

# Inhibicija uzročnika račje kuge, *Aphanomyces astaci* Schikora 1906, bakterijskim izolatima s kutikule rakova

---

Vukšić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:758161>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2022.

Lucija Vukšić

**INHIBICIJA UZROČNIKA RAČJE  
KUGE, *Aphanomyces astaci* Schikora  
1906, BAKTERIJSKIM  
IZOLATIMA S KUTIKULE  
RAKOVA**

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

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 svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Bielen na savjetima, pristupačnosti i ugodnoj suradnji tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, hvala dr. sc. Anđeli Miljanović na velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene kada je bilo najteže, a najviše hvala PBF sestri Andreji koja mi je uljepšala zadnje godine studiranja.*

*Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i strpljivo čekali ovaj dan, a posebno hvala mojoj mami Milici na godinama razumijevanja i podrške.*

*I na kraju hvala mojem dečku Antoniju koji mi je bio najveći oslonac svih ovih godina i bez kojeg ne bih bila gdje jesam danas. Hvala ti što si vjerovao u mene, čak i kada ja nisam!*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Molekularna biotehnologija

INHIBICIJA UZROČNIKA RAČJE KUGE, *Aphanomyces astaci* Schikora 1906, BAKTERIJSKIM  
IZOLATIMA S KUTIKULE RAKOVA

*Lucija Vukšić*, univ. bacc. ing. biotechn., 0058211062

**Sažetak:** Račja kuga, uzrokovana patogenom *Aphanomyces astaci*, ugrožava prirodne populacije slatkovodnih rakova te uzrokuje ekonomske gubitke u akvakulturi rakova. Cilj ovog rada bio je istražiti inhibicijski potencijal bakterijskih izolata s kutikule rakova prema rastu micelija patogena *A. astaci*. Analizom gena koji kodira za 16S rRNA identificirano je 145 bakterijskih izolata s kutikule signalnog, uskoškarog, riječnog, potočnog i bjelonogog raka. Neovisno o vrsti raka, najveći udio izolata bio je iz koljena Proteobacteria (66 %, uključujući najčešće rodove *Pseudomonas* i *Aeromonas*), zatim Bacteroidetes (18 %, s najčešćim rodom *Flavobacterium*), Firmicutes (13 %), Actinobacteria (2 %) i Cyanobacteria (1 %). Nadalje, provedeni su *in vitro* testovi inhibicije prema kojima su izolati razvrstani u inhibitore (13 %, najčešće iz rodova *Pseudomonas* i *Aeromonas*) i ne-inhibitore (87 %). Zaključno, rezultati ovog rada otvaraju mogućnost primjene bakterija kao ekološki prihvatljive metode kontrole patogena *A. astaci* u akvakulturi.

**Ključne riječi:** deseteronožni rakovi, astacikultura, biokontrola, 16S rRNA, testovi inhibicije

**Rad sadrži:** 40 stranica, 8 slika, 4 tablice, 93 literaturna navoda, 1 prilog

**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. Ane Bielen

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Anđela Miljanović

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ana Bielen (mentor)
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (zamjena)

**Datum obrane:** 28. lipanj 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

INHIBITION OF CRAYFISH PLAGUE PATHOGEN, *Aphanomyces astaci* Schikora 1906, BY  
BACTERIAL ISOLATES FROM CRAYFISH EXOSKELETON

*Lucija Vukšić*, univ. bacc. ing. biotechn., 0058211062

**Abstract:** Crayfish plague, caused by the pathogen *Aphanomyces astaci*, threatens natural freshwater crayfish and causes economic losses in astaciculture. The aim of this study was to investigate the inhibitory potential of bacterial isolates from the crayfish exoskeleton against mycelial growth of *A. astaci*. A total of 145 bacterial isolates from the exoskeleton of signal crayfish, narrow-clawed crayfish, noble crayfish, stone crayfish and white-clawed crayfish were identified by 16S rRNA gene analysis. Regardless of the crayfish species, most isolates belonged to the phylum Proteobacteria (66 %, including the most common genera *Pseudomonas* and *Aeromonas*), followed by Bacteroidetes (18 %, most commonly the genus *Flavobacterium*), Firmicutes (13 %), Actinobacteria (2 %) and Cyanobacteria (1 %). In addition, *in vitro* inhibition tests were performed, according to which the isolates were classified as inhibitors (13 %, most frequently from the genera *Pseudomonas* and *Aeromonas*) or non-inhibitors (87 %). The results of this work open up the perspective of using bacteria as an environmentally acceptable method of controlling *A. astaci* in aquaculture.

**Keywords:** decapod crayfish, biocontrol, bacterial isolates, 16S rRNA, plate inhibition assay

**Thesis contains:** 40 pages, 8 figures, 4 tables, 93 references, 1 supplement

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

**Technical support and assistance:** Anđela Miljanović, PhD

**Reviewers:**

1. Reno Hrašćan, PhD, Associate professor (president)
2. Ana Bielen, PhD, Associate professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (member)
4. Jurica Žučko, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** June 28<sup>th</sup>, 2022



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Deseteronožni rakovi.....	2
2.1.1. Akvakulturni uzgoj rakova (astacikultura).....	4
2.2. Račja kuga .....	5
2.3. Mogućnosti kontrole račje kuge u akvakulturi .....	8
2.3.1. Biokontrola kao mogućnost ekološki prihvatljive kontrole patogena .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
3.1. Uzorkovanje, uzgoj i sekvenciranje <i>16S</i> rRNA gena čistih bakterijskih kultura.....	12
3.2. Izrada filogenetskog stabla i molekularna identifikacija izolata.....	15
3.3. Testovi inhibicije rasta micelija patogena <i>A. astaci</i> .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
4.1. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata s kutikule rakova .....	18
4.2. Selekcija bakterijskih izolata koji mogu inhibirati rast patogena <i>A. astaci</i> .....	26
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>31</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>32</b>

# 1. UVOD

Posljednih desetljeća uočen je porast incidencije bolesti uzrokovanih gljivičnim i gljivama sličnim patogenima što je dovelo do smanjenja populacija divljih životinja domaćina te ekonomskih gubitaka u proizvodnji hrane, uključujući akvakulturni sektor. Posebno negativan utjecaj primijećen je u slatkovodnim ekosustavima gdje je, u odnosu na kopnene ekosustave, došlo do znatno većeg pada bioraznolikosti (Martin-Torrijos i sur., 2021). Unutar slatkovodnih ekosustava, deseteronožni rakovi iz porodice Astacidae smatraju se ključnim vrstama zbog svojeg utjecaja na bioraznolikost i stabilnost ekosustava, ali su u posljednjih nekoliko desetljeća sve više ugroženi (Maguire i sur., 2016). Smatra se da je bolest račja kuga, uz uništavanje prirodnih staništa, pada kvalitete vode i unošenja stranih invazivnih vrsta rakova, jedan od glavnih uzroka smanjenja populacija zavičajnih europskih vrsta rakova u zadnjih 150 godina (Jussila i sur., 2021; Maguire i sur., 2016). Račja kuga je visokozarazna smrtonosna bolest uzrokovana patogenom *Aphanomyces astaci* Schikora 1906 (Oomycota, vodene plijesni) koji se nalazi na popisu 100 najopasnijih invazivnih vrsta u svijetu i to upravo zbog značajnog negativnog utjecaja na zavičajne europske vrste rakova (Lowe i sur., 2000). Osim što ugrožava prirodne populacije slatkovodnih rakova, račja kuga uzrokuje i velike ekonomske gubitke u akvakulturi rakova (Harlioglu, 2007). Pojava ove bolesti dovela je do značajnih gospodarskih šteta u Skandinaviji, Njemačkoj, Španjolskoj i Turskoj, gdje su gubitci u proizvodnji riječnog raka *Astacus astacus* i uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus* ponekad veći i od 90 % (Resh i Rosenberg, 2015).

Unatoč svim naporima koji se ulažu u istraživanja, do danas nisu pronađene učinkovite, a istovremeno ekološki prihvatljive metode za kontrolu i suzbijanje ove bolesti (Martin-Torrijos i sur., 2017). Najučinkovitiji se pokazao tretman malahitnim zelenilom, međutim njegova upotreba je već 20 godina zabranjena zbog dokazanog kancerogenog i teratogenog učinka (EFSA, 2018; Caruana i sur., 2012; Carral i sur., 2009). Trenutno dostupni tretmani temelje se na primjeni kemikalija kao što su formalin, bronopol, bakrov sulfat i peroctena kiselina, koji, iako prihvatljiviji od malahitnog zelenila, također imaju štetne učinke na ljude i/ili okoliš (Pedersen i sur., 2010; Wooster i sur., 2005). Zbog svega navedenog nužno je razviti nove, ekološki prihvatljive metode za kontrolu uzročnika račje kuge koje bi zamijenile postojeće kemijske metode.

Jedna od mogućnosti, koja je trenutno vrlo slabo istražena, je biokontrola prirodno prisutnim bakterijama koje žive u simbiozi s rakovima. Selekcionirane bakterije trebale bi imati antagonistički učinak na patogena, bez štetnog učinka na domaćina. Do sada jedino istraživanje

u tom smjeru pokazalo je da su na kutikuli rakova prisutne bakterije koje imaju mogućnost inhibicije rasta micelija patogena *A. astaci* te je više od polovice identificiranih inhibitora (56 %) pripadalo rodu *Pseudomonas* (Orlić i sur., 2021). Međutim, u ovom je istraživanju obrađen relativno mali broj izolata (48), i to samo s dvije vrste rakova – invazivnog sjevernoameričkog signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* i zavičajnog uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus*. Stoga je cilj ovog rada bio analizirati veći broj bakterijskih izolata prirodno prisutnih u biofilmu kutikule više vrsta slatkovodnih rakova, invazivnog signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* i sve četiri vrste zavičajnih rakova koji dolaze na području Hrvatske, uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus*, riječnog raka *Astacus astacus*, potočnog raka *Austropotamobius torrentium* i bjelonogog raka *Austropotamobius pallipes*, te istražiti njihovu sposobnost da inhibiraju rast micelija patogena *A. astaci*.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Deseteronožni rakovi

Deseteronožni rakovi iz porodice Astacidae smatraju se ključnim vrstama u slatkovodnim ekosustavima gdje svojom veličinom i ulogom u hranidbenim mrežama doprinose stabilnosti čitave zajednice (Maguire i sur., 2016). Imaju dug životni vijek, omnivorni način prehrane te su veći od ostalih beskralježnjaka s kojima dijele stanište (Reynolds i sur., 2013).

U prošlosti i danas mnogi čimbenici su negativno utjecali na rasprostranjenost i veličine populacija rakova u Europi, poput unošenja i širenja invazivnih vrsta rakova (većinom porijeklom iz Sjeverne Amerike) i onečišćenja vode. Jedan od najznačajnijih štetnih čimbenika koji i danas ostavlja velike negativne posljedice na europske populacije rakova je slučajno unošenje račje kuge, bolesti uzrokovane patogenom *A. astaci* (Oomycota, vodene plijesni), u 19. stoljeću u Europu. Patogen je unesen s invazivnim vrstama rakova iz Sjeverne Amerike te ostavio nepovratne posljedice na distribuciju rakova na europskom kontinentu (Kouba i sur., 2014).

Danas u Europi dolaze tri roda zavičajnih rakova, *Astacus*, *Pontastacus* i *Austropotamobius* te pet vrsta: *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) – riječni rak, *Astacus pachypus* (Rathke, 1837), *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) – bjelonogi rak, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) – potočni rak i *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) – uskoškari rak. Osim navedenih zavičajnih vrsta rakova, na području Europe danas dolazi i veći broj invazivnih

stranih vrsta rakova, koji se mogu podijeliti u dvije skupine: „stare invazivne vrste“ i „nove invazivne vrste“. U stare invazivne vrste ubrajaju se tri vrste sjevernoameričkih rakova koje su unesene prije 1970-ih godina: *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) – bodljobrادي rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – signalni rak i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). Bodljobrادي rak je unesen u Njemačku krajem 19. stoljeća i do danas se smatra kroničnim izvorom patogena *A. astaci* genotipa d, koji se osim na području Njemačke, danas može pronaći i u Španjolskoj te Češkoj (Martin-Torrijos i sur., 2021; Harlioglu, 2007). Nadalje, 1960-ih godina je u Europu unesen signalni rak *Pacifastacus leniusculus* za kojeg se smatralo da će biti jedna od akvakulturno najproduktivnijih vrsta (Guan, 2000). Međutim, u Engleskoj je nakon uvođenja signalnog raka došlo do drastičnog pada populacija zavičajne vrste *A. pallipes*, a u nekim područjima je gubitak bio veći i od 95 % (Chadwick, 2019). Osim velikih gubitaka u Engleskoj, uvođenje signalnog raka je proširilo račju kugu po Švedskoj, Njemačkoj i Finskoj (Harlioglu, 2007). Signalni rak je prenositelj *A. astaci* genotipa b koji je danas široko rasprostranjen i može se pronaći na području Španjolske, Austrije, Švedske, Finske, Ukrajine, Moldavije, Turske i Hrvatske (Martin-Torrijos i sur., 2021; Pavić i sur., 2020; Maguire i sur., 2016). Krajem 20. stoljeća u Španjolskoj se pojavio crveni močvarni rak *Procambarus clarkii*, također nositelj *A. astaci* genotipa d te se od tamo širi u druge europske zemlje, poput Francuske, Italije i Njemačke (Martin-Torrijos i sur., 2021; Loureiro i sur., 2018; Souty-Grosset i sur., 2016). Osim genotipa b i d, u Europi je rasprostranjen i genotip a koji je detektiran na području Slovenije, Austrije, Češke, Danske, Švedske, Finske, Srbije, Turske i Hrvatske (Martin-Torrijos i sur., 2021; Pavić i sur., 2021, 2020; Maguire i sur., 2016). Od 1980. godine do danas uneseno je još osam vrsta invazivnih rakova što danas čini ukupno jedanaest invazivnih vrsta na području Europe. U grupu „novih invazivnih vrsta“ pripadaju dvije australske vrste: *Cherax destructor* Clark (1936) i *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) i šest vrsta sjevernoameričkih rakova: *Orconectes immunis* (Hagen, 1870), *Faxonius juvenilis* (Hagen, 1870), *Faxonius virilis* (Hagen, 1870), *Procambarus acutus* (Girard, 1852), *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) i *Procambarus alleni* (Faxon, 1884). Pretpostavlja se da će se zbog uvoza novih vrsta rakova za akvakulturu trend porasta invazivnih vrsta nastaviti i dalje (Kouba i sur., 2014). Osim što su prenosiooci bolesti, invazivne vrste su i snažni kompetitori zavičajnim vrstama rakova jer su agresivnije, otpornije na bolesti, brzo rastu kao jedinke, ali i kao populacija pa mogu lako kolonizirati nova područja i istisnuti zavičajne vrste rakova (Holdich i sur., 2009).

U Hrvatskoj dolaze četiri vrste zavičajnih rakova: *Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius torrentium* (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004) i tri vrste stranih invazivnih vrsta rakova: *Faxonius limosus*, *Pacifastacus leniusculus* i *Procambarus virginialis* (Samardžić i sur., 2014; Maguire i sur., 2008; Maguire i Klobučar, 2003). Istraživanja su pokazala da je patogen *A. astaci* prisutan i na zavičajnim i na invazivnim vrstama rakova u Hrvatskoj (Pavić i sur., 2021; Pavić i sur., 2020; Maguire i sur., 2016).

### **2.1.1. Akvakulturni uzgoj rakova (astacikultura)**

Akvakultura se definira kao kontrolirani proces uzgoja vodenih organizama (GSA, 2019). Iako ljudi uzgajaju vodene organizme za hranu već tisućama godina, akvakultura je tek nedavno doživjela procvat u cijelom svijetu (Rocha i sur., 2022). Zbog stalnog rasta ljudske populacije i prekomjernog izlova iz oceana i slatkih voda, neophodan je alternativan izvor vodenih organizama za ljudsku prehranu. Procjenjuje se da će do 2050. godine na Zemlji živjeti 10 milijardi ljudi i da će se potražnja za životinjskim proteinima povećati za čak 52 % (GSA, 2019). Zbog toga je danas akvakultura najbrže rastući sektor proizvodnje hrane i igrat će veliku ulogu u prehranjivanju budućih generacija. Svjetskom akvakulturom dominira Azija (88,7 % ukupne proizvodnje), a nakon nje Sjeverna i Južna Amerika (4,6 %), Europa (3,8 %), Afrika (2,7 %) i Oceanija (0,2 %). U Europi 83,5 % akvakulture čini uzgoj morskih organizama, a Norveška se ističe kao glavni proizvođač s više od 50 % ukupne proizvodnje (Rocha i sur., 2022).

