

Sezonske varijacije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) iz Malostonskog zaljeva i Linskog zaljeva

Pohl, Kalista

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:752746>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-31**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
FAKULTET PRIRODNIH ZNANOSTI
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Kalista Pohl

**Sezonske varijacije metalotioneina u probavnoj žlijezdi
dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*)
iz Malostonskog zaljeva i Linskog zaljeva**

Završni rad

Pula, listopad 2024.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
FAKULTET PRIRODNIH ZNANOSTI
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

KALISTA POHL

**Sezonske varijacije metalotioneina u probavnoj žlijezdi
dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*)
iz Malostonskog zaljeva i Limskog zaljeva**

Završni rad

JMBAG: 0303094636, redoviti student

Studijski smjer: Prijediplomski studij Znanost o moru

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarne prirodne znanosti

Kolegij: Molekularna toksikologija i ekotoksikologija

Mentor: doc. dr. sc. Petra Burić

Pula, listopad 2024.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana KALISTA POHL, kandidatkinja za prvostupnicu ZNANOSTI O MORU ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

STUDENTICA: Kalista Pohl

U Puli, 07. listopada 2024. godine



IZJAVA o korištenju autorskog djela

Ja, *KALISTA POHL*, dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj Završni rad pod nazivom „Sezonske varijacije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) iz Malostonskog zaljeva i Limskog zaljeva“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 07. listopada 2024.

Potpis studenta:

ZAHVALA

Zahvaljujem svim profesorima; posebice mentorici doc. dr. sc. Petri Burić koja je uvijek imala odgovore na sva moja pitanja, te na njenom strpljenju i podršci tijekom pisanja ovog Završnog rada. Također, zahvaljujem komentorici dr. sc. Loreni Perić što nam je omogućila provedbu Završnog rada na ovom projektu.

Zahvaljujem Centru za istraživanje mora Rovinj, Institut Ruđer Bošković na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

Ovaj rad je u potpunosti financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta HRZZ IP-2019-04-1956 *"Osjetljivost komercijalno važnih školjkaša u akvakulturi istočnog dijela Jadrana na promjene okolišnih uvjeta - BEST ADRIA"*.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Školjkaši	1
1.1.1. Dagnja (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	2
1.1.2. Kamenica (<i>Ostrea edulis</i>)	4
1.1.3. Uzgoj školjkaša	5
1.2. Školjkaši u ekotoksikološkim studijama	6
1.2.1. Biomarkeri.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Uzorkovanje	11
3.2. Kemikalije i materijali	11
3.3. Određivanje aktivnosti metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje i kamenice ..	12
3.3.1. Sakupljanje školjkaša	12
3.3.2. Izdvajanje probavne žlijezde (hepatopankreasa) iz školjkaša	12
3.3.3. Izolacija proteina metalotioneina i spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina	13
3.3.4. Statistička obrada podataka.....	15
4. REZULTATI	16
4.1. Koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje <i>Mytilus galloprovincialis</i> iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva	16
4.2. Koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi kamenice <i>Ostrea edulis</i> iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva	17
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČAK	20
7. LITERATURA	21
8. POPIS FOTOGRAFIJA	25
9. SAŽETAK	26
10. ABSTRACT	27

1. UVOD

Školjke kao filtratorski organizmi ključne su vrste koje pružaju brojne usluge ekosustavu (van der Schatte Olivier i sur., 2020), a njihova akvakulturna proizvodnja široko je prihvaćena kao održiva i ekološki prihvatljiva (Suplicy, 2020). Zaštićene plitke uvale i estuariji na istočnoj obali Jadrana obogaćeni hranjivim i organskim tvarima tvari smatraju se optimalnim za uzgoj školjkaša (Viličić i sur., 1994), ali su u takvom specifičnom okolišu izloženi čestim promjenama hidroloških uvjeta uvjetovanih sezonama i klimatskim promjenama (Fedele i sur., 2024) kao i antropogenim zagađivalima koja se kontinuirano unose s kopna (Milun i sur., 2016). Zbog izvanredne sposobnosti filtracije i bioakumulirajućeg kapaciteta školjkaša, postoji rizik da se ovi spojevi mogu nakupiti u njihovim tkivima u opsegu koji premašuje razine u okolnoj vodi (Gosling, 2003), što može utjecati i na organizme u višim karikama hranidbenog lanca kao i na krajnje konzumente. Međutim, osjetljivost ekonomski važnih školjkaša na području Jadrana na potencijalne stresore u njihovom uzgojnom okruženju nije dovoljno istražena. Upravo iz tih razloga, cilj ovog istraživanja bio je procijeniti biološki učinak potencijalne izloženosti metalima prisutnim u okolišu kod dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) s dva važna uzgajališta u istočnom Jadranu - Malostonski zaljev (MZ) i Limski zaljev (LZ). Promjene prirodnih uvjeta, naročito povećanje temperature mora, kao i sve veći donos antropogenih zagađivala predstavljaju značajan izazov populacijama obalnih školjkaša (Filgueira i sur., 2016; Webber i sur., 2021).

1.1. Školjkaši

Jedan od najpoznatijih razreda mekušaca (Mollusca) su upravo školjkaši (Bivalvia). Naziv Bivalvia, odaje njihovo najpoznatije obilježje: dvije ljuštore. Školjkaši su bilateralno simetrični i dorzoventralno utegnuti, a građeni su od dvije ljuštore među kojima se nalaze organi. Unutar ljuštura, koje mogu biti građene od kalcijeva karbonata (vapnenca) ili sedefa i periostrakuma, nalazi se unutarnja strana plašta na kojoj su smještene lamelaste škrge. Ljuštore su povezane ligamentom dok otvaranju i zatvaranju ljuštura pridonose mišić aduktor te sitni zubići koji su prisutni pri umbu kako bi se ljuštore pravilno zatvorile. Ljuštore su u najviše slučajeva simetrične (npr. kod školjkaša *M. galloprovincialis*), dok postoje i iznimke (npr. u školjkaša *Pecten*

jacobeus). Odrasle jedinke školjkaša imaju zakržljalo sjekirasto stopalo u kojem se nalaze i žlijezde sluznice. Upravo te žlijezde izlučuju sluz koja se pretvara u bisusne niti u doticaju s vodom te se njima školjkaši pričvršćuju za podlogu. Istraživanja pokazuju da školjkaši mogu na dan profiltrirati i do 400 litara ambijentalne vode (Turk, 2011). Po pitanju razmnožavanja, školjkaši mogu biti odvojenog spola ili dvospolci, ovisno o vrsti; koji svoje spolne stanice izlučuju direktno u okružujuću vodu. Parne spolne žlijezde su povezane s hepatopankreasom. Dok su ličinke planktonske, odrasle jedinke većinom žive sesilnim načinom života (Turk, 2011).

