterije iz grupe *fluorescens*.

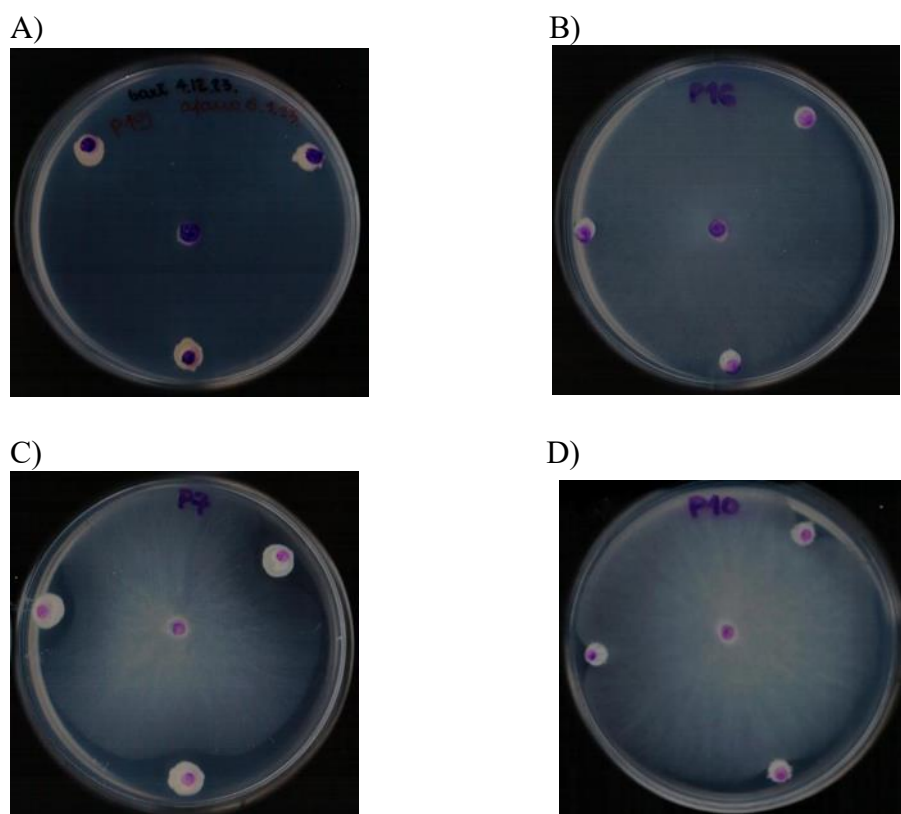
**Tablica 4.** Identifikacija 25 bakterijskih izolata roda *Pseudomonas* te njihov inhibicijski potencijal prema patogenima *A. astaci* i *S. parasitica*