Slatkovodni rakovi smatraju se idealnim organizmima za uzgoj u akvakulturi zato što su relativno veliki i nemaju stadij ličinke nego se iz jaja izliježu ominivorne juvenilne jedinke. U Europi se uzgajaju dvije vrste zavičajnih rakova: *Astacus astacus* (riječni rak) i *Pontastacus leptodactylus* (uskoškari rak), a najveći proizvođači su Austrija, Velika Britanija, Danska, Finska, Francuska, Njemačka, Irska, Italija, Litva, Norveška, Rusija, Španjolska i Švedska (FAO, 2020; Holdich, 1993). Osim navedenih zavičajnih vrsta, na područje Europe su unesene i tri vrste sjevernoameričkih rakova, *Faxonius limosus*, *Pacifastacus leniusculus* i *Procambarus clarkii*, za koje se smatralo da imaju veliki potencijal u akvakulturi. Međutim, danas se ubrajaju u invazivne vrste koje prenose uzročnika račje kuge, patogena *A. astaci*, europskim vodotocima (Harlioglu, 2007). Prema EU Uredbi br. 1143/2014, u državama članicama Europske unije zabranjeno je razmnožavanje, uzgoj, prijevoz, kupnja, prodaja, upotreba, razmjena, držanje i

puštanje invazivnih stranih vrsta (The European Parliament and the Council of the European Union, 2014).

Unatoč svim dobrobitima akvakulture kao što su proizvodnja kvalitetne hrane, izvor radnih mjesta i veliki prihodi, ne mogu se zanemariti mnogi negativni učinci koje ova gospodarska grana ostavlja na okoliš (Martinez-Porchas i Martinez-Cordova, 2012). Akvakulturom se stvara organski otpad iz ostataka hrane i izmeta organizama, mikrobnom razgradnjom organske tvari troši se kisik, te se u vodi može povećati koncentracija amonijaka i sulfida (Tom i sur., 2021; Zhang i sur., 2020; Effendi i sur., 2015). Osim organskih spojeva, otpadne vode iz akvakulturnih postrojenja sadrže i različite kemikalije koje se koriste za održavanje objekata za uzgoj i lijekove koji se upotrebljavaju za suzbijanje bolesti životinja (Kawsar i sur., 2022). Stoga akvakultura često ima višestruke negativne učinke na akvatičke životne zajednice.

## 2.2. Račja kuga

Račja kuga je visokozarazna smrtonosna bolest rakova uzrokovana patogenom *Aphanomyces astaci* koji se nalazi na popisu 100 najopasnijih invazivnih vrsta u svijetu (Martin-Torrijos i sur., 2017; Lowe, 2000). Jedna je od najopasnijih i najistraženijih bolesti slatkovodnih deseteronožnih rakova te ima značajne negativne učinke na prirodne populacije zavičajnih rakova u Europi i šire, a uzrokuje i velike ekonomske gubitke u akvakulturi slatkovodnih rakova (Harlioglu, 2007). Patogen *A. astaci* spada u vodene plijesni, Oomycota. Iako prvotno smatrana gljivama, ova skupina mikroorganizama je danas svrstana zajedno s dijatomejama i smeđim algama u skupinu praživotinja koja se naziva Chromista (OIE, 2009).

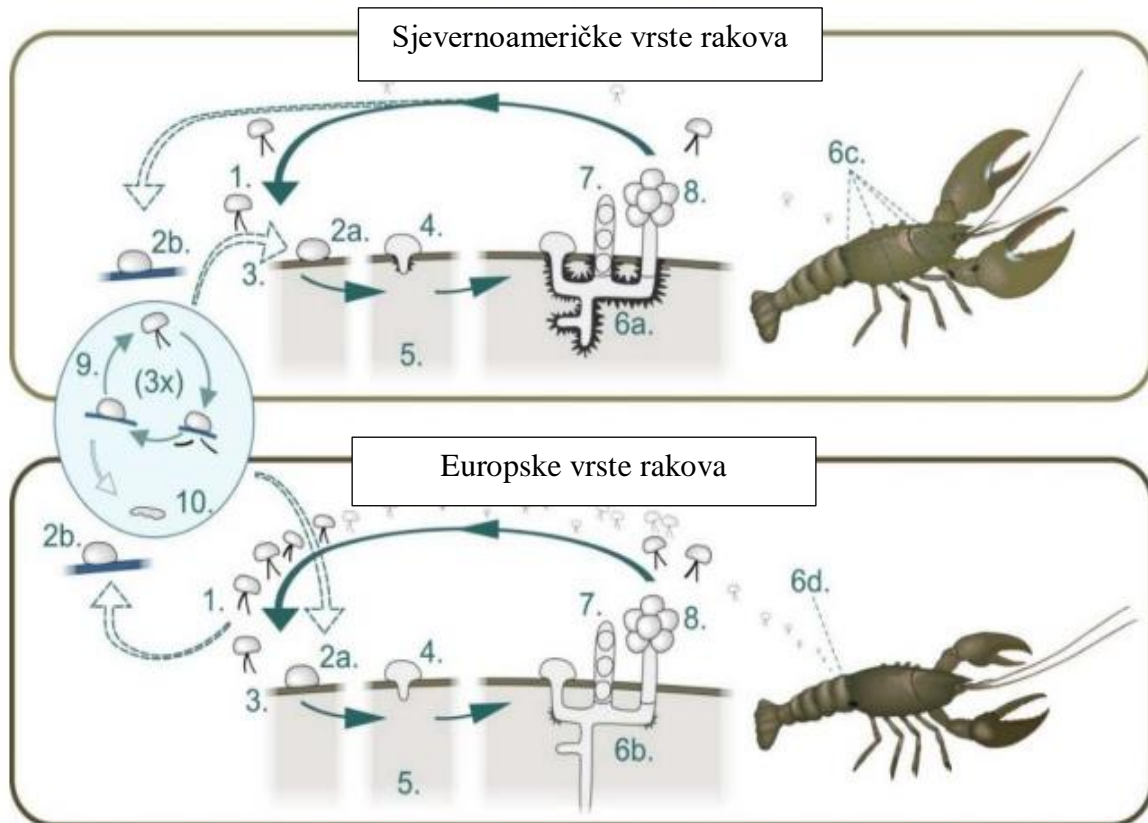
Račja kuga klasičan je primjer pojave bolesti kao posljedice unošenja stranih vrsta u novu biogeografsku regiju. Bolest potječe iz Sjeverne Amerike gdje patogen koegzistira s prirodnim domaćinima, odnosno slatkovodnim desetonožnim rakovima, ne uzrokujući značajan mortalitet jer su jedinke domaćina uglavnom otporne na razvoj bolesti zahvaljujući dugogotrajnoj koevoluciji s patogenom (Martin-Torrijos i sur., 2017). Translokacijom sjevernoameričkih rakova patogen se brzo proširio diljem svijeta, pa tako i Europom, gdje je prvi puta unesen krajem 19. stoljeća. Kod zavičajnih europskih vrsta rakova imunost sustav ne reagira tako učinkovito na prisutnost uzročnika račje kuge kao kod sjevernoameričkih invazivnih vrsta pa su jedinke najčešće podložne razvoju smrtonosne bolesti (Martin-Torrijos i sur., 2021; Martin-Torrijos i sur., 2017). Otpornost sjevernoameričkih vrsta rakova objašnjava se time što oni kontinuirano proizvode visoke razine profenoloksidaze (proPO), enzima koji je odgovoran za

melanizaciju hifa kataliziranjem reakcije oksidacije fenola u melanin, i važna je komponenta urođenog imunskog sustava deseteronožnih rakova. Kod zavičajnih vrsta rakova aktivacija kaskade profenoloksidaze je sporija/manje učinkovita, što ih čini osjetljivijima na razvoj bolesti (Cerenius i sur., 2003).

Osnovni stadij vegetativnog dijela životnog ciklusa patogena *A. astaci* čine hife odnosno micelij (slika 1). Hife se difuzno granaju, nisu podijeljene septama (pregradama), ujednačene su širine od 7,5 do 9,5  $\mu\text{m}$  i bezbojne. Zoospore čine infektivni stadij životnog ciklusa i formiraju u sporangijima koji su jednake širine kao hife, ali su od njih odvojeni pregradom. Između deset i četrdeset primarnih zoospora formira grozd koji strši iz vrha sporangija. Zoospore su promjera 9 do 11  $\mu\text{m}$  i imaju dva biča koji im omogućuju plivanje prema hranjivim tvarima. Ako nakon nekoliko dana plivanja ne pronađu odgovarajućeg domaćina, prelaze u oblik ciste. Nakon razdoblja mirovanja, ciste se mogu ponovno razviti u plivajuće zoospore. Kada pronađu odgovarajući supstrat, zoospore se vežu za njegovu površinu i odbacuju bičeve te tako stvaraju sekundarnu cistu koja može proklijati u nove hife. Većina spora nastaje kada domaćin uginе, ali dokazano je i oslobađanje spora kod asimptomatskih jedinki prenosioca (Viljamaa-Dirks, 2016). Neki od simptoma bolesti su dnevna aktivnost, progresivna paraliza, otpadanje udova te smeđe ili crne mrlje na kutikuli koje su posljedica reakcije melanizacije, odnosno imunskog odgovora domaćina na prodor hifa patogena (slika 2). Smrt se događa unutar nekoliko dana ili tjedana od početka infekcije (DAWE, 2019).

Do sada je identificirano pet genotipova patogena: A (As), B (PsI), C (PsII), D (Pc) i E (Or) (Huang i sur., 1994). Za sve genotipove, osim za A čiji je izvorni domaćin nepoznat, utvrđeno je da su njihovi izvorni domaćini sjevernoameričke vrste rakova. Tako je izvorni domaćin genotipova B i C signalni rak *Pacifastacus leniusculus*, dok su domaćini genotipova D i E vrste *Procambarus clarkii* odnosno *Faxonius limosus*. Mikroorganizam *Aphanomyces astaci* genotipa As odgovoran je za prvu epidemiju račje kuge u Europi u 19. stoljeću te se danas uglavnom može detektirati na zavičajnim vrstama rakova u Europi (Martin-Torrijos i sur., 2017). Takvi rakovi su kronično zaraženi, ali vitalni te najčešće ne dolazi do masovnog umiranja unutar populacije. Primjer takve kronično zaražene vijabilne zavičajne populacije je populacija riječnog raka *A. astacus* u rijeci Korani (Pavić i sur., 2021). Za razliku od genotipa A, genotipovi B i E pokazuju izuzetno visoku virulentnost prema zavičajnim vrstama. Primjerice, genotip B je uzrokovao masovni pomor riječnog raka *A. astacus* u Finskoj i uskoškarog raka *P. leptodactylus* u Turskoj, a genotip E riječnog raka *A. astacus* i potočnog raka

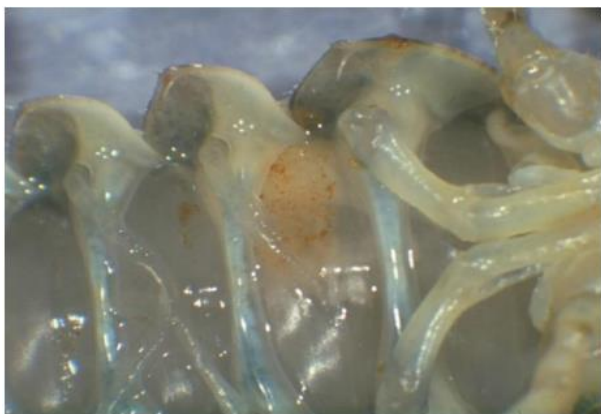
*A. torrentium* u Češkoj (Mojžišová i sur., 2020; Kokko i sur., 2018; Grandjean i sur., 2014; Makkonen i sur., 2014; Viljamaa-Dirks i sur., 2013).



**Slika 1.** Usporedba životnog ciklusa patogena *A. astaci* na sjevernoameričkim vrstama rakova koje su prenosioci patogena i na europskim vrstama koje su podložne zarazi. Sekundarna zoospora ispuštena iz primarne ciste (1), zoospora iz koje nastaje sekundarna cista na površini kutikule raka (2a), zoospora na neodgovarajućoj površini ne može proklijati (2b), epikutikula raka (3), klijajuća cista (4), kutikula raka (5), melanizirane hife (6a), nemelanizirane ili slabo melanizirane hife (6b), makroskopske tamne melanizirane pjege na američkim vrstama rakova (6c), ponekad prisutne makroskopske tamne melanizirane pjege na europskim vrstama rakova (6d), sporangij s primarnim sporama (7), nakupina spora s primarnim cistama (8), sekundarna cista koja formira novu sporu, u ciklusu koji se može ponoviti do tri puta (9), nevjabilna mrtva cista, ukoliko nije pronađen domaćin (10) (Viljamaa-Dirks, 2016)



a)



b)



**Slika 2.** Znakovi račje kuge kod potočnog raka, *Austropotamobius torrentium*. a) Tipične smeđe mrlje na abdominalnoj kutikuli simptom su infekcije patogenom *Aphanomyces astaci*. S obje strane zahvaćenog segmenta prisutno je zdravo mišićno tkivo. b) Melanizacija na bazi noge za hodanje uzrokovana infekcijom patogenom *A. astaci* (DAWE, 2019)

### 2.3. Mogućnosti kontrole račje kuge u akvakulturi

Učinkovita kontrola patogena *A. astaci* u akvakulturi temelji se na primjeni kemikalija koje imaju dokazano štetno djelovanje na zdravlje ljudi i životinja te onečišćuju okoliš. Primjerice, malahitno zelenilo je vrlo učinkovito sredstvo u suzbijanju patogena, ali je zbog dokazanog kancerogenog i teratogenog učinka njegova upotreba danas zabranjena u SAD-u i Europskoj uniji (EFSA, 2018; van den Berg i sur., 2013; Caruana i sur., 2012; Kouba i sur., 2010; Carral i sur., 2009). Nadalje, formalin je već dugi niz godina poznat kao učinkovit terapijski spoj u akvakulturi, ali također ima štetne učinke. Zbog kancerogenog, nadražujućeg i alergičnog učinka predstavlja rizik za radnike koji njime rukuju, a nakon ispuštanja u vodeni okoliš može biti toksičan za organizme u vodi. Stoga se uskoro očekuje ograničavanje upotrebe formalina u akvakulturi, kao što se ranije dogodilo s malahitnim zelenilom (Tedesco i sur., 2018; Kouba i sur., 2010; Pedersen i sur., 2010; Carral i sur., 2009; Wooster i sur., 2005). Još jedno sredstvo koje se može koristiti kao alternativa formaldehidu je bronopol, međutim dokazana je njegova toksičnost za fitoplankton i zooplankton (Tedesco i sur., 2018; González i sur., 2011). Zbog toga se sredstva koja sadrže bronopol moraju jako razrijediti prije nego što se odbace, čime se značajno povećavaju troškovi korištenja (Tedesco i sur., 2018; Nakagawa i sur., 2012). Bronopol se u prirodnim vodama brzo razgrađuje hidrolizom ili fotolizom, čime nastaju stabilniji produkti 2-bromo-2-nitroetanol (BNE) i bromonitrometan (BNM) koji zbog

potencijalnog mutagenog i kancerogenog učinka predstavljaju rizik za okoliš (Cui i sur., 2011). Nadalje, neka istraživanja pokazuju da bi se bakrov sulfat mogao koristiti u kontroli oomicetnih infekcija u akvakulturi jer inhibira rast micelija i otpuštanje primarnih zoospora vrste *Saprolegnia parasitica*, koja je srodna vrsti *A. astaci* (Sun i sur., 2014). Međutim, toksičan je za beskralježnjake i alge, a njegova upotreba u akvakulturi može pridonijeti povećanju akumulacije bakra u tlu, gdje već ima tendenciju povećanja zbog široko rasprostranjene primjene u poljoprivredi (Tedesco i sur., 2020). Dezinfekcijska sredstva na bazi peroctene kiseline (engl. *peracetic acid*, PAA) prikladna su za dezinfekciju opreme za lov rakova, ali su koncentracije PAA potrebne za inaktivaciju životnih stadija patogena *A. astaci* prilično visoke i premašuju one koje se smatraju bezopasnima za vodene životinje (Jussila i sur., 2014; Jussila i sur., 2011).