Približno 200 vrsta školjkaša možemo naći u istočnom dijelu Jadrana. U Jadranu obitavaju vrste koje su skrogo zaštićene poput periske (*Pinna nobilis*) te prstaca (*Litophaga litophaga*) koji je poznat po tome što buši kamen, ali i kao izvanredna gastronomska delicija te je zbog izlova i zaštićen. Školjkaši predstavljaju i jednu od većih i ekonomskih važnih skupina, bilo za ulov ili uzgoj. Neke od najpoznatijih vrsta u uzgoju su upravo dagnje (*M. galloprovincialis*) i kamenice (*O. edulis*).

1.1.1. Dagnja (*Mytilus galloprovincialis*)

Dagnja (*M. galloprovincialis*) je školjkaš izrazito tamne plave do skoro crne boje, pomalo izduženog ovalnog oblika koji se za podlogu pričvršćuje bisusnim nitima te tvori „pokrivače“ kao na slici 1. Ljuštura su simetrične i tanke ali dovoljno jake i tvrde (Slika 2). Unutrašnjost ljuštura prekrivena je slojem sedefa. Najveći rast zabilježen je u morima bogatim hranjivim tvarima dok se u morima s „manje“ hranjivih tvari šire i rastu polako (Turk, 2011). Mrijest dagnje u Jadranskom moru događa se najčešće dva puta u godini, a očekuje se u rano proljeće i kasnu jesen (Hrs-Brenko, 1973). Odrasle jedinke dagnje mogu se pronaći u području gornjeg infralitorala, na dubinama od 0 do 3 metra. Izraziti su filtratori te kroz jedinku na dan prođe i do 400 litara morske vode, što ima i svoju negativno stranu: u tkivima može zadržavati i razna zagađivala (Bayne, 1976; Griscom i sur., 2004). Upravo zbog toga, prije konzumiranja dagnji, važno je znati njihovo porijeklo.

Uz mediteransku dagnju, poznate su još i srodne vrste *Mytilus edulis* koja uglavnom obitava u Atlantiku, *Mytilus trossulus* u Baltiku te *Mytilus chilensis* na obalama Južne Amerike.



Slika 1. Dagnje (*M. galloprovincialis*) pričvrščene na lancu; Mali Lošinj. Izvor: privatna arhiva, kolovoz 2024.



Slika 2. Dagnja iz tri perspektive. Izvor: Paiva, Filipa (2014). "Ship transport of marine invasive species and its stress resistance", pristupljeno i preuzeto 20. kolovoza 2024.

1.1.2. Kamenica (*Ostrea edulis*)

Kao vrsta koja živi u plitkom infralitoralu, kamenica (*Ostrea edulis*) je prepoznatljiva po tome što joj je donja ljuštura cijela pričvršćena za podlogu. Plosnatog je oblika te joj je gornja ljuštura veoma naborana. Pretežito je sivkaste boje s pokojom ljubičastom prugom, a naraste do 7 centimetara. Može se pronaći i na dubini do 10 metara, većinom pričvršćenu za kamenitu podlogu ali i na potopljenim predmetima poput primjerice bačvi, blokova, stupova i slično (Slika 3). Stope rasta školjkaša *O. edulis* brže su na zaštićenim mjestima nego na izloženim mjestima, što se pripisuje volumenu sestona, a ne brzini protoka ili dostupnosti hrane (Turk, 2011). Kamenica se u Hrvatskim uzgajalištima uzgaja već duži niz godina te su najpoznatija uzgajališta u Malostonskom zaljevu i Lirskom zaljevu. Spolno zrele jedinke kamenice su protoandrični hermafroditi (Turk, 2011). Mrijest započinje početkom ožujka te traje do prosinca (Turk, 2011). Konzumira se termički obrađena ili sirova (Slika 4).



Slika 3. Kamenice (*Ostrea edulis*) pričvršćene na „muringu“ (konopu); Mali Lošinj. Izvor: privatna arhiva, kolovoz 2024.



Slika 4. Otvorena kamenica. Izvor: privatna arhiva, kolovoz 2024.

1.1.3. Uzgoj školjkaša

Činjenicu da su se školjkaši koristili u prehrambene svrhe podupiru i pismeni dokazi koji datiraju još iz grčkog i rimskog doba. Premda je u to vrijeme tehnologija marikulture bila tek u počecima, ipak moguće je iščitati kako je upravo uzgoj školjkaša bio jedan od najranijih oblika marikulture. Posljednjih desetljeća bilježi se stalni rast proizvodnje u akvakulturi, koja je 2016. godine predstavljala 41 % globalne proizvodnje hrane u ribarstvu i akvakulturi (*Science Advice for Policy by European Academies*, SAPEA 2017). Niže trofičke vrste, uključujući školjke i alge, trenutačno čine oko polovicu ukupne proizvodnje akvakulture i nude potencijal za značajan doprinos održivom rastu globalne opskrbe organizmima iz vodenih ekosustava (SAPEA, 2017). Školjke (prvenstveno dagnje i kamenice) činile su 2 700 tona obalnih i morskih životinja u akvakulturi u 2015. godine, s procijenjenom tržišnom vrijednošću od 138 milijuna dolara (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO 2024).