Šifra izolata	Identifikacija 16S						Inhibicija <i>A. astaci</i>			Inhibicija <i>S. parasitica</i>		
	Domaćin	Organ	Rod	Grupa	Podgrupa	Vrsta	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
P1	<i>Salmo marmoratus</i>	unutrašnji organi	<i>Pseudomonas</i>	<i>anguilliseptica</i>	-	NU	17,25	16,89	3,95	33,12	0,00	4,10
P2	<i>Salmo trutta</i>	slezena	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>fragi</i>	<i>fragi</i>	27,98	6,99	3,82	31,55	0,00	5,37
P3	<i>Cyprinus rubrofuscus</i> var. "koi"	epidermis	<i>Pseudomonas</i>	NU	NU	NU	34,13	0,40	3,71	31,99	0,00	5,63
P4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	epidermis	<i>Pseudomonas</i>	<i>anguilliseptica</i>	-	NU	32,89	0,83	3,77	33,38	0,00	4,44
P5	Akvarijska voda	akvarijska voda	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	-	NU	17,19	13,74	7,47	29,60	1,38	5,60
P6	<i>Salmo marmoratus</i>	unutrašnji organi	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>gessardii</i>	<i>gessardii</i>	27,89	3,13	3,75	31,73	1,48	3,48
P7	<i>Oreochromis niloticus</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>gessardii</i>	NU	21,18	9,76	6,90	27,77	4,47	5,47
P8	<i>Anguilla</i> sp.	encephalon	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	-	<i>oryzihabitans</i>	28,26	3,99	4,16	31,03	2,55	3,59
P9	<i>Austropotamobius pallipes</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	-	NU	29,70	0,00	6,28	31,28	0,00	3,92
P10	<i>Salmo marmoratus</i>	ovarijska tekućina	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	NU	NU	29,15	4,11	3,82	32,95	0,00	3,24
P11	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	slezena	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	-	NU	27,67	1,81	7,75	29,16	0,63	4,90
P12	<i>Carrasius auratus</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>koreensis</i>	<i>koreensis</i>	28,18	3,13	5,48	30,17	0,00	5,28
P13	<i>Carrasius auratus</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>lutea</i>	-	NU	27,35	5,82	4,49	27,84	5,26	3,60
P14	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	koža	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>fluorescens</i>	<i>fluorescens</i>	15,03	14,40	8,06	26,77	4,47	5,25
P15	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	slezena	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	NU	NU	30,37	2,65	4,82	32,53	0,00	5,20
P16	<i>Salmo trutta</i>	slezena	<i>Pseudomonas</i>	<i>lutea</i>	-	NU	33,93	0,00	4,00	31,73	1,48	3,48
P17	<i>Cyprinus rubrofuscus</i> var. "koi"	ozljeda kože	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>gessardii</i>	<i>gessardii</i>	30,31	3,68	3,70	32,30	0,57	3,58
P18	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	encephalon/koža	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	NU	NU	19,86	12,48	6,15	31,32	0,00	4,86
P19	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	koža	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>chlororaphis</i>	NU	9,45	25,50	3,48	30,59	2,47	3,80
P20	<i>Cyprinus carpio</i>	škrge	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	-	NU	19,90	10,63	6,84	29,94	1,17	5,51
P22	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>gessardii</i>	NU	11,86	17,85	8,36	30,51	0,95	5,79
P23	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>asplenii</i>	NU	6,94	24,87	5,78	33,31	0,00	4,77
P24	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	NU	NU	NU	28,88	4,57	5,02	33,03	0,00	4,50
P25	<i>Cyprinus rubrofuscus</i> var. "koi"	koža	<i>Pseudomonas</i>	NU	NU	NU	27,21	2,61	5,18	30,61	0,43	4,29
P27	<i>Anguilla</i> sp.	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>anguilliseptica</i>	-	<i>anguilliseptica</i>	23,17	8,67	3,55	32,54	0,94	3,81
	NU - nije utvrđena											
	- ne postoji											
	inhibitorski izolati (zone inhibicije ≥ 6 mm) označeni su žuto											

#### 4.2. Selekcija bakterijskih izolata koji mogu inhibirati rast patogena *A. astaci* i *S. parasitica*

Testovima *in vitro* istražen je inhibicijski potencijal 25 izolata iz roda *Pseudomonas* prema rastu micelija oomicetnih patogena *A. astaci* i *S. parasitica* (Tablica 4, Slika 10).

Što se tiče inhibicije vrste *A. astaci*, rezultati su pokazali da neki od izolata mogu usporiti ili potpuno zaustaviti rast micelija *A. astaci*. S obzirom na širinu zone inhibicije, izolati su podijeljeni u dvije skupine: inhibitori (zona inhibicije  $\geq 6$  mm) i ne-inhibitori (zona inhibicije  $< 6$  mm), prema ranijoj klasifikaciji Orlić i suradnika (2021).



**Slika 10.** Primjeri testova inhibicije: P19, *Pseudomonas* gr. *fluorescens* podgr. *chlororaphis*, inhibitor rasta micelija patogena *A. astaci* (rast micelija je u potpunosti zaustavljen) (A), P16, *Pseudomonas* gr. *lutea*, ne-inhibitor rasta micelija patogena *A. astaci* (B), P7, *Pseudomonas* gr. *fluorescens* podgr. *gessardii*, djelomična inhibicija rasta micelija patogena *S. parasitica* (C), i P10, *Pseudomonas* gr. *fluorescens*, ne-inhibitor rasta micelija patogena *S. parasitica* (D).