Zbog svega navedenog u posljednje se vrijeme intenzivno istražuju ekološki prihvatljive metode kontrole patogena *A. astaci* (Orlić i sur., 2021; Martin-Torrijos i sur., 2017; Harlioglu, 2007). Primjerice, utvrđeno je da eterična ulja lovora, kadulje i ružmarina te propolis mogu inhibirati rast micelija i zoospora patogena *A. astaci in vitro* (Miljanović i sur., 2022; Miljanović i sur., 2021). Osim toga, Orlić i sur. (2021) su istraživali inhibicijski potencijal bakterija koje su prirodno prisutne na kutikuli rakova i dokazali da određeni izolati, osobito oni iz roda *Pseudomonas*, inhibiraju rast micelija patogena te bi stoga mogli biti primijenjeni kao ekološki prihvatljiva metoda kontrole račje kuge.

### **2.3.1. Biokontrola kao mogućnost ekološki prihvatljive kontrole patogena**

Biološka kontrola ili biokontrola je strategija suzbijanja štetnih organizama (patogena, parazita, invazivnih vrsta, korova itd.) pomoću živih organizama. Primjerice, mogu se koristiti grabežljivci koji se hrane štetnim organizmima i na taj način smanjuju njihovu populaciju i negativne učinke (Hutchinson, 2021; van Lenteren i sur., 2018). Poznata su četiri tipa biokontrole:

1. **Prirodna biokontrola** odvija se u svim ekosustavima bez ljudske intervencije, odnosno populacija štetnih organizama u ekosustavu smanjuje se aktivnošću prirodno prisutnih korisnih organizama (van Lenteren i sur., 2018).
2. **Konzervacijska biokontrola** podrazumijeva poduzimanje radnji od strane čovjeka koje štite i stimuliraju djelovanje prirodnih neprijatelja koji se pojavljuju u prirodi. Ovakva biokontrola usmjerena je na očuvanje prirodno prisutnih neprijatelja stvaranjem staništa

gdje oni mogu preživjeti i napredovati, kao što je primjerice stvaranje zaštitnog pojasa od živice koji pruža stanište mnogim korisnim kukcima, a koristi se u poljoprivredi za zaštitu od patogena koji ugrožavaju usjeve (Bajer i sur., 2019; van Lenteren i sur., 2018).

3. **Klasična biokontrola** odnosi se na prikupljanje i puštanje prirodnih neprijatelja u područje gdje se nalazi štetna vrsta, što onda rezultira smanjenjem brojnosti štetne vrste. Primjer takve uspješne biokontrole je uvođenje virusa *Oryctes* u tropske krajeve Azije i Pacifika kako bi se kontrolirala populacija kukaca kornjaša iz porodice nosorožaca koji parazitiraju na palmama (van Lenteren i sur., 2018; Jackson i sur., 2005).
4. Kod **augmentacijske biokontrole** prirodni neprijatelji se masovno uzgajaju i puštaju u velikom broju na područje gdje je potrebna kontrola (van Lenteren i sur., 2018). Primjenjuje se u poljoprivredi tako što se masovno uzgajaju korisni kukci koji se onda ispuštaju s ciljem uspostavljanja ravnoteže između prirodnih neprijatelja i štetnika. Inokulativna augmentacija vrši se jednom tijekom sezone, a kontrolu do kraja sezone osiguravaju njihovi potomci, dok je kod inundativne kontrole potrebno unositi kukce više puta tijekom sezone jer nove generacije ne preživljavaju. U Kaliforniji je inokulativnom biokontrolom uspješno suzbijena populacija pjegave paukove grinje (*Tetranychus urticae*) u usjevima jagoda oslobađanjem korisne grinje grabežljivice (Grandperrin, 2019).

U posljednje se vrijeme sve više istražuje primjena bakterija neškodljivih za domaćina kao metoda biokontrole patogena (Blundell i sur., 2021; Oubaha i sur., 2021; Sullam i Musa, 2021; Chen i sur., 2016). Istraživanja su pokazala da simbiotske mikrobne zajednice domaćina mogu, uz djelovanje imunosnog sustava domaćina, pružiti dodatnu zaštitu od patogena. Tako je u nizu istraživanja dokazano da bakterije prirodno prisutne na koži vodozemaca i riba mogu zaštititi domaćina od gljivičnih i oomicetnih patogena (Liu i sur., 2015; Lowrey i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011; Lauer i sur., 2007; Harris i sur., 2006; Bly i sur., 1997). Međutim, postojeća istraživanja o bakterijama koje imaju antagonističko djelovanje prema patogenim vodenim plijesnima uglavnom su bila usmjerena na biljne patogene iz rodova *Phytophthora*, *Plasmopara* i *Pythium*, dok se samo jedno istraživanje bavilo učincima bakterija s kutikule rakova na patogene *A. astaci* (Orlić i sur., 2021). U tom istraživanju sakupljeno je 48 bakterijskih izolata s kutikule dvije vrste raka, signalnog raka *Pacifastacus leniusculus* i uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus* te je testiran njihov potencijal da inhibiraju rast patogena *A. astaci*. Taksonomska identifikacija sakupljenih izolata pokazala je da je 69 % izolata pripadalo koljenu Proteobacteria, 17 % koljenu Bacteroidetes, 8 % koljenu Firmicutes i 6 % koljenu Actinobacteria. Na obje vrste rakova je pronađeno najviše izolata iz rodova

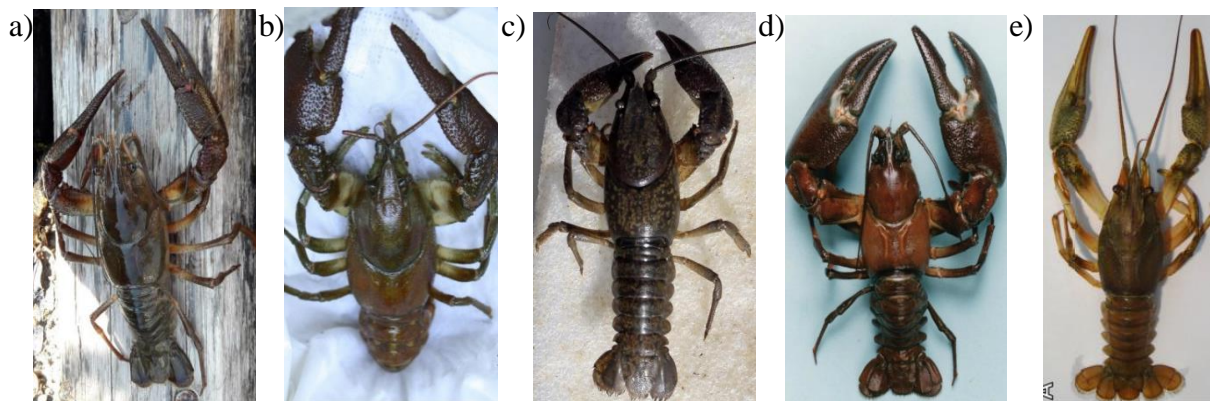
*Pseudomonas* (29 %), *Acinetobacter* (13 %) i *Flavobacterium* (8 %). Na temelju testova inhibicije izolati su svrstani u dvije skupine, inhibitori (33 %) i ne-inhibitori (67 %). Većina inhibitora pripadala je rodu *Pseudomonas*, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima gdje je dokazano da neki sojevi roda *Pseudomonas* inhibiraju rast hifa i klijanje cista vrsta iz roda *Saprolegnia*, koje su srodne rodu *Aphanomyces* (Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011; Bly i sur., 1997).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom je diplomskom radu korištena banka bakterijskih izolata s kutikule rakova sakupljena u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc, UIP-2017-05-6267) voditeljice izv. prof. dr. sc. Ane Bielen. Također, ranije je svakom bakterijskom izolatu određena sekvenca *16S* rRNA gena (poglavlje 3.1.). U sklopu ovog diplomskog rada načinjena je filogenetska analiza (poglavlje 3.2.) te testovi inhibicijske aktivnosti banke izolata (poglavlje 3.3.).

#### 3.1. Uzorkovanje, uzgoj i sekvenciranje *16S* rRNA gena čistih bakterijskih kultura

Sakupljeni su, uzgojeni i pročišćeni izolati s kutikule pet vrsta rakova (slika 3, tablica 1): riječni rak (*Astacus astacus*), bjelonogi rak (*Austropotamobius pallipes*), potočni rak (*Austropotamobius torrentium*), signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*) i uskoškari rak (*Pontastacus leptodactylus*). Rakovi bez vanjskih znakova bolesti ulovljeni su Li-Ni vršama (slika 4a): deset jedinki *A. astacus* iz Plitvičkih jezera (Novakovića Brod, donja jezera, N44°54'7" E 15°36'39"), deset jedinki *A. torrentium* iz Plitvičkih jezera (Prijeboj, N44°49'50" E15°39'49"), šest jedinki *A. pallipes* iz Jugovskog potoka (N45°25'20" E13°47'3"), deset jedinki *P. leniusculus* iz rijeke Korane (Ladvenjak, N45°24'44" E15°36'30") te deset jedinki *P. leptodactylus* iz rijeke Korane (Ušće, N45°27'54" E15°33'58").



**Slika 3.** Slatkovodni deseteronožni rakovi s čije su kutikule uzorkovani bakterijski izolati uzorkovani u ovom radu: riječni rak *Astacus astacus* (a) (Pavić, 2018), bjelonogi rak *Austropotamobius pallipes* (b) (Chucholl i sur., 2015), potočni rak *Austropotamobius torrentium* (c) (Pavić, 2018), signalni rak *Pacifastacus leniusculus* (d) (Holdich i sur., 2014) i uskoraški rak *Pontastacus leptodactylus* (e) (Perdikaris i Georgiadis, 2017)

**Tablica 1.** Bakterijski izolati analizirani u ovom radu, imenovani prema vrsti i jedinki raka s koje su uzorkovani

VRSTA RAKA	BAKTERIJSKI IZOLATI	UKUPNO IZOLATA
<i>Astacus astacus</i> riječni rak	AA2-1, AA2-2, AA3-3, AA6-1, AA6-4, AA7-2, AA8-4, AA9-1, AA10-3, AA10-5, AA10-7	11/145
<i>Austropotamobius pallipes</i> bjelonogi rak	AP1-1, AP1-4, AP1-5, AP1-6, AP1-7, AP2-1, AP2-3, AP2-4, AP2-5, AP3-1, AP3-2, AP3-3, AP3-5, AP4-2, AP4-3, AP4-4, AP4-5, AP5-1, AP5-2, AP5-3, AP5-4, AP6-1, AP6-2, AP6-3	24/145
<i>Austropotamobius torrentium</i> potočni rak	AT11-2, AT11-3, AT11-4, AT11-5, AT11-6, AT11-7, AT13-1, AT13-2, AT13-5, AT13-6, AT14-1, AT14-2, AT14-5, AT15-1, AT15-3, AT16-2, AT16-3, AT16-5, AT16-6, AT17-1, AT17-2, AT17-3, AT17-4, AT17-5, AT17-6, AT18-1, AT18-2, AT18-3, AT18-4, AT18-5, AT19-3, AT19-4, AT19-5, AT19-6, AT19-7, AT20-1, AT20-2, AT20-4	38/145
<i>Pacifastacus leniusculus</i> signalni rak	PL1-1, PL1-2, PL1-3, PL1-4, PL1-5, PL1-6, PL2-2, PL2-3, PL2-5, PL2-6, PL3-3, PL3-4, PL3-6, PL4-1, PL4-3, PL4-4, PL4-5, PL4-6, PL4-7, PL5-1, PL5-2, PL5-3, PL5-4, PL5-5, PL5-6, PL6-1, PL6-2, PL6-3, PL6-4, PL6-5, PL7-1, PL7-2, PL8-1, PL8-4, PL10-1, PL10-2, PL10-3	37/145
<i>Pontastacus leptodactylus</i> uskoškari rak	POL1-1, POL1-2, POL1-3, POL1-4, POL2-1, POL2-2, POL2-3, POL2-4, POL2-5, POL3-2, POL3-3, POL3-5, POL3-6, POL4-3, POL4-5, POL5-1, POL5-3, POL5-4, POL6-1, POL6-2, POL6-3, POL6-4, POL6-5, POL7-2, POL7-3, POL7-4, POL8-1, POL8-3, POL9-1, POL9-2, POL9-3, POL9-5, POL9-6, POL10-1, POL10-2	35/145

a)



b)

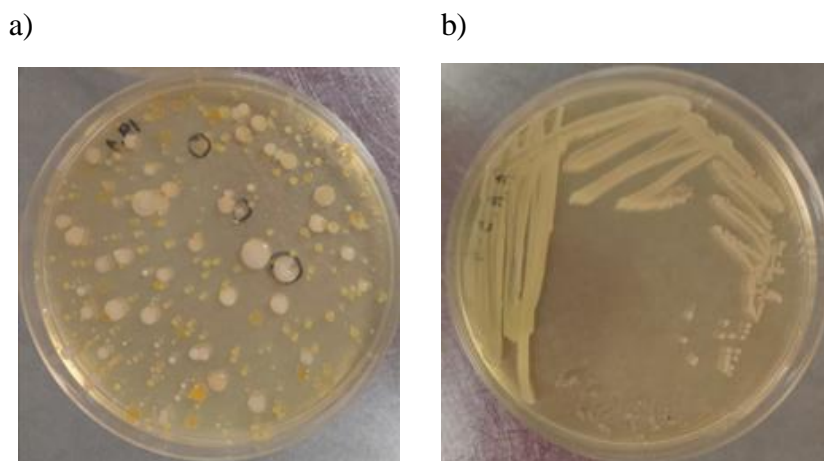


**Slika 4.** Uzorkovanje rakova: a) hvatanje rakova Li-Ni vršama. Autor fotografije: Anđela Miljanović, b) uzimanje uzorka epibiotske bakterijske zajednice kutikule u laboratoriju (Pavić i sur. 2020)

Uzorci epibiotskih bakterija uzeti su prema ranijem opisanom protokolu Pavić i sur. (2020) (slika 4b) te su serijska decimalna razrijeđenja prikupljenih suspenzija nacijepljena na peptonsko-glukoznu (engl. *peptone glucose medium*, PG1) krutu hranjivu podlogu (Unestam, 1965) i inkubirani pri 18 °C (Orlić i sur., 2021). Nakon 72 h, iz mješovitih kultura (slika 5a) odabrane su morfološki različite individualne kolonije te pročišćene tehnikom ploča s prugama (engl. *streak plate method*, slika 5b). Na ovaj je način sakupljeno 145 bakterijskih izolata, imenovanih prema vrsti i jedinki raka s koje su uzorkovani, kako je navedeno u tablici 1. Pročišćeni bakterijski izolati pohranjeni su u 30 %-tnom glicerolu pri –80 °C.

Svakom bakterijskom izolatu umnožen je gen koji kodira za *16S* rRNA lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), prema ranije objavljenom protokolu (Orlić i sur., 2021). Sangerovo sekvenciranje pročišćenih PCR-produkata provedeno je u servisu Microsynth, Inc. (Švicarska) s dvije strane, korištenjem početnica 27F i 1492R. Dobiveni kromatogrami su analizirani i uređeni u programu GeneStudio, Inc., a sekvence *16S* rRNA gena pohranjene u fasta formatu.





