

Genske nakupine za proizvodnju sekundarnih metabolita u genomima bakterija iz roda *Pseudomonas*: identifikacija mehanizama inhibicije patogenih vodenih plijesni

Vasari, Karla

Master's thesis / Diplomski 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:159:909094>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Karla Vasari

**GENSKE NAKUPINE ZA
PROIZVODNJU SEKUNDARNIH
METABOLITA U GENOMIMA
BAKTERIJA IZ RODA
Pseudomonas: IDENTIFIKACIJA
MEHANIZAMA INHIBICIJE
PATOGENIH VODENIH PLIJESNI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku i Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Ane Bielen.

Rad je izrađen u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc, UIP-2017-05-6267) voditeljice izv. prof. dr. sc. Ane Bielen, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Jurici Žučku i izv. prof. dr. sc. Ani Bielen na svim savjetima, pristupačnosti, ugodnoj suradnji i velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentske dane.

Veliko hvala mojim roditeljima Silviu i Martini i sestri Lari na neizmjerne podršci i razumijevanju tijekom godina studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za bioinformatiku i Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

GENSKE NAKUPINE ZA PROIZVODNJU SEKUNDARNIH METABOLITA U GENOMIMA BAKTERIJA IZ RODA *Pseudomonas*: IDENTIFIKACIJA MEHANIZAMA INHIBICIJE PATOGENIH VODENIH PLIJESNI

Karla Vasari, univ. bacc. ing. biotechn., 0058215308

Sažetak: Patogene vodene plijesni *Aphanomyces astaci* i *Saprolegnia parasitica* uzročnici su velikih šteta u akvakulturi pa je potrebno razviti ekološki prihvatljive metode njihove kontrole. Cilj ovog rada bio je *in silico* metodama identificirati biosintetske genske nakupine (engl. *Biosynthetic Gene Clusters*, BGC) za proizvodnju sekundarnih metabolita u genomima bakterija iz roda *Pseudomonas*. Sekvencirano je devet genoma okolišnih *Pseudomonas* izolata, od kojih je za šest ranije utvrđeno da inhibiraju *A. astaci* i/ili *S. parasitica*, a tri nisu pokazivala inhibicijski učinak. Nakon sastavljanja i analize genoma odabrana su dva filogenetski srodna izolata, inhibitor *P. cerasi* PL3-3 i ne-inhibitor *P. syringae* AT16-2, za identifikaciju BGC-a. U oba genoma je identificirano najviše BGC-a za proizvodnju siderofora (3) i lipopeptidnih biosurfaktanata (2). Kod inhibitora su pronađeni BGC za proizvodnju siringolina A, secimida, peptida FR901228, ektoina i neidentificiranog NRP-a, a kod neinhibitora nisu pa se može pretpostaviti da su ovi spojevi ključni za inhibicijsku aktivnost izolata *P. cerasi* PL3-3.

Ključne riječi: *Aphanomyces astaci*, *Saprolegnia parasitica*, antiSMASH, biosintetske genske nakupine (engl. *Biosynthetic Gene Clusters*, BGC), *in silico* analize genoma

Rad sadrži: 47 stranica, 18 slika, 7 tablica, 100 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ana Bielen (član)
4. izv. prof. dr. sc. Janko Diminić (zamjenski član)

Datum obrane: 21. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Bioinformatics and Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS FOR THE PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES IN THE GENOMES OF *Pseudomonas* BACTERIA: IDENTIFICATION OF INHIBITION MECHANISMS OF PATHOGENIC WATER MOLDS

Karla Vasari, univ. bacc. ing. biotechn., 0058215308

Abstract: The pathogenic water moulds *Aphanomyces astaci* and *Saprolegnia parasitica* cause major losses in aquaculture, making it necessary to develop environmentally friendly control methods. The aim of this study was to identify *in silico* biosynthetic gene clusters (BGC) in the genomes of *Pseudomonas* bacteria that produce secondary metabolites. Nine genomes of *Pseudomonas* isolates were sequenced, six of which had previously shown an inhibitory effect on *A. astaci* and/or *S. parasitica* and three of which showed no inhibitory effect. After genome assembly and analysis, two phylogenetically related isolates, the inhibitor *P. cerasi* PL3-3 and the non-inhibitor *P. syringae* AT16-2, were selected for the identification of BGCs. In both genomes, most BGCs were identified for the production of siderophores (3) and lipopeptide biosurfactants (2). BGCs producing syringolin A, secimide, peptide FR901228, ectoine and unidentified NRP were found in the inhibitor but not in the non-inhibitor, suggesting that these compounds may be crucial for the inhibitory activity of the *P. cerasi* PL3-3 isolate.

Keywords: *Aphanomyces astaci*, *Saprolegnia parasitica*, antiSMASH, biosynthetic gene clusters (BGC), *in silico* genome analysis

Thesis contains: 47 pages, 18 figures, 7 tables, 100 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jurica, Žučko, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Ana, Bielen, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (president)
2. Jurica Žučko, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ana Bielen, PhD, Associate professor (member)
4. Janko Diminić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 21st, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Vodene plijesni (Oomycota)	3
2.2. Mogućnosti kontrole vodenih plijesni u akvakulturi	6
2.3. Razvoj biokontrole bolesti uzrokovanih vodenim plijesnima	8
2.4. Mehanizmi inhibicijskog djelovanja bakterija iz roda <i>Pseudomonas</i> na patogene vodene plijesni.....	11
2.5. Sekvenciranje i bioinformatička analiza genoma	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Korišteni mikroorganizmi.....	16
3.2. Izolacija genomske DNA, elektroforeza i sekvenciranje	17
3.3. Bioinformatička analiza.....	21
3.3.1. Sastavljanje i anotacija genoma	21
3.3.1.1. Učitavanje podataka sekvenciranja	22
3.3.1.2. Provjera kvalitete podataka sekvenciranja	23
3.3.1.3. <i>De novo</i> sastavljanje genoma.....	24
3.3.1.4. Anotacija	24
3.3.1.5. Filogenetsko stablo	24
3.3.2. AntiSMASH	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Optimizacija bioinformatičke analize.....	27
4.2. Karakteristike sastavljenih genoma	29
4.3. Filogenetska analiza izolata	30
4.4. Predikcija genskih nakupina za sintezu sekundarnih metabolita u genomima odabranih izolata iz roda <i>Pseudomonas</i>	32
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Patogene vodene plijesni (Oomycota) uzročnici su razornih bolesti koje dovode do velikih ekonomskih gubitaka u prehrambenoj industriji, uključujući jedan od najbrže rastućih prehrambenih sektora u svijetu, akvakulturu (Derevnina i sur., 2016). Vrsta *Saprolegnia parasitica* odgovorna je za velike štete u salmonidnoj akvakulturi jer uzrokuje saprolegniozu kod svih razvojnih stadija salmonidnih riba, poput lososa i pastrve, te drugih akvatičkih životinja (Songe, 2017). Značajne negativne učinke u slatkovodnim ekosustavima ima i vrsta *Aphanomyces astaci*, uzročnik bolesti račje kuge, koja je svrstana među 100 najgorih invazivnih stranih vrsta na svijetu zbog brzog širenja i štetnih učinaka na zavičajne europske populacije slatkovodnih rakova (OIE, 2017).

Metode koje se trenutno koriste za kontrolu patogenih vodenih plijesni u akvakulturi temelje se na uporabi kemikalija, poput formalina i bronopola koji su toksični za ljude, životinje i okoliš te ne predstavljaju dugoročno održiva rješenja (Pedersen i sur., 2010). Malahitno zelenilo je najučinkovitije sredstvo za suzbijanje oomicetnih patogena, no zbog svog teratogenog i kancerogenog učinka zabranjeno je za korištenje u zemljama Europske Unije (Lone i Manohar, 2018). Stoga se sve više istražuju ekološki prihvatljive metode kontrole oomicetnih patogena kao dobra alternativa kemikalijama u prevenciji i suzbijanju bolesti. Jedan od takvih pristupa je biokontrola primjenom bakterija prirodno prisutnih na ili u organizmu domaćina. U ranijim istraživanjima kao posebno potentni inhibitori pokazani su bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* (Fregeneda-Grandes i sur., 2023; Orlić i sur., 2021; González-Palacios i sur., 2019). Mehanizmi inhibicije patogenih oomiceta bakterijama iz roda *Pseudomonas* i njihovim produktima, odnosno sekundarnim metabolitima (poput hlapljivih organskih spojeva, lipopeptidnih biosurfaktanata i siderofora) u posljednje se vrijeme sve intenzivnije istražuju, no točan mehanizam kojim bakterije inhibiraju patogene je i dalje nepoznat (Grosse i sur., 2023; González-Palacios i sur., 2020; De Vrieze i sur., 2020; Ossowicki i sur., 2017; Hunziker i sur., 2015; Van der Voort i sur., 2015; Liu i sur., 2015; Hultberg i sur., 2010).

U ranijim istraživanjima provedenim u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama pokazano je kako su se neki vrlo srodni bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* značajno razlikovali u inhibicijskom učinku prema oomicetnim patogenima *A. astaci* i *S. parasitica* (Majerčak-Škorlić, 2023; Barišić i Pirović, 2022; Vukšić, 2022) što upućuje na značajne razlike u proizvodnji anti-oomicetnih sekundarnih metabolita kod

različitih bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas*, kao i na različite mehanizme otpornosti/osjetljivosti kod dvije modelne vrste patogenih oomiceta.

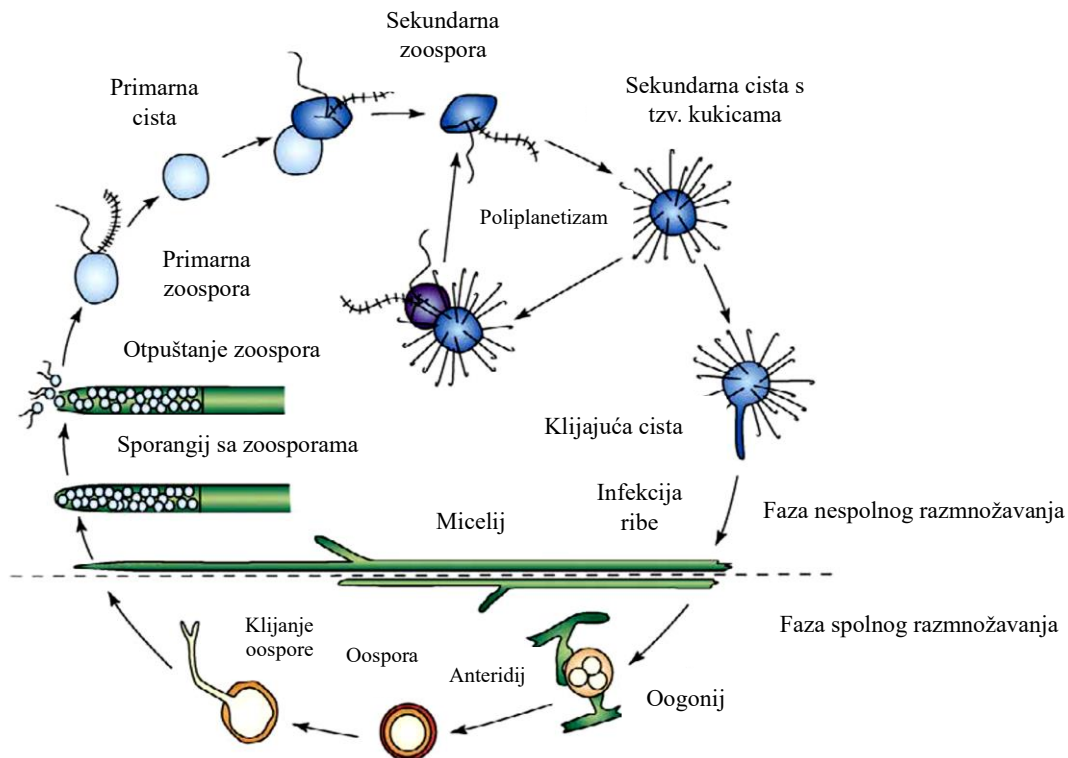
Stoga je cilj ovog rada bio *in silico* identificirati biosintetske genske nakupine za proizvodnju sekundarnih metabolita, potencijalnih inhibitora patogenih vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica* u genomima bakterija iz roda *Pseudomonas* porijeklom s različitih organa riba i rakova. U tu svrhu provedeno je sekvenciranje, *de novo* sastavljanje i anotacija devet genoma bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas*, od kojih je za šest ranije utvrđeno da inhibiraju rast micelija *A. astaci* i/ili *S. parasitica*, a tri nisu pokazivala inhibicijski učinak. Nakon toga je izrađeno filogenetsko stablo temeljem kojeg je odabran par srodnih izolata od kojih je jedan inhibitor, a drugi nema inhibicijski učinak na patogene vodene plijesni. Na ta dva izolata provedena je komparativna analiza genoma s ciljem pronalaska biosintetskih genskih nakupina za proizvodnju sekundarnih metabolita.

2. TEORIJSKI DIO

2.1.VODENE PLIJESNI (Oomycota)

Vodne plijesni (koljeno Oomycota) su eukariotski mikroorganizmi patogenog ili saprofitskog načina života. U prošlosti su svrstavani u carstvo gljiva zbog tvorbe micelija, hranjenja apsorpcijom i razmnožavanja putem spora. Danas se temeljem morfoloških i molekularnih značajki svrstavaju u kraljevstvo Chromista, zajedno s algama kremenjašicama i smeđim algama (OIE, 2017; Parr i sur., 2014). Za razliku od gljiva, vodene plijesni imaju stanične stijenke građene od polimera β -glukana i celuloze, jezgre vegetativnih stanica su diploidne te su im hife neseptirane odnosno bez pregrada (Kamoun, 2003).

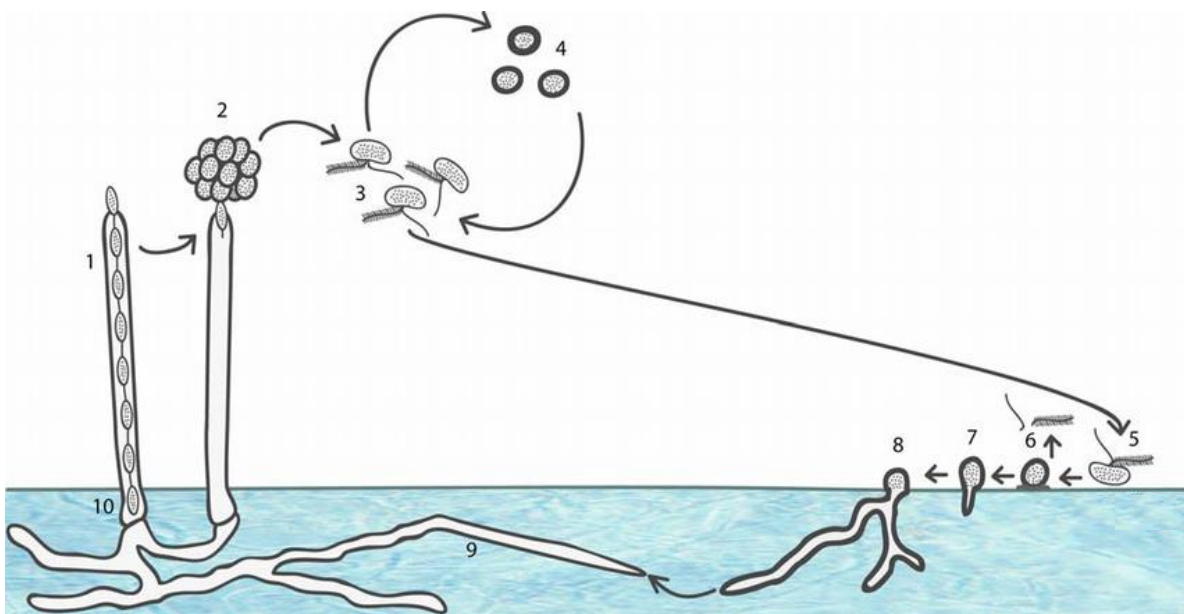
Životni ciklus većine vodenih plijesni, uključujući patogenu vrstu *Saprolegnia parasitica* sastoji se od nespolnog i spolnog dijela ciklusa (slika 1). U fazi spolnog razmnožavanja spajanjem muškog (anteridij) i ženskog (oogonij) haploidnog gametangija dolazi do oplodnje te nastaje diploidna oospora. Oospora je okružena čvrstom stijenkom koja ju štiti od nepogodnih vanjskih uvjeta, poput suše ili ekstremnih temperatura.



