

Razvoj krioprezervacije vodene plijesni *Saprolegnia parasitica* primjenom eutektičkih otapala

Delimar, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:254716>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Sara Delimar
0058219973

**Razvoj krioprezervacije vodene plijesni *Saprolegnia parasitica* primjenom
eutektičkih otapala**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biologija

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

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Razvoj krioprezervacije vodene plijesni *Saprolegnia parasitica* primjenom eutektičkih
otapala

Sara Delimar, 0058219973

Sažetak:

Postojeći protokoli za krioprezervaciju vodene plijesni *Saprolegnia parasitica* koriste tradicionalne krioprotektante koji mogu biti toksični, a preživljenje nakon odmrzavanja je često suboptimalno. Zbog toga je istražena mogućnost korištenja niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) kao alternativnih otapala za krioprezervaciju ovog mikroorganizma. Analizirano je preživljenje i brzina rasta micelija *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz korištenje glicerola kao standarda i 12 DES-ova, od kojih je najbolje rezultate dao glicerol:trehaloza. Predinkubacija u trajanju od 30 minuta uzrokovala je bolji rast nakon odmrzavanja nego duža predinkubacija (1 sat, 3 sata). Postepeno zamrzavanje, nakon predinkubacije od 1 sat, nije imalo značajan učinak na uspješnost krioprezervacije. Iako je u svim pokusima uz korištenje glicerola i DES-a glicerol:trehaloza kao krioprotektanata preživljenje vodene plijesni *S. parasitica* nakon odmrzavanja bilo 100%, duže vrijeme zamrzavanja (32 dana naspram 7 dana) uzrokovalo je sporiju regeneraciju micelija pa je potrebno dodatno optimirati protokol krioprezervacije vodene plijesni *S. parasitica*.

Ključne riječi: *Saprolegnia parasitica*, vodena plijesan, krioprotektanti, niskotemperaturna eutektička otapala

Rad sadrži: 29 stranica, 6 slika, 3 tablice, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Datum obrane: 10. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Development of cryopreservation of water mold *Saprolegnia parasitica* using eutectic solvents

Sara Delimar, 0058219973

Abstract:

Existing protocols for cryopreservation of the water mould *Saprolegnia parasitica* use traditional cryoprotectants that can be toxic and survival after thawing is often suboptimal. Thus, Deep Eutectic Solvents (DES) were investigated as alternative solvents for cryopreservation of this microorganism. The survival and growth rate of *S. parasitica* mycelium after seven days of freezing at -80 °C were analysed using glycerol as a standard and 12 DES, of which glycerol:trehalose gave the best results. Pre-incubation for 30 minutes caused better growth after thawing than longer preincubation (1 hour, 3 hours). Gradual freezing, after 1 hour pre-incubation, had no significant effect on the success of cryopreservation. Although in all experiments with the use of glycerol and glycerol:trehalose DES as cryoprotectants, the survival of the water mould *S. parasitica* after thawing was 100%, a longer freezing time (32 days versus 7 days) caused a slower regeneration of the mycelium. In conclusion, further optimisation of the cryopreservation protocol of the water mould *S. parasitica* is needed.

Keywords: *Saprolegnia parasitica*, water mould, cryoprotectants, deep eutectic solvents

Thesis contains: 29 pages, 6 figures, 3 tables, 50 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ana Bielen, Associate Professor

Technical support and assistance: Marina Cvjetko Bubalo, Associate Professor

Thesis defended: July 10, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VODENE PLIJESNI (KOLJENO OOMYCOTA)	2
2.2. METODE DUGOTRAJNOG ČUVANJA VODENIH PLIJESNI.....	3
2.2.1. SERIJSKO PRECJEPLJIVANJE NA KRUTIM HRANJIVIM PODLOGAMA	4
2.2.2. SKLADIŠTENJE U DESTILIRANOJ VODI.....	4
2.2.3 SKLADIŠTENJE U SLOJU PARAFINSKOG ULJA.....	5
2.2.3. KRIOPREZERVACIJA.....	5
2.3. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA	8
2.4. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U KRIOPREZERVACIJI.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI.....	10
3.1.1. KORIŠTENI MIKROORGANIZAM	10
3.1.2. KEMIKALIJE.....	10
3.1.3. UREĐAJI I OPREMA	11
3.2. METODE.....	11
3.2.1 PRIPRAVA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	11
3.2.2. POSTUPAK ODREĐIVANJA OPTIMALNIH UVJETA KRIOPREZERVACIJE.....	12
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	13
4.1. IZBOR OPTIMALNOG DES-A U USPOREDBI S GLICEROLOM	13
4.2. ODREĐIVANJE OPTIMALNOG NAČINA ZAMRZAVANJA.....	15
4.3. ODREĐIVANJE OPTIMALNOG TRAJANJA PREDINKUBACIJE	17
4.4. UTJECAJ VREMENA DUGOTRAJNOG POHRANJIVANJA	18

5. ZAKLJUČCI.....	22
6. POPIS LITERATURE.....	23

1. UVOD

Patogeni iz roda *Saprolegnia*, među kojima je najčešća vrsta *Saprolegnia parasitica*, uzrokuju saprolegniozu, bolest koja zahvaća sve razvojne stadije riba i mnogih drugih slatkovodnih životinja, a manifestira se u obliku bijelog ili sivog filamentoznog micelija na površini kože ili ikre (Pickering i Willoughby, 1982). Saprolegnioza predstavlja značajan problem u slatkovodnoj akvakulturi te uzrokuje prosječne godišnje gubitke od 10 %. Bolesti koje ti patogeni uzrokuju teško je kontrolirati jer upotreba učinkovitog lijeka, malahitnog zelenila, više nije dopuštena u nekoliko regija (Europa, SAD), zbog kancerogenog i teratogenog djelovanja (van den Berg i sur., 2013). Kako bi se istraživanja i metode kontrole ovog patogena mogle kontinuirano provoditi, izolati roda *Saprolegnia* moraju se dugoročno čuvati u laboratoriju. Međutim, protokoli za dugotrajno čuvanje vodenih plijesni trenutno nisu dovoljno razvijeni, pogotovo krioprezervacija, koja ima mnoge prednosti u odnosu na druge metode čuvanja. Krioprezervacija je korisno rješenje za dugoročno održavanje mikrobnih kultura jer ne zahtijeva intenzivan rad te onemogućuje pojavu mutanata i kontaminacije. Međutim, na niskim temperaturama (-80 °C ili niže) voda u stanicama se zamrzava te formira kristale leda koji mogu oštetiti stanične strukture. Stoga se prilikom zamrzavanja koriste krioprotektanti koji pomažu u smanjenju formiranja leda (Nishii i Nakagiri, 1991). U do sada provedenim istraživanjima krioprezervacije vodenih plijesni kao krioprotektanti korišteni su dimetil-sulfoksid (DMSO) i glicerol, no oba pri koncentracijama koje se koriste u krioprezervaciji pokazuju citotoksičnost, a DMSO može biti i genotoksičan, što ograničava njihovu primjenu. Osim toga, prilikom krioprezervacije vodene plijesni *S. parasitica* na -80 °C stopa preživljenja bila je značajno smanjena ukoliko je vrijeme pohrane bilo godinu dana ili duže (Tian i sur., 2022). Zbog toga je potrebno unaprijediti protokole za krioprezervaciju ove vrste te u njih uključiti nove agense za krioprotekciju.

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) smjesa su dviju ili više komponenti koja ima talište niže od zasebnih komponenata (Abbott i sur., 2003). Proces pripreme DES-ova odgovara načelima zelene kemije jer se sastoji od miješanja komponenata uz blago zagrijavanje. Postoje brojni dokazi o niskoj citotoksičnosti različitih DES-ova te o mogućnosti njihove biorazgradnje. Osim toga, neki primarni metaboliti, poput trehaloze, glukoze, sorbitola i prolina, koji se često koriste za pripravu DES-ova pronađeni su u životinjama koje preživljavaju na vrlo niskim temperaturama što je potaknulo istraživanje primjene DES-ova na području krioprezervacije (Choi i sur., 2011).

Cilj ovog rada bio je razviti protokol krioprezervacije vodene plijesni *Saprolegnia parasitica*, uz primjenu DES-a koji može zamijeniti tradicionalni krioprotektant glicerol.

2. TEORIJSKI DIO

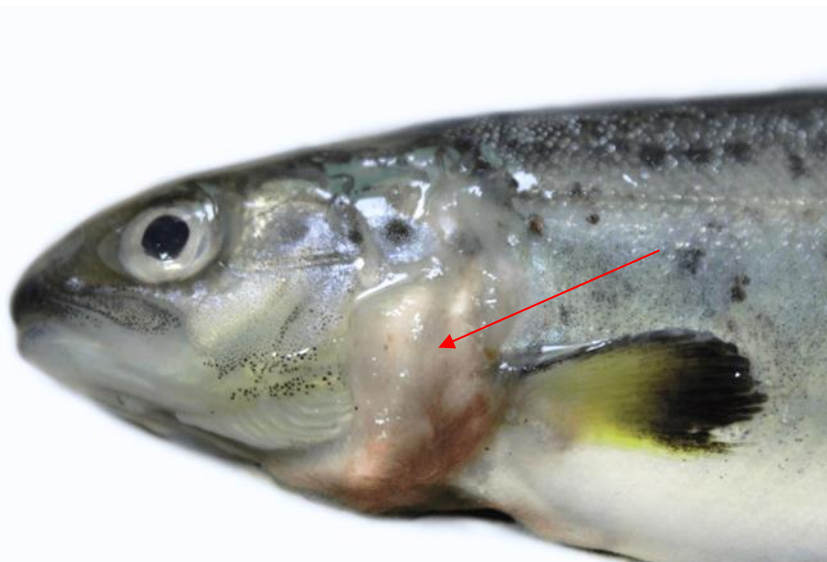
2.1. VODENE PLIJESNI (koljeno Oomycota)

Eukariotski mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* pripada porodici Saprolegniaceae, redu Saprolegniales te koljenu Oomycota (vodene plijesni). Vodene plijesni svrstane su u 12 redova, među kojima su najvažniji Saprolegniales, koji obuhvaća mnoge životinjske parazite (uključujući patogene *S. parasitica*) te Peronosporales s mnogim biljnim parazitima (Beakes i sur., 2012). Zbog prehrane apsorbicijom, filamentoznog rasta i razmnožavanja putem spora, vodene plijesni su ranije smatrane nižim oblicima gljiva. No, temeljem novijih molekularnih filogenetskih analiza, utvrđeno je da ova skupina organizama nije povezana s pravim gljivama te je koljeno Oomycota premješteno u skupinu Stramenopiles (Heterokonta), u koje spadaju i alge kremenjašice, smeđe alge i neki drugi mikroorganizmi (Lee i sur., 2012). To potvrđuju mnoga obilježja, npr. za razliku od gljiva, kod vodenih plijesni rijetke su pregrade u hifama (cenocitne hife), stanična stijenka sastoji se od celuloze, a jezgre vegetativnih stanica obično su diploidne (Link i sur., 2002).