**Slika 5.** a) Primjer mješovite bakterijske kulture nakon 72 h, b) pročišćavanje pojedinih kolonija tehnikom ploča s prugama (engl. *streak plate method*). Autor fotografija: Anđela Miljanović

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

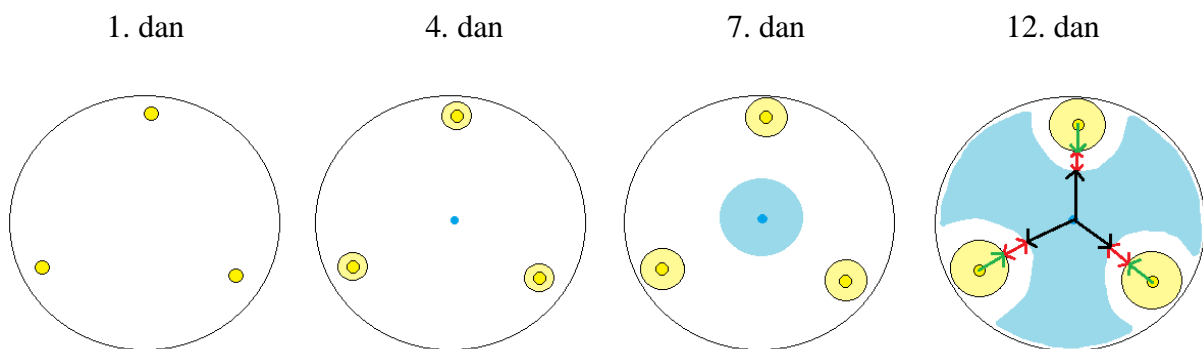
Kako bi se identificirali bakterijski izolati, slijed nukleotida *16S* rRNA gena svakog izolata uspoređen je s nukleotidnim slijedovima već poznatih mikroorganizama u javno dostupnoj bazi podataka *16S* rRNA sekvenci (Bacteria and Archea) koristeći zadane postavke programa Blastn (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI).

Višestruko poravnanje sekvenci izolata (145) i odabranih referentnih sekvenci (111) napravljeno je u programu MAFFT (Kato i Standley, 2013) koristeći standardne postavke, a zatim je uređeno u programu BioEdit (Hall i sur., 2011). Na taj je način dobiveno višestruko poravnanje 256 *16S* rRNA sekvenci koje je imalo 696 stupaca i korišteno je za izradu filogenetskog stabla metodom maksimalne vjerojatnosti (engl. *Maximum likelihood*, ML) u programu MEGA 7.0.26 (Kumar i sur., 2016). ML metoda zahtijeva model supstitucije kako bi se procijenila vjerojatnost pojedine mutacije te je u ovoj analizi korišten Kimura 2-parameter model (K2+G). Podrška za grananja unutar filogenetskog stabla određena je na temelju 1000 *bootstrap* ponavljanja. Dobiveno stablo je uređeno u programu Inkscape (<https://inkscape.org/>).



### 3.3. Testovi inhibicije rasta micelija patogena *A. astaci*

Kako bi se utvrdio inhibicijski potencijal bakterijskih izolata prema rastu micelija patogena *A. astaci* korišten je *in vitro* test inhibicije, odnosno model A opisan u radu Orlić i sur. (2021). Testovi su provedeni prema shemi prikazanoj na slici 6: istovremeno su inokulirane tri paralele istog bakterijskog izolata na jednu krutu hranjivu podlogu. Nakon četiri dana, odnosno nakon što su bakterijske kolonije porasle, na sredinu hranjive podloge nacijepljen je micelij *A. astaci*. Trajanje testa je određeno vremenom koje je potrebno da micelij *A. astaci* naraste do ruba hranjive podloge kada bakterije nisu prisutne, a to je 9 dana pri 18 °C.



**Slika 6.** Shema modela testova inhibicije. Žuto područje predstavlja rast bakterijskih kolonija, a plavo rast micelija *Aphanomyces astaci*. Mjerena je zona radijalnog rasta micelija *Aphanomyces astaci* u mm (crne strelice), zona rasta bakterijskih kolonija u mm (zelene strelice) i zona inhibicije, tj. udaljenost između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija u mm (crvene strelice) nakon 9 dana uzgoja patogena *A. astaci* pri 18 °C (ukupno 12 dana uzgoja od nacijepljivanja bakterija na hranjivu podlogu)

Za pripremu PG1 podloge (Unestam, 1965) pripremljeno je pet otopina čiji je sastav prikazan u tablici 2. Sve otopine su nakon pripreme sterilizirane autoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Nakon što su se otopine ohladile na otprilike 45 °C, pomiješane su točno određenim redoslijedom kako ne bi došlo do taloženja i zamučivanja. U 600 mL steriliziranog agara prvo je dodano 100 mL fosfatnog pufera, zatim 100 mL otopine soli, nakon toga 100 mL glukoze i na kraju 100 mL peptona. Pripremljena podloga je u sterilnim uvjetima nalivena u Petrijeve zdjelice.

Svaki bakterijski izolat nacijepljen je na zasebnu PG1 krutu hranjivu podlogu u tri paralele tako da su na podlogu postavljena tri sterilna diska od filter papira ( $d = 5 \text{ mm}$ ) te je na svaki disk inokulirano  $5 \mu\text{L}$  suspenzije bakterija u glicerolu (žuti kružići 1. dan na slici 6). Nakon četiri dana uzgoja pri sobnoj temperaturi, kada su bakterijske kolonije prerasle diskove filter papira, na sredinu podloge je nacijepljen komadić PG1 podloge obrastao micelijem patogena *A. astaci* (plavi kružić 4. dan na slici 6). Za kontrolu brzine radijalnog rasta micelija *A. astaci* nacijepljene su tri podloge PG1 bez bakterijskih izolata. Nakon još devet dana uzgoja pri  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  (12. dan, slika 6), programom ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) su izmjerene tri varijable: zona radijalnog rasta micelija *A. astaci* u mm (crne strelice na slici 6), zona rasta bakterijskih kolonija u mm (zelene strelice na slici 6) i zona inhibicije, tj. udaljenost između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija u mm (crvene strelice na slici 6). Za svaku varijablu je izračunata srednja vrijednost. S obzirom na rezultate mjerenja, bakterijski izolati su svrstani u dvije kategorije: inhibitori (promjer zone inhibicije  $\geq 6 \text{ mm}$ ) i ne-inhibitori (promjer zone inhibicije  $< 6 \text{ mm}$ ) rasta micelija *A. astaci* (Orlić i sur., 2021).

**Tablica 2.** Sastav otopina potrebnih za pripremu PG1 krute hranjive podloge

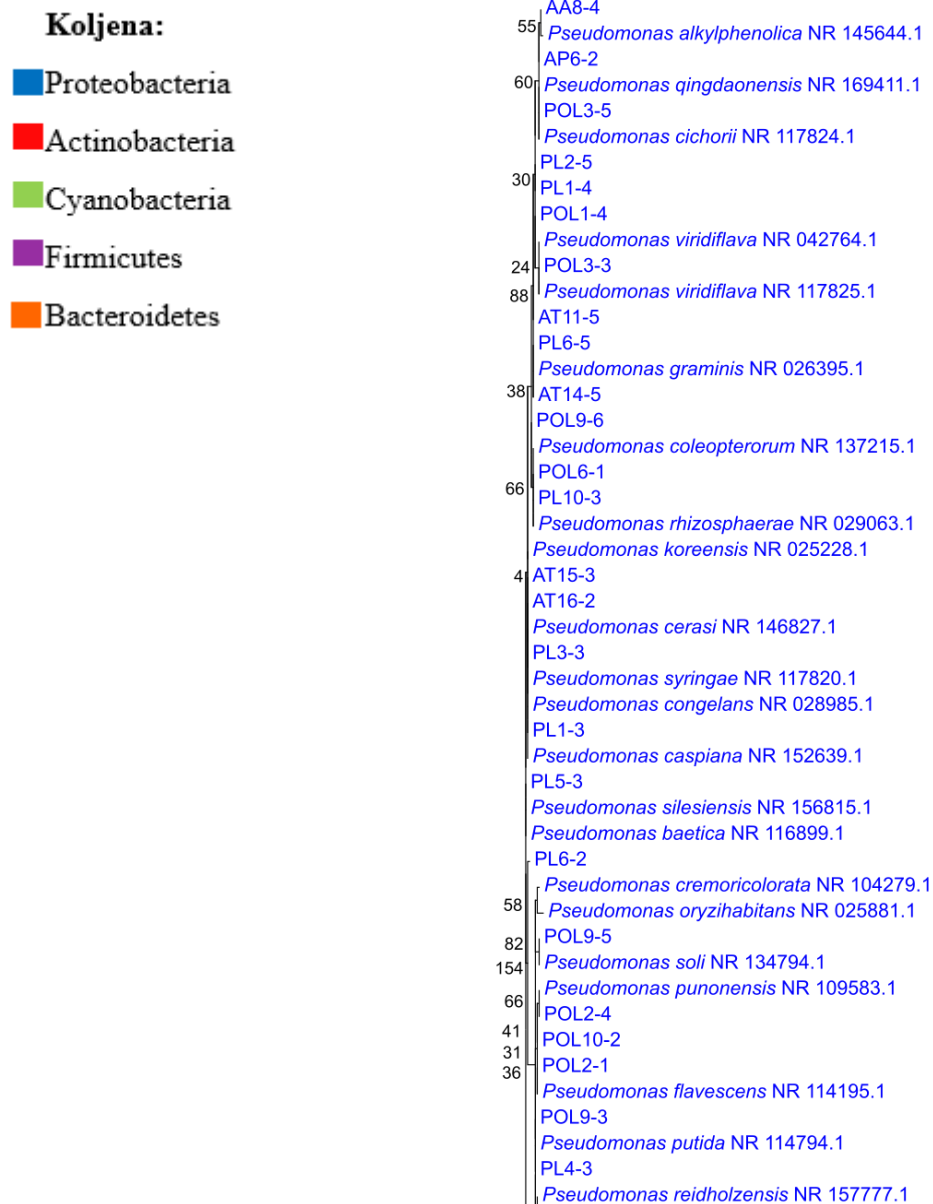
Otopina	Priprema otopine	Količina koja je potrebna za pripremu 1L podloge (mL)
Pepton	Odvagati 3 g Bacto peptona (BD) i otopiti u 100 mL destilirane vode	100
Glukoza	Odvagati 6 g D (+) glukoza monohidrata (Merck) i otopiti u 100 mL destilirane vode	100
Otopina soli	Odvagati 1,70 g $\text{MgCl}_2 \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ (J.T.Baker), 1,45 g $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ (Merck), 0,20 g $\text{FeCl}_3 \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ (Merck), 3,70 g KCl (J. T. Baker) i 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctenekiseline (Merck) i otopiti u 1000 mL destilirane vode	100
Fosfatni pufer, pH 7	Pripremiti otopine A; 9,5 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Merck) i B; 9,2 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ (J. T. Baker); nakon sterilizacije pomiješati 611 mL otopine A i 389 mL otopine B	100
Agar	Odvagati 12 g agara i otopiti u 600 mL vode	600

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

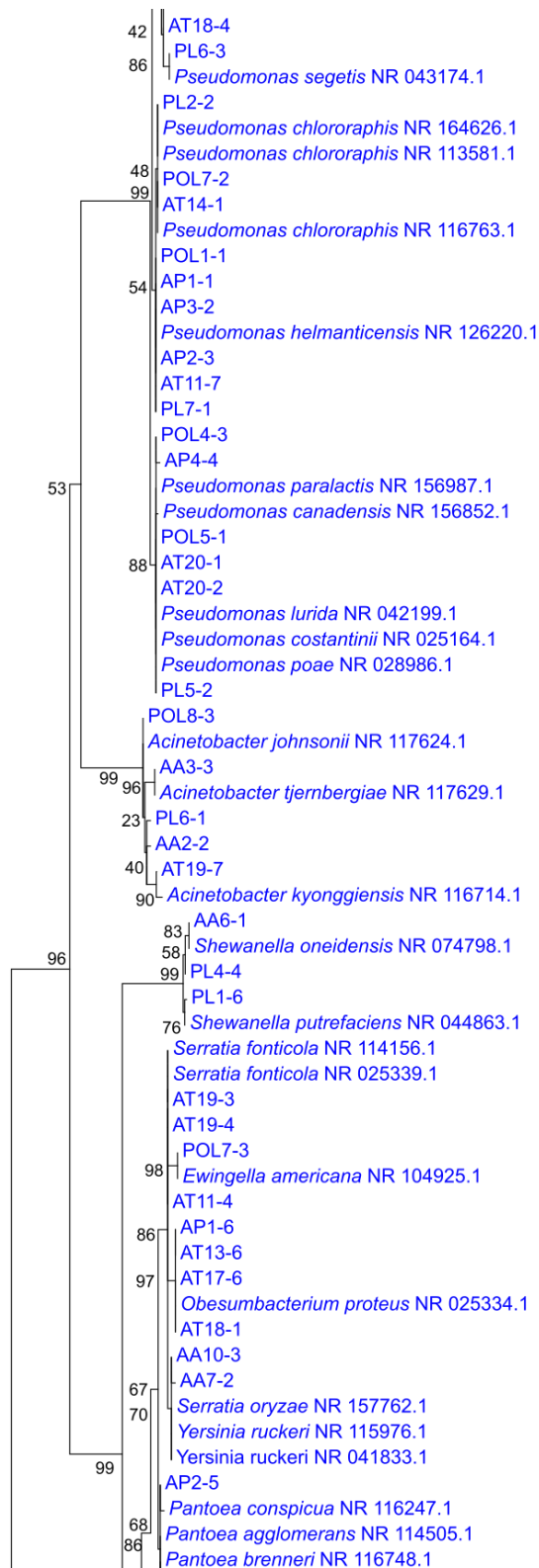
### 4.1. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata s kutikule rakova

Filogenetska analiza *16S* rRNA sekvenci 145 bakterijskih izolata s kutikule rakova *A. astacus* (AA), *A. torrentium* (AT) i *A. pallipes* (AP), *P. leniusculus* (PL) i *P. leptodactylus* (POL) prikazana je na slici 7. Neovisno o vrsti raka, najveći udio izolata spadao je u koljeno Proteobacteria (96/145 izolata, 66 %), zatim Bacteroidetes (26/145 izolata, 18 %), Firmicutes (19/145 izolata, 13 %), Actinobacteria (3/145 izolata, 2 %) i Cyanobacteria (1/145 izolata, 1 %) (tablica 3, Prilog 1). Ovo je prvo istraživanje bakterijskih izolata s kutikule riječnog raka (*A. astacus*), potočnog raka (*A. torrentium*) i bjelonogog raka (*A. pallipes*), dok su bakterijski izolati s kutikule uskoškarog (*P. leptodactylus*) i signalnog (*P. leniusculus*) raka analizirani u ranijem istraživanju Orlić i sur. (2021). Ova grupa autora je koristila isti eksperimentalni pristup kao u ovom radu (uzgoj bakterijskih izolata s kutikule rakova *P. leptodactylus* i *P. leniusculus* iz rijeke Mrežnice odnosno Korane na bogatoj hranjivoj podlozi i identifikacija sekvenciranjem *16S* rRNA gena) te su dobili slične rezultate, odnosno sakupljeni izolati pripadali su koljenima Proteobacteria (33/48 izolata, 67 %), Bacteroidetes (8/48 izolata, 17 %), Firmicutes (4/48 izolata, 8 %) i Actinobacteria (3/48 izolata, 6 %). Još jedno recentno istraživanje, Dragičević i sur. (2021), bavi se bakterijskim zajednicama kutikule signalnog raka duž rijeke Korane. U tom je radu korišten nešto drugačiji pristup odnosno izravno je izolirana ukupna DNA iz mikrobnog biofilma kutikule te su potom umnažanjem i sekvenciranjem *16S* rRNA gena identificirane prisutne bakterije. Rezultati su pokazali da su u biofilmu signalnog raka dominantna koljena Proteobacteria (33 %), Planctomycetes (25 %) i Cyanobacteria (11 %). Odstupanje od rezultata ovog istraživanja i istraživanja Orlić i sur. (2021), poput izostanka uzgojenih izolata iz koljena Planctomycetes, može se lako objasniti različitim eksperimentalnim pristupom. Bakterije iz koljena Planctomycetes je općenito vrlo teško uzgojiti u laboratorijskim uvjetima na sintetskim hranjivim podlogama, a one koje se mogu uzgojiti rastu vrlo sporo, zahtijevaju specifičan medij za uzgoj te dugo vrijeme inkubacije (Kaboré i sur., 2020). Stoga je razumljivo da pripadnici ovog koljena nisu mogli biti izolirani na hranjivim podlogama koje su korištene u ovom istraživanju i istraživanju Orlić i sur. (2021). Prednost uzgoja bakterijskih izolata je u tome što daje mogućnost detaljne laboratorijske karakterizacije sakupljenih sojeva, poput analize inhibicijske aktivnosti u ovom radu. Međutim, većina se mikroba iz okoliša (oko 99 %) ne može uzgojiti u laboratoriju (Kellenberger, 2001). Zbog toga se u mnogim istraživanjima, poput rada Dragičević i sur. (2021), danas koristi NGS (engl. *next generation sequencing*) pristup kojim