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

Kod nekih patogena iz skupine Oomycota, poput vrste *Aphanomyces astaci*, životni ciklus uključuje samo nespolno razmnožavanje te je ono odgovorno za razvoj bolesti kod podložnog domaćina (Lone i Manohar, 2018; Torto-Alalibo i sur., 2005) (slika 2). Nespolno

razmnožavanje započinje formiranjem sporangija iz specijalizirane hife, sporangiofora. Nedostatak hranjivih tvari ili nagli pad temperature mogu potaknuti oslobađanje zoospora iz sporangija, tj. sporulaciju (Van den Berg i sur., 2013). Zoospore su biflagelatne odnosno kreću se pomoću dva biča i omogućuju pronalaženje odgovarajućeg domaćina. Primarne zoospore su kratko aktivne i brzo se pretvore u primarnu cistu. Klijanjem primarne ciste nastaju sekundarne zoospore koje mogu ostati pokretne i do nekoliko dana zbog čega se smatraju glavnim infektivnim stadijem patogena. Kada sekundarna zoospora kemotaksijom pronade odgovarajućeg domaćina i dođe na površinu pogodnu za klijanje (poput kože ribe ili kutikule raka) odbacuje bičeve i pretvara se u sekundarnu cistu. Sekundarna cista proklije i hife prodiru u tkivo i unutrašnje organe domaćina što uzrokuje često smrtonosnu bolest. Kod vrste *A. astaci* do prodora hifa dolazi na oštećenim dijelovima ili mekim područjima kutikule raka, poput zglobova i abdominalnog dijela kutikule (Phillips i sur., 2008), a kod vrste *S. parasitica* na kožnim lezijama (Shin i sur., 2017). Ako sekundarne zoospore ne nađu pogodnog domaćina, pretvorit će se u nove sekundarne ciste koje onda mogu osloboditi nove sekundarne zoospore (Diéguez-Uribeondo i sur., 1994). Takva pojava ponavljanja tvorba cista i oslobađanja zoospora naziva se poliplanetizam i doprinosi patogenosti vodenih plijesni jer povećava vjerojatnost pronalaska domaćina (Songe, 2017; Philips i sur., 2008.; van West, 2006).

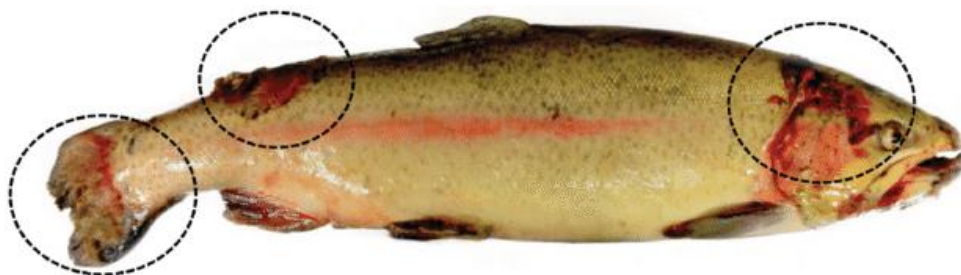


Slika 2. Životni ciklus vrste *Aphanomyces astaci*. Sporangij (1) proizvodi plivajuće biflagelatne zoospore (2, 3) koje se nakon nekoliko dana pretvore u ciste (4), a one ponovo u zoospore (pojava poliplanetizma). Ako zoospore kemotaksijom pronadu pogodnog domaćina (5) prelaze u oblik ciste (6), kličaju (7) te hife prodiru kroz kutikulu raka (8). Micelij se širi u organizmu domaćina (9) dok konačno ne dođe do smrti raka nakon čega se ponovo formiraju sporangiji (10) (Vrålstad i sur., 2011)

Patogene vodene plijesni uzrokuju razorne biljne i životinjske bolesti koje dovode do velikih ekonomskih gubitaka u akvakulturi i poljoprivredi diljem svijeta. Oomicetni patogeni biljaka koji uzrokuju najveće štete u poljoprivredi predstavnici su roda *Phytophthora* (Derevnina i sur., 2016). Primjerice, vrsta *Phytophthora infestans* uzrokuje plamenjaču krumpira, bolest koja je rezultirala velikom gladi sredinom 1840-ih u Irskoj te danas još uvijek predstavlja veliki problem u prehrambenoj industriji. Procjenjuje se da globalni gubici prinosa zbog ove bolesti premašuju tri milijarde funti godišnje, što *P. infestans* čini jednim od važnijih štetnika u globalnoj proizvodnji hrane (Walker i van West, 2007). Ostale značajne vrste su *P. palmivora*, uzročnik truleži crne mahune kakaovca (Perrine-Walker, 2020), patogen *P. ramorum*, uzročnik iznenadne smrti hrasta (Derevnina i sur., 2016), *P. cinnamomi*, patogen koji prijeti autohtonim šumama eukaliptusa u Australiji (Thines, 2018), i drugi.

Vodene plijesni patogene za životinje manje su istražene unatoč njihovim negativnim učincima u slatkovodnim ekosustavima. Oomicetni patogeni životinja uzrokuju velike gubitke u akvakulturi, jednom od najbrže rastućih prehrambenih sektora u svijetu kojim dominira uzgoj slatkovodnih riba. Uzgoj ribe i ribarstvo osigurava sredstva za život za oko 54,8 milijuna ljudi (Derevnina i sur., 2016). Najpoznatiji predstavnici oomicetnih patogena životinja pripadnici su rodova *Saprolegnia* i *Aphanomyces*.

Pripadnici roda *Saprolegnia*, među kojima je najvažnija vrsta *Saprolegnia parasitica*, uzrokuju bolest saprolegniozu kod različitih vrsta divljih i uzgojenih riba, uključujući salmonidne vrste kao što su atlantski losos, kalifornijska i potočna pastrva te nesalmonidne vrste poput grgeča, jegulje i soma (Songe, 2017). Osim riba ovi patogeni mogu zaraziti vodene kukce, rakove i žabe (Sarowar i sur., 2013). Osnovni simptom saprolegnioze su vidljive bijele ili sive nakupine vlaknastog micelija na površini kože i škrga inficiranih domaćina (slika 3). Primarna infekcija pojavljuje se na mjestima gdje je koža već ozlijeđena i širi se u unutrašnjost tijela naposljetku uzrokujući zatajenje organa i smrt. Osim odraslih jedinki bolest zahvaća i jaja. Micelij patogena najprije zahvaća mrtva ili neoplođena jaja te se potom brzo širi i na susjedna zdrava jaja što uzrokuje veliki problem u mrijestilištima (Lone i Manohar, 2018).



Slika 3. Kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) inficirana vrstom *Saprolegnia parasitica*. Mjesta infekcije i krvarenja su zaokružena (Shin i sur., 2017)

Osim saprolegnioze, značajnu prijetnju industriji akvakulture predstavlja bolest račja kuga uzrokovana patogenom *A. astaci* (Derevnina i sur., 2016). Ovaj patogen je zbog brzog širenja i štetnih učinaka na zavičajne europske populacije slatkovodnih rakova svrstan među 100 najgorih invazivnih stranih vrsta na svijetu (OIE, 2017; Lowe i sur., 2000; Alderman, 1996). Danas se njegovo širenje smatra jednim od glavnih uzroka smanjenja populacija autohtonih vrsta rakova u Europi. Glavni prijenosnici patogena su invazivni sjevernoamerički alohtoni rakovi koji su uglavnom otporni na infekciju (Maguire i sur, 2016; Makkonen i sur., 2012). Neki od simptoma bolesti su pojava smeđih ili crnih melaniziranih mrlja na kutikuli (slika 4), dnevna aktivnost, progresivna paraliza te otpadanje udova. Smrt nastupa unutar nekoliko dana ili tjedana od početka infekcije (DAWE, 2019).



Slika 4. Melanizirane mrlje na karapaksu (a) i na trbušnoj kutikuli (b) raka kao posljedica imunog odgovora jedinke na infekciju patogenom *A. astaci* (Vrålstad i sur., 2011)

2.2. MOGUĆNOSTI KONTROLE VODENIH PLIJESNI U AKVAKULTURI

Metode kontrole patogenih vodenih plijesni u akvakulturi temelje se na uporabi kemikalija koje su toksične za ljude, životinje i okoliš. Najučinkovitije sredstvo za suzbijanje oomicetnih patogena je malahitno zelenilo, no zbog svog teratogenog i kancerogenog učinka 2002. godine zabranjeno je za korištenje u zemljama Europske Unije (Lone i Manohar, 2018; Srivastava i sur., 2004). Malahitno zelenilo nije biorazgradivo pa se nakupljanjem u industrijskim otpadnim vodama u velikim koncentracijama dugo zadržavalo u okolišu te infiltriralo u hranidbeni lanac (Sharma i sur., 2023). U kontroli oomicetnih patogena u akvakulturi trenutno se koriste različite kemikalije, poput formalina, bronopola i bakrova sulfata, ali ni jedna od njih ne predstavlja dugoročno održivo rješenje (Pedersen i sur., 2010). Formalin, iako je vrlo koristan u industriji

akvakulture, uzrokuje potencijalno štetne promjene na koži ribe što je pokazano u istraživanju u kojem su kalifornijske pastrve tretirane formalinom imale znatno stanjenu epidermu (Sanchez i sur., 1998). Osim toga, formalin može inhibirati izlijeganje jaja i uzrokovati oštećenje tkiva ribe (Mert i sur., 2015; Akpoilih i Adebayo, 2011). Zbog svog kancerogenog učinka može negativno utjecati i na zdravlje radnika koji njime rukuju, ali i na zdravlje potrošača jer koncentracije formalina koje se mogu naći u mesu riba, rakova i školjkaša mogu uzrokovati iritaciju sluznice i čir na probavnom traktu (Tedesco i sur., 2019; Norliana i sur. 2009; Wooster i sur., 2005). Kao alternativa malahitnom zelenilu koristi se i bronopol (komercijalno poznat kao Pyceze) iako su produkti njegove razgradnje toksični za vodenu biotu (fitoplankton, zooplankton, ribe, školjkaši) i mogu se akumulirati u okolišu (Magara i sur., 2021; Tedesco i sur., 2019; Srivastav i Roy, 2016; Cui i sur. 2011). Neka istraživanja ukazuju da bi se bakrov sulfat mogao koristiti za suzbijanje vodenih plijesni u akvakulturi jer inhibira rast micelija i otpuštanje primarnih zoospora patogena *S. parasitica* (Sun i sur., 2014). No, s druge strane, bakrov sulfat je toksičan za beskralježnjake i alge i može uzrokovati povećanje akumulacije bakra u tlu. Nadalje, vodikov peroksid je u koncentracijama 0,5 – 1 g L⁻¹ vrlo učinkovit u suzbijanju infekcija uzrokovanim vrstama iz roda *Saprolegnia* u salmonidnim jajima, međutim, povećanje koncentracije u vodi smanjuje stopu izlijeganja jaja kod kalifornijske pastrve, *Oncorhynchus mykiss* (Caruana i sur., 2012). Isto tako, koncentracije peroctene kiseline u sredstvima koja se koriste za dezinfekciju ribičke opreme i opreme za lov rakova jer su učinkovite protiv patogena *A. astaci* mogu biti toksične za vodene organizme (Jussila i sur., 2014).

Zbog gore navedenih štetnih učinaka sve više se istražuju ekološki prihvatljive metode kontrole oomicetnih patogena (npr. Orlić i sur., 2021; Saito i Lal, 2019; Caruana i sur., 2012). Primjerice, u nedavnim je *in vitro* istraživanjima dokazan inhibicijski učinak eteričnih ulja lovora, kadulje i ružmarina te propolisa na micelij i zoospore patogena *A. astaci* i *S. parasitica* (Miljanović i sur., 2022; Miljanović i sur., 2021). Osim toga, u posljednje je vrijeme u više publikacija demonstriran potencijal bakterija iz roda *Pseudomonas* u biokontroli oomicetnih patogena (Grosse i sur., 2023; Orlić i sur., 2021; De Vrieze i sur., 2020; Hyder i sur., 2020; Liu i sur., 2015; Caruana i sur., 2012; Carbajal-González i sur., 2011).

2.3. RAZVOJ BIOKONTROLE BOLESTI UZROKOVANIH VODENIM PLIJESNIMA

Biokontrola ili biološka kontrola je metoda suzbijanja patogena ili bolesti primjenom živih organizama. Temelji se na činjenici da svaki štetnik ima prirodne neprijatelje ili hiperparazite. Primjerice, može se pretpostaviti da tijekom klijanja cista odnosno penetracije hifa patogenih oomiceta u organizam domaćina, patogen dolazi u kontakt s mikrobnim biofilmom kože/kutikule te sudjeluje u različitim vrstama ekoloških interakcija s prisutnim mikrobima, uključujući antagonizam. Sve više istraživanja ukazuje na učinkovito djelovanje bakterijskih izolata, prirodno prisutnih na ili u organizmu domaćina, u biokontroli bolesti domaćina (Sullam i Musa, 2021; Caruana i sur., 2012). Simbiotske mikrobne zajednice domaćina pojačavaju djelovanje imunskog sustava domaćina i na taj način ga dodatno štite od patogena, a mogu pokazivati i direktan antagonizam prema patogenu. U mnogim istraživanjima dokazano je inhibicijsko djelovanje bakterija izoliranih s kože nekih vodozemaca i riba prema gljivičnim i oomicetnim patogenima (Fregeneda-Grandes i sur., 2023; Orlić i sur., 2021; González-Palacios i sur., 2020; Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011; Lauer i sur., 2007; Harris i sur., 2006).

U posljednje se vrijeme sve više istražuje primjena biokontrola u akvakulturi, kao dobra alternativa kemikalijama u prevenciji i suzbijanju bolesti (Fregeneda-Grandes i sur., 2023; Benavent-Celma i sur., 2022; González-Palacios i sur., 2020; Kumar i sur., 2016; Liu i sur., 2015; Ravi i sur., 2007). Bolesti uzrokovane vodenim plijesnima također su u fokusu ovakvih pristupa. Na primjer, bakterijski izolati iz rodova *Alteromonas*, *Pseudomonas* i *Aeromonas* iz lezija kalifornijske pastrve učinkovito su inhibirali rast micelija *S. parasitica in vitro* (Hussein i Hatai, 2001; Petersen i sur., 1994). Nadalje, Fregeneda-Grandes i sur. (2023) testirali su inhibicijski učinak tri probiotika *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 i *Lactobacillus plantarum* CLFP3, inače učinkovitih u suzbijanju vibrioze ili laktokokoze, na patogen *S. parasitica* kod brancina i kalifornijske pastrve. Svi izolati su inhibirali rast micelija i klijanje cista te su smanjili prianjanje cista na kožnu sluz *in vitro*, ali niti jedan izolat nije pokazao inhibicijsko djelovanje *in vivo* nakon primjene dodatkom u vodu ili kroz hranu. Nadalje, u *in vivo* istraživanju bakterijski izolat H6 iz roda *Pseudomonas* smanjio je smrtnost jaja lososa uzrokovanu patogenom *Saprolegnia diclina* (Liu i sur., 2015). Također, Carbajal-González i sur. (2011) pokazali su kako bakterije izolirane s kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss* i potočne pastrve *Salmo trutta* L. mogu *in vitro* inhibirati rast micelija i klijanje cista patogena *S. parasitica*. Najveću inhibicijsku sposobnost su pokazali izolati koji su pripadali vrstama *Aeromonas piscicola*, *A. sobria*, *Pantoea agglomerans* i *Pseudomonas*

fluorescens. U nastavku istraživanja je dokazano da navedeni izolati nisu patogeni za kalifornijsku pastrvu *Oncorhynchus mykiss* te da mogu smanjiti adheziju zoospora i cista patogena *S. parasitica* na kožnu sluz (Carbajal-González i sur., 2013). Također, dva soja bakterije *Pseudomonas fluorescens*, LE89 i LE141, smanjila su infekciju uzrokovanu patogenom *S. parasitica* kod kalifornijske pastrve nakon što su bakterije dodane u spremnike s vodom (González-Palacios i sur., 2019).