Uzgoj školjkaša temelji se na prikupljanju ličinaka iz prirodnih populacija te nasađivanja na kolektore. Prema najranijim spisima iz 16. stoljeća, kao mjesto uzgoja dagnje i kamenice spominje se Malostonski zaljev te upravo one su jedine vrste koje se i danas uzgajaju, ne samo na toj lokaciji nego i duž cijelog istočnog Jadrana. Prema podacima iz publikacije *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2017), tri

najveća uzgajališta u Hrvatskoj su Malostonski zaljev (Slika 5), Limski zaljev (Slika 6) te ušće rijeke Krke kod Šibenika. U godini dana proizvede se i do 1 000 000 komada kamenica, dok se dagnji proizvede i do 300 tona.



Slika 5. Uzgajalište školjkaša u Malom Stonu. Autor fotografije: dr. sc. Lorena Perić.



Slika 6. Uzgajalište školjkaša u Limskom zaljevu. Autor fotografije: dr. sc. Lorena Perić.

1.2. Školjkaši u ekotoksikološkim studijama

Vrlo često korišteni bioindikator u toksikološkim studijama jesu upravo školjkaši, zbog iznimne sposobnosti filtracije morske vode i bioakumulacije zagađivala, osobito u tkivima kao što je probavna žlijezda (hepatopankreas) i škrge (Canesi i sur., 2012). Zahvaljujući navedenim fiziološkim karakteristikama, školjkaši, a osobito dagnje, već

se desetljećima koriste širom svijeta kao modelni organizmi u programima monitoringa prostornih i vremenskih trendova prisustva kemijskih zagađivala (Goldberg 1975, Bajt i sur., 2019; Briand i sur., 2023).

Kad je riječ o zagađivalima u morskome okolišu kojima su izloženi školjkaši, najčešće se radi o metalima, čije je prisustvo uvjetovano biogeokemijskim karakteristikama određenog područja, kao i unosom vezanim uz antropogene aktivnosti u obalnom dijelu. Metali u stanicu ulaze preko stanične membrane procesom olakšane difuzije, aktivnog transporta ili pinocitoze te se u citoplazmi vežu na ligande. Biološki neophodni metali u stanici zbog kemijske sličnosti mogu biti zamijenjeni toksičnim metalima, što može rezultirati poremećajima funkcija u stanici ili smrtnim ishodom. Da bi se to izbjeglo, aktiviraju se različiti homeostatski mehanizmi (Mason i Jenkins, 1995).

Povišene koncentracije metala mogu uzrokovati ozbiljno smanjenje ili eliminaciju netolerantnih vrsta, čime se značajno povećava učinak na raznolikost i trofičku strukturu biološke zajednice (Peterson, 1986). Unos i kasnija bioraspodjelivost metala uvelike ovise o biološkim i geokemijskim čimbenicima. Među biološkim čimbenicima, postoje velike razlike u bioakumulaciji između vrsta školjkaša: unutar jedne vrste, akumulacija može biti funkcija dobi, veličine, spola, genotipa, fenotipa, aktivnosti hranjenja i reproduktivnog statusa. Fiziologija školjkaša također je podložna promjenama potaknutima temperaturom i dinamikom uvjeta okoliša. Nadalje, promjene temperature mogu promijeniti dinamiku mrijesta školjkaša, što će utjecati na masu i sastav lipida mekog tkiva (Beliaff i sur., 1997).

Geokemijski čimbenici koji utječu na bioakumulaciju metala su organski ugljik, tvrdoća vode, temperatura, pH, otopljeni kisik, zrnatost sedimenta veličine i hidroloških značajki sustava (Lemus i sur., 2017) Dodatno, meteorološke prilike poput oborina utječu na donos metala i ostalih zagađivala s tla i zraka u obalni morski ekosustav.

1.2.1. Biomarkeri

Sam podatak o razini kemijskih zagađivala u tkivima je važan pokazatelj njihove prisutnosti u okolišu. No, učinak zagađivala na organizme, pogotovo kad je riječ o tipičnim koncentracijama prisutnim u okolišu, moguće je utvrditi praćenjem bioloških pokazatelja stresa, koji se nazivaju biomarkerima. Odgovori biomarkera na promjene u okolišu na molekularnoj, staničnoj, fiziološkoj i biokemijskoj razini te promjene u ponašanju, koje se na navedenim razinama biološke organizacije očituju u relativno

kratkom vremenu nakon podražaja, mogu poslužiti kao rano upozorenje na promjene u okolišu.

U polju ekotoksikologije, biomarkeri se najčešće koriste za procjenu izloženosti i/ili toksičnosti tvari koje izazivaju neki određen i mjerljiv učinak (Farris i Van Hassel, 2007). Dijele se na biomarkere izloženosti i biomarkere učinka (Farris i Van Hassel, 2007). Biomarkeri izloženosti opisuju je li organizam bio izložen kemikalijama. Za razliku od biomarkera izloženosti, biomarkeri učinka opisuju posljedicu izloženosti, tj. koji je učinak kemikalija imala na organizam (Koeman i sur., 1993).

Idealan biomarker ima određene karakteristike koje ga čine prikladnim za procjenu izloženosti i/ili učinka zagađivala. U idealnom slučaju, takav bi biomarker trebao imati sljedeće karakteristike:

- biti jednostavno mjerljiv,
- isplativ za praćenje određenog zagađivala,
- pokazivati jasnu ovisnost o koncentraciji ili dozi zagađivala i
- biti neovisan o spolovima, dobnim skupinama, reproduktivnom ciklusu i sl.

Biomonitoring zagađivala u školjkaša uključuje mjerenje učinaka onečišćenja u prirodnom okruženju. Organizmi na izloženost visokim koncentracijama metala reagiraju na dva načina: patološkim odgovorom na uzrokovane poremećaje u normalnim biokemijskim reakcijama i poticanjem stvaranja proteina koji vežu toksične tvari (Wang i Lu, 2017).

1.2.1.1. Metalotioneini

Kako bi spriječili toksično djelovanje metala, školjkaši koriste različite homeostatske mehanizme kao što su stvaranje netopljivih taloga u obliku granula, odjeljivanje unutar lizosoma, te vezivanje za specifične topljive ligande od kojih su najvažniji metalotioneini (MT) (Viarengo i sur., 1993).