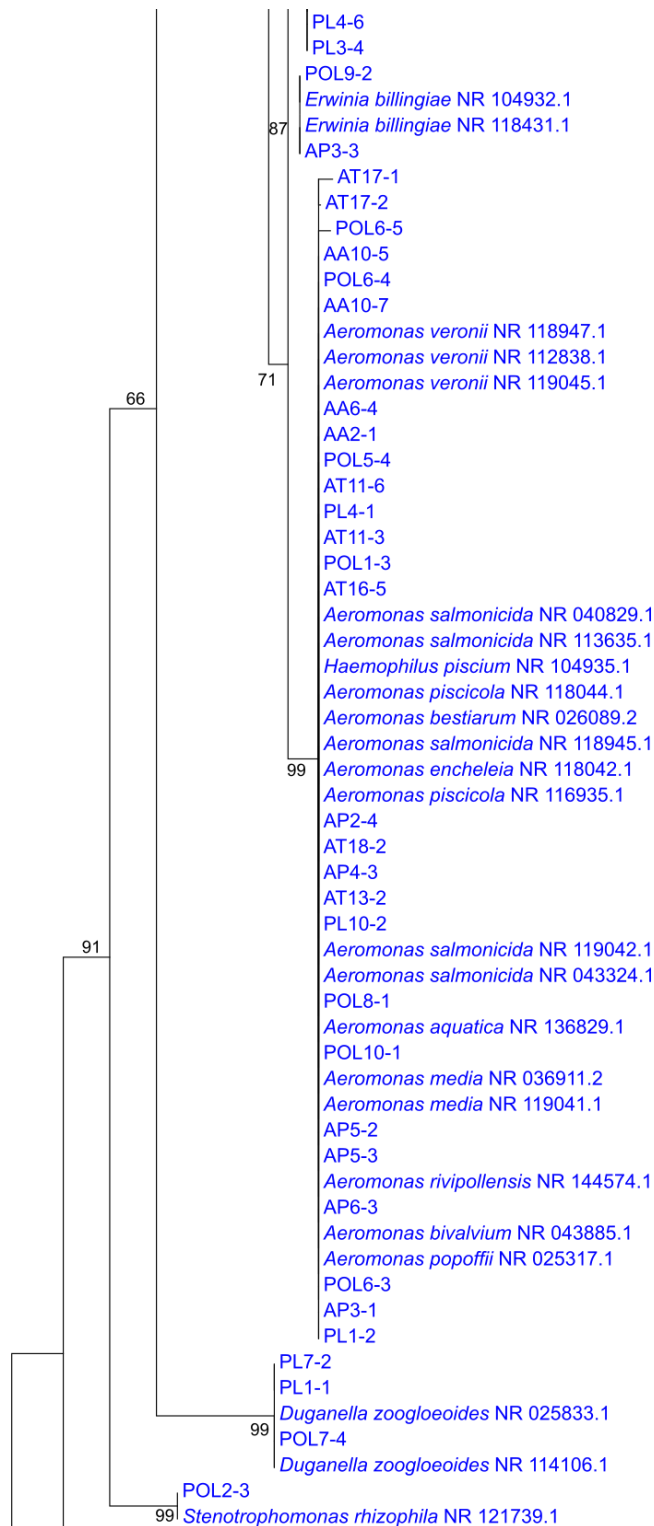
se dobije se informacija o (gotovo) svim bakterijama prisutnim u nekom staništu. Ovim je pristupom između ostalog demonstrirano da je mikrobiom kutikule signalnog raka iznimno raznolik, i određen s jedne strane karakteristikama okoliša (odnosno mikrobnim zajednicama sedimenta u kojem rakovi žive), a s druge strane intrinzičnim karakteristikama životinja (Dragičević i sur., 2021).



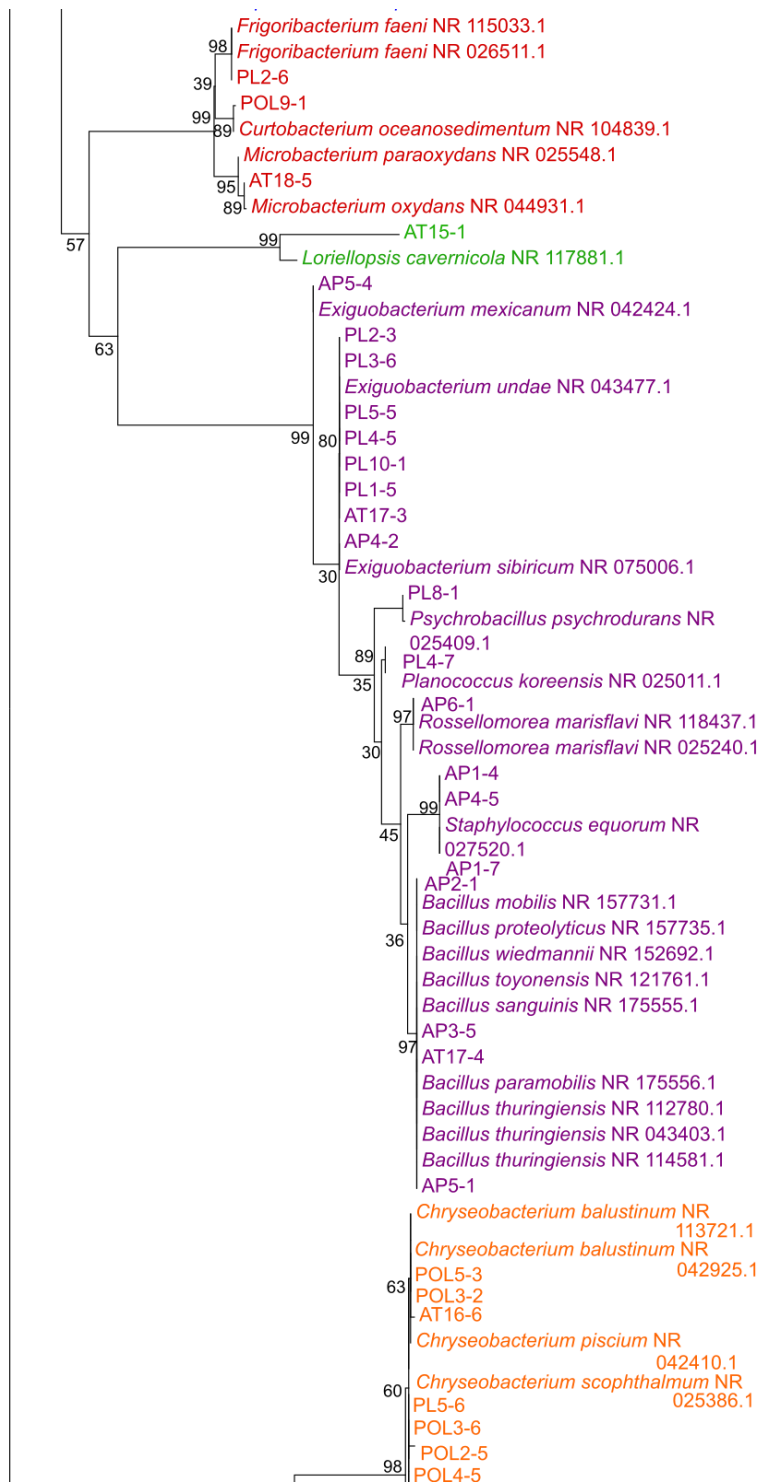
**Slika 7.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci *16S* rRNA gena bakterijskih izolata s kutikule rakova konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored glavnih čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,1 supstitucije)



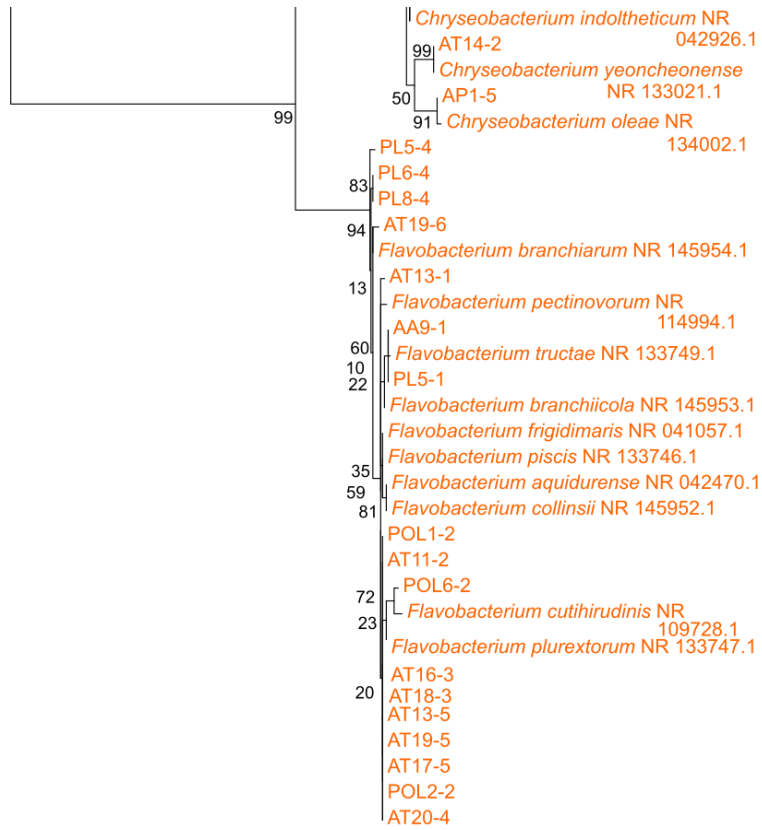
**Slika 7.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci *16S* rRNA gena bakterijskih izolata s kutikule rakova konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored glavnih čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,1 supstitucije)-  
*nastavak*



**Slika 7.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci *16S* rRNA gena bakterijskih izolata s kutikule rakova konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored glavnih čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,1 supstitucije)-  
*nastavak*



**Slika 7.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci *16S* rRNA gena bakterijskih izolata s kutikule rakova konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored glavnih čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,1 supstitucije)-  
*nastavak*



**Slika 7.** Filogenetsko stablo dobiveno na temelju sekvenci *16S* rRNA gena bakterijskih izolata s kutikule rakova konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). Pored glavnih čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,1 supstitucije)-  
*nastavak*



Među analiziranim bakterijskim izolatima s kutikule rakova, najčešći rodovi su bili *Pseudomonas* (42/145, 29 %) i *Aeromonas* (27/145, 19 %) iz koljena Proteobacteria, *Flavobacterium* (17/145, 12 %) i *Chryseobacterium* (9/145, 6 %) iz koljena Bacteroidetes, te *Exiguobacterium* (9/145, 6 %) iz koljena Firmicutes (tablica 3). Ovi rezultati su također prilično podudarni s ranijim istraživanjem Orlić i sur. (2021), u kojem su od ukupno 48 bakterijskih izolata najčešće pronađeni rodovi bili *Pseudomonas* (29 %), *Acinetobacter* (13 %) i *Flavobacterium* (8 %).

Dominantni rodovi su se donekle razlikovali ovisno o vrsti raka s koje su prikupljeni izolati, kako je vidljivo u tablici 3 i Prilogu 1. S kutikula riječnog raka *A. astacus* (ukupno deset jedinki) i bjelonogog raka *A. pallipes* (ukupno šest jedinki) dobiveno je ukupno 11 odnosno 24 izolata od kojih je najviše bilo iz roda *Aeromonas* (4/11, 36 %; odnosno 6/24, 25 %). S kutikula signalnog raka *P. leniusculus* (ukupno deset jedinki) i uskoškarog raka (*P. leptodactylus*) dobiveno je ukupno 37 odnosno 35 izolata od kojih je najviše bilo iz roda *Pseudomonas* (13/37, 35 %; odnosno 14/35, 40 %). Naposljetku, s kutikula deset jedinki potočnog raka *A. torrentium* dobiveno je ukupno 38 izolata od kojih je najviše bilo iz rodova *Flavobacterium* (9/38, 24 %) i *Pseudomonas* (9/38, 24 %). Unatoč opisanim razlikama u zastupljenosti različitih bakterijskih rodova na kutikulama različitih vrsta rakova, te razlike nisu bile statistički značajne (Mann-Whitney U test;  $p > 0.05$ ), slično rezultatima Orlić i sur. (2021) za bakterijske izolate s kutikule signalnog i uskoškarog raka.

**Tablica 3.** Usporedba rodova bakterija ovisno o vrsti raka s koje su izolirani. AA - *A. astacus*, POL - *P. leptodacylus*, AP - *A. pallipes*, AT - *A. torrentium*, PL - *P. leniusculus*

Koljeno izolata	Rod izolata	Broj izolata s određene vrste raka					Broj izolata iz pojedinog roda/ukupni broj izolata
		AA	POL	AP	AT	PL	
Actinobacteria	<i>Curtobacterium</i>	0	1	0	0	0	1/145 (1 %)
	<i>Frigoribacterium</i>	0	0	0	0	1	1/145 (1 %)
	<i>Microbacterium</i>	0	0	0	1	0	1/145 (1 %)
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	0	5	1	2	1	9/145 (6 %)
	<i>Flavobacterium</i>	1	3	0	9	4	17/145 (12 %)
Cyanobacteria	<i>Loriellopsis</i>	0	0	0	1	0	1/145 (1 %)
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	0	0	3	1	0	4/145 (3 %)
	<i>Exiguobacterium</i>	0	0	2	1	6	9/145 (6 %)
	<i>Planococcus</i>	0	0	0	0	1	1/145 (1 %)
	<i>Psychrobacillus</i>	0	0	0	0	1	1/145 (1 %)
	<i>Rosellomorea</i>	0	0	1	0	0	1/145 (1 %)
	<i>Staphylococcus</i>	0	0	3	0	0	3/145 (2 %)
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	2	1	0	1	1	5/145 (3 %)
	<i>Aeromonas</i>	4	7	6	7	3	27/145 (19 %)
	<i>Duganella</i>	0	1	0	0	2	3/145 (2 %)
	<i>Erwinia</i>	0	1	1	0	0	2/145 (1 %)
	<i>Ewingella</i>	0	1	0	0	0	1/145 (1 %)
	<i>Obesumbacterium</i>	0	0	1	3	0	4/145 (3 %)
	<i>Pantoea</i>	0	0	1	0	2	3/145 (2 %)
	<i>Pseudomonas</i>	1	14	5	9	13	42/145 (29 %)
	<i>Serratia</i>	1	0	0	3	0	4/145 (3 %)
	<i>Shewanella</i>	1	0	0	0	2	3/145 (2 %)
	<i>Stenotrophomonas</i>	0	1	0	0	0	1/145 (1 %)
<i>Yersinia</i>	1	0	0	0	0	1/145 (1 %)	
UKUPNO		11	35	24	38	37	145

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

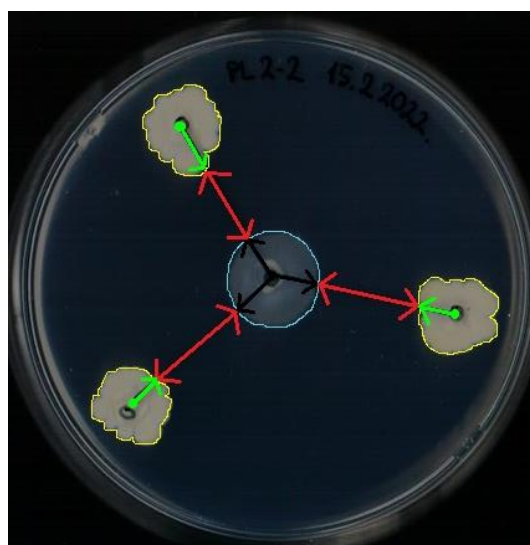
Testovima *in vitro* istražen je inhibicijski potencijal svih 145 izolata prema rastu micelija patogena *A. astaci*. Rezultati testova pokazali su da neki od izolata mogu usporiti ili zaustaviti rast micelija patogena (slika 8, tablica 4, Prilog 1). S obzirom na širinu zone inhibicije, izolati su podijeljeni u dvije skupine: inhibitori (zona inhibicije  $\geq 6$  mm, 19/145 izolata, 13 %) i ne-inhibitori (zona inhibicije  $< 6$  mm, 126/145 izolata, 87 %), prema ranijoj publikaciji Orlić i sur. (2021). Na slici 8 nalaze se primjeri fotografija testova inhibicije za bakterijske izolate koji inhibiraju (8a i 8b) i koji ne inhibiraju rast micelija *A. astaci* (8c i 8d).