11/25 izolata (44 %) klasificirano je kao inhibitor rasta micelija *A. astaci*, a preostalih 14/25 izolata (56 %) kao ne-inhibitor. Većina identificiranih inhibitora pripadala je grupi *fluorescens*

(7/11 izolata, 64 %), a najjači su bili izolati P19 *Pseudomonas* sp. grupa *fluorescens* podgrupa *chlororaphis* (zona inhibicije = 25,50 mm) i P23 *Pseudomonas* sp. grupa *fluorescens* podgrupa *asplenii* (zona inhibicije = 24,87 mm). Što se tiče vrste *S. parasitica*, inhibicija je bila značajno slabija (Tablica 4) te prema ranije navedenoj podjeli niti jedan izolat nije klasificiran kao inhibitor ovog patogena. Ipak, pojedini izolati imali su blagi inhibicijski učinak, odnosno izmjerena je zona inhibicije bila je blizu minimalne vrijednosti za klasifikaciju kao inhibitor. Najjačima su se pokazali izolati P13, *Pseudomonas* grupa *lutea* (zona inhibicije = 5,26 mm), P14, *Pseudomonas fluorescens* (zona inhibicije = 4,47 mm) i P7, *Pseudomonas* grupa *fluorescens* podgrupa *gessardii* (zona inhibicije = 4,47 mm).

U skladu s opisanim rezultatima, u više je prethodnih istraživanja utvrđeno da bakterijski izolati s riba i rakova svrstani u grupu *fluorescens* imaju snažan *in vitro* inhibicijski učinak prema oomicetnim patogenima *A. astaci* (Vukšić, 2022; Orlić i sur., 2021) i *S. parasitica* (Carbajal-González i sur., 2011). Primjerice, izolat POL4.5 (porijeklom s kutikule uskoškara raka *Pontastacus leptodactylus*) koji spada u grupu *fluorescens* podgrupu *chlororaphis* uzrokovao je najveću zonu inhibicije prema patogenu *A. astaci* od 25,25 mm u radu Orlić i suradnika (2021). Ovo je vrlo slično zoni inhibicije najjačeg inhibitora iz ovog rada P19 *Pseudomonas* sp. grupa *fluorescens* podgrupa *chlororaphis* (25,50 mm), porijeklom s kože kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss*.

Nadalje, u ovom je radu utvrđena izraženo veća osjetljivost patogena *A. astaci* od osjetljivosti patogena *S. parasitica* prema izolatima iz roda *Pseudomonas*. Jedan od najizraženijih primjera bilo je djelovanje izolata P23, koji je bio jedan od najjačih inhibitora rasta micelija patogena *A. astaci*, dok uopće nije inhibirao rast patogena *S. parasitica* (zona inhibicije = 0 mm). Ovi su rezultati u skladu s ranijim rezultatima (Pirović i Barišić, 2022; Vukšić, 2022). Primjerice, izolati iz roda *Pseudomonas* porijeklom s kutikule signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* puno su jače inhibirali rast micelija patogena *A. astaci* nego patogena *S. parasitica*. Slično ovome, ranije je uočeno da je micelij patogena *A. astaci* osjetljiviji od micelija patogena *S. parasitica* na inhibicijske bioaktivne molekule biljnog porijekla, odnosno eterična ulja kadulje, lovora te ružmarina (Miljanović i sur., 2021). Međutim, još nema istraživanja koja bi objasnila molekularne mehanizme ovakvih razlika.

Zaključno, rezultati ovog rada korisni su kao početna točka za razvijanje novih pristupa biokontrolu oomicetnih patogena u slatkovodnoj akvakulturi koja bi se mogla primjenjivati npr. u obliku dodataka prehrani ili bakterijskih kupki koji bi zdrave životinje obranili od potencijalne infekcije ili kao lijek za životinje već zaražene patogenima.