Kako je vidljivo iz navedenih istraživanja, najčešće su kao potentni inhibitori oomicetnih patogena identificirani bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* (Orlić i sur., 2021; González-Palacios i sur., 2019; Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011). U ranijim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama testirano je *in vitro* inhibicijsko djelovanje većeg broja bakterijskih izolata porijeklom sa slatkovodnih riba i rakova prema oomicetnim patogenima *A. astaci* i *S. parasitica* (Majerčak-Škorlić, 2023; Barišić i Pirović, 2022; Vukšić, 2022; Orlić i sur., 2021). Među testiranim bakterijama također su se kao posebno potentni inhibitori pokazali izolati iz roda *Pseudomonas*, i to većinom iz grupe *fluorescens* (slika 5, tablica 1) (Majerčak-Škorlić, 2023; Vukšić, 2022). Inhibicijske aktivnosti testiranih izolata iz roda *Pseudomonas* općenito su bile puno jače prema patogenu *A. astaci* nego prema *S. parasitica*. Primjerice, ponekad je inhibicija prema *A. astaci* bila jako izražena, a prema *S. parasitica* je nije bilo (npr. *P. wadenswilerensis* P23). U nekim je slučajevima inhibicijski učinak određenog izolata bio izražen i prema *A. astaci* i prema *S. parasitica* (npr. *P. canadensis* AT20-2, *P. chlororaphis* PL2-2, *P. cerasi* PL3-3), ali je intenzitet inhibicije vrste *S. parasitica* ipak bio značajno slabiji (tablica 1). Nadalje, opaženo je da su se neki izolati koji su na razini sličnosti sekvence koja kodira za 16S rRNA vrlo srodni značajno razlikovali u inhibicijskom učinku prema patogenim oomicetima, primjerice inhibitori izolati *P. chlororaphis* PL2-2 i ne-inhibitorski izolati *P. chlororaphis* PL1-4 (tablica 1). Sve navedeno upućuje na značajne razlike u proizvodnji anti-oomicetnih sekundarnih metabolita kod različitih bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas*, kao i na različite mehanizme otpornosti/senzitivnosti kod dvije modelne vrste patogenih oomiceta. Stoga bi u daljnjim istraživanjima trebalo utvrditi mehanizme inhibicijskog djelovanja bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* prema patogenim vodenim plijesnima. Primjeri takvih istraživanja navedeni su u sljedećem poglavlju.

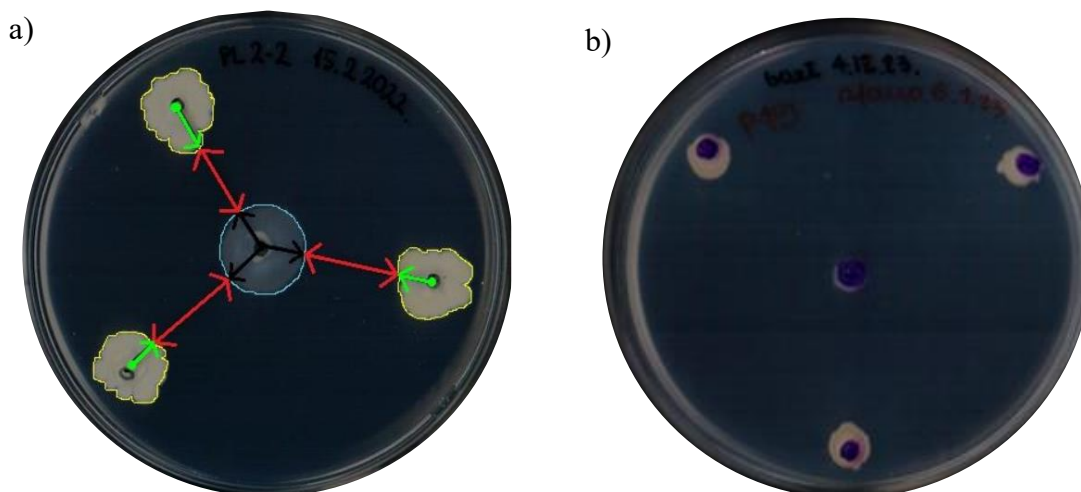
Tablica 1. Bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* analizirani u ovom radu i njihova inhibicijska aktivnost prema oomicetnim patogenima *A. astaci* i *S. parasitica* (Majerčak-Škorlić, 2023; Barišić i Pirović, 2022; Vukšić, 2022).

Šifra izolata	Domaćin	Organ	Identifikacija prema 16S rRNA sekvenci				Inhibicija <i>A. astaci</i>	Inhibicija <i>S. parasitica</i>	Izvor
			Rod	Grupa*	Podgrupa*	Vrsta**	Zona inhibicije (mm)	Zona inhibicije (mm)	
P19	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	koža	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>protegens</i>	<i>protegens</i>	25,50	2,47	Dr. Tobia Pretto
AT20-2	<i>Austropotamobius torrentium</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>fluorescens</i>	<i>canadensis</i>	21,12	10,91	projekt InteractOomyc
PL2-2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>chlororaphis</i>	<i>chlororaphis</i>	19,85	14,11	projekt InteractOomyc
P22	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>fluorescens</i>	<i>azotoformans</i>	17,85	0,95	Dr. Tobia Pretto
PL1-4	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	<i>chlororaphis</i>	<i>chlororaphis</i>	0,00	0,00	projekt InteractOomyc
P23	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	bubreg	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	-	<i>wadenswilerensis</i>	24,87	0,00	Dr. Tobia Pretto
P9	<i>Austropotamobius pallipes</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	-	<i>mosselii</i>	0,00	0,00	Dr. Tobia Pretto
PL3-3	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	-	<i>cerasi</i>	20,02	8,15	projekt InteractOomyc
AT16-2	<i>Austropotamobius torrentium</i>	kutikula	<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	-	<i>syringae</i>	0,00	0,00	projekt InteractOomyc

* Podjela na grupe i podgrupe unutar roda *Pseudomonas* određena je prema Lalucat i sur. (2020).

** Identifikacija vrste temelji se na najslabijoj vrsti u NCBI bazi podataka dobivenoj pretragom Blastn baze 16S rRNA sekvencom izolata (NCBI, 2023). Postotci identičnosti sekvence izolata sa najslabijom sekvencom u bazi bili su $\geq 99\%$.

Inhibitorski izolati (zona inhibicije ≥ 6 mm) označeni su crveno, a ne-inhibitorski zeleno (zona inhibicije < 6 mm).



Slika 5. Primjeri testova inhibicije rasta micelija *A. astaci*: (a) izolat *P. chlororaphis* PL2-2, (Vukšić, 2022), (b) izolat *P. protegens* P19 (rast micelija je u potpunosti zaustavljen) (Majerčak-Škorlić, 2023). Na slici (a) označena je zona rasta micelija *A. astaci* (plavo područje), promjer micelija u mm (crne strelice), zona rasta bakterijskih kolonija (žuto područje), promjer bakterijskih kolonija u mm (zelene strelice) i zona inhibicije, tj. udaljenost između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija u mm (crvene strelice) (Vukšić, 2022)

2.4. MEHANIZMI INHIBICIJSKOG DJELOVANJA BAKTERIJA IZ RODA *Pseudomonas* NA PATOGENE VODENE PLIJESNI

Mehanizmi inhibicije patogenih vodenih plijesni bakterijama i njihovim produktima u posljednje se vrijeme sve intenzivnije istražuju. Znatno više istraživanja provedeno je na biljnim oomicetnim patogenima, primjerice vrstama *Phytophthora infestans* (uzročnik plamenjače krumpira i rajčice) i *Globisporangium ultimum* (uzročnik opadanja i truljenja korijena kod preko 300 različitih vrsta biljaka), dok je inhibicijski učinak bakterija prema oomicetnim patogenima životinja slabo istražen. Jedan od glavnih mehanizama kojima bakterije djeluju antagonistički na oomicetne patogene je proizvodnja sekundarnih metabolita, odnosno bioaktivnih tvari, poput hlapljivih organskih spojeva (Ossowicki i sur., 2017; Hunziker i sur., 2015; De Vrieze i sur., 2015), lipopeptidnih biosurfaktanata (Van Der Voort i sur., 2015; Liu i sur., 2015; Hultberg i sur., 2010; De Souza i sur., 2003) i siderofora (Grosse i sur., 2023; De Vrieze i sur., 2020; Hyder i sur., 2020; Wagner i sur., 2018). U većini inhibicijski aktivnih izolata utvrđeno je više različitih bioaktivnih spojeva. Primjerice, u *de novo* sastavljenim genomima sojeva bakterija iz roda *Pseudomonas* koji su pokazali antagonistički potencijal prema oomicetnom patogenu *P. infestans* računalnim programom antiSMASH identificirani su

geni koji kodiraju za produkte koji sudjeluju u sintezi organskih spojeva fenazina, pirolnitrina i 2-heksil, 5-propil rezorcinola, hlapljivog spoja cijanovodika te siderofora piocina (De Vrieze i sur., 2020). U istraživanju Hyder i sur. (2020) svi testirani sojevi bakterija iz roda *Pseudomonas* značajno su suzbili infekciju uzrokovanu patogenom *Phytophthora capsici* kod paprike (*Capsicum annum* L.) te je biokemijskom analizom utvrđeno da su svi sojevi bili pozitivni na cijanovodik, proizvodnju katalaze i proizvodnju indol-3-octene kiseline, a najveći postotak proizvodnje siderofora zabilježen je kod soja bakterije *Pseudomonas putida*.

Neka istraživanja su pokazala kako siderofori, mali spojevi s visokim afinitetom vezanja za željezo, poboljšavaju antimikrobnu aktivnost bakterija na temelju kompeticije za željezo s patogenom. Grosse i sur. (2023) otkrili su da bakterija *Pseudomonas* NCIMB 10586 proizvodi dva siderofora, mupirocelin i triabaktin, te u uvjetima s ograničenim izvorom željeza inhibira rast patogena *G. ultimum* MUCL 38045. U nedavnom istraživanju analizirani su različiti mehanizmi djelovanja dva bakterijska izolata *Pseudomonas fluorescens* koji su se pokazali korisnim u biokontroli saprolegnioze kod kalifornijske pastrve. Utvrđeno je da je inhibicijsko djelovanje ovih izolata povezano s proizvodnjom siderofora (González-Palacios i sur., 2020).

Nadalje, bakterije luče hlapljive organske spojeve (engl. *volatile organic compounds*, VOC) koji mogu inhibirati rast hifa, stvaranje i klijanje sporangija, te proizvodnju, pokretljivost i klijanje zoospora. Primjerice, pročišćeni spoj 1-undecen iz smjese VOC-a proizvedenih uglavnom bakterijama iz roda *Pseudomonas* izoliranih s krumpira inhibirao je rast micelija, stvaranje sporangija i oslobađanje zoospora patogena *P. infestans* (Hunziker i sur., 2015). Također, testirana je i anti-oomicetna aktivnost pojedinačnih komponenti iz smjese VOC-a koje sadrže sumpor: S-metil metantiosulfonat (MMTS), dimetiltrisulfid (DMTS), dimetildisulfid (DMDS), bis(metiltiometil) sulfid (BMTMS) i S-metil butantioat (SM). Skoro svi spojevi su inhibirali rast micelija patogena *P. infestans in vitro*, a MMTS je pokazao najveći inhibicijski učinak. Tretiranje velikim koncentracijama MMTSa uzrokovalo je liziranje zoospora, a DMDS, DMTS i MMTS inhibirali su njihovu pokretljivost (De Vrieze i sur., 2015). Ossowicki i sur. (2017) su dokazali da proizvodnja VOC-a (dimetil sulfid, S-metil tioacetat, metil tiocijanat, dimetil trisulfid, 1-undecan i HCN) snažnog antioomicetnog djelovanja kod bakterijskog izolata *Pseudomonas donghuensis* P482 ovisi o regulatornom sustavu GacS/GacA. Pokazano je da navedeni hlapljivi spojevi imaju važnu ulogu u supresiji patogena jer je *gacA* mutant u potpunosti izgubio sposobnost inhibicije rasta patogena *Pythium ultimum*.

U nekoliko je istraživanja utvrđeno da lipopeptidni surfaktanti također imaju antioomicetno djelovanje. Van der Voort i sur. (2015) proveli su *in silico* funkcionalnu analizu genoma bakterijskog izolata *Pseudomonas* SH-C52 izoliranog sa šećerne repe te identificirali šest

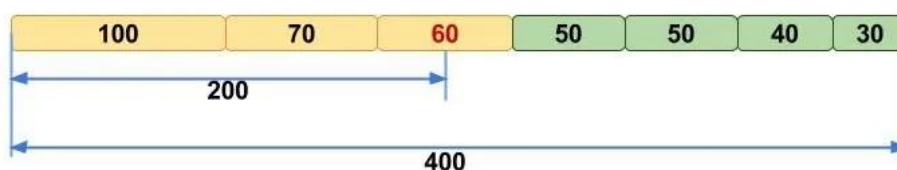
nakupina gena za neribosomalnu peptid sintetazu (engl. *non-ribosomal peptide synthetase*, NRPS), uključujući NRPS nakupine za proizvodnju lipopeptida tanamicina i brabantamida. Brabantamid A pokazao je antioomicetnu aktivnost i stimulacijski učinak na aktivnost fosfolipaze D koja potiče prelazak iz zoospora u ciste kod patogena *Phytophthora infestans*. Masenom spektrometrijom identificiran je treći spoj tanapeptin i njegovih sedam strukturnih varijanti s različitim stupnjevima antioomicetne aktivnosti. Hultberg i sur. (2010) testirali su inhibicijski potencijal biosurfaktanta kojeg proizvodi bakterija *Pseudomonas koreensis* prema oomicetnom patogenu *Pythium ultimum*, te su ga dodavali kao sirovi ekstrakt tijekom hidroponskog uzgoja rajčice. Primijećeno je značajno smanjenje bolesti, a dodatak biosurfaktanta nije utjecao na autohtonu mikrofloru korijena rajčice. Kemijskom analizom biosurfaktanta metodom elektrosprej ionizacijske masene spektrometrije (engl. *electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MSMS) identificiran je ciklički lipopeptid lokisin. U istraživanju Liu i sur. (2015) metodom masene spektrometrije određeno je da soj H6 bakterije *Pseudomonas fluorescens* proizvodi lipopeptidni surfaktant sličan viskozinu. Ovaj biosurfaktant inhibirao je rast micelija patogena *Saprolegnia diclina in vitro*, ali nije uočena značajna zaštita jaja lososa od saprolegnioze *in vivo*.

2.5. SEKVENCIRANJE I BIOINFORMATIČKA ANALIZA GENOMA

Sekvenciranje genoma važan je korak u uspostavljanju povezanosti genotipa s fenotipskim svojstvima. Tehnologije sekvenciranja podijeljene su u tri generacije. Sekvenciranje prve generacije ili Sangerovo sekvenciranje bilo je temelj za razvoj tehnologija sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) koje su prevladale neka od ograničenja Sangerovog sekvenciranja, poput male brzine i niske propusnosti (Verma i sur., 2017). NGS je podijeljeno na temelju duljine čitanja u tehnologije kratkog čitanja, odnosno tehnologije druge generacije i tehnologije dugog čitanja, tj. tehnologije treće generacije. Tehnologije sekvenciranja druge generacije pružaju visoku točnost ograničenu duljinom čitanja, dok tehnologije treće generacije pružaju puno dulja očitavanja nauštrb točnosti. Zajednička značajka tehnologija kratkog čitanja je masovno sekvenciranje kratkih (25-800 bp, najčešće oko 300 pb), kloniranjem umnoženih DNA molekula, pri čemu se milijuni pojedinačnih reakcija sekvenciranja odvijaju paralelno. Jedan od najčešće korištenih pristupa sekvenciranja kratkog čitanja je tehnologija Illumina, a temelji se na sekvenciranju sintezom (engl. *sequencing by synthesis*, SBS) koje uključuje ugradnju nukleotida, ovisnu o DNA-polimerazi, u rastući lanac DNA. Illumina tehnologija omogućava sekvenciranje sparenih

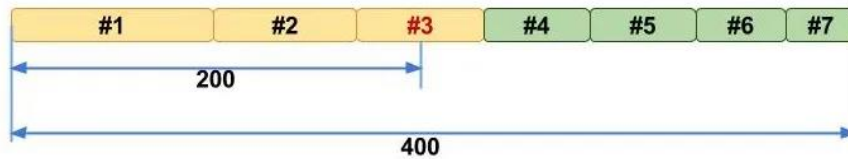
krajeva (engl. *paired-end sequencing*), odnosno sekvenciranje s oba kraja fragmenta DNA čime se dobivaju visokokvalitetni podaci o sekvencama s velikom pokrivenošću i očitanim slijedom skoro dvostruko duljim od jednostrukog očitavanja. Illumina sekvenciranje sparenih krajeva generira dvije FASTQ datoteke što je specifično za Illumina platformu (Hu i sur., 2021). U ovom radu genomi bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* sekvencirani su Illumina tehnologijom pomoću NovaSeq uređaja.