Prema načinu prehrane, vodene plijesni mogu biti saprotrofi (hrane se mrtvom organskom tvari) i paraziti (patogeni koji se hrane živim organizmima i uzrokuju bolesti). Mnoge su vrste oportunistički patogeni, odnosno mogu sa saprofitskog prijeći na parazitski način života ako je imunost sustava domaćina oslabljen ili tome pogoduju drugi okolišni uvjeti. Među domaćine parazitskih vodenih plijesni spadaju mnoge životinjske i biljne vrste (Derevnina i sur., 2016). Oomicetni patogeni biljaka, poput predstavnika roda *Phytophthora*, imaju značajne negativne učinke u poljoprivredi, uzrokujući trulež korijena, stabljika i ostalih dijelova biljaka, što može dovesti do smrti inficirane biljke (Derevnina i sur., 2016). Iako su razorni učinci oomicetnih patogena životinja u slatkovodnim ekosustavima poznati, ti patogeni su i dalje premalo istraženi (Beakes i sur., 2012). Među najpoznatijim predstavnicima su *S. parasitica*, koja izaziva bolest saprolegniozu kod različitih domaćina, uglavnom riba, te *Aphanomyces astaci*, koji je uzročnik račje kuge kod slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae.

Vrste roda *Saprolegnia* (*S. parasitica*, *S. australis*, *S. diclina* i druge) koje uzrokuju saprolegniozu sveprisutne su u slatkovodnom okolišu i uglavnom se smatraju oportunističkim sekundarnim patogenima koji inficiraju domaćina u stresnim uvjetima, kao što su infekcija drugim patogenima, ozljede ili nepovoljni uvjeti okoliša općenito (van den Berg i sur., 2013, Gozlan i sur., 2014). Međutim, za neke sojeve vrste *S. parasitica* zabilježeno je da su visoko virulentni i uzrokuju primarne infekcije (Stueland i sur., 2005, Thoen i sur., 2011). Saprolegnioza može zahvatiti sve razvojne faze ribe, od ikre do odraslih jedinki. Bolest se manifestira kao sivo-bijele nakupine micelija na površini kože, škrga ili jaja (Torto-Alalibo i sur., 2005), što je prikazano na Slici 1. Infekcija obično započinje na mjestu površinske ozljede, uzrokuje nekrozu i propadanje epidermalnog i dermalnog tkiva (Pickering i Willoughby, 1982,

Bruno i sur., 2013) te se širi prema unutrašnjosti tijela, zahvaćajući mišiće i druge organe, što na kraju dovodi do smrti (Lone i Manohar, 2018). Kada je u pitanju ikra, micelij patogena prvo napada mrtva jaja, a zatim se širi i na zdrava, što predstavlja veliki problem u akvakulturi (Link i sur., 2002). Za razliku od patogena *A. astaci*, koji ima relativno uski raspon domaćina te uzrokuje bolest samo kod slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae, raspon domaćina vrste *S. parasitica* je puno širi, te ova vrsta može izazvati bolest kod riba, rakova i vodozemaca (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009). Saprolegnioza uzrokuje značajnu smrtnost mnogih vrsta riba koje su važne za slatkovodnu akvakulturu, kao što su atlantski losos (*Salmo salar*), kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) te razne divlje vrste poput europskog grgeča (*Perca fluviatilis*) i atlantske jesetre (*Acipenser sturio*). Iako prisutna i u prirodnim populacijama, saprolegnioza prvenstveno predstavlja problem u salmonidnoj akvakulturi gdje su, kao rezultat nedostatnih mjera kontrole bolesti i loših uvjeta uzgoja, česte masovne infekcije ribljih jaja (van West 2006, van der Berg i sur. 2013). Ovo je značajan problem širom svijeta, jer saprolegnioza u slatkovodnim akvakulturnim postrojenjima uzrokuje godišnje ekonomske gubitke više od 10 %, a povremeno i do 50 % (van West, 2006, Diéguez-Uribeondo i sur., 2007, van den Berg i sur., 2013).



Slika 1. Jedinka atlantskog lososa (*Salmo salar*) zaražena saprolegniozom. Crvenom strelicom označen je micelij patogena (Thoen i sur., 2011)

2.2. METODE DUGOTRAJNOG ČUVANJA VODENIH PLIJESNI

Dugotrajno čuvanje kolekcija čistih i genetski stabilnih kultura mikroorganizama, uključujući vodene plijesni poput vrste *S. parasitica*, neophodno je za provođenje fundamentalnih i primijenjenih istraživanja te u svim granama gdje se koriste mikroorganizmi, poput biotehnologije, prehrambene i farmaceutske industrije i medicine. Dugotrajno čuvane kolekcije mikroorganizama predstavljaju mjeru zaštite od gubitka i kontaminacije vrijednih sojeva. Jedino na ovaj način istraživači mogu kontinuirano pristupati istim sojevima mikroorganizama

tijekom dugih vremenskih razdoblja. Primjerice, referentni sojevi se mogu opetovano koristiti u ponovljivim eksperimentima, u biotehnološkim i industrijskim primjenama čuvani mikroorganizmi služe kao stabilan izvor željenih proizvoda, a očuvani sojevi patogena (poput *S. parasitica*) omogućavaju provedbu ciljanih istraživanja njihove biologije i razvoj metoda kontrole bolesti. Opisano je više metoda za kratkoročno (≤ 1 godine, poglavlje 2.2.1.) i dugoročno (> 1 godine, poglavlja 2.2.2. – 2.2.4.) održavanje kultura vodenih plijesni.

2.2.1. Serijsko precjepljivanje na krutim hranjivim podlogama

Vodne plijesni rodova *Phytophthora* (Houseknecht i sur., 2012), *Saprolegnia* (Songe i sur., 2014), *Achlya*, *Pythium* i drugih mogu se kratkoročno održavati u laboratoriju serijskim precjepljivanjem na krutim hranjivim podlogama svakih 2-3 mjeseca (Smith i sur., 1986). Prednost ove metode je da se kulture čuvaju u hladnjacima te je jednostavna i jeftina jer nije potrebna specijalizirana oprema. Međutim, održavanje žive kulture povremenim precjepljivanjem vremenski je intenzivno i podložno kontaminaciji, posebno kada se rutinski radi s velikom zbirkom (Nakasone i sur., 2004). Što je još važnije, tijekom opetovanog precjepljivanja može doći do selekcije mutanata koji imaju promijenjena genetska i fenotipska obilježja (npr. slabljenje sposobnosti sporulacije, slabljenje virulencije) (Ko 2003, Songe i sur., 2014). Zbog navedenih nedostataka metoda je općenito neprikladna za dugoročno čuvanje kolekcija sojeva vodenih plijesni (Nakasone i sur., 2004).

2.2.2. Skladištenje u destiliranoj vodi

Jedna od metoda dugotrajnog čuvanja vodenih plijesni je skladištenje u destiliranoj vodi. Prvi korak uobičajenog protokola je uzgoj vodene plijesni na krutoj hranjivoj podlozi, a zatim se diskovi krute hranjive podloge s ruba kolonije prenesu u epruvete sa sterilnom vodom, sa ili bez sjemenki konoplje. Epruvete se najčešće čuvaju na sobnoj temperaturi u mraku. Diskovi s micelijem se mogu prema potrebi nacijepiti na svježim krutim hranjivim podlogama kako bi se nastavio rast (Sutton i sur., 2009). Ova je metoda prikladna za skladištenje mnogih vrsta roda *Phytophthora* do 7 godina, ali opažene su razlike u preživljenju između različitih vrsta ovog roda (Boesewinkel, 1976). Primjerice, Ko (2003.) je uspješno očuvao izolate *P. cinnamomi*, *P. parasitica* i *P. palmivora* u sterilnoj destiliranoj vodi na sobnoj temperaturi i do 23 godine, no ta metoda nije bila prikladna za održavanje vrste *P. infestans* i nekih izolata *P. colocasiae*, jer su uginuli tijekom prvih 2 do 6 mjeseca skladištenja. Stoga su Cui i sur. (2018) modificirali ovu metodu i uspješno skladištili *P. infestans* u destiliranoj vodi na 12 °C i zaključili da se optimalna temperatura skladištenja razlikuje ovisno o vrsti iz roda *Phytophthora*. Molina-Gayosso i sur. (2016), osim što su uspješno očuvali tri vrste iz roda *Phytophthora* do 21 godinu, uspjeli su očuvati i dvije vrste roda *Pythium* do 7 godina. Čuvanje vrsta iz rodova *Phytophthora* i *Pythium* u sterilnoj vodi je jednostavno i jeftino, posebno u usporedbi s metodama u kojima je potrebno

učestalo precjepljivanje ili skupa oprema kao u slučaju krioprezervacije (Molina-Gayosso i sur., 2016). U istraživanju koje su proveli Smith i sur. (1986) pokazano je da ova metoda omogućuje čuvanje većine izolata iz rodova *Phytophthora* i *Pythium* i do 3 godine, ali su mnogi od onih koji su preživjeli pokazali pogoršanje rasta i sporulacije. Zbog toga ova je metoda preporučena samo za srednje trajno skladištenje. Važno je također napomenuti da je nakon re-kultivacije 10 izolata (18 %) roda *Phytophthora* i 4 izolata (33 %) roda *Pythium* bilo kontaminirano. Iako nema objavljenih znanstvenih radova, ova metoda se može koristiti i za srednje trajno skladištenje vrsta iz roda *Saprolegnia*. U Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu sojevi vodenih plijesni iz roda *Saprolegnia*, uključujući *S. parasitica*, skladišti se upravo ovom metodom. Vodena plijesan skladišti se na sjemenkama konoplje u destiliranoj vodi pri 4 °C te se precjepljuje svakih godinu dana (Pavić i sur., 2021).

2.2.3 Skladištenje u sloju parafinskog ulja

Skladištenje u sloju parafinskog ulja je metoda za očuvanje vodenih plijesni na način da se kulture prvo uzgoje na kosim krutim hranjivim podlogama, a zatim preliju parafinskim uljem i čuvaju na 4-10 °C (Buell i Weston, 1947). Tu je metodu primijenila Reischer (1949) za skladištenje sedam rodova vodenih plijesni (*Achlya*, *Dictyuchus*, *Isoachlya*, *Leptolegnia*, *Pythiopsis*, *Saprolegnia*, *Thraustotheca*). Većina je izolata preživjela, a svih 19 izolata iz roda *Saprolegnia* preživjelo je od 10 do 30 mjeseci. Tijekom dugotrajnijeg skladištenja sojeva iz roda *Saprolegnia* potrebno je subkultiviranje svake dvije godine (Ravimannan i sur., 2012). Iako je ova metoda jednostavna i ne zahtijeva skupu opremu, zbog ograničenog vremena skladištenja, prikladna je za vodene plijesni koje se ne mogu krioprezervirati (Cui i sur., 2018).