Metalotioneini su po prvi puta izolirani iz korteksa bubrega konja (Margoshes i Vallee, 1957), a kasnije i u kralježnjaka uključujući mnoge vrste riba (Olsson i sur., 1998, Roeva i sur., 1999), kod vodenih beskralježnjaka (Roesijadi i Fowler, 1991), uglavnom mekušaca (Langston i sur., 1998) i rakova (Roesijadi, 1992). Metalotioneini su dakle vrlo posebni proteini s molarnom masom između 6-7 kDa, bogati cisteinom (30%) koji nemaju aromatske aminokiseline. Obzirom na sposobnost vezanja metala, općenito

se smatra da ti proteini igraju ulogu u homeostatskoj kontroli esencijalnih metala (Cu, Zn) (Brouwer et. al., 1989; Viarengo i Nott, 1993; Roesijadi, 1996), kao i neesencijalnih metala kao što su Cd i Hg koji imaju veliki afinitet vezanja za ove proteine (Amiard i Cosson, 1997). Kod mnogih vrsta (kolutićavci, mekušci, rakovi, ribe) dokazana je indukcija sinteze MT metalima (Ag, Cd, Cu, Hg), što ukazuje na potencijal MT kao biomarkera izloženosti metalima. Ipak, literaturni podaci pokazuju mnoge proturječnosti i nedosljednosti u indukciji sinteze MT. Pojedina laboratorijska istraživanja pokazala su indukciju u vrlo kratkim vremenskim razdobljima, dok su na terenu bile potrebne duge višemjesečne izloženosti kako bi se pokazao značajan porast koncentracije MT u školjkašima transplantiranim na onečišćene lokacije (Wang i Lu, 2017).

Kao posljedica, svaki odnos izloženosti MT-metal lakše je dokazati kod riba nego kod beskralježnjaka, budući da postoji manje ili nimalo smetnji od procesa biomineralizacije, koji su uobičajeni u detoksikaciji metala u tragovima kod beskralježnjaka (Mason i Jenkins, 1995).

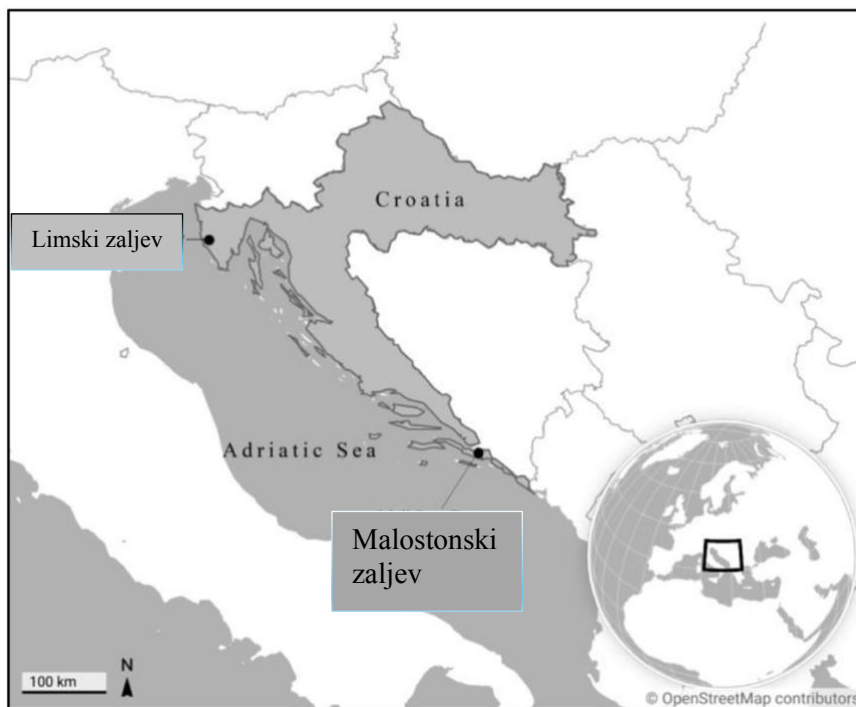
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je odrediti i usporediti koncentraciju metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) sa dva uzgajališta školjkaša u istočnom Jadranu: Malostonski zaljev (MZ) i Linski zaljev (LZ).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

Dagnje i kamenice nabavljene od lokalnih uzgajivača prethodno su raspoređene na dubini od 6 metara na lokaciji MZ i 10 metara na lokaciji LZ poznatih po uzgoju školjkaša i ribe, a oba pod zakonskom zaštitom kao morski rezervat u istočnom Jadranu (Slika 9). Nakon tri mjeseca od nasađivanja, provedeno je šest dvomjesečnih uzorkovanja u razdoblju od 07/2020 do 05/2021. Dubina na uzgojnim lokacijama MZ i LZ iznosila je 8 odnosno 28 metara.



Slika 7. Geografski položaj Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva. Mapa izrađena u programu Datawrapper (Datawrapper GmbH; <https://www.datawrapper.de/>, 2024.) (Pristupljeno 01. rujna 2024.).

3.2. Kemikalije i materijali

Kemikalije koje su korištene za istraživanje su sljedeće:

- Otopina A – pufer za homogeniziranje
 - 20 mM trisaminometan (TRIS) pH 8,6 + 0,5 M Saharoza + inhibitori proteaza (leupeptin 3 μ l/mL i fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) 1,5 μ l/mL) i 0,01 % beta merkptoetanol
- Otopina B – za ispiranje taloga

- etanol : kloroform : otopina A (87:1:12 v/v)
- Otopina C – 0.2 M natrij fosfatni pufer pH 8,0 koji sadrži 2 M NaCl
- Štok otopina glutationa (GSH) u 0,25 M NaCl (1 mg/mL)

Materijali i pribor korišteni u istraživanju:

- tekući dušik,
- led,
- staklene i polipropilenske epruvete,
- mikrotitarske ploče s 96 jažica,
- vaga,
- pipete,
- homogenizator sa teflonskim tučkom
- centrifuga Heraeus Biofuge Stratos,
- miješalica (vortex),
- ultrazvučni štapni sonifikator i
- spektrofotometar Multiscan Ascent – za mjerenje u mikrotitarskim pločama.

3.3. Određivanje aktivnosti metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje i kamenice

3.3.1. Sakupljanje školjkaša

Školjkaši su ručno prikupljeni i preneseni u vlažnim komorama u laboratorij u roku od maksimalno 30 minuta gdje su dalje obrađeni prema uobičajenom protokolu.