No, kako bi se to ostvarilo potrebno je provesti niz dodatnih istraživanja. Primjerice, trebalo bi

poboljšati identifikaciju odabranih izolata s najjačom inhibitorskom aktivnošću primjenom prethodno navedenih dodatnih gena markera (Khosravi i sur., 2015) ili sekvenciranja čitavih genoma (Lalucat i sur., 2020). Nadalje, budući da zoospore predstavljaju infektivni stadij oomicetnih patogena, u daljnjim istraživanjima trebalo bi pobliže istražiti inhibicijski utjecaj roda *Pseudomonas* na klijavost i pokretljivost zoospora patogena, a ne samo na rast micelija (Wagner i sur., 2018). Osim toga, trebalo bi primijeniti različite pristupe kako bi se utvrdili mehanizmi inhibicijske aktivnosti. Do sad su sekvenciranjem i analizom genoma bioinformatički detektirani genski klasteri odgovorni za proizvodnju sekundarnih metabolita. Tako je za niz izolata iz roda *Pseudomonas* koji pokazuju inhibicijsku aktivnost prema oomicetnim patogenima biljaka utvrđeno da posjeduju genske klasterne za sintezu brojnih sekundarnih metabolita, uključujući siderofore, lipopeptide i hlapive spojeve (Wagner i sur., 2018) Nadalje, i analize metaboloma bakterija mogu pomoći u identifikaciji ključnih inhibicijskih molekula (Hunziker i sur., 2015). Npr. analizom bakterija roda *Pseudomonas* otkriveno je da hlapljivi organski i anorganski spojevi, poput dimetil trisulfida i metil metantiosulfonata, inhibiraju rast i razvoj biljnog oomicetnog patogena *Phytophthora infestans* (Hunziker i sur., 2015). Također su Lategan i sur. 2006. dokazali da određeni soj bakterije *A. media* proizvodi molekulu sličnu bakteriocinu koja inhibira rast hifa i klijanje cista patogena iz roda *Saprolegnia*. Naposljetku, kako bi se ova saznanja primijenila u akvakulturi, potrebno je provesti detaljna *in vivo* istraživanja. Primjerice, potrebno je utvrditi optimalnu dozu i način primjene odabranih bakterijskih izolata, istražiti učinak primjene bakterija na domaćina (učinak na rast, reprodukciju i komponente imunog odgovora). Takva istraživanja će biti korak dalje u razvoju biokontrole oomicetnih bolesti u akvakulturi.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Provedena je molekularna identifikacija 25 bakterijskih izolata sa slatkovodnih rakova i riba sekvenciranjem *16S* rRNA gena i filogenetskom analizom te je 28 % izolata uspješno identificirano do razine vrste, 16 % do podgrupe, 44 % do grupe te 12 % do razine roda *Pseudomonas*. Najveći udio analiziranih izolata (48 %) pripadao je grupi *fluorescens*..
2. 11/25 izolata roda *Pseudomonas* (44 %) pokazalo je inhibicijski potencijal prema rastu micelija *A. astaci* (zona inhibicije  $\geq 6$  mm), te je većina identificiranih inhibitora *A. astaci* pripadala grupi *fluorescens* (7/11 izolata, 64 %).
3. Inhibicija vrste *S. parasitica* je bila značajno slabija te niti jedan izolat nije klasificiran kao inhibitor ovog patogena.

## 6. POPIS LITERATURE

Abdel-Tawwab M, Abdel-Rahman AM, Ismael NEM (2008) Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. *Aquac* **280**, 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.055>

Aguilar-Macias OL, Ojeda-Ramirez JJ, Campa-Cordova AI, Saucedo PE (2010) Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *J World Aquacult Soc* **41**, 447–454. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00386.x>

Aly SM, Ahmed YAG, Ghareeb AA, Mohamed MF (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immun* **25**, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>

Antony SP, Singh IB, Jose RM, Kumar PA, Philip R (2011) Antimicrobial peptide gene expression in tiger shrimp, *Penaeus monodon* in response to gram-positive bacterial probiotics and white spot virus challenge. *Aquac* **316**, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.025>

Aubin J, Gatesoupe FJ, Labbé L, Lebrun L (2005) Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac Res* **36**, 758–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01280.x>

Axel C, Zannini E, Coffey A, Guo J, Waters DM, Arendt EK (2012) Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4282-y>

Azimirad M, Meshkini S, Ahmadifard N, Hoseinifar SH (2016) The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Fish Shellfish Immun* **54**, 516–522.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.001>

Barišić L i Pirović E (2022) Epibiotske bakterije domaćina kao inhibitori rasta micelija patogenog mikroorganizma *Saprolegnia parasitica* (rad za natječaj za dodjelu Rektorove nagrade), Prehrambeno-biotehnološki fakultet i Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Beakes GW, Glockling SL, Sekimoto S (2012) The evolutionary phylogeny of the oomycete. *Protoplasma* **249**, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2>