2.2.3. Krioprezervacija

Skladištenje u zamrzivaču (-80 °C) ili u tekućem dušiku (-196 °C) metode su dugotrajnog skladištenja kod kojih dolazi do zamrzavanja na niskim temperaturama što onemogućuje daljnji rast micelija i mogućnost nastanka mutanata te isključuje mogućnost kontaminacije. Pri tome se uzorku može dodati i krioprotektant, odnosno tvar koja štiti stanice od oštećenja uzrokovanih zamrzavanjem tako što sprečava formiranje ledenih kristala unutar stanica ili smanjuje negativne učinke tih kristala na stanice. Velika prednost krioprezervacije je što ne zahtijeva intenzivan rad jer omogućuje višegodišnju pohranu kultura mikroorganizama, a njezin jedini nedostatak je visoka cijena aparature, a posebno tekućeg dušika kojeg je potrebno mijenjati svakih nekoliko dana ili tjedana, ovisno o volumenu posude (Nishii i Nakagiri, 1991, Nakasone i sur., 2004).

Za većinu rodova i vrsta vodenih plijesni, uključujući rod *Saprolegnia*, metode krioprezervacije tek su u razvoju (Tablica 1). U svim do sada provedenim istraživanjima krioprezervacije

vodenih plijesni korišteni su penetrirajući krioprotektanti, odnosno molekule koje su dovoljno male da mogu proći kroz stanične membrane i djelovati unutar stanica. Najčešće korišteni penetrirajući krioprotektanti uključuju DMSO, glicerol i etilen glikol. Oni pomažu u smanjenju točke smrzavanja vode i sprečavaju formiranje velikih ledenih kristala (Tian i sur., 2022). Vodene plijesni, uključujući i vrstu *S. parasitica*, uglavnom su postepeno smrzavane i brzo odmrzavane na povišenoj temperaturi (30 – 40 °C), a preživljenje je variralo i u postotku (22 – 100 %) i u trajanju (5 min – 5 god) (Smith i sur., 1986, Morris i sur., 1988, Nishii i Nakagiri, 1991, Eszterbauer i sur., 2020, MacAulay, 2023, Tablica 1). Smith i sur. (1986) su nakon dvogodišnjeg skladištenja izolata *S. parasitica* u tekućem dušiku, postigli preživljenje od 63 %, skoro jednako kao i tijekom krioprezervacije ostalih vodenih plijesni iz rodova *Phytophthora* i *Pythium*. Morris i sur. (1988) su postigli preživljenje od 32.5 % tijekom skladištenja u tekućem dušiku iako je vrijeme smrzavanja bilo samo 5 minuta, a Nishii i Nakagiri (1991) jedini su dobili 100 %-tno preživljenje nakon krioprezervacije *S. parasitica* u tekućem dušiku. Budući je preživljenje nakon skladištenja u tekućem dušiku jako variralo, a cijena ovog postupka je za dugo vrijeme pohranjivanja visoka, novija istraživanja fokusirala su se na skladištenje u zamrzivaču na -80 °C. Tako su Eszterbauer i sur. (2020) postigli 66 %-tno preživljenje kultura *S. parasitica* nakon 12 mjeseci tijekom skladištenja u 10 %-tnom glicerolu na sjemenkama konoplje pri -80 °C. MacAulay (2023) provjerio je uspješnost metoda krioprezervacije (Tablica 1) na preživljenje vrste *S. parasitica* tijekom skladištenja u trajanju 1 – 50 dana i uz korištenje većeg broja replika (7 – 20). Stope preživljavanja *S. parasitica* varirale su ovisno o metodi krioprezervacije, sa stopom uspješnosti od 100 % za sve sojeve testirane prema metodi Eszterbauer i sur. (2020.), dok je preživljavanje korištenjem ostalih metoda variralo od 0 % do 57 %.

Zaključno, u svim gore navedenim istraživanjima navedeni su samo podaci o preživljenju, ali ne i o potencijalnim razlikama u regeneraciji odnosno brzini rasta nakon različitih tretmana. Također, najduže vrijeme krioprezervacije nakon kojeg je preživljenje izolata *S. parasitica* još uvijek bilo 100 % iznosilo je 6 mjeseci (Nishii i Nakagiri 1991). Stoga je vidljivo da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razvili i unaprijedili protokoli za dugotrajnu krioprezervaciju vrste *S. parasitica* i drugih vodenih plijesni.

Tablica 1. Metode krioprezervacije vodenih plijesni. DMSO = dimetilsulfoksid, LN = tekući dušik (engl. *liquid nitrogen*), PEG = polietilen glikol

Vodena plijesan	Krioprotektant	Temperatura (°C)		Preživljenje % (broj replika)	Trajanje pohranjivanja	Izvor
		Smrzavanje	Odmrzavanje			
<i>Phytophthora infestans</i>	15 % DMSO	-1°C min ⁻¹ do -40°C, te uronjen u LN (-196°C)	40 °C	22 % (n = 3)	5 godina	Dahmen i sur. (1983)
<i>Phytophthora</i> & <i>Pythium</i>	10 % glicerol	60 min na -35°C, te uronjen u LN (-196°C)	37 °C	64 % (n = 23)	2 godine	Smith i sur. (1986)
<i>S. parasitica</i>	10 % glicerol	60 min na -35°C, te uronjen u LN (-196°C)	37 °C	63 % (n = 24)	2 godine	Smith i sur. (1986)
<i>S. parasitica</i>	10 % glicerol	-1°C/min do -40°C, te uronjen u LN (-196°C)	35 °C	32.5 % (n = 4)	5 minuta	Morris i sur. (1988)
<i>Phytophthora</i> & <i>Pythium</i>	10 % DMSO	-1°C/min do -40°C, te -2°C min ⁻¹ do -80°C, te uronjen u LN (-196°C)	30 °C	100 % (n = 18)	2 godine	Nishii i Nakagiri (1991)
<i>S. parasitica</i>	10 % glicerol	-1°C/min do -40°C, te -2°C/min do -80°C, te uronjen u LN (-196°C)	30 °C	100 % (n = 4)	6 mjeseci	Nishii i Nakagiri (1991)
<i>S. parasitica</i> , <i>S. australis</i> i <i>S. ferax</i>	10 % glicerol i sjemenka konoplje	+4°C 1h, te direktno na -80°C	sobna temperatura	66 % (n = 3)	1 godina	Eszterbauer i sur. (2020)
<i>S. parasitica</i>	10 % glicerol i sjemenka konoplje	+4°C 1h, te direktno na -80°C	sobna temperatura	100 % (n = 15)	7 dana	MacAulay (2023)
<i>S. parasitica</i>	10 % glicerol	+4°C 1h, te direktno na -80°C	sobna temperatura	100 % (n = 10)	7 dana	MacAulay (2023)

2.3. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Tradicionalna organska otapala koja se koriste u industriji i laboratorijima tijekom provođenja različitih procesa, npr. ekstrakcije, otapanja ili suspendiranja materijala netopivih u vodi, poput heksana, heptana, diklormetana, dimetilsulfoksida, dimetilformamida i drugih, često imaju negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš. Primjerice, izloženost različitim otapalima može uzrokovati različite simptome poput mučnine, gubitka ravnoteže, ošamućenosti, nesvjestice te kožnih i respiratornih bolesti, a uslijed odlaganja ovih otapala može doći do kontaminacije tla, vode i zraka te toksičnih učinaka na živi svijet (Uzma i sur., 2008). Znanstvenici stoga razvijaju nova alternativna otapala koja imaju manje izražene negativne učinke.

Jedna od takvih alternativnih održivijih otapala su niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES). Eutektik je termin koji se koristi za definiranje homogene smjese tvari čije je talište niže od točke tališta bilo kojeg od njenih sastojaka, no kod DES-ova dolazi do značajne negativne devijacije od onog što se očekuje za idealnu smjesu. Tijekom pripreme smjese kvaternih amonijevih soli (npr., kolin klorid, talište 302 °C) i uree (talište 133 °C) u molarnom omjeru 1:2 dolazi do značajnog sniženja tališta u usporedbi s talištem pojedinih komponenata te talište smjese iznosi 12 °C (Abbott i sur., 2003). Tako značajno snižavanje tališta pripisuje se interakciji između komponenti smjese preko intermolekularnih vodikovih veza jer DES-ovi nastaju miješanjem donora vodikove veze i akceptora vodikove veze što uzrokuje delokalizaciju naboja i snižavanja tališta (Sekharan i sur., 2022).

DES-ovi imaju mnoga povoljna svojstva kao što su niska hlapljivost, nezapaljivost, niska toksičnost te jednostavna priprema iz široko dostupnih prirodnih sirovina pa se smatraju izvrsnom zelenom alternativom konvencionalnim organskim otapalima i mogu se uključiti u brojne procese kako bi bili učinkovitiji i održiviji (Hansen i suradnici, 2021). Osim toga održivost DES-ova, mogućnost finog podešavanja njihovih svojstava (npr. pH-vrijednost, polaritet, hidrofilitet/hidrofobnost, viskoznost), čine ih idealnim zelenim kandidatima za (bio)kemijske, elektrokemijske i materijalne primjene, kao i za ekstrakciju različitih spojeva, kako anorganskih tako i organskih (Mbous i suradnici, 2017). Također, primarni metaboliti koji se koriste kao gradivne komponente DES-ova, poput trehaloze, glukoze, sorbitola i prolina, pronađeni su u organizmima koje preživljavaju izrazito niske temperature i uključene su u mnoge metaboličke puteve tijekom zime. To je potaknulo primjenu DES-ova u krioprezervaciji stanica (Choi i sur., 2011).

2.4. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U KRIOPREZERVACIJI

Trenutno najrašireniji krioprotektant za krioprezervaciju stanica sisavaca u biomedicini je DMSO, koji je prihvaćen kao „zlatni standard” za krioprezervaciju (Castro i sur., 2018).

Međutim, DMSO pokazuje nezanemarivu citotoksičnost i mutagenost (Weng i Beauchesne, 2020), što ograničava njegovu široku primjenu. Osim DMSO-a, kod krioprezervacije mikroorganizama najčešće se koristi glicerol (Câmara i Sant'Ana, 2021), iako također ispoljava citotoksičnost u višim koncentracijama, uzrokujući potencijalne probleme tijekom krioprezervacije (Tian i sur., 2022).