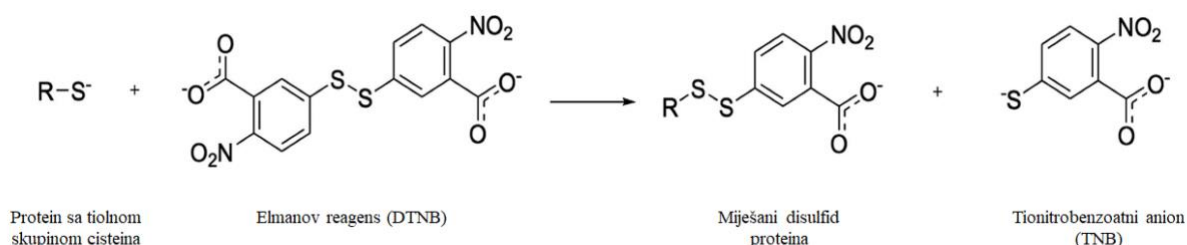
3.3.2. Izdvajanje probavne žlijezde (hepatopankreasa) iz školjkaša

Uzorci školjkaša (po 24 komada od svake vrste) pažljivo su otvoreni skalpelom (dagnje) ili nožem (kamenice), te je tkivo probavne žlijezde izdvojeno škarama i pincetom i pospremljeno u prethodno označene kriotubice, koje su odmah potom smrznute u tekućem dušiku. Uzorci tkiva su skladišteni u zamrzivaču na temperaturi od - 80 °C do daljnje upotrebe.

Prije daljnje obrade, od tri uzoraka probavne žlijezde složeni su kompozitni uzorci. U konačnici, za svako uzorkovanje dobiveno je po osam kompozitnih uzoraka, od po tri probavne žlijezde (ukupne mase 0,75 – 1,20 g).

3.3.3. Izolacija proteina metalotioneina i spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina

Osjetljiva i brza metoda za određivanje koncentracije metalotioneina se temelji na procjeni sulfhidrilnog udjela ovih proteina (Viarengo i sur., 1997). Selektivno određivanje ovih metaloproteina u uzorku realizirano je korištenjem Ellmannovog reagensa (DTNB, 5,5 dihtiobis 2 nitrobenzojeva kiselina; Ellman, 1959). Slika 8 prikazuje reakciju bezbojnog DTNB-a sa tiolnim (SH) skupinama bočnih ogranaka cisteinskih ostataka, u kojoj kao produkt nastaje tionitrobenzoatni anion (TNB²⁻), karakteristične žute boje i maksimalne apsorbancije na valnoj duljini 412 nm.



Slika 8. Reakcija Ellmanovog reagensa (DTNB) sa tiolnom skupinom proteina (R-S⁻) (Preuzeto iz Nieri et al, 2017).

Sadržaj metalotioneina (MT) određen je prema protokolu Viarengo i sur. (1999) i kvantificiran pomoću standardne krivulje reduciranog glutationa (GSH), neproteinskog tiolnog spoja kojeg karakterizira prisutnost cisteinskih ostataka.

Za određivanje metalotioneina u tkivu korištenjem Ellmanovog reagensa (DTNB) uzorci moraju biti pripremljeni u a) značajno reducirajućim uvjetima kako bi se spriječilo stvaranje visokomolekularnih produkata (> 20000 Da) uslijed oksidacije MT i formiranja disulfidnih mostova, te b) uz korištenje inhibitora proteaza koji se u velikoj količini sintetiziraju u stanicama probavne žlijezde. Frakcioniranje etanolom i kloroformom omogućuje s jedne strane eliminiranje niskomolekularnih topivih tiolnih spojeva koji bi, reakcijom sa DTNB, mogli interferirati sa kvantifikacijom MT, dok s druge strane dolazi do ukoncentriravanja frakcije MT čija je razina u tkivima organizama koji nisu izloženi metalima uobičajeno vrlo niska.

U svaki je kompozitni uzorak prenešen u epruvetu za homogeniziranje dodan određeni volumen pufera za homogeniziranje (0.5 M saharoze, 20 mM TRIS, pH 8,6) u omjeru 1:3 (w/V), prethodno ohlađen na + 4 °C, a koji je sadržavao 0,01 % β-merkaptotanol

kao reducens i inhibitore proteaza leupeptin i PMSF. Uzorci su homogenizirani na ledu kako bi se spriječilo pregrijavanje i degradacija uzorka, korištenjem mehaničkog homogenizatora sa teflonskim tučkom. Po 1 ml homogenata izdvojen je iz svakog homogeniziranog uzorka u staklenu epruvetu, te su homogenati centrifugirani pri 15 000 g na + 4 °C u vremenu od 60 minuta. Zatim je iz epruveta pažljivo, izbjegavajući površinski sloj masti, izdvojeno po 1 ml supernatanta koji su prebačeni u zasebne čiste staklene epruvete, te je u svaku od njih dodano po 1,05 mL ledenog (- 20 °C) etanola i 20 µL kloroforma. Nakon ponovnog centrifugiranja pri 6 000 g na + 4 °C u vremenu od 10 minuta, izdvojen je sav supernatant koji je premješten u čistu polipropilensku epruvetu, dok je talog koji sadrži proteine više molekularne mase odbačen. Supernatantu se dodalo 40 µL 36,5 % HCl i 3 volumena ledenog etanola (- 20 °C), te su se epruvete promućkale na vortexu i inkubirale na - 20 °C preko noći (24 h) radi taloženja proteina. Sljedeći dan, istaloženi proteini oboreni su centrifugiranjem na 6 000 g na + 4 °C u vremenu od 10 minuta, nakon čega je uklonjen supernatant a koncentrirani proteinski talog sa MT je ocijeđen i osušen na zraku. Osušeni talog se zatim dvaput isprao otopinom B radi odstranjivanja mogućih zaostalih tiolnih spojeva (uključujući i reducens β-merkaptioetanol) te je potom resuspendiran u 150 µL NaOH i 150 µL HCl koja je sadržavala EDTA radi odstranjivanja metala vezanih za MT. Kruti i slabo topivi talog na stijenci epruvete usitnio se na ledu korištenjem štapnog ultrazvučnog sonifikatora.