Carbajal-González MT, Fregeneda-Grandes JM, Suárez-Ramos S, Rodríguez Cadenas F, AllerGancedo JM (2011) Bacterial skin flora variation and in vitro inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. *Dis Aquat Organ* **96**, 125-135. <https://doi.org/10.3354/dao02391>

Caruana S, Yoon GH, Freeman MA, Mackie JA (2012) The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoids in controlling infections of *Saprolegnia australis* (Saprolegniales; Oomycetes). *Aquac* **358–359**, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.035>

Cerenius L, Bangyeekhun E, Keyser P, Söderhäll I, Söderhäll K (2003) Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cell Microbiol* **5**, 353-357. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00282.x>

Cui N, Yhang X, Xie Q, Wang S, Chen J, Huang L, i sur. (2011) Toxicity profile of labile preservative bronopol in water: The role of more persistent and toxic transformation products. *Environ Pollut* **159**, 609-615. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.036>

Derevnina L, Petre B, Kellner R, Dagdas YF, Sarowar MN, Giannakopoulou A, De la Concepcion JC, Chaparro-Garcia A, Pennington HG, van West P, Kamoun S (2016) Emerging oomycete threats to plants and animals. *R Soc Open Sci* **371**, 543-551. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0459>



Diéguez-Uribeondo J, García MA, Cerenius L, Kozubíková E, Ballesteros I, Windels C i sur. (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genet Biol* **46**, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.004>

Frenken T, Agha R, Schmeller DS, van West P, Wolinska J (2019) Biological Concepts for the Control of Aquatic Zoosporic Diseases. *Trends Parasitol* **35**, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.003>

GeneStudio Incorporated (2020) Molecular Biology Suite for Windows (Verzija 2.0). <https://genestudio.software.informer.com/> Pristupljeno 20. svibnja 2023.

Hibbet DS, Binder M, Bischoff JF i sur., (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **3**, 509-547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>

Holdich DM, Reynolds JD, Souty-Grosset C, Sibley PJ (2009) A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ec* **11**, 394-395. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>

Hunziker L, Bönisch D, Groenhagen U, Bailly A, Schulz S, Weisskopf L (2015) *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Appl Environ Microb* **81**, 821-830. <https://doi.org/10.1128/AEM.02999-14>

Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**, 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Khalaf EM, Raizada MN (2018) Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Front Microbiol* **9**, 42-46. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>

Khosravi AD, Sadeghi P, Shahraki AH, Heidarieh P, Sheikhi N (2015) Molecular Methods for Identification of *Acientobacter* Species by Partial Sequencing of the rpoB and 16S rRNA

Genes. J Clin Diagn Res **9**, 9-13. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13867.6188>

Korkea-aho TL, Papadopoulou A, Heikkinen J, von Wright A, Adams A, Austin, B (2012) *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. J Appl Microbiol **113**, 24–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05325.x>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. Mol Biol Evol **35**, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Lalucat J, Mulet M, Gomila M, García-Valdés E (2020) Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. Genes **11**, 139-143. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>

Lane DJ, Stackebrandt E, Goodfellow M (1991) 16S/23S rRNA Sequencing: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. Int J Food Microbiol **15**, 115-175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.023>

Lategan MJ, Booth W, Shimmon R, Gibson LF (2006) An Inhibitory Substance Produced by *Aeromonas media* A199, an Aquatic Probiotic. Aquac **254**, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.019>

Lauritsen JG, Hansen ML, Bech PK, Jelsbak L, Gram L, Strube ML (2021) Identification and Differentiation of *Pseudomonas* Species in Field Samples Using an rpoD Amplicon Sequencing Methodology. mSystems **6**, 704-711. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00704-21>

Link H, Powelson V, Johnson KB (2002) Oomycetes. Plant Health Instr **45**, 246-252. <https://doi.org/10.18805/LR-4309>

Liu Y, Rzeszutek E, van der Voort M, Wu CH, Thoen E, Skaar I i sur. (2015) Diversity of aquatic *Pseudomonas* species and their activity against the fish pathogenic Oomycete *Saprolegnia*. Plos One **10**, 136-241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136241>