Nakon sekvenciranja bioinformatička analiza uključuje sastavljanje i anotaciju genoma, a u ovom radu je provedena u platformi KBase (engl. *The Department of Energy Systems Biology Knowledgebase*). KBase je softverska i podatkovna znanstvena platforma dizajnirana s ciljem da istraživačima, biolozima i bioinformatičarima omogući predviđanje i dizajniranje bioloških funkcija iz digitalnih bioloških podataka. Korisnicima omogućuje učitavanje podataka s različitih platformi sekvenciranja. KBase sadrži razne aplikacije za *de novo* sastavljanje genoma među kojima se najčešće koriste SPAdes i Velvet. Sastavljanje genoma predstavlja sklapanje sekvenci/čitanja NGS-a u kontige (engl. *contig*), skupove sekvenci DNA koje se međusobno preklapaju i zajedno čine regiju genoma (NIH, 2023). Nakon provođenja sastavljanja genoma potrebno je provesti analizu kvalitete sastavljanja svakog seta kontiga, odnosno genoma kako bi se usporedile izvedbe različitih aplikacija. Rezultat aplikacija SPAdes i Velvet je set kontiga čija se kvaliteta definira parametrima koje računa QUAST (engl. *Quality Assessment Tool*) aplikacija, poput broja kontiga, N50 i L50 vrijednosti, udjela gvanina i citozina (broj gvanina i citozina podijeljen s ukupnim brojem nukleotida u genomu), duljine najduljeg kontiga, broja nepozvanih baza, odnosno nepodudaranja (engl. *mismatches*, N) i broja predviđenih gena. N50 vrijednost dobiva se tako da se kontigi poredaju od najduljeg prema najkraćem te se njihove duljine zbrajaju dok se ne dobije 50 % ukupne duljine sastavljenog genoma kao što je prikazano na slici 6. N50 je vrijednost duljine prvog najkraćeg kontiga čiji zbroj s dužim kontigima je duži od 50 % ukupne duljine sastavljenog genoma te pokazuje je li genom pretežno sastavljen od duljih (veći broj N50) ili kraćih kontiga (manji broj N50).



Slika 6. Shematski prikaz računanja N50 vrijednosti za set od sedam kontiga (poredanih od najduljeg (100 kbp) prema najkraćem (30 kbp)). N50 vrijednost u ovom primjeru iznosi 60 kbp (Videvall, 2017)

L50 označava broj X najduljih kontiga čiji je zbroj duljina jednak ili veći od 50 % ukupne duljine sastavljenog genoma (slika 7). Dakle, kvalitetnije sastavljeni genom će imati nižu L50, a veću N50 vrijednost, manji broj kontiga i N-ova.



Slika 7. Shematski prikaz računanja L50 vrijednosti za set od sedam kontiga (poredanih od najduljeg (#1) prema najkraćem (#7)). L50 vrijednost iznosi tri (Videvall, 2017)

Sljedeći korak u bioinformatičkoj analizi je anotacija genoma, odnosno proces identifikacije i označavanja različitih dijelova genoma, uključujući gene, regulatorne elemente, ponavljanja i druge značajne karakteristike koje imaju biološke funkcije. U KBase-u anotaciju genoma bakterija moguće je provesti u aplikacijama RAST (Annotate Genome/Assembly with RASTtk - v1.073) i Prokka (Annotate Assembly and Re-annotate Genomes with Prokka - v1.14.5) koje generiraju podatke o ukupnom broju gena, broju gena koji kodiraju za proteine i o prosječnoj duljini predviđenih proteina (Arkin i sur., 2018).

S obzirom da je jedan od glavnih mehanizama kojima bakterije djeluju antagonistički na oomicetne patogene proizvodnja sekundarnih metabolita, daljnja analiza genoma u ovom radu bila je usmjerena na identifikaciju genskih nakupina za sintezu sekundarnih metabolita računalnim programom antiSMASH (engl. *antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*). AntiSMASH identificira nakupine biosintetskih gena (engl. *Biosynthetic Gene Clusters*, BGC) na temelju profila skrivenih Markovljevih modela gena (engl. *profile Hidden Markov Models*, pHMMs) koji su specifični za određene vrste genskih nakupina. BGC često sadrže sve gene potrebne za biosintezu jednog ili više prirodnih proizvoda (engl. *Natural Products*, NP), odnosno sekundarnih metabolita. Algoritmi ClusterBlast i ClusterCompare uspoređuju kontige koji sadrže nakupine gena iz antiSMASH baze podataka i kontige s pripadajućim genskim nakupinama iz analiziranog genoma (Blin i sur., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KORIŠTENI MIKROORGANIZMI

U ovom istraživanju korišteno je devet bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* porijeklom s različitih organa riba i rakova. Izolati su navedeni u tablici 1 te su odabrani prema prethodnim rezultatima *in vitro* testiranja inhibicijskog potencijala koji se temelje na ko-kultivaciji bakterijskih izolata i oomicetnih patogena na krutom hranjivom mediju te mjerenju zone inhibicije, odnosno udaljenosti između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija patogena *A. astaci* odnosno *S. parasitica* (slika 5) (Majerčak-Škorlić, 2023; Barišić i Pirović, 2022; Vukšić, 2022). Šest izolata (P19, P22, P23, PL2-2, PL3-3, AT20-2) odabrano je zbog snažnog inhibicijskog djelovanja na rast micelija oomicetnih patogena (zona inhibicije ≥ 6 mm). Preostala tri izolata (P9, PL1-4, AT16-2) odabrana su kao kontrola, odnosno prema analizi gena koji kodira za *16S* rRNA su bili filogenetski srodni izolati koji nisu pokazali inhibicijsko djelovanje (zona inhibicije = 0 mm), kako je vidljivo iz tablice 1.

Bakterije su uzgajane na PG1 krutoj hranjivoj podlozi (tablica 2; Unestam, 1965) na 21 °C, precjepljivane u sterilnim uvjetima u laminaru i čuvane u 30 %-tnom glicerolu na -80 °C. Za pripremu PG1 podloge (Unestam, 1965) pripremljeno je pet otopina sastava prikazanog u tablici 2. Navedene otopine su sterilizirane autoklaviranjem pri 121 °C kroz 20 min te potom ohlađene na 45 °C. Nakon toga otopine su pomiješane točno određenim redoslijedom kako ne bi došlo do zamućivanja 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 2. Sastav otopina potrebnih za pripremu PG1 krute hranjive podloge (Unestam, 1965)

Otopina	Priprema otopine	Volumen potreban za pripremu 1 L 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

Tablica 2. Sastav otopina potrebnih za pripremu PG1 krute hranjive podloge (Unestam, 1965)
- nastavak




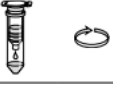
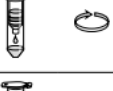


Otopina	Priprema otopine	Volumen potreban za pripremu 1 L podloge
Otopina soli	Odvagati 1,70 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O (J. T. Baker), 1,45 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck), 0,20 g FeCl ₃ x 6 H ₂ O (Merck), 3,70 g KCl (J. T. Baker) i 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (Merck) i otopiti u 1000 mL destilirane vode	100 mL
Fosfatni pufer, pH 7	Pripremiti otopine A; 9,5 g/L Na ₂ HPO ₄ (Merck) i B; 9,2 g/L NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ 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. IZOLACIJA GENOMSKE DNA, ELEKTROFOREZA I SEKVENCIRANJE

S ciljem uzgoja biomase za izolaciju genomske DNA izolata, u laminaru je sterilno nacičepjeno po 100 µL glicerolske matične suspenzije svakog izolata na PG1 krutu hranjivu podlogu i inkubirano na sobnoj temperaturi preko noći. Porasla biomasa je sastrugana s podloge i resuspendirana u 1,5 mL fiziološke otopine (0,9 % NaCl). Ukupna genomska DNA izolirana je komercijalnim kompletom *NucleoSpin Microbial DNA Mini kit for genomic DNA from microorganisms* (Macherey Nagel), slijedeći upute proizvođača. Stanice su lizirane Macherey-Nagel kuglicama tipa B vorteksiranjem na uređaju Corning® LSE™ u trajanju 4 – 12 minuta pri srednjoj jačini (slika 8).

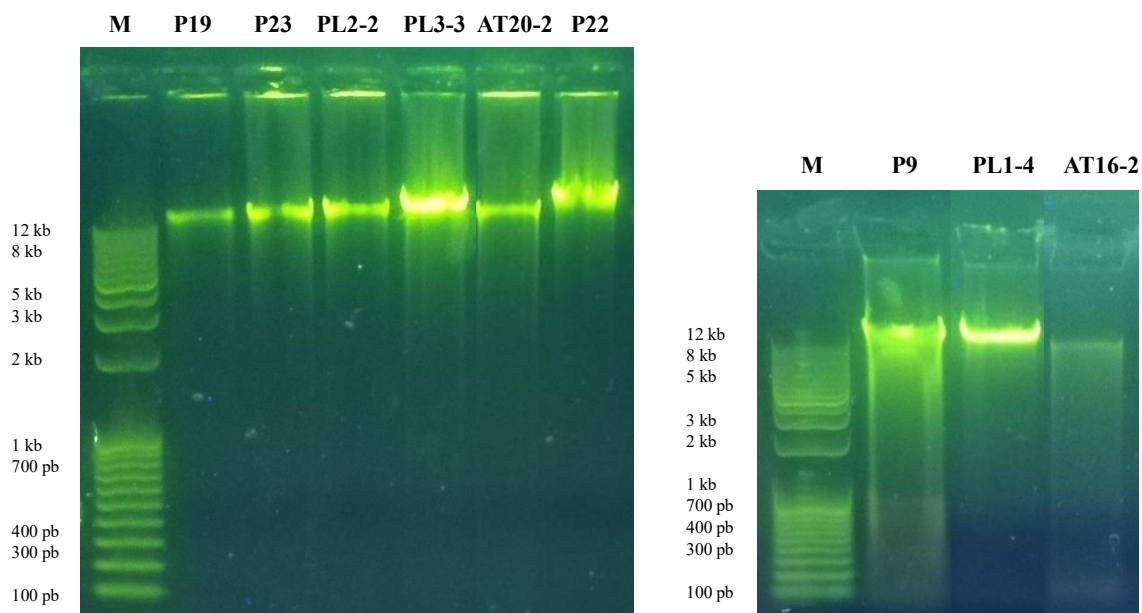
Izolacija genomske DNA iz mikroorganizama

Protokol (Rev. 06)

NucleoSpin® Microbial DNA		
1		< 40 mg mokre biomase 100 µL elucijskog pufera BE
2		Prebaciti uzorak u MN tubicu tipa B 40 µL pufera MG 10 µL tekuće proteaze K Vorteksirati srednjom jačinom 4–12 min 11,000 x g, 30 s
3		600 µL pufera MG Vorteks 3 s 11,000 x g, 30 s
4		Staviti 500-600 µL uzorka na NucleoSpin® Microbial DNA kolonu 11,000 x g, 30 s
5		1st 500 µL BW 11,000 x g, 30 s 2nd 500 µL B5 11,000 x g, 30 s
6		11,000 x g, 30 s
7		100 µL elucijskog pufera BE RT, 1 min 11,000 x g, 30 s

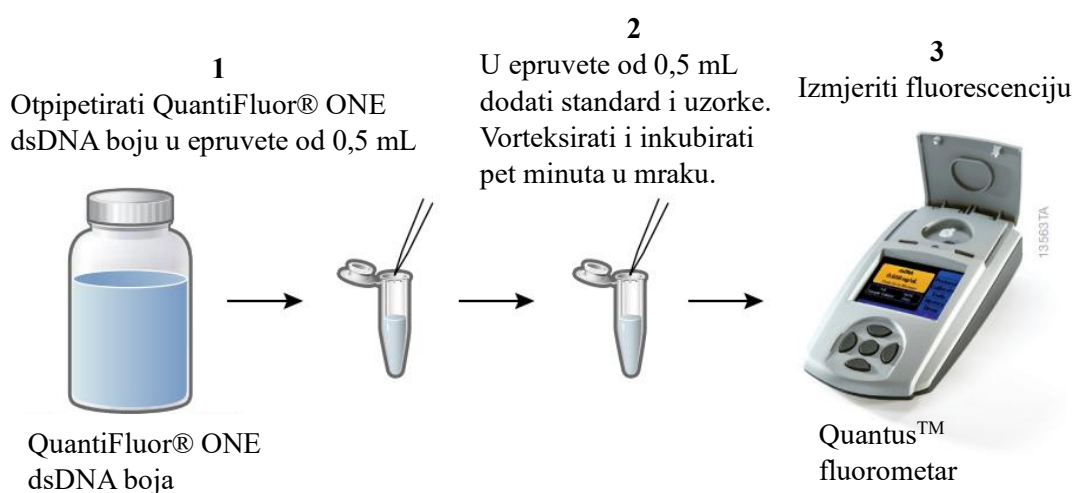
Slika 8. Postupak izolacije ukupne genomske DNA komercijalnim kompletom *NucleoSpin Microbial DNA Mini kit for genomic DNA from microorganisms* (Macherey Nagel)

Uspješnost izolacije genomske DNA provjerena je elektroforezom. Za pripremu 1 %-tnog agaroznog gela otopljeno je 0,8 g agaroze (Sigma-Aldrich) u 80 mL TAE-pufera (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 agarozna otopila te joj je nakon hlađenja na 60 °C dodana boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza). Ova fluorescentna 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 (Lonza). Molekule DNA razdvojene su u električnom polju napona 100 V u TAE-puferu kroz 45 minuta koristeći aparaturu za elektroforezu te su potom vizualizirane pod UV-svjetlom (UVIpure, UVITEC Cambridge) i fotografirane (slika 9). Očekivano, dobivene vrpce genomske DNA putuju sporije od najveće vrpce molekularnog biljega (> 12 kpb).



Slika 9. Rezultati uspješne izolacije genomske DNA (5 μ L). M označava molekularni biljeg (SimplyLoad Tandem DNA ladder)

Koncentracija DNA izmjerena je QuantusTM fluorometrom (Promega) prateći protokol proizvođača (slika 10, tablica 3). Dobivene koncentracije DNA iznosile su 22 – 287 ng μ L⁻¹, odnosno bile zadovoljavajuće za sljedeći korak sekvenciranja (tablica 4).