Neposredno prije sljedećeg koraka priređena je otopina C, visoke ionske jakosti radi kompletne denaturacije MT, a u koju je dodan Ellmanov reagens (DTNB). U svaki je uzorak dodano po 4,2 mL navedene otopine, nakon čega su se uzorci centrifugirali na 6 000 g na + 15 °C u vremenu od 10 minuta. U epruvetama je nastao pahuljasti talog, a za mjerenje se koristio supernatant.

Paralelno s uzorcima školjkaša, priređivali su se i uzorci otopine glutationa (GSH), potrebni za izvođenje standardne krivulje za kvantifikaciju. Serijska razrjeđenja GSH priređena su iz matične otopine GSH (1 mg/mL) u 0,25 M NaCl i iznosila su 0; 7,2; 14,4; 21,6; 28,8; 36,0; 43,2 i 57,8 nmol/mL. Nakon pripreme, u prethodno označene čiste epruvete otpipetirano je po 150 µL svakog od razrjeđenja GSH, osim u epruvetu koja predstavlja nulto razrjeđenje („blank“ ili „nula“) gdje je dodano samo 150 µL 0,25 M otopine NaCl. U svako od razrjeđenja GSH dodano je potom i po 150 µL 1M otopine HCl sa 4 mM EDTA, a nakon miješanja uzorka i po 4,2 mL otopine DTNB-a. Nakon centrifugiranja uzoraka, dio supernatanta (300 µL) izdvojen je pipetom i prebačen u

jažice mikrotitarske ploče. Isto je učinjeno i sa otopinom razrjeđenja standarda GSH. Apsorbancija svih uzoraka mjerenja je odmah, na valnoj duljini od 412 nm.

Od vrijednosti apsorbancije svih uzoraka oduzeta je vrijednost apsorbancije „blanka“ („nula“). Vrijednosti za sve koncentracije standardnog razrjeđenja GSH korištene su za izradu kalibracijske krivulje u programu Excel, pri čemu se u grafikonu raspršenja kroz dobivene točke povukao pravac i izračunala jednadžba pravca.

Koncentracija metalotioneina određena preko kalibracijske krivulje, je potom preračunata na masu mokre težine tkiva prema formuli:

$$A_{412} \times \varepsilon_{GSH}^{-1} \times \text{dilucijski faktor } 7,73 \text{ } (\mu\text{g/g mokre težine}),$$

(Viarengo i sur., 1997)

Gdje ε_{GSH} predstavlja koeficijent smjera kalibracijskog pravca, a dilucijski faktor uzima u obzir molekularnu masu MT od 8600 Da, okvirni broj cisteinskih ostataka u molekuli MT (Mackay i sur., 1993) te finalni volumen reakcijske smjese i dilucijski faktor homogenata.

3.3.4. Statistička obrada podataka

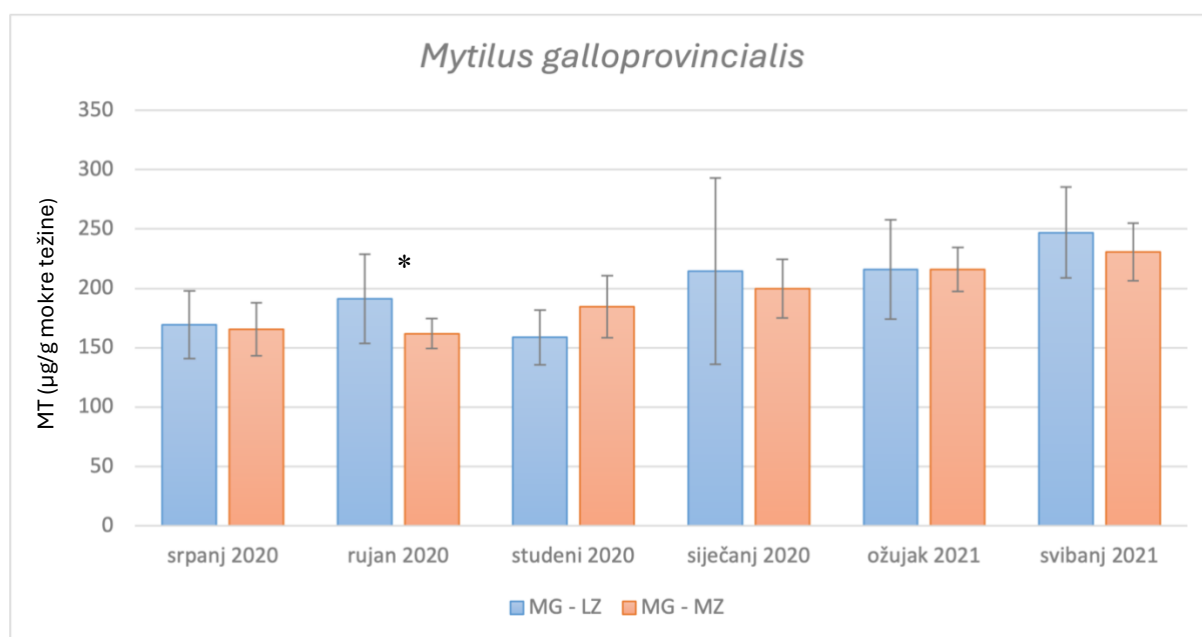
Za usporedbu razine metalotioneina kod dagnji i kamenica između dva istraživana lokaliteta za svaku sezonu uzorkovanja, korišten je neparametarski Mann-Whitney test. Za izračun je korišten R programski paket Rstudio 2023.09.1 (Posit Team, 2023).

4. REZULTATI

4.1. Koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva

Iz niže prikazanog grafa koji predstavlja varijacije koncentracije metalotioneina (MT) u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis* iz Limskog zaljeva (LZ) i Malostonskog zaljeva (MZ) (Slika 9), može se uočiti kako se koncentracija MT mijenja kroz istraživano razdoblje, pri čemu je vidljiv trend postepenog porasta kod dagnji iz LZ od minimalnih vrijednosti $158,81 \pm 23,17 \mu\text{g/g}$ mokre težine koje su zabilježene u ljeto 2020, prema maksimalnoj vrijednosti u proljeće 2021. koja je iznosila $246,96 \pm 38,32 \mu\text{g/g}$ mokre težine.