Većina bakterijskih izolata koji su inhibirali rast micelija patogena *A. astaci* pripada rodu *Pseudomonas* (15/19 izolata inhibitora, 79 %), zatim *Aeromonas* (3/19 izolata inhibitora, 16 %) i *Ewingella* (1/19 izolata inhibitora, 5 %, tablica 4). Iz rodova *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Duganella*, *Erwinia*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Frigoribacterium*, *Loriellopsis*, *Microbacterium*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Planococcus*, *Psychrobacillus*, *Rossellomorea*, *Serratia*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* i *Yersinia* nije pronađen niti jedan izolat s inhibicijskim djelovanjem prema rastu micelija *A. astaci*. Kao najjači inhibitori pokazali su se izolati *Pseudomonas* sp. AT20-1 (zona inhibicije = 21,83 mm), *Pseudomonas* sp. AT20-2 (zona inhibicije = 21,12 mm) i *Pseudomonas* sp. PL3-3 (zona inhibicije = 20,02 mm).

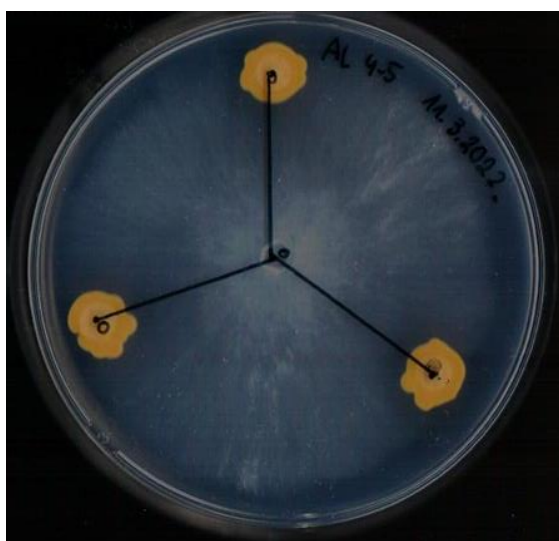
a)



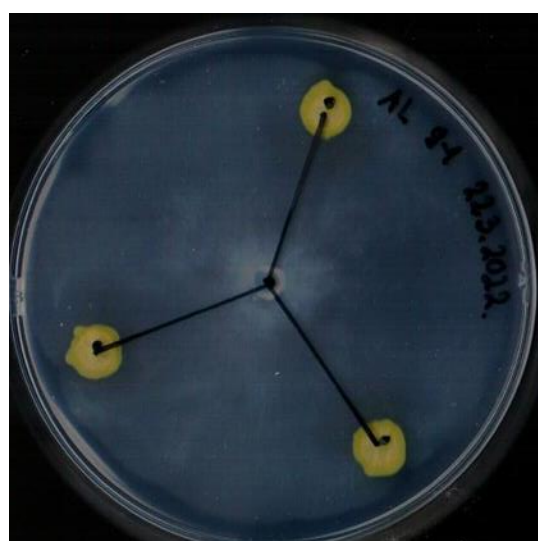
b)



c)



d)



**Slika 8.** Primjeri testova inhibicije za izolate *Pseudomonas helmanticensis* AP3-2, inhibitor rasta micelija patogena *A. astaci* (a), *Pseudomonas chlororaphis* PL2-2, inhibitor (b), *Chryseobacterium* sp. POL4-5, ne-inhibitor (c) i *Curtobacterium oceanosedimentum* POL9-1, ne-inhibitor (d). Na slici (b) označena je zona radialnog rasta micelija *A. astaci* (plavo područje), mjerenje veličine micelija u mm (crne strelice), zona rasta bakterijskih kolonija (žuto područje), mjerenje veličine bakterijskih kolonija u mm (zelene strelice) i mjerenje zone inhibicije, tj. udaljenost između ruba bakterijske kolonije i ruba micelija u mm (crvene strelice)

U usporedbi s istraživanjem Orlić i sur. (2021), u ovom je radu dobiven nešto manji udio inhibicijskih izolata: 19/145 izolata (13 %) naspram 16/48 izolata (33 %). Međutim, u oba su se istraživanja kao najbolji inhibitori pokazale bakterije iz roda *Pseudomonas*. To je u skladu i s nizom drugih istraživanja u kojima je pokazano inhibicijsko djelovanje bakterija iz roda *Pseudomonas* prema oomicetnim patogenima biljaka i životinja (Wagner i sur., 2018; Ossowick i sur., 2017; De Vrieze i sur., 2015; Hunziker i sur., 2015; Liu i sur., 2015; Bly i sur., 1997). Primjerice, pokazano je da neki sojevi roda *Pseudomonas* inhibiraju rast hifa i klijanje cista vrsta iz roda *Saprolegnia*, koje su srodne rodu *Aphanomyces* (Liu i sur., 2015; Carbajal-González i sur., 2011; Bly i sur., 1997). Mehanizmi inhibicije izolata iz roda *Pseudomonas* temelje se na lučenju specifičnih lipopetidnih surfaktanata i hlapljivih organskih spojeva koji mogu inhibirati rast hifa, ali i stvaranje i klijanje sporangija, te proizvodnju, pokretljivost i klijanje zoospora/cista (De Vrieze i sur., 2015; Hunziker i sur., 2015). Osim izolata iz roda *Pseudomonas*, ostali inhibitori su pripadali rodovima *Aeromonas* i *Ewingella*. Ovo je prvo istraživanje koje je demonstriralo inhibicijsko djelovanje bakterija iz roda *Ewingella* (izolat POL7-3) prema rastu micelija oomicetnih patogena, dok je inhibicijski potencijal roda *Aeromonas* prema oomicetnim patogenima u slatkovodnim ekosustavima poznat od ranije. Orlić i sur. (2021) pokazali su inhibiciju rasta micelija *A. astaci in vitro* bakterijskim izolatima identificiranima kao *A. encheleia* i *A. sobria*, a Lategan i Gibson (2003) su dokazali kako jedan soj bakterije *A. media* proizvodi tvar sličnu bakteriocinu koja inhibira rast hifa i klijanje cista oomicetnog patogena iz roda *Saprolegnia*. Za razliku od rezultata ovog rada, Orlić i sur. (2021) navode i inhibitore rasta micelija *A. astaci* iz rodova *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Curtobacterium* i *Pantoea*, međutim u ovom istraživanju nije pronađen niti jedan inhibirajući izolat iz tih rodova (*Acinetobacter* - 0/5, *Bacillus* - 0/4, *Pantoea* - 0/3, *Curtobacterium* - 0/1 i *Stenotrophomonas* - 0/1).

Rezultati dobiveni u ovom radu otvaraju mogućnost primjene bakterija kao ekološki prihvatljive metode kontrole patogena *A. astaci* u akvakulturnom uzgoju rakova. Međutim, identifikacija inhibirajućih izolata tek je prvi korak u razvoju biokontrole račje kuge, nakon kojeg slijedi analiza mehanizama inhibicije molekularnim i kemijskim metodama. Odabranim izolatima sa snažnom inhibicijskom aktivnošću može se sekvencirati genom te ga pretražiti za prisutnost genskih klastera odgovornih za sintezu bioaktivnih sekundarnih metabolita. Primjerice, Wagner i sur. (2018) su sekvencirali genom izolata *Pseudomonas* 06C 126 i identificirali genski klaster odgovoran za sintezu siderofora, sekundarnog metabolita koji inhibira rast oomicetnih patogena *Phytophthora sojae* i *Pythium* sp. Osim toga, mehanizam

inhibicije može se pretpostaviti i analizom transkriptoma, proteoma i/ili metaboloma inhibirajućih sojeva. Osim ovakvih *in vitro* istraživanja, potrebni su i *in vivo* pokusi kojima bi se istražio najbolji način primjene selekcioniranih bakterijskih sojeva te potvrdilo da su neškodljivi za domaćina i pružaju zaštitu od zaraze. Tako je ranije pokazano da dodavanje bakterija *Aeromonas media* u akvarij s bolesnim jeguljama *Anguilla australis* pomaže u oporavku od saprolegnioze, kao i da se smrtnost atlantskog lososa *Salmo salar* zaraženog s *Aeromonas salmonicida* smanjila nakon kupanja u suspenziji bakterija iz roda *Pseudomonas* (Lategan i sur., 2004; Lategan i Gibson 2003; Smith i Davey, 1993). Nadalje, neka od istraživanja su pokazala da dodavanje bakterija iz roda *Pseudomonas* u hranu kozica *Penaeus latisulcatus* ima pozitivan učinak na njihovu imunost, a kod kalifornijskih pastrva *Oncorhynchus mykiss* primjećena je smanjena smrtnost nakon zaraze patogenom *Vibrio anguillarum* (van Hai i sur., 2009; Gram i sur., 1999).

**Tablica 4.** Bakterijski izolati sakupljeni s kutikula rakova *Astacus astacus* (AA), *Austropotamobius torrentium* (AT), *Austropotamobius pallipes* (AP), *Pacifastacus leniusculus* (PL) i *Pontastacus leptodactylus* (POL) klasificirani prema potencijalu da inhibiraju micelij patogena *Aphanomyces astaci* (inhibitori i ne-inhibitori)

Rod bakterija	Vrsta raka	Broj inhibitora	Broj ne-inhibitora	Broj inhibitora/ukupan broj izolata
<i>Acinetobacter</i>	AA, POL, AT, PL	0	5	0/5 (0 %)
<i>Aeromonas</i>	AA, POL, AP, AT, PL	3	24	3/27 (11 %)
<i>Bacillus</i>	AP, AT	0	4	0/4 (0 %)
<i>Chryseobacterium</i>	POL, AP, AT, PL	0	9	0/9 (0 %)
<i>Curtobacterium</i>	POL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Duganella</i>	POL, PL	0	3	0/3 (0 %)
<i>Erwinia</i>	POL, AP	0	2	0/2 (0 %)
<i>Ewingella</i>	POL	1	0	1/1 (100 %)
<i>Exiguobacterium</i>	AP, AT, PL	0	9	0/9 (0 %)
<i>Flavobacterium</i>	AA, POL, AT, PL	0	17	0/17 (0 %)
<i>Frigoribacterium</i>	PL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Loriellopsis</i>	AT	0	1	0/1 (0 %)
<i>Microbacterium</i>	AT	0	1	0/1 (0 %)
<i>Obesumbacterium</i>	AP, AT	0	4	0/4 (0 %)
<i>Pantoea</i>	AP, PL	0	3	0/3 (0 %)
<i>Planococcus</i>	PL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Pseudomonas</i>	AA, POL, AP, AT, PL	15	27	15/42 (36 %)
<i>Psychrobacillus</i>	PL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Rosellomorea</i>	AP	0	1	0/1 (0 %)
<i>Serratia</i>	AA, AT	0	4	0/4 (0 %)
<i>Shewanella</i>	AA, PL	0	3	0/3 (0 %)
<i>Staphylococcus</i>	AP	0	3	0/3 (0 %)
<i>Stenotrophomonas</i>	PL	0	1	0/1 (0 %)
<i>Yersinia</i>	AA	0	1	0/1 (0 %)
<b>UKUPNO</b>		19	126	19/145 (13 %)

## 5. ZAKLJUČCI

1. Molekularna identifikacija 145 bakterijskih izolata s kutikule slatkovodnih deseteronožnih rakova sekvenciranjem *16S* rRNA gena pokazala je da najveći udio izolata pripada koljenu Proteobacteria (66 %, s dominantnim rodovima *Pseudomonas* i *Aeromonas*), zatim Bacteroidetes (26/145 izolata, 18 %, s najčešćim rodом *Flavobacterium*), Firmicutes (19/145 izolata, 13 %), Actinobacteria (3/145 izolata, 2 %) i Cyanobacteria (1/145 izolata, 1 %).
2. Od ukupno 145 bakterijskih izolata, njih 19 (13 %) pokazalo je inhibicijski potencijal prema rastu micelija *A. astaci* (zona inhibicije  $\geq 6$  mm), dok preostalih 126 izolata (87 %) nije pokazalo inhibicijski potencijal (zona inhibicije  $< 6$  mm).
3. Većina bakterijskih izolata koji su inhibirali rast micelija patogena *A. astaci* pripada rodu *Pseudomonas* (79 %).
4. Ovim istraživanjem je prvi puta dokazano inhibicijsko djelovanje izolata iz roda *Ewingella* prema oomicetnim patogenima.



## 6. LITERATURA

Bajer PG, Ghosal R, Maselko M, Smanski MJ, Lechelt JD, Hansen G, i sur. (2019) Biological control of invasive fish and aquatic invertebrates: a brief review with case studies. *Manag of Biol Invasions* **10**, 227-254. <https://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.2.02>

Blundell R, Arreguin M, Eskalen A (2021) *In vitro* evaluation of grapevine endophytes, epiphytes and sap micro-organisms for potential use to control grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol Mediterr* **60**, 535-548. <https://doi.org/10.36253/phyto-12500>

Bly JE, Quiniou SMA, Lawson LA, Clem LW (1997) Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *J Fish Dis* **20**, 35-40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.d01-104.x>

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

Carral JM, González A, Celada JD, Sáez-Royuela M, Melendre PM, González R, i sur. (2009) Antifungal treatments in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae): Searching for alternatives to formaldehyde. *Knowl Manag Aquat Ec* **16**, 394-395. <https://doi.org/10.1051/kmae/2010010>

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

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

Chadwich DDA (2019) Invasion of the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in England: implications for the conservation of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (doktorski rad), University College London, University of London, London.