Slika 10. Postupak kvantifikacije dsDNA (engl. *double stranded DNA*, dvolančana DNA) pomoću QuantusTM fluorometra

Tablica 3. Priprema otopina za određivanje koncentracije DNA prema protokolu proizvođača

Slijepa proba	Standard	Uzorak
200 μL QuantiFluor® ONE dsDNA boje	1 μL QuantiFluor® ONE Lambda DNA standard + 200 μL QuantiFluor® ONE dsDNA boje	1 μL uzorka + 200 μL QuantiFluor® ONE dsDNA boje

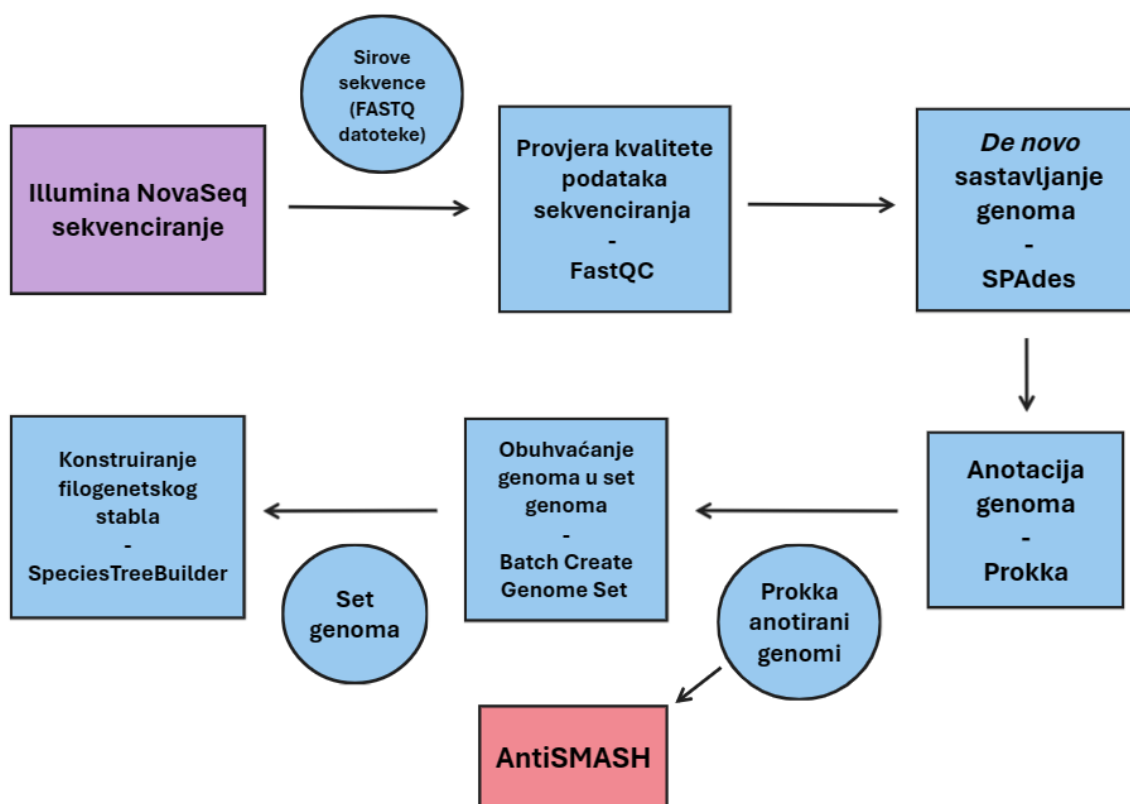
Tablica 4. Koncentracije DNA izmjerene Quantus™ fluorometrom

Uzorak	Koncentracija ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)
P19	22
P22	181
P23	58
PL2-2	138
PL3-3	191
AT20-2	75
P9	287
PL1-4	215
AT16-2	17

Sekvenciranje DNA provedeno je u komercijalnom servisu Microsynth (Austrija). Korištena je metoda sekvenciranja sparenih krajeva (engl. *paired-end sequencing*) pomoću Illumina NovaSeq uređaja. Fragmenti genomske DNA uzorka korišteni su za izradu TruSeq DNA Nano knjižnice te zatim sekvencirani Illumina NovaSeq platformom, prateći standardni protokol proizvođača za sekvenciranje sparenih krajeva.

3.3. BIOINFORMATIČKA ANALIZA

Bioinformatička analiza podataka sekvenciranja provedena je u bioinformatičkoj platformi KBase s ciljem sastavljanja i anotacije genoma bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* (Poglavlje 3.3.1.). Osim toga, izrađeno je filogenetsko stablo kako bi se utvrdila srodnost analiziranih izolata. Na temelju dobivenog stabla odabran je par srodnih bakterijskih izolata od kojih jedan snažno inhibira patogene oomicete *A. astaci* i *S. parasitica* (*P. cerasi* PL3-3), a drugi ne pokazuje inhibicijsko djelovanje (*P. syringae* AT16-2). Njihovi su genomi analizirani računalnim programom antiSMASH (engl. *antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*) s ciljem pronalaska genskih nakupina koje kodiraju za enzime koji sudjeluju u biosintezi sekundarnih metabolita odnosno potencijalnih inhibitora patogenih vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica* (Poglavlje 3.3.2.). Primijenjeni koraci bioinformatičke analize, optimizirani temeljem testiranja više aplikacija, prikazani su shematski na slici 11.



Slika 11. Shematski prikaz koraka bioinformatičke analize. Plavom bojom su označeni koraci analize provedeni u KBase platformi. Okruglim oblikom su označeni rezultati pojedinih koraka analize

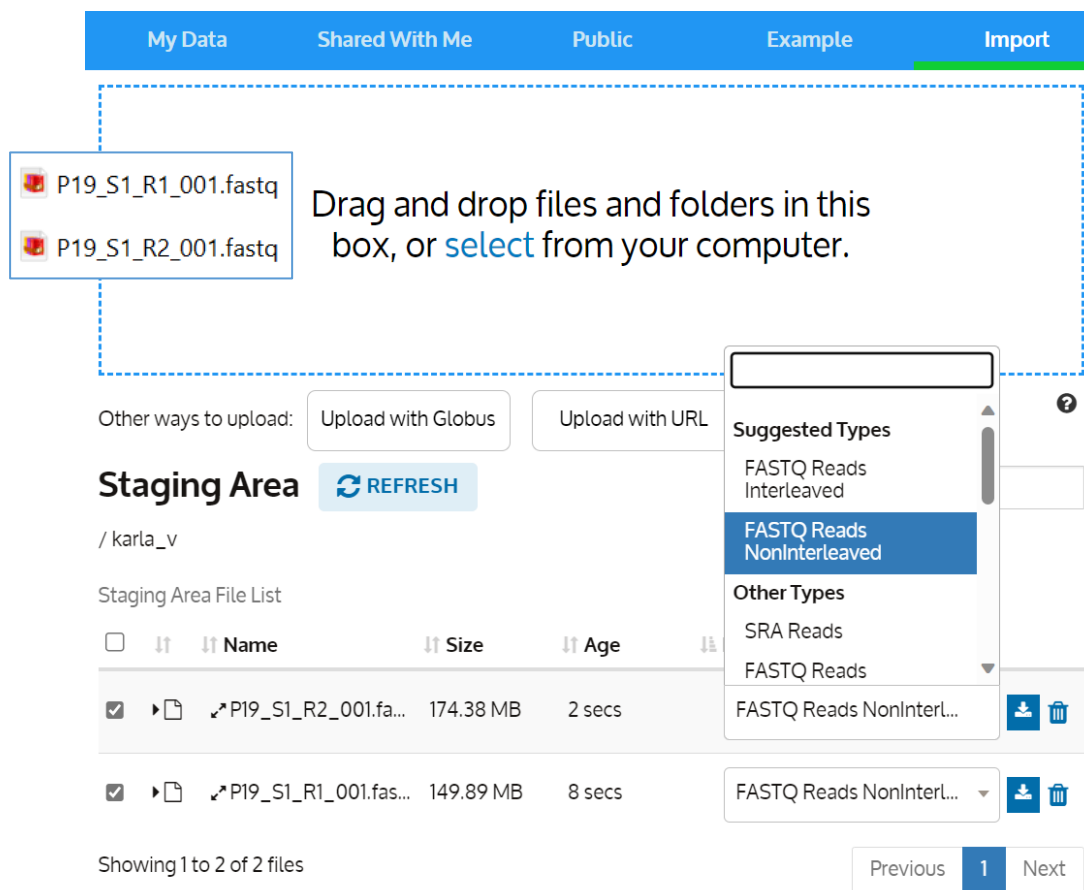
3.3.1. Sastavljanje i anotacija genoma

Podaci sekvenciranja genoma devet bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* (tablica 1) preuzeti su s poslužitelja tvrtke Microsynth te su obrađeni u KBase (Arkin i sur., 2018).

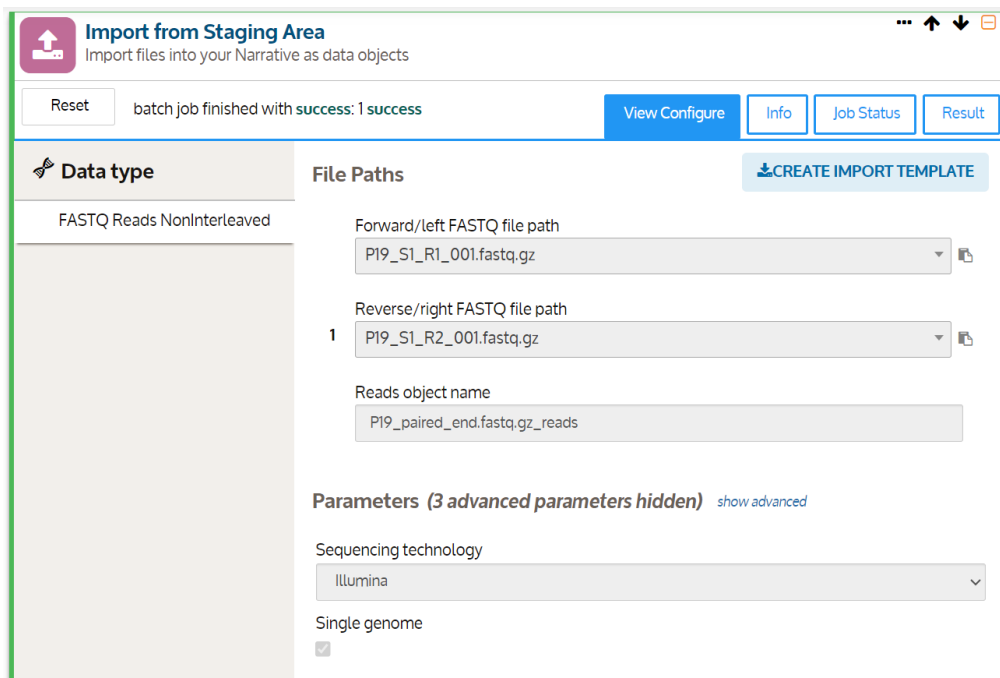
Sekvence izolata *P. protegens* P19 i izolata *P. chlororaphis* PL1-4 odabrane su za testiranje i usporedbu alata na temelju čega je procijenjen optimalan alat za daljnje analize. Kvaliteta podataka dobivenih sekvenciranjem provjerena je pomoću FastQC aplikacije (Poglavlje 3.3.1.2.). Sekvence su sastavljene *de novo* pomoću dvije KBase aplikacije SPAdes i Velvet (Poglavlje 3.3.1.3.), a za anotaciju genoma testirane su aplikacije Prokka i RAST (Poglavlje 3.3.1.4.). Na kraju je konstruirano filogenetsko stablo programom FastTree 2 (Poglavlje 3.3.1.5.).

3.3.1.1. Učitavanje podataka sekvenciranja

Sirovi podaci sekvenciranja nalaze se u obliku datoteka u FASTQ formatu koje se učitavaju u radnu površinu KBase-a kao *interleaved* ili *noninterleaved* datoteke. *Interleaved* datoteke su tip FASTQ datoteke u kojoj su zajedno pohranjena R1 i R2 očitavanja, a *noninterleaved* označava R1 i R2 očitavanja kao zasebne datoteke. U ovom slučaju, jedna je datoteka odgovarala očitanim sljedovima nukleotida u prednjem (engl. *forward*, R1) načinu čitanja, a druga u stražnjem (engl. *reverse*, R2) načinu čitanja pa su datoteke učitane u radnu površinu (engl. *Staging area*) KBase-a klikom na opciju FASTQ Reads NonInterleaved, pri čemu je stvoren objekt u narativu koji sadrži FASTQ sljedove prednjeg i stražnjeg očitavanja (slika 12 i 13).



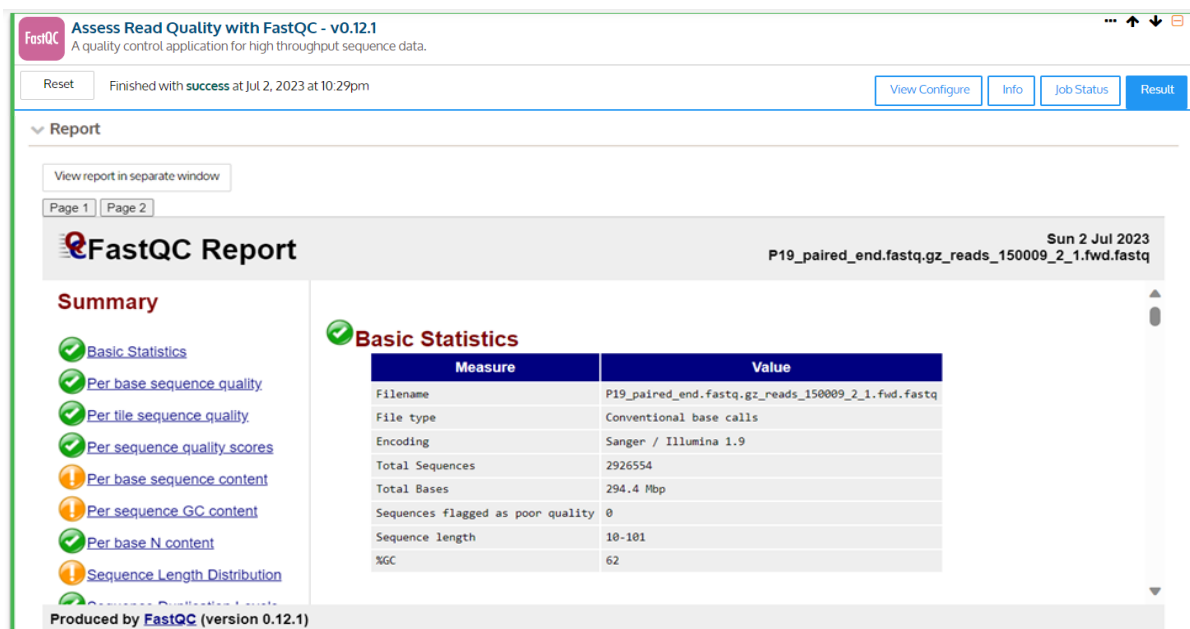
Slika 12. Postupak učitavanja FASTQ datoteka u KBase radnu površinu



Slika 13. Forma za učitavanje datoteka iz radne površine

3.3.1.2. Provjera kvalitete podataka sekvenciranja

Kvaliteta produkata sekvenciranja utvrđena je pomoću FastQC aplikacije. Rezultat FastQC analize je izvješće u HTML (engl. *Hyper Text Markup Language*) formatu koje se sastoji od grafičkog prikaza i statističkih podataka. Za knjižnicu očitanih sekvenci sa sparenim krajevima (engl. *paired-end read library*), prva stranica izvješća prikazuje rezultate za prednje (engl. *forward*) sljedove nukleotida, a druga stranica prikazuje rezultate za stražnje (engl. *reverse*) sljedove nukleotida (slika 14).



Slika 14. Prikaz izvješća FastQC aplikacije

U sažetku izvješća prikazani su parametri koji su bitni za procjenu kvalitete sekvenciranja. Zeleni simbol označava dobru kvalitetu očitanih sekvenci, dok crveni simbol označava da promatrani parametar nije zadovoljavajuće kvalitete. FastQC može pokazati i žuti simbol koji navodi korisnika da treba provesti kontrolu kvalitete za određeni aspekt očitanih sekvenci (slika 14). Kvaliteta očitanih sekvenci kod svih devet izolata je bila zadovoljavajuća.

3.3.1.3. *De novo* sastavljanje genoma

KBase aplikacije SPAdes (*_Assemble Reads with SPAdes - v3.15.3_*) i Velvet (*_Velvet Assembler - v1.2.10_*) korištene su za sastavljanje sekvenci izolata *P. protegens* P19 i *P. chlororaphis* PL1-4 kako bi se odredio algoritam koji rekonstruira genom u manjem broju kontiga. U slučaju idealne rekonstrukcije genoma algoritam bi vratio samo jedan kontig. Setovi kontiga nazvani su: "P19_SPAdes_Assembly", "PL1-4_SPAdes_Assembly" "P19_Velvet_assembly" i "PL1-4_Velvet_assembly". Usporedba korištenih *de novo* sastavljača SPAdes i Velvet te provjera kvalitete sastavljenih setova kontiga provedena je u QUAST (engl. *Quality Assessment Tool*) aplikaciji. S obzirom da je pomoću aplikacije SPAdes sastavljen genom s nižom L50, a većom N50 vrijednosti, manjim brojem kontiga i N-ova, ista aplikacija je korištena za sastavljanje genoma ostalih izolata.