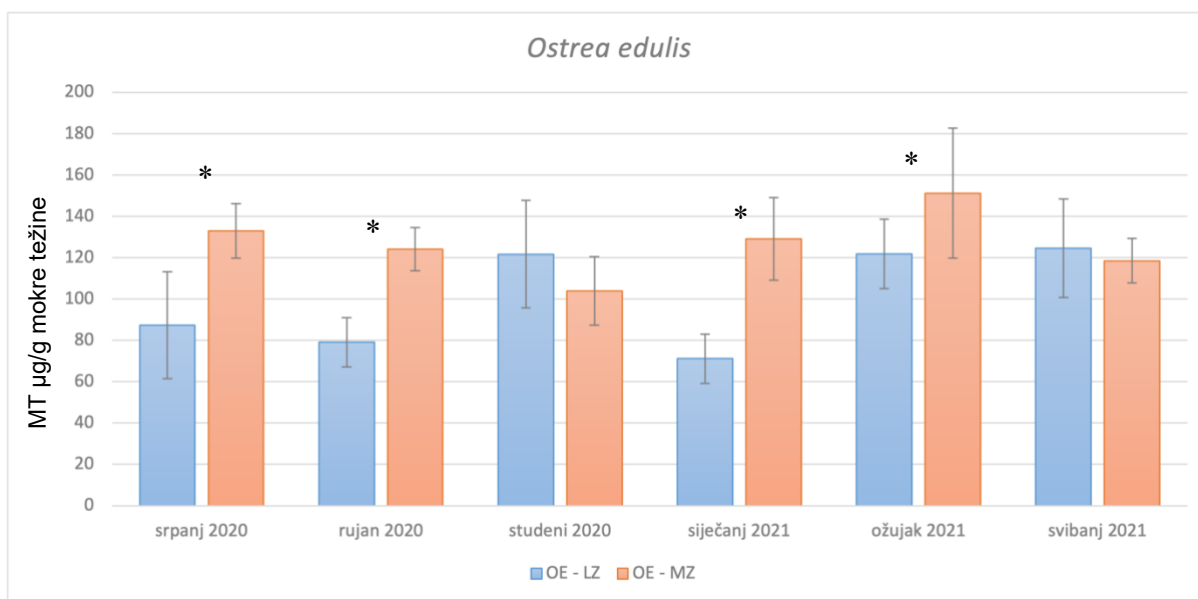
Koncentracija MT u probavnoj žlijezdi dagnje iz MZ također pokazuje stabilan rast kroz cijelo razdoblje uzorkovanja, pri čemu je minimum u ljeto te iznosi $161,92 \pm 12,50 \mu\text{g/g}$ mokre težine i zatim maksimalna vrijednost zabilježena u proljeće ($230,71 \pm 24,26 \mu\text{g/g}$ mokre težine). Značajna razlika u koncentraciji MT u probavnoj žlijezdi dagnje iz MZ i LZ, zabilježena je samo u sezoni 09/2020.



Slika 9. Varijacije koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* iz Limskog zaljeva (MG-LZ) i Malostonskog zaljeva (MG-MZ).* - statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

4.2. Koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi kamenice *Ostrea edulis* iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva

Koncentracija metalotioneina u probavnoj žlijezdi kamenice *O. edulis* iz Limskog zaljeva (Slika 10), pokazuje vrlo izražene varijacije kroz istraživano razdoblje. Koncentracije MT kreće se između minimalne vrijednosti u siječnju ($71,12 \pm 11,92 \mu\text{g/g}$ mokre težine) te maksimalne vrijednosti u svibnju ($124,57 \pm 23,84 \mu\text{g/g}$ mokre težine). Ova skupina kamenica pokazuje niže vrijednosti koncentracije MT u usporedbi s kamenicama iz MZ te najniže zabilježene koncentracije MT u ovom istraživanju. Iz varijacije koncentracije MT u probavnoj žlijezdi kamenice *O. edulis* iz Malostonskog zaljeva (Slika 10) vidljivo je kako koncentracija MT varira kroz istraživano razdoblje pri čemu doseže minimum ($103,90 \pm 16,52 \mu\text{g/g}$ mokre težine) u studenom te maksimum u proljeće ($151,17 \pm 31,40 \mu\text{g/g}$ mokre težine).



Slika 10. Varijacije koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi kamenice *Ostrea edulis* iz Limskog zaljeva (OE-LZ) i Malostonskog zaljeva (OE-MZ).

* - statistički značajna razlika ($p < 0.05$)

5. RASPRAVA

U usporedbi s prijašnjim istraživanjima na istočnom Jadranu i drugim obalnim regijama Sredozemnog mora, koncentracije MT kod dagnje su općenito bile istog reda veličine (Balbi i sur., 2017; Ivanković i sur., 2005; Perić i sur., 2017). Općenito trend nižih koncentracija MT tijekom ranih ljetnih mjeseci i porasta u zimskim mjesecima primijećen je već ranije kod dagnji s područja Mediterana (Balbi i sur., 2017). Također, Ivanković i sur. (2005) navode najviše vrijednosti MT zimi, a najniže u jesen za divlje dagnje sa lokacija istočnog Jadrana.

Za razliku od dagnji, gdje je gotovo linearni trend porasta koncentracije bio jasno izražen, kod kamenica je utvrđena značajna varijabilnost koncentracije MT kroz istraživano razdoblje, koja bi se mogla pripisati intrinzičnim čimbenicima. Naime, dobro je poznato da koncentracije MT mogu varirati uslijed tzv. biološkog razrjeđivanja zbog unosa i nakupljanja hranjivih tvari u tkivima tijekom različitih faza reproduktivnog ciklusa (Ivanković i sur., 2005). što je i vidljivo iz izraženih sezonskih promjena vrijednosti indeksa kondicije, koji je određen u okviru ovog projekta (Kaštelan, 2021; Kljun, 2021).