U posljednje se vrijeme sve više istražuje primjena DES-ova kao novih krioprotektanata (Castro i sur., 2018, Qiao i sur., 2018, Craveiro i sur., 2021, Hornberger i sur., 2021, Bryant i sur., 2022, Tian i sur., 2022, He i sur., 2023). Castro i sur. (2018) koristili su DES na bazi glicerola i trehaloze (Gly:Treh) za krioprezervaciju mišjih fibroblasta te je utvrđeno da taj DES može smanjiti broj kristala leda, a time i oštećenja stanica tijekom smrzavanja, što je rezultiralo boljim učincima u usporedbi s DMSO-om. Hornberger i sur. (2021) također su dokazali da Gly:Treh DES može dobro krioprezervirati Jurkat stanice, liniju ljudskih limfocita T. Potvrdili su da Gly:Treh DES utječe na termofizička svojstva otopine na način da suzbija stvaranje kristala leda i dehidraciju nezamrznutog područja. Craveiro i sur. (2021) prvi su koristili DES-ove na bazi prolina i glukoze te prolina, glukoze i uree za krioprezervaciju stanica sisavaca. Rezultati tog istraživanja pokazali su da su korišteni DES-ovi manje toksični, a jednako djelotvorni kao DMSO. Bryant i sur. (2022) najbolje rezultate krioprezervacije četiri ljudske stanične linije (THP-1, HaCat, PC3, UG87-MG) postigli su kada su koristili DES od prolina i glicerola, u odnosu na ostale korištene DES-ove (kolin klorid:glicerol, kolin klorid:galaktoza, betain:glicerol, betain:galaktoza, prolin:glicerol, prolin:galaktoza). He i sur. (2023) istražili su utjecaj šest DES-ova (betain:etilen glikol, kolin klorid:etilen glikol, prolin:etilen glikol, kolin klorid:glicerol, prolin:glicerol) na krioprezervaciju mezenhimalnih matičnih stanica ljudske pupkotine (HuMSC). Najveće preživljenje postignuto je kada su koristili DES-ove betain:glicerol i prolin:glicerol, a općenito svi DES-ovi uzrokovali su manju toksičnost i veće preživljenje stanica nego DMSO. Samo dva istraživanja krioprezervacije uz primjenu DES-ova provedena su na mikroorganizmima te su oba utvrdila da je primjena DES-ova u krioprezervaciji pogodnija od primjene glicerola ili DMSO-a. Qiao i sur. (2018) izvijestili su o pet DES-ova (kolin klorid:ksilitol, etilen glikol:prolin, kolin klorid:glukoza, glicerol:prolin, kolin klorid:sorbitol) kao alternativnih krioprotektanata za dugotrajno čuvanje bakterija mliječne kiseline, a najbolje rezultate dobili su koristeći DES pripremljen od glicerola i prolina. Ovaj DES najbolje je djelovao na strukturni integritet stanične membrane i aktivnost unutarstaničnih enzima te je postignuto najveće preživljenje kod triju testiranih vrsta mliječnih bakterija (*S. thermophilus*, *L. casei* i *L. lactis*). Nadalje, testirana je primjena dvaju DES-ova (prolin:glukoza i prolin:sorbitol) u krioprezervaciji kvasca *S. cerevisiae* (Tian i sur., 2022) te je pokazano da su korišteni DES-ovi manje toksični od glicerola i DMSO te, za razliku od glicerola i DMSO-a, ne uzrokuju promjene morfologije stanica.

Iz svega navedenog vidljivo je da veći broj novijih istraživanja dokazuje pozitivno djelovanje DES-ova u krioprezervaciji stanica sisavaca i mikroorganizama te predstavlja održiviju alternativu tradicionalnim krioprotektantima DMSO-u i glicerolu. Međutim, mogućnosti korištenja DES-ova kao krioprotektanata nisu istražene kod mnogih skupina organizama, uključujući vodene plijesni. Stoga je tema ovog završnog rada bila po prvi put razviti protokol za krioprezervaciju patogene vodene plijesni *Saprolegnia parasitica* uz korištenje DES-ova.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Korišteni mikroorganizam

U ovom istraživanju korišten je izolat vodene plijesni *Saprolegnia parasitica* Coker CBS 223.65 (red Saprolegniales, koljeno Oomycota) sa štuke (*Esox lucius*), dobiven od R. Galuppi (Sveučilište u Bolonji, Italija). Vodena plijesan *S. parasitica* uzgajana je na krutoj hranjivoj podlozi GY (5 g/L glukoze, 1 g/L kvašćevog ekstrakta, 12 g/L agara) s dodatkom antibiotika penicilina G (6 mg/L) i oksolinske kiseline (10 mg/L) kako bi se spriječio rast većine bakterija (Pavić i sur., 2021). Vodena plijesan *S. parasitica* uzgajana je pri 14 °C te čuvana pri 4 °C i precjepljivana u aseptičkim uvjetima u laminaru svakih tjedan dana.

3.1.2. Kemikalije

Betain, Thermo Fischer Scientific, Belgija

Destilirana voda, PBF, Zagreb, RH

D-Fruktoza, Lach-Ner, Republika Češka

Dimetilsulfonopropionat, Biosynth, Slovačka

Ektoin, Sigma-Aldrich, Njemačka

Glicerol, Merck, Njemačka

Izopropanol, Sigma-Aldrich, Njemačka

L-Prolin, Thermo Fischer Scientific, Njemačka

L-a-Glicerofosforilkolin, Biosynth, Slovačka

Oksolinska kiselina, Sigma-Aldrich, Kina

Penicilin G, Sigma-Aldrich, SAD

Saharoza, Sigma-Aldrich, Švicarska

Sarkozin, Sigma-Aldrich, Kina

Sorbitol, Biosynth, Slovačka

Taurin, Sigma-Aldrich, Kina

Trehaloza, Sigma-Aldrich, SAD

Urea, Sigma-Aldrich, Njemačka

3.1.3. Uređaji i oprema

Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka

Inkubator/tresilica ES-20/60, Biosan, Latvija

Innova 42 Inkubator s hlađenjem, Eppendorf, Kanada

Komora za sterilni rad, Alpina, Poljska

„Mr Frosty”, Nalgene, visina 86 mm, promjer 117 mm, Sigma Aldrich

Zamrzivač ultra niskih temperatura DF-290, Nüve, Turska

Laboratorijski pribor (automatske pipete, nastavci za pipete, Falcon epruvete, Petrijeve zdjelice, mikrobiološka eza, kriotube, špatula, plamenik)

3.2. Metode

3.2.1 Priprava niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Za potrebe provođenja istraživanja pripravljeno je dvanaest DES-ova čije su gradivne komponente te njihovi omjeri popisani u Tablici 2. Sva navedena otapala pripravljena su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Tablica 2. Niskotemperaturna eutektička otapala korištena pri izradi završnog rada

Niskotemperaturno eutektičko otapalo	Kratice	Molarni omjer komponenata	Udio vode [%]
Dvokomponentni DES-ovi:			
prolin:glicerol	Pro:Gly	1:3	/
ektoin:glicerol	Ect:Gly	1:2	20
betain:glicerol	B:Gly	1:2	10
glicerol:trehaloza	Gly:Treh	30:1	/
sarkozin:glicerol	Sar:Gly	1:2	20
dimetilsulfonopropionat:glicerol	DMSP:Gly	1:2	20
Višekomponentni DES-ovi:			
betain:glicerol:saharoza	B:Gly:Suc	2:3:1	10
betain:glicerol:ektoin	B:Gly:Ect	1:3:2	/
betain:saharoza:prolin	B:Suc:Pro	5:2:2	20
prolin:fruktoza:glicerol	Pro:Fru:Gly	1:1:1	12
betain:glicerol:trehaloza	B:Gly:Treh	2:3:1	13
betain:glicerofosforilkolin:sorbitol:taurin:urea	(B:GPC: Sor:Tau:U)	1:2.8:3.1:0.1:7.1	7

Kemikalije za pripremu DES-ova korištene su bez prethodnog pročišćavanja te su vagane na analitičkoj vagi. Odvage potrebnih kemikalija kvantitativno su prenesene u Falcon epruvete, te je po potrebi dodan određeni volumen destilirane vode, nakon čega su smjese zagrijavane na temperaturu između 40 °C i 60 °C i miješane u inkubator-tresilici u trajanju do 3 sata. Reakcija je završena kada se kao produkt dobije bistra tekućina. Tako pripremljeni DES-ovi razrijeđeni su sterilnom destiliranom vodom do volumnog udjela od 10 %. Osim DES-ova pripremljen je 10 %-tni glicerol miješanjem odgovarajućeg omjera glicerola i sterilne destilirane vode.

3.2.2. Postupak određivanja optimalnih uvjeta krioprezervacije

Rub micelija kulture *S. parasitica* porasle na krutoj hranjivoj podlozi GY izbušen je prethodno steriliziranim metalnim bušačem (d = 5 mm) kako bi se dobili diskovi hranjive podloge promjera 5 mm obrasli svježim micelijem. Potom su diskovi mikrobiološkom ezom preneseni u kriotube volumena 2 mL koje su sadržavale 1,5 mL glicerola ili određenog DES-a volumnog udjela 10 %. Tako pripremljeni uzorci su predinkubirani pri 14 °C u inkubatoru te nakon toga smrznuti u zamrzivaču pri -80 °C. Nakon nekog vremena uzorci su odmrznuti u vodenoj kupelji na sobnoj temperaturi. Nakon odmrzavanja, diskovi prorašteni micelijem *S. parasitica* isprani su u sterilnoj destiliranoj vodi kako bi se uklonilo preostalo otapalo i naciepljeni na krutu hranjivu podlogu GY. Vodena plijesan je uzgajana pri 14 °C tijekom 7 dana te je praćeno njezino preživljenje i rast mjerenjem polumjera micelija. Pokusi su rađeni s 3 ili 5 replika što je u prikazu rezultata naznačeno s n = 3 ili n = 5.

Gore opisani opći postupak korišten je tijekom svakog eksperimenta, uz variranje određenih parametara s ciljem određivanja optimalnih uvjeta krioprezervacije vodene plijesni *S. parasitica*:

- korišteni DES (Tablica 1):
 - dvokomponentni (Pro:Gly, B:Gly, Ect:Gly, Gly:Treh, Sar:Gly ili DMSP:Gly),
 - višekomponentni (B:Gly:Treh, B:Gly:Suc, B:Gly:Ect, B:Suc:Pro, Pro:Fru:Gly ili B:GPC: Sor: Tau:U),
- trajanje predinkubacije pri 14 °C:
 - 30 minuta,
 - 1 sat,
 - 3 sata,
- način zamrzavanja:
 - uzorci nakon predinkubacije stavljeni direktno u zamrzivač na -80 °C,
 - uzorci nakon predinkubacije stavljeni u Mr. Frosty-spremnik s izopropanolom na -80 °C kroz 40 min, kako bi došlo do postepenog zamrzavanja (-1 °C/min),

te nakon toga pohranjeni bez Mr. Frosty-spremnika na -80 °C,

- vrijeme pohrane pri -80 °C:
 - 7 dana,
 - 32 dana.