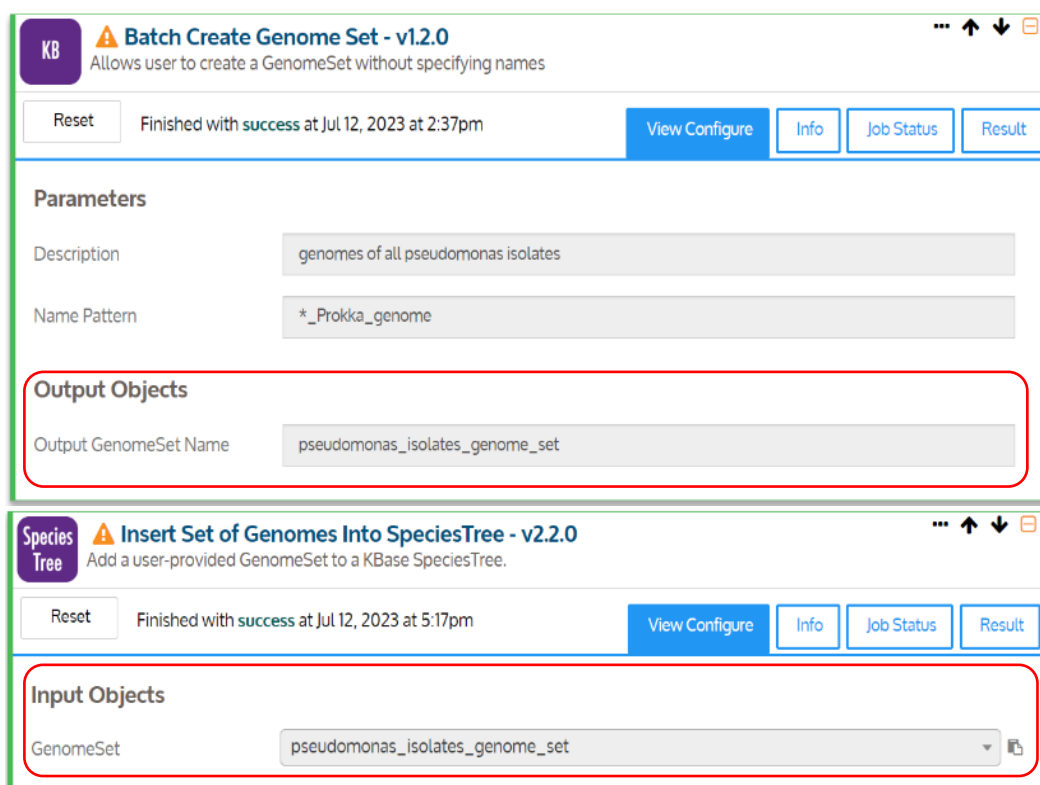
3.3.1.4. Anotacija

Anotacija sastavljenog genoma sojeva *P. protegens* P19 i *P. chlororaphis* PL1-4 provedena je u aplikacijama RAST (Annotate Genome/Assembly with RASTtk - v1.073) i Prokka (Annotate Assembly and Re-annotate Genomes with Prokka - v1.14.5). S obzirom da je pomoću aplikacije Prokka anotirano manje nekodirajućih gena, ista aplikacija je korištena za anotaciju genoma ostalih sojeva.

3.3.1.5. Filogenetsko stablo

Aplikacijom "SpeciesTreeBuilder", baziranom na FastTree2 algoritmu, konstruirano je filogenetsko stablo pomoću skupa 49 temeljnih univerzalnih gena definiranih obiteljima genskih klastera grupa ortologa (engl. *Clusters of Orthologous Groups*, COG). Aplikacija kombinira genome koje pruža korisnik sa automatski identificiranim skupom srodnih genoma iz KBase RefSeq baze podataka. Najprije su Prokka anotirani genomi svih devet uzoraka skupljeni u set genoma pomoću aplikacije Batch Create Genome Set - v1.2.0 s obzirom da aplikacija "SpeciesTreeBuilder" kao unos zahtijeva set genoma (slika 15).

Srodnost genoma iz KBase baze podataka i korisničkih genoma određena je na temelju sličnosti poravnanja s podskupom od 49 COG domena. Korisnički genomi umetnuti su u višestruko poravnanje sekvenci (engl. *multiple sequence alignment*, MSA) za svaku COG obitelj. Nakon toga su združena (engl. *concatenated*) višestruka poravnanja svih 49 COG-ova te je rekonstruirano filogenetsko stablo u programu FastTree2 metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*). Na granama dobivenog stabla označena su imena vrsta NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) RefSeq oznakom i GCF identifikacijskim brojevima. Podrška za grananja unutar filogenetskog stabla određena je na temelju 1000 *bootstrap* ponavljanja (Price i sur., 2010).



Slika 15. Redosljed korištenja aplikacija za konstrukciju filogenetskog stabla u KBase

3.3.2. AntiSMASH

U računalnom programu antiSMASH analizirani su genomi para srodnih izolata od kojih jedan (*P. cerasi* PL3-3) inhibira patogene *S. parasitica* i *A. astaci*, a drugi ne inhibira (*P. syringae* AT16-2) s ciljem pronalaska genskih nakupina koji sudjeluju u biosintezi sekundarnih metabolita s potencijalnim inhibicijskim djelovanjem prema patogenim vodenim plijesnima. Na slici 16 prikazano je kako su podaci učitani u antiSMASH.

The image shows a multi-step process for uploading a Prokka-annotated genome to antiSMASH. It is divided into three numbered sections:

- Section 1:** In the 'DATA' section, the entry 'PL3-3_Prokka_genome' is selected. The 'Export as:' dropdown is set to 'JSON', and the 'GENBANK' button is highlighted with a red box.
- Section 2:** A file named 'KBase_derived_PL3-3_Prokka_genome.gbff' is shown in a separate box, representing the output of the export process.
- Section 3:** In the antiSMASH interface, the 'Data input' section is highlighted with a red box. The 'Upload file' button is selected, and the file 'KBase_derived_PL3-3_Prokka_genome' is chosen from the file list. The 'Submit' button is visible at the bottom of the form.

Slika 16. Redosljed operacija za učitavanje Prokka anotiranog genoma u program antiSMASH

4. REZULTATI I RASPRAVA

Opći cilj ovog rada bio je *in silico* identificirati biosintetske genske nakupine za proizvodnju sekundarnih metabolita, potencijalnih inhibitora patogenih vodenih plijesni *A. astaci* i *S. parasitica* u genomima bakterija iz roda *Pseudomonas*. U tu svrhu odabrano je devet genoma okolišnih *Pseudomonas* izolata, od kojih je za šest ranije utvrđeno da inhibiraju *A. astaci* i/ili *S. parasitica*, a tri nisu pokazivala inhibicijski učinak (tablica 1) te je provedeno sljedeće:

1. pročišćavanje genomske DNA devet izolata iz roda *Pseudomonas* i sekvenciranje genoma na Illumina platformi;
2. optimizacija bioinformatičke analize (poglavlje 4.1.);
3. usporedba sastavljenih genoma (poglavlje 4.2.);
4. filogenetska analiza radi odabira para srodnih bakterijskih izolata, jednog inhibitora i jednog neinhibitora oomicetnih patogena (poglavlje 4.3.);
5. identifikacija i usporedba genskih nakupina za proizvodnju sekundarnih metabolita u odabranim genomima (poglavlje 4.4.).

4.1. OPTIMIZACIJA BIOINFORMATIČKE ANALIZE

Koristeći sekvence izolata *P. protegens* P19 i izolata *P. chlororaphis* PL1-4 testirane su alternativne metode za sastavljanje i anotaciju genoma te su rezultati uspoređeni kako bi se odabrala optimalna metoda. Cilj je bio rekonstrukcija genoma u što manjem broju kontiga i dodjela funkcionalne anotacije sa što manjim udjelom gena nepoznate funkcije.

Genomi odabranih izolata sastavljeni su aplikacijama SPAdes i Velvet. Usporedbom kvalitete sastavljanja genoma, odnosno setova kontiga, utvrđeno je da SPAdes aplikacija uglavnom daje bolje rezultate (slika 17):

- SPAdes aplikacija daje manji broj kontiga (45 naspram 543 kod aplikacije Velvet) kod *P. protegens* P19, a kod *P. chlororaphis* PL1-4 Velvet aplikacijom je sastavljen genom s manjim brojem kontiga, ali potpuno neuspješno (sastavljen je genom od 6356 bp umjesto 6461365 bp);
- SPAdes aplikacija daje nižu L50, a veću N50 vrijednost (genom pretežno sastavljen od duljih kontiga);
- SPAdes aplikacijom je sastavljen genom izolata *P. protegens* P19 sa znatno manje umetnutih N-ova (497) u usporedbi sa setom kontiga sastavljenim Velvet aplikacijom (38750). Kod izolata *P. chlororaphis* PL1-4 Velvet aplikacijom nije uspješno rekonstruiran genom jer je sastavljen genom veličine 6 kb umjesto 6 Mb zbog čega je broj N-ova 0.

Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima istraživanja Forouzan i sur. (2017) u kojem je aplikacijom Quast uspoređena kvaliteta devet *de novo* sastavljača uključujući SPAdes i Velvet na temelju parametara koji su razmatrani i u ovom radu (broj kontiga, N50 vrijednost, broj N-ova). Genomi sastavljeni aplikacijama SPAdes i IDBA-UD imali su znatno manji broj kontiga, veću N50 vrijednost i znatno manji broj umetnutih N-ova u usporedbi s rezultatima ostalih *de novo* sastavljača, uključujući Velvet. Nadalje, slični rezultati dobiveni su u istraživanju u kojem je izolat s biljke uljane palme *Pseudomonas* sp. LA21 (sekvenciran Illumina tehnologijom) sastavljen s tri sastavljača SPAdes, ABySS i Velvet te je SPAdes dao najbolje rezultate: veća N50 vrijednost (336333 naspram 12340 kod Velvet), manji broj kontiga (180 naspram 1124 kod Velvet) i veća duljina najvećeg kontiga (777292 bp naspram 82903 bp kod Velvet) (Wee i sur., 2022).

Statistics without reference	P19_SPAdes.Assembly	P19_Velvet_assembly	PL1-4_SPAdes.Assembly	PL1-4_Velvet_assembly
# contigs	45	543	40	10
# contigs (>= 0 bp)	45	543	40	10
# contigs (>= 1000 bp)	40	439	30	1
# contigs (>= 10000 bp)	33	136	22	0
# contigs (>= 100000 bp)	17	10	15	0
# contigs (>= 1000000 bp)	1	0	1	0
Largest contig	1 115 946	309 663	1 314 244	1092
Total length	6 833 783	6 773 911	6 461 365	6356
Total length (>= 0 bp)	6 833 783	6 773 911	6 461 365	6356
Total length (>= 1000 bp)	6 830 485	6 700 922	6 454 088	1092
Total length (>= 10000 bp)	6 796 016	5 622 866	6 428 474	0
Total length (>= 100000 bp)	6 097 304	1 849 369	6 161 160	0
Total length (>= 1000000 bp)	1 115 946	0	1 314 244	0
N50	447 865	47 487	743 129	594
N75	209 854	15 886	215 365	554
L50	5	32	4	5
L75	11	92	8	8
GC (%)	62.24	62.24	60.84	45.52
Mismatches				
# N's	497	38 750	1495	0
# N's per 100 kbp	7.27	572.05	23.14	0
Predicted genes				
# predicted genes (unique)	5995	6321	5741	8
# predicted genes (>= 0 bp)	5989 + 6 part	6102 + 219 part	5730 + 11 part	7 + 1 part
# predicted genes (>= 300 bp)	5448 + 5 part	5491 + 203 part	5267 + 8 part	3 + 0 part
# predicted genes (>= 1500 bp)	917 + 3 part	803 + 18 part	854 + 4 part	0 + 0 part
# predicted genes (>= 3000 bp)	117 + 0 part	84 + 7 part	94 + 3 part	0 + 0 part

Slika 17. QUAST izvješće kvalitete sastavljanja genoma izolata *P. protegens* P19 i *P. chlororaphis* PL1-4 aplikacijama SPAdes i Velvet. Rezultati loše kvalitete sastavljanja genoma označeni su crveno, a rezultati dobre kvalitete plavo

Nadalje, anotacija genoma izolata *P. protegens* P19 i *P. chlororaphis* PL1-4 provedena je korištenjem dvije aplikacije: Prokka i RAST. Prokka aplikacijom anotirano je manje gena koji ne kodiraju za proteine (ostali geni) kod oba izolata nego RAST aplikacijom te Prokka aplikacija koristi noviju referentnu bazu (tablica 5) (Seemann, 2014). Stoga je Prokka aplikacija odabrana za anotaciju genoma ostalih izolata u ovom radu. U istraživanju Seeman (2014) također su pokazani najbolji rezultati za aplikaciju Prokka kod anotacije genoma *E.coli* K-12 u usporedbi s rezultatima preostale dvije testirane aplikacije RAST i xBase2.

Tablica 5. Usporedba anotacije genoma izolata *P. protegens* P19 i *P. chlororaphis* PL1-4 aplikacijama Prokka i RAST

	P19		PL1-4	
	Prokka	RAST	Prokka	RAST
Broj gena	6088	6283	5827	5979
Geni koji kodiraju za proteine	6028	6204	5774	5896
Ostali geni	60	79	53	83

4.2. KARAKTERISTIKE SASTAVLJENIH GENOMA

Rezultati *de novo* sastavljanja i anotacije genoma devet bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* u KBase platformi prikazani su u tablici 6. Veličina genoma analiziranih izolata bila je u rasponu od 5,97 do 6,91 Mbp. Najmanji broj protein-kodirajućih sekvenci (5060) zabilježen je u genomu ne-inhibitorskog izolata *P. syringae* AT16-2, a najveći (6028) u genomu inhibitorskog izolata *P. protegens* P19. Rezultati su uglavnom u skladu s veličinama genoma i brojem gena kod genoma drugih okolišnih izolata iz roda *Pseudomonas* (De Vrieze i sur., 2020; Silby i sur., 2011).

Tablica 6. Karakteristike genoma devet bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* dobivene analizom u KBase platformi

	P19	P22	P23	PL2-2	PL3-3	AT20-2	P9	PL1-4	AT16-2
Veličina genoma (Mbp)	6,83	6,70	5,97	6,91	6,17	6,54	5,98	6,46	6,16
Broj očitavanja*	2926554	6100957	7460499	7317029	6732689	8434661	7160716	7739283	6134604
% G + C	62	60	62	63	59	60	64	61	58
Broj gena	6088	6107	5452	6139	5357	5982	5262	5827	5113
Geni koji kodiraju za proteine	6028	6055	5395	6089	5304	5927	5209	5774	5060
Ostali geni	60	52	57	50	53	55	53	53	53
Prosječna duljina proteina (aa)	333	326	332	331	341	331	335	335	334
Broj kontiga	45	90	49	36	81	62	205	40	368
N50 (bp)	447865	144594	187686	341715	145033	222657	51192	743129	329063
L50	5	11	11	6	13	8	38	4	5
N-ovi	497	1124	600	593	1220	392	1394	1495	65924

aa – aminokiselina; *rezultat FastQC aplikacije

Genomi izolata *P. mosselii* P9 i *P. syringae* AT16-2 sastavljeni su u znatno većem broju kontiga (205 i 368) od genoma ostalih izolata (36-90). U genomu izolata *P. syringae* AT16-2 zabilježen je i velik broj umetnutih N-ova. Osim toga, za genom izolata *P. mosselii* P9 L50 vrijednost bila je znatno veća, a N50 vrijednost znatno manja u usporedbi s vrijednostima kod ostalih izolata što upućuje na lošiju kvalitetu sastavljanja genoma. Broj očitavanja kod izolata *P. mosselii* P9 i *P. syringae* AT16-2 bio je sličan broju očitavanja ostalih izolata (tablica 6) pa se može pretpostaviti da je razlog lošije kvalitete sastavljanja genoma ovih dvaju izolata relativno veći udio repetitivnih regija DNA u genomu. Sastavljanje genoma koji imaju visok udio ponavljajućih sekvenci DNA može biti problematično posebno kod sastavljanja kratkih čitanja prilikom kojeg *de novo* sastavljač ne može točno odrediti koliko puta se sekvenca ponavlja. Ovaj izazov se pokušava savladati primjenom sekvenciranja tehnologijama koje generiraju dugačka čitanja, poput *Pacific Biosciences* (PacBio) i *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) (Schmid i sur., 2018).