Liu CH, Chiu CH, Wang SW, Cheng W (2012) Dietary administration of the probiotic, *Bacillus*

*subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immun **33**, 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.012>

Lone SA, Manohar S (2018) *Saprolegnia parasitica*, a lethal oomycete pathogen: demands to be controlled. J Infect **6**, 36-44. <https://doi.org/10.17582/journal.jimb/2018/6.2.36.44>

Luis-Villaseñor, IE, Macías-Rodríguez ME, Gómez-Gil B, Ascencio-Valle F, Campa-Córdova ÁI (2011) Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Aquac **321**, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.036>

Makkonen J, Kokko H, Vainikka A, Kortet R, Jussila J (2014) Dose-dependent mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). J of Invertebr Pathol **115**, 86-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.009>

Miljanović A, Grbin D, Pavić D, Dent M, Jerković I, Marijanović Z i sur. (2021) Essential Oils of Sage, Rosemary, and Bay Laurel Inhibit the Life Stages of Oomycete Pathogens Important in Aquaculture. Plants **10**, 1676. <https://doi.org/10.3390/plants10081676>

Orlić K, Šver L, Burić L, Kazazić S, Grbin D, Maguire I i sur. (2021) Cuticle-associated bacteria can inhibit crayfish pathogen *Aphanomyces astaci*: Opening the perspective of biocontrol in astaciculture. Aquac **533**, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736112>

Pedersen L-F, Pedersen PB, Nielsen JL, Nielsen PH (2010) Long term/low dose formalin exposure to small-scale recirculation aquaculture systems. Aquac Eng **42**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736112>

Robertson PA, O'Dowd W, Burrells C, Williams P, Austin B (2000) Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquac **185**, 235–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00349-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00349-X)

Sakai M, Yoshida T, Atsuta S, Kobayashi M (1995) Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. J Fish Dis **18**, 187–190. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2761.1995.tb00276.x

Saticioglu I, Yardimci B, Altun S, Duman M (2021) A comprehensive perspective on a *Vagococcus salmoninarum* outbreak in rainbow trout broodstock. *Aquac* **54**, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737224>

Shinn AP, Picon-Camacho SM, Bawden R, Taylor NG (2009) Mechanical control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora) in a rainbow trout hatchery. *Aquac Eng* **41**, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.07.002>

Sun Q, Hu K, Yang X-L (2014) The Efficacy of Copper Sulfate in Controlling Infection of *Saprolegnia parasitica*. *J World Aquacult Soc* **45**, 220-225. <https://doi.org/10.1111/jwas.12113>

Tedesco P, Fioravanti ML, Galuppi R (2018) *In vitro* activity of chemicals and commercial products against *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia delica* strains. *J Fish Dis* **42**, 237-248. <https://doi.org/10.1111/jfd.12923>

Torto-Alalibo T, Tian M, Gajendran K, Waugh ME, van West P, Kamoun S (2005) Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiol* **5**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-46>

Unestam T (1965) Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*: I. Some Factors Affecting Growth in vitro. *Physiol Plantarum* **18**, 483–506. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06911.x>

Van Hai N, Buller N, Fotedar R (2009) The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Fish Shellfish Immun* **27**, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.004>

van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* **63**, 39-59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>

Vrålstad T, Håstein T, Taugbøl T, Lillehaug A (2006) Krepsepest - smitteforhold i norske

vassdrag og forebyggende tiltak mot videre spredning av krepsepest.  
<http://www.mattilsynet.no>. Pristupljeno 23. svibnja 2023.

Vukšić L (2022) Inhibicija uzročnika račje kuge, *Aphanomyces astaci* Schikora 1906, bakterijskim izolatima s kutikule rakova (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Wagner A, Norris S, Chatterjee P, Morris PF, Wildschutte H (2018) Aquatic Pseudomonads inhibit oomycete plant pathogens of *Glycine max*. *Front Microbiol* **9**, 1007.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01007>

Wakelin SA, Walter M, Jaspers M, Stewart A (2002) Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria. *Australas Plant Pathol* **31**, 401–407.  
<https://doi.org/10.1071/AP02051>

## Izjava o izvornosti

Ja MATILDA MAJERČAK-ŠKORLIĆ izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Matilda Majerčak-Škorlić*

Vlastoručni potpis