3.3. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza provedena je u nekoliko koraka u programskom jeziku Python u Google Colab okruženju. Podaci su prvo učitani iz Excel datoteke u DataFrame pomoću pandas knjižnice. Za testiranje postoji li statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti različitih grupa podataka korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*). Nakon što je ANOVA test pokazao statističku značajnost, primijenjen je Tukeyev HSD test za višestruke usporedbe. Ovaj test daje uvid u parove grupa koji pokazuju značajne razlike, uz pružanje intervala povjerenja za te razlike.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izbor optimalnog DES-a u usporedbi s glicerolom

Analizirana je mogućnost primjene različitih DES-ova u krioprezervaciji patogene vodene plijesni *S. parasitica* u usporedbi s glicerolom kao čestim krioprotektantom vodenih plijesni i drugih tipova stanica. Uzorci vodene plijesni inkubirani su u različitim DES-ovima i glicerolu volumnog udjela 10 % pri 14 °C u trajanju od 1 sat, smrznuti pri -80 °C te odmrznuti nakon 7 dana u vodenoj kupelji. Volumni udio otapala od 10 % odabran je jer su u većini ranijih istraživanja najbolji rezultati krioprezervacije i najmanja toksičnost dobiveni kada je korišten volumni udio bio 10 % (Smith i sur., 1986, Morris i sur., 1988, Nishii i Nakagiri, 1991, Castro i sur., 2018, Eszterbauer i sur., 2020, Craveiro i sur., 2021, Bryant i sur., 2022, Bryant i sur., 2023, MacAulay, 2023).

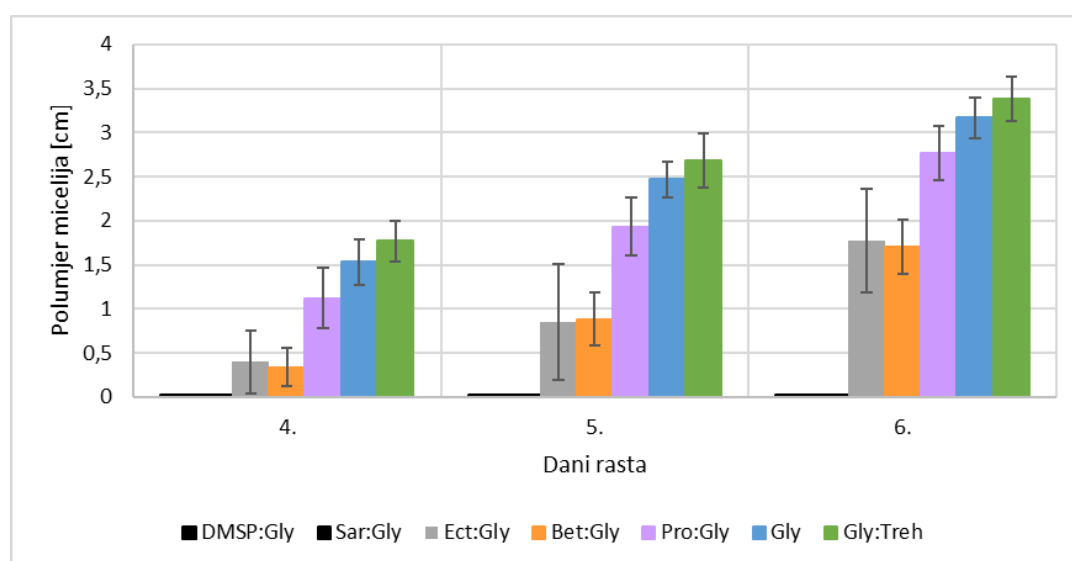
Rezultati ovog pokusa pokazali su značajne razlike u preživljenju (Tablica 3) i rastu (Slike 2 i 3) uzoraka *S. parasitica* ovisno o korištenom otapalu. Rezultati ANOVA testa pokazali su postojanje statistički značajnih razlika između svih testiranih grupa 6. dan rasta ($F = 26,7919$, $p < 0,0001$), a Tukeyevim HSD testom je utvrđeno između kojih grupa postoje značajne razlike.

Glicerol, većina dvokomponentnih DES-ova (Pro:Gly, Ect:Gly, B:Gly, Gly:Treh) i višekomponentni DES (B:GPC:Sor:Tau:U) imali su najbolje krioprotektivno djelovanje jer su preživjele sve 3 replike (Tablica 3). Za ostale DES-ove utvrđeno je slabije krioprotektivno djelovanje jer su preživjele 2/3 replike (B:Gly:Treh, B:Gly:Suc), 1/3 replike (B:Gly:Ect, B:Suc:Pro) ili niti jedna replika nije preživjela (Sar:Gly, DMSP:Gly). Najbolja krioprotektivna

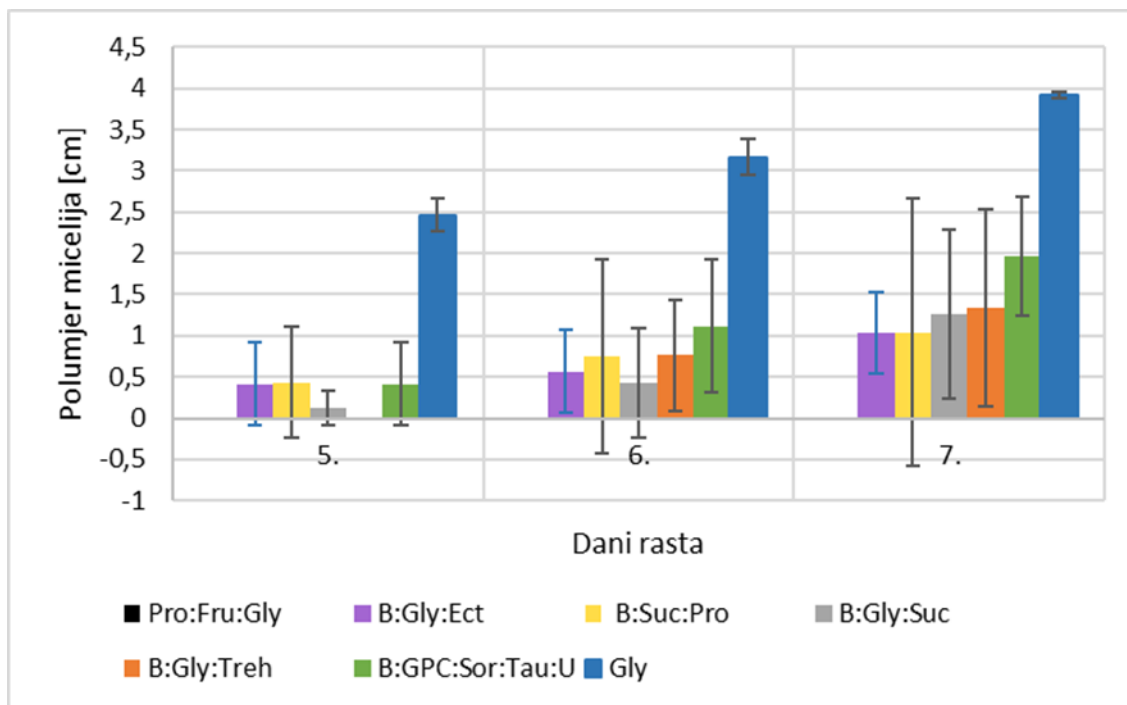
svojstva pokazali su Gly:Treh (prosječni radijus micelija 6. dana uzgoja $3,383 \pm 0,256$ cm), Gly ($3,167 \pm 0,225$ cm) i Pro:Gly ($2,767 \pm 0,301$ cm) (Slika 2), ali između ova tri krioprotektanta Tukeyevim HSD testom nije utvrđena statistički značajna razlika u rastu micelija *S. parasitica* 6. dana uzgoja ($p > 0,05$). Ipak, s obzirom da je rast bio najbolji nakon korištenja Gly:Treh DES-a i Gly, daljnji pokusi optimizacije krioprezervacije vodene plijesni *S. parasitica* provedeni su uz korištenje ta dva otapala.

Tablica 3. Preživljenje vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja uz primjenu različitih DES-ova i glicerola kao standardnog krioprotektanta u volumnom udjelu 10 %. Preživljenje je iskazano u obliku broja preživjelih uzoraka od ukupno tri.

Otapalo	Preživljenje
Gly	3/3
Pro:Gly	3/3
Ect:Gly	3/3
B:Gly	3/3
Gly:Treh	3/3
B:GPC:Sor:Tau:U	3/3
B:Gly:Treh	2/3
B:Gly:Suc	2/3
B:Gly:Ect	1/3
B:Suc:Pro	1/3
Sar:Gly	0/3
DMSP:Gly	0/3
Pro:Fru:Gly	0/3



Slika 2. Rast micelija vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja uz primjenu glicerola i dvokomponentnih DES-ova u volumnom udjelu od 10 %. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija ($n = 3$).