4.3. FILOGENETSKA ANALIZA IZOLATA

Filogenetska analiza genoma devet bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* na temelju 49 COG-ova prikazana je na slici 18. Dobiveni rezultati uglavnom su u skladu s rezultatima identifikacije izolata temeljene na *16S* rRNA sekvenci (tablica 1): izolati *P. protegens* P19, *P. canadensis* AT20-2, *P. chlororaphis* PL2-2 i *P. azotoformans* P22 pripadaju grupi *fluorescens*, izolati *P. cerasi* PL3-3 i *P. syringae* AT16-2 grupi *syringae*, a izolati *P. wadenswilerensis* P23 i *P. mosselii* P9 grupi *putida* (prema klasifikaciji Lalucat i sur., 2020). Jedino znatno odstupanje od *16S* rRNA identifikacije vidljivo je kod izolata PL1-4 kojemu je filogenetski najbliži bio neklasificirani izolat *Pseudomonas* sp. StFLB209 (Morohoshi i sur., 2014) (slika 18), dok je prema *16S* rRNA identifikaciji svrstan u grupu *fluorescens* (tablica 1). Identifikacija temeljena na *16S* rDNA sekvenci često se koristi zbog brzine analize i niske cijene te velikog i stalno rastućeg broja referentnih *16S* rRNA sekvenci različitih bakterijskih vrsta u bazama podataka (poput baza NCBI i SILVA). Međutim, poznato je da je razlučivost *16S* rDNA sekvence na razini vrste često slaba. Blisko srodne prokariotske vrste, uključujući vrste unutar roda *Pseudomonas*, često dijele visoku, ponekad čak i 100 %-tnu, identičnost u *16S* rRNA sekvenci, odnosno razlike između sekvenci su vrlo male ili ne postoje (Seuylemezian i sur., 2018; Vos i sur., 2012). Osim toga, baze podataka sekvenci sadrže dio pogrešno identificiranih *16S* rDNA sekvenci, što može dovesti do daljnjih pogrešnih klasifikacija ukoliko se vrste identificiraju na temelju blastn pretraga (Morimoto i sur., 2020; Jin i sur., 2020). Stoga je za precizniju

sekundarne metabolite, njihovi su genomi odabrani za predikciju nakupina za sintezu sekundarnih metabolita programom antiSMASH.

4.4. PREDIKCIJA GENSKIH NAKUPINA ZA SINTEZU SEKUNDARNIH METABOLITA U GENOMIMA ODABRANIH IZOLATA IZ RODA *Pseudomonas*

Analizom genoma inhibitorskog izolata *P. cerasi* PL3-3 u antiSMASH programu identificirano je puno više biosintetskih genskih nakupina (14) nego u genomu ne-inhibitorskog izolata *P. syringae* AT16-2 u kojem ih je identificirano samo devet (tablica 7). U genomima oba izolata pronađeno je po tri genske nakupine za proizvodnju siderofora (azotobactin D, fragin i Pf-5 pioverdin), dvije za proizvodnju lipopeptidnih biosurfaktanata (siringomicin i siringofaktin (Geissler i sur., 2019)) i po jedna genska nakupina za sintezu aril poliena, hitinimida, lankacidina i N-acetilglutaminilglutamin amida (engl. *N-Acetylglutaminylglutamine amide*, NAGGN). Za neke od navedenih bioaktivnih spojeva u prijašnjim istraživanjima pokazano je antifungalno, antibakterijsko odnosno antivirusno djelovanje. Aril polieni povećavaju zaštitu od oksidativnog stresa i pridonose stvaranju biofilma kod bakterija (Johnston i sur., 2021). Fragin, azotobactin D i Pf-5 pioverdin su siderofori čija je antifungalna aktivnost temeljena na kelaciji metala (Jenul i sur., 2018; Gross i Loper, 2009; Demange i sur., 1988). Za siringomicine, sekundarne metabolite bakterije *P. syringae* pokazano je antifungalno djelovanje (Hashizume i Nishimura, 2008). Hitinimidi su definirani kao detoksini s antagonističkom aktivnošću prema antibiotiku blasticidinu S u bakteriji *Bacillus cereus* (Liu i sur., 2021). Za NAGGN je pokazano da djeluju kao osmoliti koje bakterije *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* akumuliraju kao oblik prilagodbe na uvjete osmotskog stresa (D'Souza-Ault i sur., 1993). Lankacidini su poliketidi snažnog antimikrobnog djelovanja prema Gram-pozitivnim bakterijama *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae* i *Xanthomonas oryzae* (Cai i sur., 2020; Chang i sur., 2018).

Tablica 7. Rezultati analize genoma inhibitorskog izolata *P. cerasi* PL3-3 (označeno crveno) i ne-inhibitorskog izolata *P. syringae* AT16-2 (označeno zeleno) u programu antiSMASH

Skupina NPa	Regija	Tip	Od (bp)	Do (bp)	Najsličnija poznata nakupina	Sličnost (%)
Siderofori	6.2	hserlakton, NRPS	174,604	222,783	azotobactin D	66
	10.1	NRPS-like	159,655	183,774	fragin	37
	37.1	NRP-metalofor, NRPS	1	59,152	Pf-5 pioverdin	18
	11.1	NRPS-like	1	24,117	fragin	37
	13.1	NRPS	111,013	146,187	azotobactin D	66
	26.1	NRPS, NRP-metalofor	1	34,781	Pf-5 pioverdin	11
Lipopeptidini biosurfaktanti	1.1	NRPS	13,558	161,850	siringomicin	100
	1.2	NI-siderofor, NRPS	163,766	233,863	siringofaktin	66
	1.1	NRPS, NI-siderofor	275,561	352,874	siringofaktin	66
	1.2	NRPS	357,357	506,851	siringomicin	100
Aril polieni	3.1	Aril polien	184,826	228,425	aril polien	38
	7.1	Aril polien	132,844	176,443	aril polien Vf	40
Hitinimidi	6.1	NRPS	10,097	72,003	hitinimid B/F/D/A/C/E/G	33
	15.1	NRPS	56,407	116,843	hitinimid B/F/D/A/C/E/G	33
Dipeptidi	25.1	NAGGN	12,996	27,796	-	-
	9.1	NAGGN	162,142	176,943	-	-
Lankacidini	65.1	Redoks kofaktor	1	11,881	lankacidin C	13
	8.1	NAPAA, redoks kofaktor	62,793	104,809	lankacidin C	13
Secimidi	11.1	transAT-PKS	95,951	160,947	secimid	92
	35.1	hserlakton	1	19,737	FR901228	14
Sirbaktini	41.1	NRPS, T1PKS	6,506	52,846	siringolin A	100
	25.2	NRPS	35,770	86,045	-	-
Ektoini	32.1	ektoin	48,826	59,212	-	-

NP – prirodni proizvod (engl. *natural product*, NP); NRPS – neribosomalna peptid sintetaza (engl. *Non-ribosomal peptide synthetase*, NRPS); NI-siderofor – NRPS-neovisni, IucA/IucC-slični siderofori; hserlakton – homoserin lakton; Vf – *Vibrio fischeri* ES114; PKS – poliketid sintaza (engl. *polyketide synthases*, PKS); transAT-PKS – trans-aciltransferaza PKS; T1PKS – PKS tipa I; NAGGN – N-acetilglutaminilglutamin amid; NAPAA – ne- α poliaminokiseline slične e-polilizinu (engl. *Non-alpha poly-amino acids like e-Polylysin*); - nije pronađena najbližnja poznata nakupina

Iako antagonistička aktivnost gore navedenih spojeva prema oomicetnim patogenima do sada nije istraživana, u ranijim je istraživanjima pokazano da siderofori i lipopeptidni biosurfaktanti mogu inhibirati oomicetne patogene. Za siderofore je pokazano da u uvjetima ograničenog izvora željeza kompeticijom za željezo s patogenom mogu uzrokovati inhibiciju, a za lipopeptidne biosurfaktante da potiču prelazak patogena iz zoospora (infektivnog stadija) u ciste te da mogu *in vitro* inhibirati rast micelija patogena (Grosse i sur., 2023; González-Palacios i sur., 2020; Van Der Voort i sur., 2015; Liu i sur., 2015; Hultberg i sur., 2010). Ipak, činjenica da su nakupine za njihovu sintezu nađene i kod inhibitorskog i kod ne-inhibitorskog izolata upućuje na sljedeće pretpostavke (i) u ovom slučaju ovi bioaktivni spojevi nisu ključni za inhibicijski učinak ili (ii) imaju inhibicijski značaj ali je njihova ekspresija puno jača kod inhibitora nego kod neinhibitora ili (iii) jače/slabije djeluju sinergijski s nekim drugim spojevima, odnosno sekundarnim metabolitima.

Kod inhibitora *P. cerasi* PL3-3 pronađene su genske nakupine za proizvodnju sirbaktina (siringolin A), secimida, peptida FR901228 (s antitumorskom aktivnosti (Ueda i sur., 1994)), neidentificiranog ektoina i neidentificiranog neribosomski sintetiziranog peptida (engl. *nonribosomal peptides*, NRP), a kod neinhibitora *P. syringae* AT16-2 nisu pa se može postaviti hipoteza da je jedan od ovih spojeva, ili više njih, ključan za inhibicijsku aktivnost izolata *P. cerasi* PL3-3 prema patogenima *A. astaci* i *S. parasitica* (tablica 7). Sirbaktini čine skupinu spojeva koje proizvodi biljna patogena bakterija *P. syringae* i njihov glavni mehanizam djelovanja prema biljci je ireverzibilna inhibicija proteasoma (Krahn i sur., 2011). U istraživanju Schellenberg i sur. (2010) sirbaktin siringolin A pokazan je kao faktor virulencije fitopatogene bakterije *P. syringae* pv. *syringae* B728a (koja je u ovom radu bila filogenetski najbliža vrsta inhibitorskom izolatu *P. cerasi* PL3-3 (slika 18)) prema domaćinu, biljci graha *Phaseolus vulgaris*. Pokazano je da siringolin A potiče pokretljivost bakterija *P. syringae* i potiskuje imunski odgovor biljke na mjestu mehaničke ozljede te na taj način olakšava kolonizaciju bakterija s mjesta primarne infekcije na susjedna tkiva (u kojima blokira signalizaciju hormona stresa salicilne kiseline) (Misas-Villamil i sur., 2013). Pronađena je i genska nakupina za proizvodnju slabo istraženog poliketida secimida, produkta enzima trans-aciltransferaze poliketid sintaze (engl. *Trans-acyltransferase polyketide synthases*, trans-AT PKS) koji katalizira biosintezu mnogih farmaceutski važnih poliketida poput antibiotika mupirocina i virginiamicina (Helfrich i sur., 2021). Nadalje, pronađena je genska nakupina slična nakupini ektoina, spojeva koje halofilne bakterije proizvode i akumuliraju kako bi se zaštitile od visokog osmotskog tlaka (Van Thuoc i sur., 2021). Sve navedeno upućuje na mogućnost da jedan ili više navedenih bioaktivnih spojeva uzrokuje antagonističku aktivnost

inhibitorskog izolata *P. syringae* PL3-3 iako njihovo anti-oomicetno djelovanje ranije uglavnom nije istraživano. Od navedenih spojeva jedino je za NRP-ove dokazano anti-oomicetno djelovanje (De Vrieze i sur., 2020). Primjerice za lipopeptid brabantamid A pokazano je da stimulira aktivnost fosfolipaze D koja potiče prelazak zoospore u ciste oomicetnog patogena *P. infestans* (Van der Voort i sur., 2015).

Opisani rezultati predstavljaju prvi korak u razvoju biokontrole oomicetnih patogena u slatkovodnoj akvakulturi primjenom bakterija iz roda *Pseudomonas* i njihovih produkata odnosno sekundarnih metabolita. Temeljem dobivenih rezultata u nastavku istraživanja trebalo bi:

- (i) provesti komparativnu antiSMASH analizu genoma preostalih inhibitorskih i ne-inhibitorskih izolata iz roda *Pseudomonas*;
- (ii) eksperimentalno analizirati proizvodnju ciljnih bioaktivnih molekula u inhibitorskim i neinhibitorskim izolatima, kako bi se potvrdila ili opovrgnula hipoteza da inhibitorski izolati proizvode, a ne-inhibitorski ne proizvode ciljne inhibitorne metabolite. Kada je neka genska nakupina pronađena u genomu to nužno ne znači da se u određenim uvjetima eksprimira, odnosno da dolazi do proizvodnje sekundarnog metabolita za čiju sintezu ta genska nakupina kodira (Hoskisson i Seipke, 2020);
- (iii) izolirati potencijalne anti-oomicetne spojeve te *in vitro* testirati njihovo djelovanje u raznim fazama životnog ciklusa oomicetnih patogena (zoospore, ciste, micelij);
- (iv) pokusima *in vivo*, u kojima je uključen i domaćin i patogen i inhibitorski *Pseudomonas* izolat, analizirati primjenjivost okolišnih izolata iz roda *Pseudomonas* u kontroli oomicetnih bolesti u slatkovodnoj akvakulturi.

5. ZAKLJUČCI

1. Sekvencirano je, sastavljeno i anotirano devet genoma bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* porijeklom iz slatkovodnih riba i deseteronožnih rakova.
2. Utvrđeno je da su SPAdes i Prokka bioinformatički alati optimalni za *de novo* sastavljanje i anotaciju genoma bakterija iz roda *Pseudomonas*.
3. Filogenetskom analizom genoma devet bakterijskih izolata iz roda *Pseudomonas* na temelju 49 COG-ova utvrđeno je da izolati *P. protegens* P19, *P. canadensis* AT20-2, *P. chlororaphis* PL2-2 i *P. azotoformans* P22 pripadaju grupi *fluorescens*, izolati *P. cerasi* PL3-3 i *P. syringae* AT16-2 grupi *syringae*, a izolati *P. wadenswilerensis* P23 i *P. mosselii* P9 grupi *putida*. Za izolat PL1-4 nije bilo moguće utvrditi u koju grupu u rodu *Pseudomonas* spada jer je filogenetski bio najbliži neklasificiranom izolatu *Pseudomonas* sp. StFLB209. Od analiziranih izolata, najsrodniji par izolata od kojih jedan inhibira, a drugi ne inhibira oomicetne patogene *A. astaci* i *S. parasitica* bili su inhibitori izolat *P. cerasi* PL3-3 i ne-inhibitorski izolat *P. syringae* AT16-2.
4. Na temelju antiSMASH analize u genomu inhibitori izolat *P. cerasi* PL3-3 identificirano je znatno više biosintetskih genskih nakupina (14) nego u genomu ne-inhibitorskog izolata *P. syringae* AT16-2 u kojem ih je identificirano samo devet.
5. U genomima oba izolata identificirano je najviše genskih nakupina za proizvodnju siderofora (azotobactin D, fragin i Pf-5 pioverdin) i lipopeptidnih biosurfaktanata (siringomicin i siringofaktin).
6. Kod inhibitora *P. cerasi* PL3-3 su pronađene genske nakupine za proizvodnju sirbaktina (siringolin A), secimida, peptida FR901228, ektoina i neidentificiranog NRP-a, a kod neinhibitora *P. syringae* AT16-2 nisu pa se može pretpostaviti da je jedan od ovih spojeva, ili više njih, ključan za inhibicijsku aktivnost izolata *P. cerasi* PL3-3 prema patogenima *A. astaci* i *S. parasitica*.

6. LITERATURA

Akpoilih B, Adebayo O (2011) Effect of Formalin on the Hatching Rate of eggs and Survival of larvae of the African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **14**, 31-34. <https://doi.org/10.4314/JASEM.V14I4.63252>.

Alderman DJ (1996) Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* **15**, 603–632. <https://doi.org/10.20506/RST.15.2.943>

Arkin AP, Cottingham RW, Henry CS, Harris NL, Stevens RL, Maslov S, i sur. (2018) KBase: The United States department of energy systems biology knowledgebase. *Nature Biotechnology* **36**, 566–569. <https://doi.org/10.1038/NBT.4163>

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

Benavent-Celma C, López-García N, Ruba T, Šciślak ME, Street-Jones D, van West P, i sur. (2022) Current practices and emerging possibilities for reducing the spread of oomycete pathogens in terrestrial and aquatic production systems in the European Union. *Fungal Biology Reviews* **40**, 19–36. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2021.10.001>

Blin K, Shaw S, Augustijn HE, Reitz ZL, Biermann F, Alanjary M, i sur. (2023) AntiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research* **51**, W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>

Cai L, Yao Y, Yeon SK, Seiple IB (2020) Modular approaches to lankacidin antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* **142**, 15116. <https://doi.org/10.1021/JACS.0C06648>

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>

Carbajal-González, MT, Fregeneda-Grandes JM, González-Palacios C, Aller-Gancedo JM (2013) Adhesion to brown trout skin mucus, antagonism against cyst adhesion and pathogenicity to rainbow trout of some inhibitory bacteria against *Saprolegnia parasitica*. *Diseases of Aquatic Organisms* **104**, 35–44. <https://doi.org/10.3354/DAO02582>

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. *Diseases of Aquatic Organisms* **96**, 125–135. <https://doi.org/10.3354/DAO02391>

Chang L, Jin-Meng L, Qi H, Zhang H, Zhang J, Wen-Sheng X, i sur. (2018) Two new lankacidin-related metabolites from *Streptomyces* sp. HS-NF-1178. *The Journal of Antibiotics* **71**, 397–401. <https://doi.org/10.1038/s41429-017-0004-0>

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>

DAWE (2019) *Aquatic animal diseases significant to Australia: identification field guide 5th edition*, DAWE - Department of Agriculture, Water and the Environment, Canberra.