- Chen Y-Y, Chen P-C, Tsay T-T (2016) The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biol Control* **98**, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
- Churchill C, Mrugala A, Petrussek A (2015) First record of an introduced population of the southern lineage of white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) north of the Alps. *Knowl Managt Aquatic Ecosyst* **416**, 10-18. <https://doi.org/10.1051/kmae/2015006>
- 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.
- 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 antioomycete agents. *Front Microbiol* **6**, 1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01295>
- Dragičević P, Bielen A, Petrić I, Vuk M, Žučko J, Hudina S (2021) Microbiome of the successful freshwater invader, the signal crayfish, and its changes along the invasion range. *Microbiol Spectr* **9**, e0038921. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00389-21>
- Effendi H, Utomo BA, Darmawangsa GM, Hanafiah DA (2015) Wastewater Treatment Of Freshwater Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) Culture With Lettuce (*Lactuca sativa*). *Int J Appl Environm Sci* **10**, 409-420.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2018) The 2016 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J* **16**, 5348. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5348>
- FAO (2020) The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. FAO- Food and Agriculture Organization, <https://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Pristupljeno 7. svibnja 2022.
- González Á, Celada JD, Melendre PM, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, i sur. (2011) Effects of different bronopol treatments on final survival rates in the artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). *Aquac Res* **44**, 354-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03036.x>

- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen TF (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl Environ Microb* **65**, 969-973. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.969-973.1999>
- Grandjean F, Vrålstad T, Diéguez-Uribeondo J, Jelić M, Mangombi J, Delaunay C, i sur. (2014) Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet Microbiol* **170**, 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.020>
- Grandperrin T (2019) Augmentative biological control. An efficient pest management solution. <https://www.uaviq.com/en/2019/02/augmentative-biocontrol-an-efficient-pest-management-solution/>. Pristupljeno 18. svibnja 2022.
- GSA (2019) What Is Aquaculture and Why Do We Need It? GSA-Global Seafood Alliance, <https://www.globalseafood.org/blog/what-is-aquaculture-why-do-we-need-it/>. Pristupljeno 7. svibnja 2022.
- Guan R-Z (2000) Abundance and production of the introduced signal crayfish in a British lowland river. *Aquacult Int* **8**, 59-76. <https://doi.org/10.1023/A:1009272916339>
- Hall T, Biosciences I, Carlsbad CA (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* **2**, 60-61. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2966-8>
- Harlioglu M M (2007) The harvest of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz in Turkey: harvest history, impact of crayfish plague, and present distribution of harvested populations. *Aquacult Int* **16**, 351-360. <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9145-7>
- 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>
- Holdich DM (1993) A review of astaciculture: freshwater crayfish farming. *Aquat Living Resour* **6**, 307-317. <http://dx.doi.org/10.1051/alr:1993032>
- Holdich DM, James J, Jackson C, Peay S (2014) The North American signal crayfish, with particular reference to its success as an invasive species in Great Britain. *Ethol Ecol Evol* **26**, 232-262. <https://doi.org/10.1080/03949370.2014.903380>

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

Huang T-S, Cerenius L, Süderhäll K (1994) Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* **126**, 1-10. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90243-7)

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

Hutchinson M (2021) Popular Methods of Biological Control and the Future of Baculoviruses. *Undergraduate Review* **16**, 100-108.

Jackson TA, Crawford AM, Glare TR (2005) *Oryctes* virus—Time for a new look at a useful biocontrol agent. *J Invertebr Pathol* **89**, 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.03.009>

Jussila J, Edsman L, Maguire I, Diéguez-Uribeondo J, Theissinger K (2021) Money Kills Native Ecosystems: European Crayfish as an Example. *Front Ecol Evol* **9**, 648495. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.648495>

Jussila J, Makkonen J, Kokko H (2011) Peracetic acid (PAA) treatment is an effective disinfectant against crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) spores in aquaculture. *Aquaculture*, **320**, 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.008>

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>

Kaboré OD, Godreuil S, Drancourt M (2020) Planctomycetes as Host-Associated Bacteria: A Perspective That Holds Promise for Their Future Isolations, by Mimicking Their Native Environmental Niches in Clinical Microbiology Laboratories. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 519301. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.519301>

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

- Kawsar MA, Alam MT, Pandit D, Rahman MM, Mia M, Talukdar A, i sur. (2022) Status of disease prevalence, drugs and antibiotics usage in pond-based aquaculture at Narsingdi district, Bangladesh: A major public health concern and strategic appraisal for mitigation. *Heliyon* **8**, e09060. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09060>
- Kellenberger E (2001) Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO Rep* **2**, 5-7. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve014>
- Kokko H, Harlioglu MM, Aydin H, Makkonen J, Gökmen G, Aksu O, i sur. (2018) Observations of crayfish plague infections in commercially important narrow-clawed crayfish populations in Turkey. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* **419**, 10-14. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018001>
- Kouba A, Carral J M, Buřič M, Mráz J, Policar T, Kozák P (2010) Artificial incubation of noble crayfish (*Astacus astacus*) eggs in a partially recirculating system using formaldehyde as an -antifungal treatment. *Aquac Res* **41**, 618-623. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02569.x>
- Kouba A, Petrusek A, Kozák P (2014): Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl Manag Aquat Ec* **413**, 5-36. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>
- 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>
- Lategan MJ, Gibson LF (2003) Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. *J Fish Dis* **26**, 147-153. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00443.x>
- Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF (2004) Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture* **240**, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.009>
- 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)

- 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>
- Loureiro TG, Anastácio PM, Bueno SLS, Araujo PB (2018) Management of invasive populations of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae): test of a population-control method and proposal of a standard monitoring approach. *Environ Monit Assess* **190**, 559-570. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6942-6>
- 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*, 1. izd., The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), New Zealand, str. 6-7.
- Lowrey L, Woodhams CD, Tacchi L, Salinas I (2015) Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Appl Environ Microb* **81**, 6915-6925. <https://doi.org/10.1128/AEM.01826-15>
- Maguire I, Gottstein-Matočec S (2004) The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana* **77**, 25-47. <https://doi.org/10.1163/156854004323037874>
- 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>
- Maguire I, Klobučar G, Marčić Z, Zanella D (2008) The first record of *Pacifastacus leniusculus* in Croatia. *Crayfish News* **30**, 4.
- Maguire I, Klobučar GIV (2003) Appearance of *Orconectes limosus* in Croatia. *Crayfish News* **25**, 7.
- Makkonen J, Kokko H, Vainikka A, Kortet R, Jussila J (2014) Dose-dependent mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). *J of Invertebr Pathol* **115**, 86-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.009>
- Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR (2012) World Aquaculture: Environmental Impacts and Troubleshooting Alternatives. *Sci World J* **2012**, 389623. <https://doi.org/10.1100/2012/389623>

- Martin-Torrijos L, Llach MC, Pou-Rovira Q, Diéguez-Uribeondo J (2017) Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the endangered freshwater crayfish species, *Austropotamobius pallipes*. *PLoS ONE* **12**, e0181226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181226>
- Martin-Torrijos L, Martinez-Rios M, Casabella-Herrero G, Adams SB, Jackson CR, Diéguez-Uribeondo J (2021) Tracing the origin of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, to the Southeastern United States. *Sci Rep* **11**, 9332. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88704-8>
- Miljanović A, Bhat RAH, Tandel RS, Pavić D, Grbin D, Dent M, i sur. (2022) Bioactive compounds in fluid propolis preparations inhibit different life stages of pathogenic oomycetes *Aphanomyces astaci* and *Saprolegnia parasitica*. *Aquaculture* **522**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737982>
- Miljanović A, Grbin D, Pavić D, Dent M, Jerković I, Marijanović Z, i sur. (2021) Essential Oils of Sage, Rosemary, and Bay Laurel Inhibit the Life Stages of Oomycete Pathogens Important in Aquaculture. *Plants* **10**, 1676. <https://doi.org/10.3390/plants10081676>
- Mojžišová M, Mrugała A, Kozubíková-Balcarová E, Vlach P, Svobodová J, Kouba A, i sur. (2020) Crayfish plague in Czechia: Outbreaks from novel sources and testing for chronic infections. *J Invertebr Pathol* **173**, 107390. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107390>
- Nakagawa K, Hara C, Tokuyama S, Takada K, Imamura N (2012) Saprolymycins A–E, new angucycline antibiotics active against *Saprolegnia parasitica*. *J Antibiot* **65**, 599-607. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.86>
- OIE (2009) *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, OIE - World Organisation for Animal Health, Pariz.
- Orlić K, Šver L, Burić L, Kazazić S, Grbin D, Maguire I, i sur. (2021) Cuticle-associated bacteria can inhibit crayfish pathogen *Aphanomyces astaci*: Opening the perspective of biocontrol in astaciculture. *Aquaculture* **533**, 736112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736112>
- 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>

Oubaha B, Ezzanad A, Bolívar-Anillo HJ (2021) Plant Beneficial Microbes Controlling Late Blight Pathogen, *Phytophthora infestans*. U: Abdulkhair WMH (ured.) *Agro-Economic Risks of Phytophthora and an Effective Biocontrol Approach*, IntechOpen, London, str. 35-58.

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

Pavić D, Bielen A, Hudina S, Špoljarić I, Grandjean F, Jussila J, i sur. (2021) Distribution of *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906, the causative agent of crayfish plague, in the Plitvice Lakes National Park, Croatia. *Bioinvasions Rec* **10**, 654-668. <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.3.16>

Pavić D, Čanković M, Sviličić Petrić I, Makkonen J, Hudina S, Maguire I, i sur. (2020) Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *J Invertebr Pathol* **169**, 107274. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107274>

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

Perdikris C, Georgiadis C (2017) Co-occurrence of narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* sensu lato) and noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in the southwestern Balkans: The case of Lake Pamvotida (NW Greece). *North-West J Zool* **13**, 18-26.

Resh VH, Rosenberg DM (2015) Economic Aspects of Freshwater Invertebrates. U: Thorp JH, Rogers DC (ured.) *Ecology and General Biology*. Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates*, 4. izd., Academic Press, Elsevier Inc., Amsterdam/Boston/Heidelberg/London/New York/Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/Singapore/Sydney/Tokyo, str. 93-109.

Reynolds J, Souty-Grosset C, Richardson A (2013) Ecological Roles of Crayfish in Freshwater and Terrestrial Habitats. *Freshwater Crayfish* **19**, 197-218. <https://doi.org/10.5869/fc.2013.v19-2.197>

Rocha CP, Cabral HN, Marques JC, Gonçalves AMM (2022) A Global Overview of Aquaculture Food Production with a Focus on the Activity's Development in Transitional Systems—The Case Study of a South European Country (Portugal). *J Mar Sci Eng* **10**, 417-437. <https://doi.org/10.3390/jmse10030417>



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

Smith PR, Davey S (1993) Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *J Fish Dis* **16**, 521-524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00888.x>

Souty-Grosset C, Anastácio PM, Aquiloni L, Banha F, Choquer J, Chucholl C, i sur. (2016) The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologica* **58**, 78-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2016.03.003>

Sullam KE, Musa T (2021) Ecological Dynamics and Microbial Treatments against Oomycete Plant Pathogens. *Plants* **10**, 2697. <https://doi.org/10.3390/plants10122697>

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, Beraldo P, Massimo M, Fioravanti ML, Volpatti D, Dirks R, i sur. (2020) Comparative Therapeutic Effects of Natural Compounds Against *Saprolegnia* spp. (Oomycota) and *Amyloodinium ocellatum* (Dinophyceae). *Front Vet Sci* **7**, 83. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00083>

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

The European Parliament and the Council of the European Union (2014) Regulation (EU) no. 1143/2014 of the European Parliament and of the Council of 22 October 2014 on the prevention and management of the introduction and spread of invasive alien species. *Official Journal of the European Union* **317**, 35-55.

Tom AP, Jayakumar JS, Biju M, Somarajan J, Ibrahim MA (2021) Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: A review. *Energy Nexus* **4**, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100022>

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

- van den Berg A, McLaggan D, Diéguez-Uribeondo 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 Hai N, Buller N, Fotedar R (2009) The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Fish Shellfish Immunol* **27**, 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.004>
- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* **63**, 39-59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Viljamaa-Dirks S (2016) Epidemiology of crayfish plague (disertacija), Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki.
- Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Torssonen H, Pursiainen M, Mattila J, Pelkonen S (2013) Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland. *Dis Aquat Org* **130**, 199-208. <https://doi.org/10.3354/dao02575>
- Wagner A, Norris S, Chatterjee P, Morris PF, Wildschutte H (2018) Aquatic Pseudomonads inhibit oomycete plant pathogens of *Glycine max*. *Front Microbiol* **9**, 1007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01007>
- Wooster GA, Martinez CM, Bowser PR, O'Hara DS (2005) Human Health Risks Associated with Formalin Treatments Used in Aquaculture: Initial Study. *N Am J Aquacult* **67**, 111-113. <https://doi.org/10.1577/A04-026.1>
- Zhang K, Zheng X, He Z, Yang T, Shu L, Yiao F, i sur. (2020) Fish growth enhances microbial sulfur cycling in aquaculture pond sediments. *Microb Biotechnol* **13**, 1597-1610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13622>

## 7. PRILOZI

**Prilog 1.** Bakterijski izolati prikupljeni s kutikule rakova *Astacus astacus* (AA), *Austropotamobius torrentium* (AT), *Austropotamobius pallipes* (AP), *Pacifastacus leniusculus* (PL) i *Pontastacus leptodactylus* (POL) klasificirani prema potencijalu da inhibiraju micelij patogena *Aphanomyces astaci*. Crvenom bojom su označeni bakterijski izolati koji ne inhibiraju rast patogena (zona inhibicije < 6 mm) dok su zelenom bojom označeni izolati koji inhibiraju rast patogena (zona inhibicije  $\geq$  6 mm). Dane su prosječne vrijednosti polumjera micelija *A. astaci* i rasta bakterijskih izolata, te zone inhibicije u mm (n = 3)

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
AA2-1	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas bivalvium</i> strain 868E 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,28	NR_043885.1	27,87	0	5,08
AA2-2	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,44	NR_117624.1	27,16	0	4,75
AA3-3	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> strain DSM 14971 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,36	NR_117629.1	26,56	0	4,74
AA6-1	<i>Shewanella oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> strain MR-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,90	NR_074798.1	23,58	3,20	4,76
AA6-4	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,28	NR_118947.1	27,34	0	4,61
		<i>Aeromonas veronii</i> strain JCM 7375 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_112838.1			
		<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119045.1			
AA7-2	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> strain CCUG 14190 16S ribosomal RNA, partial sequence	97,81	NR_115976.1	27,05	0	5,42

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
AA8-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> strain KL28 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,64	NR_145644.1	22,96	4,20	03,27
AA9-1	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium tractae</i> strain 435-08 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,70	NR_133749.1	7,96	5,75	17,80
AA10-3	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia oryzae</i> strain J11-6 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,22	NR_157762.1	24,93	0	5,27
AA10-5	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	NR_118947.1	26,73	0	4,94
		<i>Aeromonas veronii</i> strain JCM 7375 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_112838.1			
		<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119045.1			
AA10-7	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_118947.1	27,19	0	5,00
		<i>Aeromonas veronii</i> strain JCM 7375 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_112838.1			
		<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119045.1			
POL1-1	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain OHA11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,64	NR_126220.1	21,59	5,96	3,90
POL1-2	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,91	NR_133746.1	11,79	0	21,01
POL1-3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain JCM 7873 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_040829.1	25,28	0	6,33
		<i>[Haemophilus] piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_104935.1			

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain CECT 7443 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118044.1			
		<i>Aeromonas salmonicida subsp. masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_113635.1			
		<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CIP 74.30 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_026089.2			
POL1-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i> strain JJ3 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,84	NR_169411.1	20,98	4,61	3,04
POL2-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas flavescens</i> strain NBRC 103044 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,07	NR_114195.1	26,91	0	5,38
POL2-2	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,76	NR_133746.1	15,26	0	16,16
POL2-3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain e-p10 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,71	NR_121739.1	26,14	0	5,36
POL2-4	<i>Pseudomonas punonensis</i>	<i>Pseudomonas punonensis</i> strain LMT03 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_109583.1	28,74	0	5,38
POL2-5	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium piscium</i> strain LMG 23089 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,69	NR_042410.1	27,43	0	5,16
POL3-2	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium balustinum</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	NR_042925.1	25,84	0	6,19
POL3-3	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i> strain CECT 458 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,56	NR_042764.1	21,12	2,68	7,39
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_117825.1			
POL3-5	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas cichorii</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,49	NR_117824.1	23,28	5,18	5,11
POL3-6	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i> strain LMG 13028 16S ribosomal RNA, partial sequence	97,67	NR_025386.1	26,21	0	4,98

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
POL4-5	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i> strain LMG 4025 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_042926.1	26,72	0	5,11
POL5-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas canadensis</i> strain 2-92 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_156852.1	14,43	10,78	8,07
POL5-3	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium balustinum</i> strain NBRC 15053 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	NR_113721.1	27,85	0	5,12
		<i>Chryseobacterium balustinum</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042925.1			
POL5-4	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas bivalvium</i> strain 868E 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,65	NR_043885.1	27,09	0	4,35
POL6-1	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	<i>Pseudomonas coleopterorum</i> strain Esc2Am 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_137215.1	26,05	0	6,27
POL6-2	<i>Flavobacterium cutihirudinis</i>	<i>Flavobacterium cutihirudinis</i> strain E89 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,16	NR_109728.1	17,56	2,78	12,00
POL6-3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas encheleia</i> strain CECT 4342 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,36	NR_118042.1	28,65	14,31	5,03
POL6-4	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_118947.1	28,34	11,12	4,69
		<i>Aeromonas veronii</i> strain JCM 7375 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_112838.1			
		<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119045.1			
POL6-5	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,85	NR_118947.1	25,82	11,99	5,61