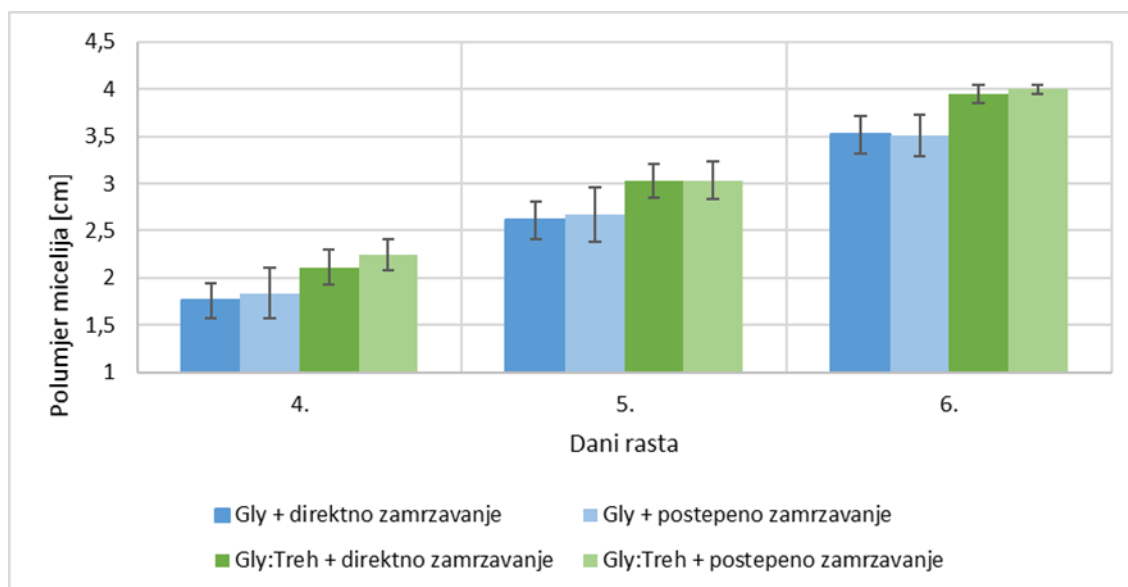
Slika 3. Rast micelija vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja uz primjenu glicerola i višekomponentnih DES-ova u volumnom udjelu od 10 %. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Neki od navedenih rezultata u skladu su s ranijim istraživanjima. Primjerice dvokomponentni DES-ovi Pro:Gly, B:Gly i Gly:Treh koji su rezultirali 100%-tnim preživljenjem vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog skladištenja i ranije su pokazali potencijal u krioprezervaciji različitih tipova stanica (Castro i sur., 2018, Qiao i sur., 2018, Craveiro i sur., 2021, Hornberger i sur., 2021, Bryant i sur., 2022, Tian i sur., 2022, Bryant i sur., 2023, He i sur., 2023). Ostali DES-ovi korišteni u ovom radu po prvi su puta korišteni kao krioprotektanti, a među njima su najbolji rezultati dobiveni korištenjem B:GPC:Sor:Tau:U čiji je sastav jednak sastavu osmolita u bubregu zeca (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). Ovo sugerira da bi se u budućim istraživanjima mogli testirati DES-ovi koji se nalaze u ribama ili rakovima koji su prirodni domaćini vodenoj plijesni *S. parasitica*. Pretpostavlja se da bi bioinspirirani DES-ovi mogli biti bolji krioprotektanti jer oponašaju prirodne osmolitne sustave koji su poznati po svojoj sposobnosti stabiliziranja biomolekula u stresnim uvjetima, uključujući smrzavanje.

4.2. Određivanje optimalnog načina zamrzavanja

U mnogim protokolima krioprezervacije, uključujući vodene plijesni kao modelne organizme, primijenjeno je postepeno zamrzavanje. Primjerice, Nishii i Nakagiri (1991) postigli su 100 %-tno preživljenje kada su provodili postepeno zamrzavanje (Tablica 1) tijekom krioprezervacije patogena *S. parasitica* i vrsta iz rodova *Phytophthora* i *Pythium*. Nasuprot tome, MacAulay

(2023) postigao je slabije preživljenje kada je koristio postepeno zamrzavanje, a 100%-tno preživljenje kada nije. Stoga je u ovom radu istraženo ima li postepeno zamrzavanje korištenjem Mr. Frosty spremnika u kojem se nalazio izopropanol pozitivan učinak na regeneraciju i preživljenje vodene plijesni *S. parasitica* (Slika 4). Uzorci vodene plijesni inkubirani su u Gly i Gly:Treh pri 14 °C u trajanju od 1 sat, zatim su ili direktno smrznuti pri -80 °C ili postepeno zamrznuti u Mr. Frosty spremniku brzinom od -1 °C/min kroz 40 min pa tek onda smrznuti pri -80 °C. Odmrznuti su nakon sedam dana u vodenoj kupelji pri sobnoj temperaturi te su rezultati ANOVA testa pokazali postojanje statistički značajnih razlika između svih testiranih grupa 6. dan rasta ($F = 28,0747$, $p < 0,0001$). Tukeyevim HSD testom utvrđeno je da statistički značajne razlike postoje između dva primijenjena otapala, odnosno da je Gly:Treh nešto bolji krioprotektant od široko rasprostranjenog glicerola ($p < 0,05$), potvrđujući trend opažen u prethodnom pokusu (Slika 2). Što se tiče načina zamrzavanja, može se uočiti da je postepeno zamrzavanje blago pozitivno utjecalo na brzinu rasta micelija, ali taj efekt nije bio statistički značajan ($p > 0,05$). Ipak, zbog toga je tijekom provođenja ostalih pokusa korišteno postepeno zamrzavanje. U nekim ranijim istraživanjima je dobro preživljenje vodenih plijesni nakon odmrzavanja bilo postignuto i bez predinkubacije, ali uz postepeno zamrzavanje (Dahmen i sur., 1983, Smith i sur., 1986, Morris i sur., 1988, Nishii i Nakagiri, 1991). Može se pretpostaviti da postepeno zamrzavanje može biti alternativa predinkubaciji u smislu penetracije krioprotektanta u stanice.

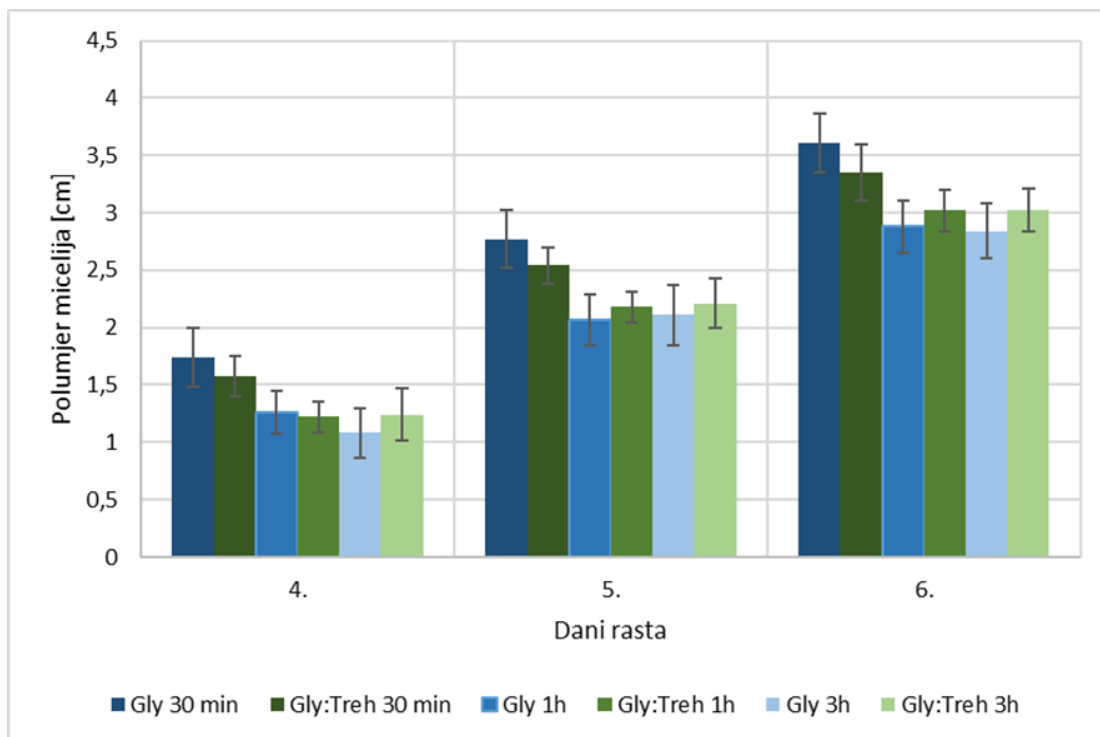


Slika 4. Rast micelija vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja uz primjenu Gly i Gly:Treh u volumnom udjelu od 10 %. Zamrzavanje je provedeno na dva načina: nakon inkubacije s krioprotektantom u trajanju od 1 sat pri 14 °C, uzorci su stavljeni direktno na -80 °C ili su postepeno zamrznuti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n = 5).

4.3. Određivanje optimalnog trajanja predinkubacije

Trajanje predinkubacije u prisutnosti krioprotektanta značajno utječe na uspješnost krioprezervacije. Duža predinkubacija može omogućiti bolju penetraciju krioprotektanta u stanice, što povećava njihovu otpornost na stvaranje kristala leda i smrzavanje. S druge strane preduga predinkubacija može pojačati eventualne toksične učinke krioprotektanta. Stoga optimalno trajanje predinkubacije ovisi o vrsti stanica i koncentraciji i vrsti korištenog krioprotektanta. Primjerice, Bryant i sur. (2022) istraživali su utjecaj trajanja predinkubacije stanica sisavaca s DES-om te su 2022. godine najbolje rezultate postigli sa predinkubacijom od 30 min ili 1 sat kada su koristili Pro:Gly. Zatim su 2023. godine istraživali utjecaj trajanja predinkubacije HaCat stanica sa šest DES-ova (kolin-klorid:glicerol, betain:glicerol, prolin:glicerol, kolin klorid:galaktoza, betain:galaktoza, prolin:galaktoza) te su najbolje rezultate za sve DES-ove postigli sa predinkubacijom od 1 sat, a daljnje produženje trajanja predinkubacije dovelo je do smanjenja preživljenja stanica.