Demange P, Bateman A, Dell A, Abdallah MA (1988) Structure of Azotobactin D, a Siderophore of *Azotobacter vinelandii* Strain D (CCM 289). *Biochemistry* **27**, 2745–2752. https://doi.org/10.1021/BI00408A014/ASSET/BI00408A014.FP.PNG_V03

D'Souza-Ault MR, Smith LT, Smith GM (1993) Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 473–478. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.2.473-478.1993>

De Souza JT, de Boer M, de Waard P, van Beek TA, Raaijmaker JM (2003) Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7161–7172. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7161-7172.2003>

De Vrieze M, Pandey P, Bucheli TD, Varadarajan AR, Ahrens CH, Weisskopf L, i sur. (2015) Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. *Frontiers in Microbiology* **6**, 167095. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01295/BIBTEX>

De Vrieze M, Varadarajan AR, Schneeberger K, Bailly A, Rohr RP, Ahrens CH, i sur. (2020) Linking Comparative Genomics of Nine Potato-Associated *Pseudomonas* Isolates With Their Differing Biocontrol Potential Against Late Blight. *Frontiers in Microbiology* **11**, 521699. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00857/BIBTEX>

- Derevnina L, Petre B, Kellner R, Dagdas YF, Sarowar MN, Giannakopoulou A, i sur. (2016) Emerging oomycete threats to plants and animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, 20150459. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0459>
- Diéguez-Uribeondo J, Cerenius L, Söderhäll K (1994) Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. *Mycological Research* **98**, 810–815. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81060-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81060-5)
- Forouzan E, Maleki MSM, Karkhane AA, Yakhchali B (2017) Evaluation of nine popular *de novo* assemblers in microbial genome assembly. *Journal of Microbiological Methods* **143**, 32–37. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2017.09.008>
- Fregeneda-Grandes JM, González-Palacios C, Pérez-Sánchez T, Padilla D, Real F, Aller-Gancedo JM (2023) Limited Probiotic Effect of *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 and *Lactobacillus plantarum* CLFP3 to Protect Rainbow Trout against Saprolegniosis. *Animals* **13**, 954. <https://doi.org/10.3390/ANI13050954>
- Geissler M, Heravi KM, Henkel M, Hausmann R (2019) Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus* Species. *Biobased Surfactants: Synthesis, Properties, and Applications* 205–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00006-X>
- González-Palacios C, Fregeneda-Grandes JM, Aller-Gancedo JM (2019) Biocontrol of saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using two bacterial isolates (LE89 and LE141) of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases* **42**, 269–275. <https://doi.org/10.1111/JFD.12928>
- González-Palacios C, Fregeneda-Grandes JM, Aller-Gancedo JM (2020) Possible mechanisms of action of two *Pseudomonas fluorescens* isolates as probiotics on saprolegniosis control in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Animals* **10**, 1507. <https://doi.org/10.3390/ANI10091507>
- Gross H, Loper JE (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports* **26**, 1408. <https://doi.org/10.1039/b817075b>
- Grosse C, Brandt N, van Antwerpen P, Wintjens R, Matthijs S (2023) Two new siderophores produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 10586: The anti-oomycete non-ribosomal peptide synthetase-dependent mupirochelin and the NRPS-independent triabactin. *Frontiers in Microbiology* **14**, 1143861. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1143861>

Harris RN, James TY, Lauer A, Simon MA, Patel A (2006) Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* **3**, 53-56. <https://doi.org/10.1007/s10393-005-0009-1>

Hashizume H, Nishimura Y (2008) Cyclic Lipopeptide Antibiotics. *Studies in Natural Products Chemistry* **35**, 693–751. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80016-6)

Helfrich EJN, Ueoka R, Chevrette MG, Hemmerling F, Lu X, Leopold-Messer S., i sur. (2021) Evolution of combinatorial diversity in trans-acyltransferase polyketide synthase assembly lines across bacteria. *Nature Communications* **12**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21163-x>

Hoskisson PA, Seipke RF (2020) Cryptic or silent? The known unknowns, unknown knowns, and unknown unknowns of secondary metabolism. *MBio* **11**, 1–5. <https://doi.org/10.1128/mbio.02642-20>

Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A (2021) Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* **82**, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>

Hultberg M, Alsberg T, Khalil S, Alsanius B (2010) Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl* **55**, 435–444. <https://doi.org/10.1007/S10526-009-9261-6/METRICS>

Hunziker L, Bönisch D, Groenhagen U, Bailly A, Schulz S, Weisskopf L (2015) *Pseudomonas* Strains Naturally Associated with Potato Plants Produce Volatiles with High Potential for Inhibition of *Phytophthora infestans*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 821. <https://doi.org/10.1128/AEM.02999-14>

Hussein MMA, Hatai K (2001) *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniasis. *Fish Pathology* **36**, 73–78. <https://doi.org/10.3147/JSFP.36.73>

Hyder S, Gondal AS, Rizvi ZF, Ahmad R, Alam MM, Hannan A, i sur. (2020) Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientific Reports* **10**, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69410-3>

- Jenul C, Sieber S, Daepfen C, Mathew A, Lardi M, Pessi G, i sur. (2018). Biosynthesis of fragin is controlled by a novel quorum sensing signal. *Nature Communications* **9**, 1297. <https://doi.org/10.1038/S41467-018-03690-2>
- Jin S, Kim KY, Kim MS, Park C (2020) An assessment of the taxonomic reliability of DNA barcode sequences in publicly available databases. *ALGAE* **35**, 293–301. <https://doi.org/10.4490/algae.2020.35.9.4>
- Johnston I, Osborn LJ, Markley RL, McManus EA, Kadam A, Schultz KB, i sur. (2021) Identification of essential genes for *Escherichia coli* aryl polyene biosynthesis and function in biofilm formation. *NPJ Biofilms and Microbiomes* **7**, 56. <https://doi.org/10.1038/S41522-021-00226-3>
- Jussila J, Toljamo A, Makkonen J, Kukkonen H, Kokko H (2014) Practical disinfection chemicals for fishing and crayfishing gear against crayfish plague transfer. *Knowl Manag Aquat Ec* **413**, 2-8. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014002>
- Kamoun S (2003) Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**, 191–199. <https://doi.org/10.1128/EC.2.2.191-199.2003>
- Khosravi AD, Sadeghi P, Shahraki AH, Heidarieh P, Sheikhi N (2015) Molecular Methods for Identification of *Aciantobacter* 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>
- Krahn D, Ottmann C, Kaiser M (2011) The chemistry and biology of syringolins, glidobactins and cepafungins (syrbactins). *Natural Product Reports* **28**, 1854–1867. <https://doi.org/10.1039/C1NP00048A>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lauer A, Simon MA, Banning JL, Andre E, Duncan K, Harris RN (2007) Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia* **2007**, 630-640. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2007\)2007\[630:CCBFTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2007)2007[630:CCBFTE]2.0.CO;2)
- 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>

- Liu J, Zhou H, Yang Z, Wang X, Chen H, Zhong L, i sur. (2021) Rational construction of genome-reduced *Burkholderiales chassis* facilitates efficient heterologous production of natural products from proteobacteria. *Nature Communications*, 12, 4347. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-24645-0>
- 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, e0136241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136241>
- Lone SA, Manohar S (2018) *Saprolegnia parasitica*, a lethal oomycete pathogen: demands to be controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology* 6, 36-44. <https://doi.org/10.17582/journal.jimb/2018/6.2.36.44>
- 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.
- Maguire I, Jelić M, Klobučar G, Delpy M, Delaunay C, Grandjean F (2016) Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Dis Aquat Org* 118, 45-53. <https://doi.org/10.3354/dao02955>
- Magara G, Sangsawang A, Pastorino P, Bellezza Oddon S, Caldaroni B, Menconi V, i sur. (2021) First insights into oxidative stress and theoretical environmental risk of Bronopol and Detarox® AP, two biocides claimed to be ecofriendly for a sustainable aquaculture. *Science of The Total Environment* 778, 146375. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146375>
- Majerčak-Škorlić M (2023) Bakterijski izolati iz roda *Pseudomonas* kao inhibitori rasta micelija slatkovodnih patogenih mikroorganizama iz skupine Oomycota (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Makkonen J, Jussila J, Kortet R, Vainikka A, Kokko H (2012) Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* 102, 129–136. <https://doi.org/10.3354/DAO02547>
- Mert R, Benli KA, Arslan G (2015) Determination of histological and genotoxic effects of formalin on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research* 46, 2798-2807. <https://doi.org/10.1111/ARE.12434>

- Misas-Villamil JC, Kolodziejek I, Crabill E, Kaschani F, Niessen S, Shindo T, i sur. (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Uses Proteasome Inhibitor Syringolin A to Colonize from Wound Infection Sites. *PLOS Pathogens* **9**, e1003281. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003281>
- Morohoshi T, Kato T, Someya N, Ikeda T (2014) Complete genome sequence of N-acylhomoserine lactone-producing *Pseudomonas* sp. strain StFLB209, isolated from potato phyllosphere. *Genome announcements* **2**, 10-1128. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01037-14>
- Morimoto Y, Tohya M, Aibibula Z, Baba T, Daida H, Kirikae T (2020) Re-identification of strains deposited as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in genbank based on whole genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**, 5958–5963. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004468/CITE/REFWORKS>
- NCBI (2023) National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pristupljeno 5. svibnja 2023.
- NIH (2023) Contig. NIH-National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Contig>. Pristupljeno 19. listopada 2023.
- Norliana S, Abdulmir AS, Abu Bakar F, Salleh AB (2009) The health risk of formaldehyde to human beings. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* **4**, 98–106. <https://doi.org/10.3844/AJPTSP.2009.98.106>
- OIE (2017) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, OIE - World Organisation for Animal Health, [2.2.02_CRAYFISH.pdf \(woah.org\)](https://www.woah.org/). Pristupljeno 25. listopada 2023.
- Ossowicki A, Jafra S, Garbeva P (2017) The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLOS ONE* **12**, e0174362. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174362>
- Parr CS, Wilson N, Leary P, Schulz K, Lans K, Walley L, i sur. (2014) The Encyclopedia of Life v2: Providing Global Access to Knowledge About Life on Earth. *Biodiversity Data Journal* **2**, e1079. <https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e1079>

- Pedersen L-F, Pedersen PB, Nielsen JL, Nielsen PH (2010) Long term/low dose formalin exposure to small-scale recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* **42**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.AQUAENG.2009.08.002>
- Perrine-Walker, F. (2020) *Phytophthora palmivora*–Cocoa Interaction. *Journal of Fungi* **6**, 167. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>
- Petersen AB, Jegstrup I, Olson L (1994) Screening for bacteria antagonistic to *Saprolegnia parasitica* with BASF pluronic polyol-F-127. In *Salmon Saprolegnias*. US Department of Energy, Portland, DOE/BP-02836-1 pp, 149-160.
- Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, van West P (2008) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* **16**, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.013>
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5**, e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Ravi A, Musthafa KS, Jegathambal G, Kathiresan K, Pandian SK (2007) Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 219–223. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2007.02180.X>
- Sanchez J, Speare D, Sims D, Johnson G (1998) Morphometric assessment of epidermal and mucous-biofilm changes caused by exposure of trout to chloramine-T or formalin treatment. *Journal of comparative pathology* **118**, 81-7. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(98\)80032-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(98)80032-7).
- Sarowar MN, van den Berg AH, McLaggan D, Young MR, van West P (2013) *Saprolegnia* strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. *Fungal Biology* **117**, 752–763. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.09.002>
- Schellenberg B, Ramel C, Dudler R (2010) *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1287–1293. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Schmid M, Frei D, Patrignani A, Schlapbach R, Frey JE, Remus-Emsermann MNP, i sur. (2018) Pushing the limits of *de novo* genome assembly for complex prokaryotic genomes harboring very long, near identical repeats. *Nucleic Acids Research* **46**, 8953–8965. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY726>

- Seuylemezian A, Aronson HS, Tan J, Lin M, Schubert W, Vaishampayan P (2018) Development of a custom MALDI-TOF MS database for species-level identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces. *Frontiers in Microbiology* **9**, 339283. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00780/BIBTEX>
- Sharma J, Sharma S, Soni V (2023) Toxicity of malachite green on plants and its phytoremediation: A review. *Regional Studies in Marine Science* **62**, 102911. <https://doi.org/10.1016/J.RSMA.2023.102911>
- Shin S, Kulatunga DCM, Dananjaya SHS, Nikapitiya C, Lee J, Zoysa MD (2017) *Saprolegnia parasitica* Isolated from Rainbow Trout in Korea: Characterization, Anti-*Saprolegnia* Activity and Host Pathogen Interaction in Zebrafish Disease Model. *Mycobiology* **45**, 297-311. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.297>
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews* **35**, 652–680. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00269.X>
- Songe MM (2017) Pathogenicity and infectivity of *Saprolegnia* species in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their eggs (doktorski rad), Norwegian University of Life Sciences, National Veterinary Institute, Oslo. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2447712>
- Srivastav AK, Roy D (2016) Malachite green (Triarylmethane dye) and Pyceze (Bronopol) induced histopathological and biochemical changes in the liver of a catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). *Indian Journal of Fisheries* **63** <https://doi.org/10.21077/ijf.2016.63.1.32019-21>
- Srivastava S, Sinha R, Roy D (2004) Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology* **66**, 319–329. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2003.09.008>
- Sullam KE, Musa T (2021) Ecological dynamics and microbial treatments against oomycete plant pathogens. *Plants* **10**, 2697. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10122697/S1>
- 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 (2019) *In vitro* activity of chemicals and commercial products against *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia delica* strains. *Journal of Fish Diseases* **42**, 237-248. <https://doi.org/10.1111/jfd.12923>

Thines M (2018) Oomycetes. *Current Biology* **28**, R812–R813. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.062>

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 Microbiology* **5**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-46/FIGURES/4>

Van den Berg A, McLaggan D, Diéguez-Urbeondo J, Van West P (2013) The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biol Rev* **27**, 33-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.05.001>

Van der Voort M, Meijer HJG, Schmidt Y, Watrous J, Dekkers E, Mendes R, i sur. (2015) Genome mining and metabolic profiling of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. SH-C52 for antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology* **6**, 147250. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00693/BIBTEX>

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>

van Thuoc D, Loan TT, Tra NT (2021) Accumulation of Ectoines By Halophilic Bacteria Isolated from Fermented Shrimp Paste: An Adaptation Mechanism to Salinity, Temperature, and pH Stress. *Current Microbiology* **78**, 2355–2366. <https://doi.org/10.1007/S00284-021-02481-1>

Van West P (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* **20**, 99–104. <https://doi.org/10.1016/J.MYCOL.2006.06.004>

Verma M, Kulshrestha S, Puri A (2017) Genome sequencing. *Methods in Molecular Biology* **1525**, 3–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1/COVER

Videvall E (2017) What's N50? - The Molecular Ecologist. <https://www.molecularecologist.com/2017/03/29/whats-n50/>. Pristupljeno 25. studenog 2023.

Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M, Kowalchuk GA (2012) A Comparison of *rpoB* and *16S* rRNA as Markers in Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity. *PLOS ONE* **7**, e30600. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030600>

Vrålstad T., Johnsen S. I., Taugbøl, T. (2011) NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Aphanomyces astaci*. – From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS < https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/a/aphanomyces-astaci/aphanomyces_astaci.pdf > Pristupljeno 20. rujna 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*. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01007>

Walker CA, van West P (2007) Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* **21**, 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2007.02.001>

Wee WY, Chew XY, Taheri S, Tan XL, Teo CH (2022) Whole genome sequencing and phylogenomic analyses of a novel glufosinate-tolerant *Pseudomonas* species. *3 Biotech* **12**, 123. <https://doi.org/10.1007/S13205-022-03185-4>

Wooster GA, Martinez CM, Bowser PR, O'Hara DS (2005) Human Health Risks Associated with Formalin Treatments Used in Aquaculture: Initial Study. *North American Journal of Aquaculture* **67**, 111–113. <https://doi.org/10.1577/A04-026.1>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja KARLA VASARI izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

— *Karla Vasari* —

Vlastoručni potpis