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identočnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>Aeromonas veronii</i> strain JCM 7375 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_112838.1			
		<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> strain ATCC 35624 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119045.1			
POL7-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9-14 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,14	NR_025228.1	11,46	10,84	8,40
POL7-3	<i>Ewingella americana</i>	<i>Ewingella americana</i> strain CIP 81.94 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,43	NR_104925.1	24,19	6,48	3,46
POL7-4	<i>Duganella zoogloeoidea</i>	<i>Duganella zoogloeoidea</i> strain IAM 12670 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,78	NR_025833.1	28,67	0	4,10
		<i>Duganella zoogloeoidea</i> strain NBRC 102465 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_114106.1			
POL8-1	<i>Aeromonas encheleia</i>	<i>Aeromonas encheleia</i> strain CECT 4342 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_118042.1	27,92	0	4,18
POL8-3	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,43	NR_117624.1	26,72	0	4,67
POL9-1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> strain ATCC 31317 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,28	NR_104839.1	27,18	0	4,11
POL9-2	<i>Erwinia billingiae</i>	<i>Erwinia billingiae</i> strain Billing E63 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_104932.1	24,65	0	8,57
POL9-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM 17059 = NBRC 16634 strain IAM 1541 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,07	NR_104279.1	16,02	5,78	9,17
POL9-5	<i>Pseudomonas soli</i>	<i>Pseudomonas soli</i> strain F-279,208 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_134794.1	21,63	5,65	3,83
POL9-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas coleopterorum</i> strain Esc2Am 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,85	NR_137215.1	20,68	0	10,03

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
POL10-1	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas media</i> strain RM 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,78	NR_036911.2	28,94	0	4,38
		<i>Aeromonas media</i> strain ATCC 33907 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119041.1			
POL10-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas punonensis</i> strain LMT03 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,28	NR_109583.1	20,53	5,44	5,43
AP1-1	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain OHA11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,50	NR_126220.1	9,23	15,96	6,99
AP1-4	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> strain PA 231 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_027520.1	28,72	0	2,82
AP1-5	<i>Chryseobacterium oleae</i>	<i>Chryseobacterium oleae</i> strain CT348 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,77	NR_134002.1	27,08	0	4,65
AP1-6	<i>Obesumbacterium proteus</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_025334.1	24,62	0	8,12
AP1-7	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> strain PA 231 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,58	NR_027520.1	28,10	0	4,83
AP2-1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_121761.1	17,26	3,81	10,27
		<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC 1A05942 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_157731.1			
AP2-3	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain OHA11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_126220.1	15,22	10,88	3,44
AP2-4	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ATCC 33658 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_119042.1	25,85	0	5,81
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain JCM 7873 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_040829.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CECT 894 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043324.1			



Izolot	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>[Haemophilus] piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_104935.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NCIMB 1102 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118945.1			
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain CECT 7443 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118044.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_113635.1			
		<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CIP 74.30 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_026089.2			
AP2-5	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea agglomerans</i> strain ATCC 27155 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,01	NR_114505.1	21,72	0	8,73
		<i>Pantoea brenneri</i> strain LMG 5343 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_116748.1			
AP3-1	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas encheleia</i> strain CECT 4342 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,36	NR_118042.1	27,77	0	4,67
AP3-2	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain OHA11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,00	NR_126220.1	18,89	8,03	3,49
AP3-3	<i>Erwinia billingiae</i>	<i>Erwinia billingiae</i> strain LMG 2613 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,90	NR_118431.1	23,89	0	8,37
AP3-5	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC 1A05942 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,28	NR_157731.1	18,79	5,16	4,79
		<i>Bacillus paramobilis</i> strain BML-BC017 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_175556.1			
AP4-2	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> strain 255-15 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,51	NR_075006.1	28,57	0	3,99
AP4-3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ATCC 33658 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,71	NR_119042.1	26,54	0	5,77
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CECT 894 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043324.1			

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NCIMB 1102 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118945.1			
AP4-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas costantinii</i> strain CFBP 5705 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,15	NR_025164.1	22,57	2,40	5,80
		<i>Pseudomonas poae</i> strain P 527/13 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_028986.1			
		<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042199.1			
AP4-5	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> strain PA 231 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_027520.1	28,96	0	3,60
AP5-1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,92	NR_157735.1	29,33	0	3,44
		<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_152692.1			
		<i>Bacillus paramobilis</i> strain BML-BC017 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_175556.1			
		<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_114581.1			
		<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043403.1			
		<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_112780.1			
		<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_121761.1			
		<i>Bacillus sanguinis</i> strain BML-BC004 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_175555.1			
		<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC 1A05942 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_157731.1			

Izolati	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
AP5-2	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas media</i> strain RM 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_036911.2	27,27	0	4,20
		<i>Aeromonas media</i> strain ATCC 33907 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119041.1			
AP5-3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas rivipollensis</i> strain P2G1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_144574.1	27,83	0	4,88
AP5-4	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> strain 8N 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,78	NR_042424.1	29,53	0	3,19
AP6-1	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	<i>Rossellomorea marisflavi</i> strain TF-11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_118437.1	28,55	0	4,25
		<i>Rossellomorea marisflavi</i> strain TF-11 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_025240.1			
AP6-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas qingdaoensis</i> strain JJ3 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,07	NR_169411.1	26,56	0,309	4,07
AP6-3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas rivipollensis</i> strain P2G1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,65	NR_144574.1	27,94	0	4,65
AT11-2	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,77	NR_133746.1	14,66	0	15,44
		<i>Flavobacterium aquidurens</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042470.1			
AT11-3	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas aquatica</i> strain AE235 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,64	NR_136829.1	25,05	0	6,72
AT11-4	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia fonticola</i> strain NBRC 102597 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,64	NR_114156.1	23,43	0	8,63
AT11-5	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> strain DSM 11363 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_026395.1	22,59	0,361	3,71
AT11-6	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas aquatica</i> strain AE235 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_136829.1	26,70	0	5,22

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
AT11-7	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain OHA11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,78	NR_126220.1	12,42	13,28	4,68
AT13-1	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium pectinovorum</i> strain DSM 6368 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,62	NR_114994.1	.16,91	2,17	13,28
AT13-2	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_113635.1	26,39	0	6,07
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain CECT 7443 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118044.1			
		[ <i>Haemophilus</i> ] <i>piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_104935.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain JCM 7873 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_040829.1			
		<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CIP 74.30 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_026089.2			
AT13-5	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,69	NR_133746.1	17,66	0	13,91
AT13-6	<i>Obesumbacterium proteus</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,51	NR_025334.1	24,77	0	6,05
AT14-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9-14 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,29	NR_025228.1	11,43	13,37	8,78
AT14-2	<i>Chryseobacterium yeoncheonense</i>	<i>Chryseobacterium yeoncheonense</i> strain DCY67 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,84	NR_133021.1	28,26	0	0,519
AT14-5	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> strain DSM 11363 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,78	NR_026395.1	23,68	5,67	3,41
AT15-1	<i>Loriellopsis</i> sp.	<i>Loriellopsis cavernicola</i> strain LF-B5 16S ribosomal RNA, partial sequence	86,81	NR_117881.1	27,52	0	5,38

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
AT15-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas syringae</i> strain ICMP 3023 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_117820.1	25,03	0	9,16
		<i>Pseudomonas congelans</i> strain P 538/23 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_028985.1			
		<i>Pseudomonas cerasi</i> strain 58 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_146827.1			
AT16-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas syringae</i> strain ICMP 3023 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_117820.1	23,79	0	7,66
		<i>Pseudomonas congelans</i> strain P 538/23 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_028985.1			
AT16-3	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,84	NR_133746.1	21,12	0	11,14
		<i>Flavobacterium aquidurens</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042470.1			
AT16-5	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ATCC 33658 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_119042.1	26,14	0	6,00
		<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CIP 74.30 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_026089.2			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_113635.1			
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain CECT 7443 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118044.1			
		<i>[Haemophilus] piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_104935.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CECT 894 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043324.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain JCM 7873 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_040829.1			

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NCIMB 1102 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118945.1			
AT16-6	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium balustinum</i> strain NBRC 15053 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,03	NR_113721.1	22,71	0	9,08
AT17-1	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NCIMB 1102 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,64	NR_118945.1	26,71	0	5,23
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CECT 894 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043324.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ATCC 33658 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119042.1			
AT17-2	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas bivalvium</i> strain 868E 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,29	NR_043885.1	26,14	0	6,21
AT17-3	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_043477.1	25,89	0	5,22
AT17-4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_114581.1	20,94	2,08	10,06
		<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043403.1			
		<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_121761.1			
AT17-5	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,77	NR_133746.1	13,98	0	15,82
		<i>Flavobacterium aquidurense</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042470.1			
AT17-6	<i>Obesumbacterium proteus</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,64	NR_025334.1	23,07	0	7,92
AT18-1	<i>Obesumbacterium proteus</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_025334.1	27,05	0	4,82
AT18-2	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NCIMB 1102 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_118945.1	24,08	0	6,76

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CECT 894 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043324.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ATCC 33658 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119042.1			
AT18-3	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,84	NR_133746.1	14,21	0	17,45
		<i>Flavobacterium aquidurens</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042470.1			
AT18-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas reidholzensis</i> strain ID3 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,28	NR_157777.1	23,16	4,35	4,72
		<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> strain L-1 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_025881.1			
AT18-5	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium oxydans</i> strain DSM 20578 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,42	NR_044931.1	26,55	0	4,40
		<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain CF36 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_025548.1			
AT19-3	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Serratia fonticola</i> strain DSM 4576 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,65	NR_025339.1	23,78	0	7,76
		<i>Serratia fonticola</i> strain NBRC 102597 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_114156.1			
AT19-4	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Serratia fonticola</i> strain DSM 4576 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,72	NR_025339.1	1,98	3,00	7,41
		<i>Serratia fonticola</i> strain NBRC 102597 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_114156.1			
AT19-5	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,84	NR_133746.1	8,42	2,63	21,30
AT19-6	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium branchiarum</i> strain 57B-2-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,62	NR_145954.1	28,35	0	3,87

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
AT19-7	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i> strain KSL5401-037 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,21	NR_116714.1	25,02	0	5,31
AT20-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas canadensis</i> strain 2-92 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_156852.1	6,63	21,83	4,03
AT20-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas canadensis</i> strain 2-92 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,72	NR_156852.1	7,97	21,12	3,94
AT20-4	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium aquidurens</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence	97,54	NR_042470.1	8,90	4,19	17,65
PL1-1	<i>Duganella zoogloeoides</i>	<i>Duganella zoogloeoides</i> strain NBRC 102465 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_114106.1	24,51	0	6,23
PL1-2	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,28	NR_113635.1	23,73	0	6,08
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain S1.2 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_116935.1			
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain CECT 7443 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118044.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NCIMB 1102 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118945.1			
		<i>[Haemophilus] piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_104935.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain CECT 894 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_043324.1			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain JCM 7873 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_040829.1			
		<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CIP 74.30 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_026089.2			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ATCC 33658 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_119042.1			



Izolati	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
PL1-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas caspiana</i> strain FBF102 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,58	NR_152639.1	24,16	3,51	3,63
PL1-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain NBRC 3904 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,43	NR_113581.1	23,27	0	6,68
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain ATCC 9446 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_116763.1			
PL1-5	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,72	NR_043477.1	26,90	0	3,13
PL1-6	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain Hammer 95 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,06	NR_044863.1	20,66	3,92	4,41
PL2-2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain NCIB 10068 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	NR_164626.1	7,50	16,62	6,86
PL2-3	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,79	NR_043477.1	25,83	0	4,63
PL2-5	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i> strain JJ3 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,49	NR_169411.1	23,96	3,06	3,72
PL2-6	<i>Frigoribacterium faeni</i>	<i>Frigoribacterium faeni</i> strain 801 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,71	NR_026511.1	26,02	0	5,25
		<i>Frigoribacterium faeni</i> strain DSM 10309 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_115033.1			
PL3-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas cerasi</i> strain 58 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,93	NR_146827.1	4,05	20,02	7,09
PL3-4	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea brenneri</i> strain LMG 5343 16S ribosomal RNA, partial sequence	96,25	NR_116748.1	21,36	1,00	7,60
PL3-6	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_043477.1	26,68	0	3,94
PL4-1	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas popoffii</i> strain LMG 17541 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,85	NR_025317.1	25,48	0	5,53

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
PL4-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i> strain ICMP 2758 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,92	NR_114794.1	20,72	4,50	6,15
PL4-4	<i>Shewanella oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> strain MR-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,87	NR_074798.1	26,25	0	4,75
PL4-5	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,58	NR_043477.1	27,13	0	3,62
PL4-6	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea conspicua</i> strain LMG 24534 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,40	NR_116247.1	22,70	0	7,31
PL4-7	<i>Planococcus koreensis</i>	<i>Planococcus koreensis</i> strain JG07 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,23	NR_025011.1	27,17	0	3,63
PL5-1	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium plurextorum</i> strain 1126-1H-08 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,77	NR_133747.1	28,16	0	2,72
PL5-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_042199.1	13,73	9,60	7,58
PL5-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain OHA11 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,50	NR_126220.1	13,69	11,78	3,96
PL5-4	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium frigidimaris</i> strain KUC-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	97,78	NR_041057.1	5,71	3,07	20,83
		<i>Flavobacterium collinsii</i> strain 983-08 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_145952.1			
		<i>Flavobacterium piscis</i> strain 412R-09 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_133746.1			
		<i>Flavobacterium aquidurensense</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042470.1			
PL5-5	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_043477.1	26,19	0	4,72
PL5-6	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i> strain LMG 4025 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,26	NR_042926.1	25,27	0	5,79

Izolot	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
PL6-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter guillouiae</i> strain ATCC 11171 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,05	NR_117626.1	24,21	0	6,45
PL6-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,57	NR_116899.1	24,61	3,08	3,37
PL6-3	<i>Pseudomonas segetis</i>	<i>Pseudomonas segetis</i> strain FR1439 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,56	NR_043174.1	24,13	0	6,77
PL6-4	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium branchicola</i> strain 59B-3-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,31	NR_145953.1	21,35	0	9,92
		<i>Flavobacterium aquidurense</i> strain WB 1.1-56 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_042470.1			
PL6-5	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> strain DSM 11363 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,86	NR_026395.1	26,03	3,42	3,54
PL7-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas silesiensis</i> strain A3 16S ribosomal RNA, complete sequence	99,78	NR_156815.1	18,08	10,86	4,38
PL7-2	<i>Duganella zoogloeoides</i>	<i>Duganella zoogloeoides</i> strain NBRC 102465 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,55	NR_114106.1	22,13	0	9,30
PL8-1	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> strain 68E3 16S ribosomal RNA, partial sequence	95,56	NR_025409.1	27,49	0	4,50
PL8-4	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium branchicola</i> strain 59B-3-09 16S ribosomal RNA, partial sequence	98,72	NR_145953.1	20,27	0	11,19
PL10-1	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,72	NR_043477.1	25,31	0	4,48
PL10-2	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	NR_113635.1	25,16	0	6,13
		<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CIP 74.30 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_026089.2			
		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain JCM 7873 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_040829.1			

Izolat	Identifikacija izolata	Najbolji blast pogodak	Postotak identičnosti	Pristupni broj	Polumjer micelija (mm)	Zona inhibicije (mm)	Polumjer zone rasta izolata (mm)
		<i>[Haemophilus] piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_104935.1			
		<i>Aeromonas piscicola</i> strain CECT 7443 16S ribosomal RNA, partial sequence		NR_118044.1			
PL10-3	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> strain IH5 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,71	NR_029063.1	25,72	2,91	4,04

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUCIJA VUKŠIĆ 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.

  
\_\_\_\_\_

Vlastoručni potpis