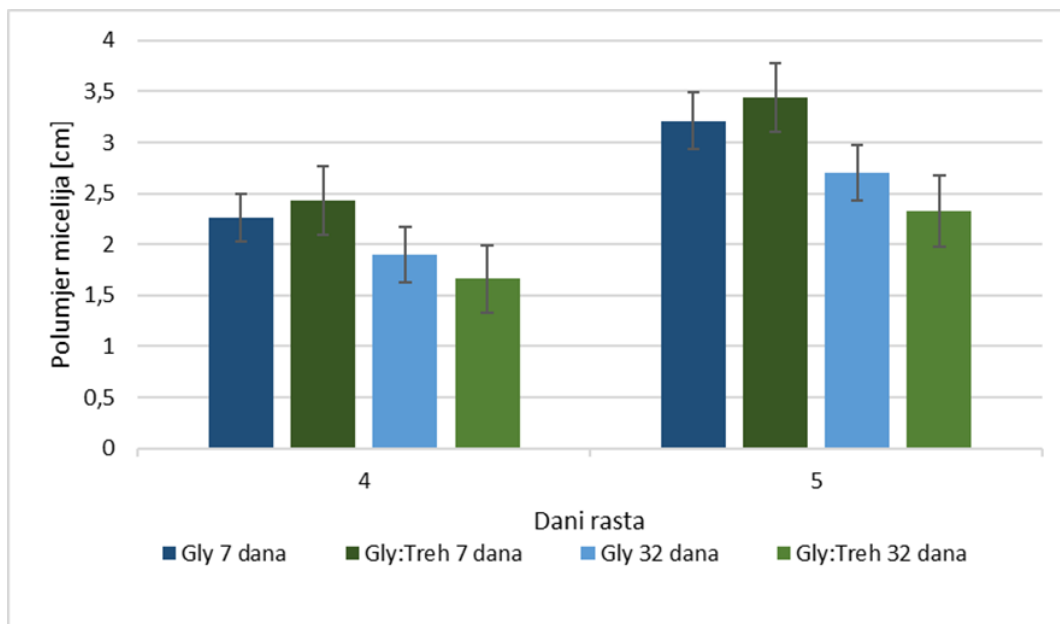
U ovom je radu testiran učinak različitog trajanja predinkubacije pri 14 °C (30 min, 1 sat, 3 sata) u 10 % Gly i Gly-Treh, uz postepeno zamrzavanje, na preživljenje vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja pri -80 °C (Slika 5). Rezultati ANOVA testa pokazali su postojanje statistički značajnih razlika između svih testiranih grupa 6. dan rasta ($F = 17,7887$, $p < 0,0001$). Predinkubacija u trajanju od 30 minuta rezultirala je značajno boljim porastom micelija *S. parasitica* i kod Gly i kod Gly:Treh u usporedbi s istim otapalima kod predinkubacije od 1 ili 3 sata (Tukeyev HSD test, $p < 0,05$), dok je rast micelija nakon predinkubacije od 1 sat i 3 sata bio podjednak ($p > 0,05$). Nadalje, u slučaju predinkubacije u trajanju od 30 min rast je bio bolji kod Gly kao krioprotektanta, a kod duže predinkubacije (1 sat i 3 sata) kod Gly:Treh, ali ove razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Opisani rezultati mogu se objasniti pretpostavkom da produženje predinkubacije omogućuje da krioprotektant duže penetrira u stanice vodene plijesni pa su njegovi potencijalni toksični učinci na stanice izraženiji. To također upućuje na to da glicerol ima toksičniji učinak na stanice *S. parasitica* i brže u njih penetrira od Gly:Treh DES-a, jer je u slučaju glicerola uočen veći pad rasta micelija s trajanjem inkubacije. U skladu s tim, Castro i sur. (2018) izvijestili su da kada je korišten samo Gly ili samo Treh to je rezultiralo većom toksičnošću na stanice mišjih fibroblasta, nego kada je korišten Gly:Treh, što je pokazatelj sinergističkog učinka između ovih spojeva kada su u obliku DES-a. Trebalo bi eksperimentalno utvrditi vrijedi li ovo i za vodenu plijesan *S. parasitica*. Osim toga, budući da je uočen trend boljeg rasta sa smanjenjem trajanja inkubacije, u nastavku istraživanja potrebno je analizirati učinak predinkubacije u više vremenskih točaka u rasponu od 0 do 60 min.



Slika 5. Rast micelija vodene plijesni *S. parasitica* nakon sedmodnevnog zamrzavanja uz primjenu Gly i Gly:Treh u volumnom udjelu od 10 % i različito trajanje predinkubacije pri 14 °C (30 minuta, 1 sat, 3 sata). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n = 5).

4.4. Utjecaj vremena dugotrajnog pohranjivanja

Na kraju je uspoređeno preživljenje vodene plijesni nakon predinkubacije pri 14 °C u trajanju od 30 minuta u Gly i Gly:Treh te nakon postepenog smrzavanja i pohrane pri -80 °C u trajanju od 7 i 32 dana (Slika 6). U prijašnjim istraživanjima krioprezervacije promatrano je samo preživljenje vodene plijesni *S. parasitica*, a nije mjerena brzina regeneracije micelija nakon odmrzavanja. Tako su Nishii i Nakagiri (1991) nakon krioprezervacije u trajanju od 6 mjeseci te MacAluay (2023) u trajanju od 24 dana dobili 100%-tno preživljenje vodene plijesni *S. parasitica*, no nisu istraživali utjecaj vremena dugotrajnog pohranjivanja na brzinu regeneracije micelija *S. parasitica*. Također, nakon dužeg vremena pohranjivanja (1 godine) došlo je do smanjenja preživljenja vodene plijesni *S. parasitica* na 66 % (Eszterbauer i sur., 2020). Zbog toga je u ovom radu osim preživljenja (koje je bilo 100 %-tno u svim pokusima u kojima je korišten Gly i Gly:Treh), istražen i utjecaj vremena dugotrajnog pohranjivanja na brzinu rasta vodene plijesni *S. parasitica*. Rezultati su pokazali da je došlo do značajnog smanjenja brzine rasta micelija ($p < 0,05$) kod pohranjivanja u trajanju od 32 dana u usporedbi s pohranjivanjem u trajanju od 7 dana. Stoga se može zaključiti da je potrebna daljnja optimizacija određenih parametara kao što je trajanje predinkubacije, koncentracija DES-a, odabira DES-a i drugo, kako bi se dobili bolji rezultati regeneracije micelija *S. parasitica* i nakon dulje pohrane.



Slika 6. Rast micelija vodene plijesni *S. parasitica* nakon zamrzavanja uz primjenu Gly i Gly:Treh u volumnom udjelu od 10 % u trajanju od 7 dana i 32 dana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (n = 5).

Dobiveni rezultati pokazuju potencijal DES-ova za krioprezervaciju vodenih plijesni, ali tek nakon što se provede niz dodatnih istraživanja. Neki od mogućih smjerova budućih istraživanja su:

1. Testiranje većeg broja različitih bioinspiriranih DES-ova

U ovom radu testirano je 12 različitih DES-ova i uočeno je da oni DES-ovi koji su i u prijašnjim istraživanjima pokazali potencijal kao krioprotektanti za stanice sisavaca i mikroorganizama, poput Gly:Treh i Pro:Gly (Castro i sur., 2018, Qiao i sur., 2018, Hornberger i sur., 2021, Bryant i sur., 2022, He i sur., 2023), bili su dobri krioprotektanti i vodene plijesni *S. parasitica*. Međutim, pozitivni rezultati dobiveni su uz korištenje nekih DES-ova koji se ranije nisu koristili u krioprezervaciji, poput Ect:Gly i B:GPC: Sor:Tau:U, koji se prirodno pojavljuje u bubregu zeca (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). S obzirom na iznimnu raznovrsnost bioinspiriranih DES-ova, u nastavku istraživanja trebalo bi testirati širi raspon DES-ova kreiranih na temelju osmolita prirodno prisutnih u vodenim organizmima, osobito onima u hladnijoj klimi.

2. Testiranje toksičnosti DES-ova na stanice vodenih plijesni

U ovom su radu, temeljem prethodnih istraživanja (Smith i sur., 1986, Morris i sur., 1988, Nishii i Nakagiri, 1991, Castro i sur., 2018, Eszterbauer i sur., 2020, Craveiro i sur., 2021, Bryant i sur., 2022, Bryant i sur., 2023, MacAulay, 2023), korišteni samo glicerol i DES-ovi volumnog udjela 10 %. Međutim, u nekim je istraživanjima pokazano da optimalna koncentracija krioprotektanta, pri kojoj je postignut kompromis između toksičnosti i krioprotekcije, može biti

i manja ili veća od 10 %, najčešće u rasponu od 5 do 15 % (Maulida i sur., 2023). U nastavku istraživanja bi stoga trebalo odrediti optimalnu koncentraciju odabranih DES-ova za krioprezervaciju vodenih plijesni.

3. Utvrđivanje optimalnog načina zamrzavanja i trajanja predinkubacije

Kako je gore navedeno, rezultati ovog rada pokazali su da je regeneracija micelija *S. parasitica* bila bolja pri kraćoj predinkubaciji u trajanju od 30 minuta. Može se pretpostaviti da je tada postignut kompromis na način da je krioprotektant dovoljno penetrirao u stanice da ih može zaštititi od oštećenja, a istovremeno su njegovi potencijalni toksični učinci bili manje izraženi. U nekim ranijim istraživanjima je dobro preživljenje vodenih plijesni nakon odmrzavanja bilo postignuto i bez predinkubacije, ali uz postepeno zamrzavanje koje je ipak moglo omogućiti penetraciju krioprotektanta u stanice (Dahmen i sur., 1983, Smith i sur., 1986, Morris i sur., 1988, Nishii i Nakagiri, 1991). Stoga u nastavku istraživanja treba analizirati učinak predinkubacije u više vremenskih točaka u rasponu od 0 do 60 min. Osim toga, budući je u ovom radu testirano direktno i postepeno zamrzavanje samo uz predinkubaciju u trajanju od 1 sat, treba ispitati i kombinaciju bez inkubacije u kojoj se micelij postepeno zamrzava, koja se pokazala uspješna u gore navedenim istraživanjima.

4. Utvrđivanje optimalne temperature odmrzavanja

U ovom je radu vodena plijesan odmrzavana u vodenoj kupelji na sobnoj temperaturi. S obzirom da temperatura u vodenoj kupelji nije detaljno praćena, može se pretpostaviti da je ona donekle varirala u različitim pokusima, ovisno o temperaturi okoline, što je moglo utjecati na rezultate istraživanja. Iako je u svim pokusima uz korištenje Gly i Gly:Treh preživljenje bilo 100 %, regeneracija micelija je u uzastopnim, jednako provedenim pokusima donekle varirala. Primjerice, 6. dan nakon odmrzavanja polumjer micelija je u jednom pokusu iznosio za Gly $3,167 \pm 0,225$ cm, a za Gly:Treh $3,383 \pm 0,256$ cm (Slika 1), a u drugom istovjetnom pokusu $3,52 \pm 0,199$ cm odnosno $3,95 \pm 0,097$ cm (Slika 4). Osim toga, u nekim drugim istraživanjima vodena plijesan *S. parasitica*, osim pri sobnoj temperaturi, odmrzavana je i pri višim temperaturama, primjerice pri 30 °C (Nishii i Nakagiri, 1991). Zbog toga je potrebno testirati utjecaj temperature i načina odmrzavanja na regeneraciju i rast micelija *S. parasitica*.

5. Testiranje protokola krioprezervacije uz korištenje DES-ova za dugotrajnu pohranu vodene plijesni *S. parasitica*

Zbog ograničenja u vremenu u ovom je završnom radu maksimalno trajanje zamrzavanja pri -80 °C bilo 32 dana. Stoga je u nastavku istraživanja, nakon konačne optimizacije protokola krioprezervacije, uzorke micelija *S. parasitica* potrebno pohraniti na duže vrijeme, najmanje godinu dana, i na taj način testirati uspješnost protokola za dugotrajnu pohranu.

6. Razvoj metoda krioprezervacije temeljenih na DES-ovima za druge rodove i vrste vodenih plijesni

U gore navedenoj Tablici 1 vidljivo je da su metode krioprezervacije vodenih plijesni do sada razvijane i testirane na relativno malom broju rodova i vrsta. Među vrstama i rodovima postojale su značajne razlike u preživljenju što ukazuje na potrebu optimizacije protokola za pojedinačne vrste ili bar rodove. Stoga, ako se protokoli krioprezervacije vrste *S. parasitica* uz korištenje DES-ova pokažu uspješnim, trebaju se pokušati razviti i za druge vrste i rodove iz reda Saprolegniales.

5. ZAKLJUČCI

1. Od 12 testiranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*), te glicerola kao standardnog krioprotektanta, regeneracija micelija *S. parasitica* je nakon odmrzavanja bila najbolja uz DES glicerol:trehaloza, zatim sam glicerol, te prolin:glicerol kao drugi najbolji DES.
2. Postepeno zamrzavanje u Mr. Frosty-spremniku u prisutnosti izopropanola, nakon predinkubacije u trajanju od 1 sat, nije poboljšalo uspješnost krioprezervacije u odnosu na direktno smrzavanje. Zbog toga je potrebno analizirati utjecaj načina zamrzavanja (postepeno ili direktno) i nakon kraće predinkubacije.
3. Regeneracija micelija nakon odmrzavanja bila je brža nakon predinkubacije u trajanju od 30 minuta nego nakon duže predinkubacije (1 h, 3 h), osobito kada je kao krioprotektant korišten 10 %-tni glicerol.
4. Iako je u svim provedenim pokusima uz korištenje glicerola i DES-a glicerol:trehaloza kao krioprotektanta preživljenje vodene plijesni *S. parasitica* nakon odmrzavanja bilo 100 %, duže vrijeme zamrzavanja (32 dana naspram 7 dana) uzrokovalo je sporiju regeneraciju micelija. Ovo upućuje na potrebu daljnje optimizacije protokola krioprezervacije vodene plijesni *S. parasitica*.

6. POPIS LITERATURE

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications* **1**, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>

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

Boesewinkel HJ (1976) Storage of fungal cultures in water. *Transactions of the British Mycological Society* **66** (1), 183-185. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80119-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80119-2)

Bruno DW, Noguera PA, Poppe TT (2013) A Colour Atlas of Salmonid Diseases, 2. izd., Springer, Dordrecht, str. 99-105.

Bryant S, Awad M, Elbourne A, Christofferson AJ, Martin AV, Meftahi N i sur. (2022) Deep Eutectic Solvents as Cryoprotective Agents for Mammalian Cells. *Journal of Materials Chemistry B* **10** (6), <https://doi.org/10.1039/D2TB00573E>.

Bryant S, Shaw Z, Huang L, Elbourne A, Abraham A, Vongsvivut J i sur. (2023) Insights into Chemical Interactions and Related Toxicities of Deep Eutectic Solvents with Mammalian Cells Observed Using Synchrotron Macro-ATR-FTIR Microspectroscopy. *Biophysica*, **3**(2), 318-334. <https://doi.org/10.3390/biophysica3020021>

Buell CB, Weston WH (1947) Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany* **34**, 555-561.

Câmara AA Jr., Sant'Ana AS (2021) Advances in Yeast Preservation: Physiological Aspects for Cell Perpetuation. *Current Opinion in Food Science* **38**, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.019>.

Castro VIB, Craveiro R, Silva JM, Reis RL, Paiva A, Duarte, ARC (2018) Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology* **83**, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.010>

Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW, Witkamp GJ, Verpoorte R (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology* **156**(4), 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>

Craveiro R, Castro VIB, Viciosa MT, Dionísio M, Reis RL, Duarte ARC, Paiva A (2021) Influence of natural deep eutectic systems in water thermal behavior and their applications in cryopreservation, *Journal of Molecular Liquids* **329**, 115533, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115533>.

Cui H, Ren X, Yun L, Hou Q, Feng F, Liu H (2018) Simple and inexpensive long-term preservation methods for *Phytophthora infestans*. *Journal of Microbiological Methods* **152**, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.020>

Cvjetko Bubalo M, Andreou T, Panić M, Radović M, Radošević K, Radojčić Redovniković I (2023) Natural multi-osmolyte cocktails form deep eutectic systems of unprecedented complexity: discovery, affordances and perspectives. *Green Chemistry* **9** <https://doi.org/10.1039/D2GC04796A>

Dahmen H, Staub T, Schwinn FJ (1983) Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology* **73**, 241-246

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 of London. Series B, Biological sciences* **371**(1709), 543-551. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0459>

Diéguez-Uribeondo J, García MA, Cerenius L, Kozubíková E, Ballesteros I, Windels C i sur. (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* **46**(5), 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.004>

Eszterbauer E, Hardy T, Rónai Z, Sipos D, Zsigmond G (2020) Cryopreservation of three *Saprolegnia* species (Oomycota): Preliminary evidence for the long-term archiving of water mould species. *Fungal Biology* **124**(7), 682–687. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.005>

Gozlan RE, Marshall WL, Lilje O, Jessop CN, Gleason FH, Andreou D (2014) Current Ecological Understanding of Fungal-Like Pathogens of Fish: What Lies Beneath? *Frontiers in Microbiology* **5**, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00062>

Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein J. i sur. (2021) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews* **121**(3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>

He W, Zhang TJ, Han H, Xu Y (2023) Optimization of Deep Eutectic Solvents Enables Green and Efficient Cryopreservation. *Langmuir* **40**(1), 624-637 <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c02808>.

Hornberger K, Li R, Duarte ARC, Hubel A (2021) Natural deep eutectic systems for nature-inspired cryopreservation of cells. *AIChE Journal. American Institute of Chemical Engineers*, **67**(2), e17085.

Houseknecht JL, Suh SO, Zhou JJ (2012) Viability of fastidious *Phytophthora* following different cryopreservation treatments. *Fungal Biology* **116**(10), 1081–1089. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.08.001>

Link H, Powelson V, Johnson KB (2002) Oomycetes. *Plant Health Instructor* **45**, 246-252.

Lee SC, Ristaino JB, Heitman J (2012) Parallels in intercellular communication in oomycete and fungal pathogens of plants and humans. *PLOS pathogens*, **8**(12), e1003028. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003028>

Ko WH (2003) Long-term storage and survival structure of three species of *Phytophthora* in water. *Journal of General Plant Pathology* **69**(3), 186-188. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0033-3>

Lone SA, Manohar S (2018) *Saprolegnia parasitica*, a lethal Oomycete pathogen: demands to be controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology* **6**(2), 36-44. <https://doi.org/10.17582/journal.jimb/2018/6.2.36.44>

MacAulay S (2023) Reeling in the truth: Drivers of aquatic infection & control. PhD Thesis, Cardiff University. <https://orca.cardiff.ac.uk/id/eprint/169213>

Maulida S, Eriani K, Fadli N, Kocabaş FK, Siti-Azizah MN, Wilkes M, Muchlisin ZA (2023) Effect of type and concentration of cryoprotectant on the motility, viability, and fertility of climbing perch *Anabas testudineus* Bloch, 1792 (Pisces: Anabantidae) sperm. *Theriogenology* **201**, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.02.014>

Mbous YP, Hayyan M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY (2017) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering - Promises and challenges. *Biotechnology Advances* **35**(2), 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>

Molina-Gayosso E, Andrade-Hoyos P, Garcia-Espinosa R, Sosa-Hernandez CM (2016) Survivability of three species of *Phytophthora* and two of *Pythium* substrates preserved in short and long term. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **7**(7), 1759-1764

Morris GJ, Smith D, Coulson GE (1988) A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *Microbiology* **134**, 2897-2906

Nakasone KK., Peterson SW., Jong SC (2004) Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Amsterdam. Elsevier Academic Press, 37-47.

Nishii T, Nakagiri A (1991) Cryopreservation of Oomycetous fungi in liquid nitrogen. *IFO Research Commun* **15**, 105-18.

Pavić D, Miljanović A, Grbin D, Šver L, Vladušić T, Galuppi R, Tedesco P, Bielen A (2021) Identification and molecular characterization of oomycete isolates from trout farms in Croatia, and their upstream and downstream water environments. *Aquaculture* **540**, 736652, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736652>

Pickering AD, Willoughby LG (1982) *Saprolegnia* Infections of Salmonid Fish. U: 50th Annual Report, Institute of Freshwater Ecology Windermere Laboratory, England. Freshwater Biological Association. 38-48.

Qiao Y, Cai HL, Yang X, Zang YY, Chen ZG (2018) Effects of natural deep eutectic solvents on lactic acid bacteria viability during cryopreservation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**(13), 5695–5705. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8996-3>

Ravimannan N, Pathmanathan S, Mangayatkarsi P (2012) Preservation of Fungi by using Mineral Oil and Silica gel in Laboratories for Teaching Purposes. Department of Botany, University of Jaffna, Sri Lanka <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1296.8560>

Reischer HS (1949) Preservation of Saprolegniaceae by the mineral oil method. *Mycologia* **41**(2), 177–179.

Sekharan TR, Chandira RM, Tamilvanan S, Rajesh SC, Venkateswarlu BS (2022) Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. *Biointerface Research Applied Chemistry* **12**(1), 847–860. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.847860>

Smith D (1986) The evaluation and development of techniques for the preservation of living filamentous fungi. PhD thesis, London University, UK

Songe MM, Thoen E, Evensen Ø, Skaar I (2014) *In vitro* passages impact on virulence of *Saprolegnia parasitica* to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr. *Journal of Fish Diseases* **37**(9), 825–834. <https://doi.org/10.1111/jfd.12175>

Stueland S, Hatai K, Skaar I (2005) Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **28**(8), 445–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00635.x>.

Sutton W, Reeser P, Hansen E (2009) Long-term storage of *Phytophthora* cultures in water. In: Goheen EM, Frankel SJ, tech. coords. Proceedings of the fourth meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Working Party S07.02.09: Phytophthoras in forests and natural ecosystems. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-221. Albany, CA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station: 327-330.

Thoen E, Evensen Ø, Skaar I (2011) Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *Journal of Fish Diseases*, **34**(8), 601–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01273.x>

Tian Y, Sun DW, Xu L, Fan TH, Zhang ST, Zhu Z (2022) Bioinspired Cryoprotectants Enabled by Binary Natural Deep Eutectic Solvents for Sustainable and Green Cryopreservation. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **10**(23) <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01578>

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**(46), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-46>

Uzma N, Salar BM, Kumar BS, Aziz N, David MA, Reddy VD (2008) Impact of organic solvents and environmental pollutants on the physiological function in petrol filling workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **5**(3), 139–146. <https://doi.org/10.3390/ijerph5030139>

van den Berg AH, 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 Biology Reviews* **27**(2), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.05.001>

van West P (2006) *Saprolegnia parasitica*, an Oomycete Pathogen with a Fishy Appetite: New Challenges for an Old Problem. *Mycologist* **20**(3), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2006.06.004>

Weng L, Beauchesne PR (2020) Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A revije. *Cryobiology* **94**, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.012>

Izjava o izvornosti

Ja Sara Delimar izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink that reads "Sara Delimar". The signature is written in a cursive style.

Vlastoručni potpis