Na kretanje vrijednosti MT svakako utječe i potreba za detoksifikacijom metala kojima bi školjkaši mogli biti izloženi u uzgojnom okolišu. U tom smislu, neki metali poput kadmija su poznati kao tipični i izrazito snažni induktori MT kod školjkaša i drugih morskih organizama (Amiard i sur., 2006; Perić i sur., 2017). Međutim, kad je riječ o drugim metalima odgovor MT nije tako nedvosmislen i jasan. Primjerice, ranija su laboratorijska istraživanja pokazala izostanak indukcije MT (Perić i Burić, 2019) kao i sniženje koncentracije MT (Maria i Bebianno, 2011; Perić i sur., 2017) kod dagnji uslijed *in vivo* izlaganja bakru. Ranije je također zabilježen pozitivan odnos koncentracije MT i žive kod divljih dagnji *M. galloprovincialis* (Caricato i sur., 2019; Greggio i sur., 2021), iako su potrebna daljnja istraživanja inducibilnosti MT živom posebno s obzirom na distribuciju ovog metala u različitim tkivima.

Koncentracije metala u tkivima dagnji i kamenica uključenih u ovo istraživanje nisu poznate, no jasno vidljiva razlika razine MT kod ove dvije vrste školjkaša upućuje na vrsnu specifičnost mehanizma akumulacije, detoksifikacije i eliminacije metala koji su sasvim sigurno prisutni u uzgojnom okolišu Linskog zaljeva i Malostonskog zaljeva, kao što pokazuju ranija istraživanja na tim područjima (Gavrilović i sur., 2007, Bilandžić i sur., 2016, Milun i sur., 2016). Statistički značajno viša koncentracija MT kod

kamenica sa lokaliteta u MZ, koja upućuje na pojačanu detoksifikacijsku aktivnost, mogla bi biti rezultat jače izloženosti MT-inducirajućim metalima, nego što je to slučaj na lokalitetu LZ.

Vrijedi na kraju napomenuti i da su u usporedbi sa lokalitetom u LZ, i dagnje i kamenice na lokalitetu MZ bile više izložene sedimentu zbog relativno male dubine od 8 do 9 m. Naime, metali koji ulaze u morski ekosustav talože se i vezuju za čestice sedimenta, te se neprestano resuspendiraju u vodenom stupcu uslijed djelovanja struja ili izmjene plime i oseke, čime postaju bioraspoloživi organizmima koji filtriraju morsku vodu, pa tako i školjkašima (Griscom i Fisher, 2004). Ipak, kako je na lokalitetu u MZ kondicijski indeks kamenica bio viši (Kaštelan, 2021), može se utvrditi da je detoksifikacija MT bila dovoljno efikasna da spriječi mogući štetan utjecaj izloženosti metalima na fiziologiju kamenica. Kad je riječ o dagnjama, usporedbom koncentracija MT nije bilo moguće utvrditi razliku detoksifikacijske aktivnosti između dvije lokacije, no potencijalno toksični učinak metala ili nekih drugih zagađivala na dagnje sa lokaliteta MZ nije isključen, s obzirom da je njihov kondicijski indeks bio značajno niži u usporedbi s dagnjama sa lokaliteta LZ (Kljun, 2021). Za konačnu potvrdu ove pretpostavke potrebno je provesti analizu i drugih bioloških pokazatelja.

Međutim, kako bi rezultati bili što vjerodostojniji i kako bismo ih dalje mogli uspoređivati, bitno je ovo istraživanje provesti na višegodišnjoj razini. Time bismo osigurali pouzdan obrazac koncentracije MT tijekom višegodišnjih uzorkovanja te nešto jasniju sliku o samoj izmjeni teških metala i drugih zagađivala u jedinkama školjkaša, poput dagnje i kamenice koje su korištene u ovom istraživanju.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanje pridonosi razumijevanju specifičnosti uzgojnih lokaliteta koja proizlaze iz različitih uvjeta okoliša.

- Utvrđene su razlike u razini metalotioneina (MT) probavne žlijezde između dagnji i kamenica s dva različita i geografski udaljena mjesta za uzgoj školjkaša.
- U usporedbi s prijašnjim istraživanjima na istočnom Jadranu i drugih obalnih regija Sredozemnog mora, koncentracije MT su bile unutar standardnih okvira.
- Sadržaj MT u probavnoj žlijezdi dagnji s oba lokaliteta bio je najniži u ljetnim mjesecima i s trendom porasta prema najhladnijem dijelu godine, kada su vrijednosti bile najviše.
- Razina MT kod dagnji uglavnom nije varirala s obzirom na lokaciju.
- Koncentracija MT je u kamenica bila općenito niža i varijabilnija nego kod dagnji.
- Značajno više razine MT utvrđene su kod kamenica iz Malostonskog zaljeva u usporedbi sa lokalitetom Linski zaljev.
- Za bolje objašnjenje sezonalnog kretanja koncentracija MT kod školjkaša potrebno je utvrditi razine bioakumulacije MT-inducirajućih metala.

7. LITERATURA

Amiard J.-C., Amiard- Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P. S. (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.

Bajt, O., Ramšak, A., Milun, V., Andral, B., Romanelli, G., Scarpato, A., Mitrić, M., Kupusović, T., Kljajić, Z., Angelidis, M., Çullaj, A., Galgani, F. (2019) Assessing chemical contamination in the coastal waters of the Adriatic Sea using active mussel biomonitoring with *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 283-298.

Bebiano M. J., Nott J. A., Langston W. J. (1993) Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: The role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology* 27, 315–334.

Bilandžić, N., Sedak, M., Čalopek, B., Zrnčić, S., Oraić, D., Benić, M., Džafić, N., Ostojić, D.M., Bogdanović, T., Petričević, S., Ujević, I. (2016) Element differences and evaluation of the dietary intake from farmed oysters and mussels collected at different sites along the Croatian coast of the Adriatic Sea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 39-49.

Farris J.L., Van Hassel J.H. (2007): *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola.

Fedele, G., Manco, I., Barbato, G., Verri, G., Mercogliano, P. (2024) Evaluation of atmospheric indicators in the Adriatic coastal areas: a multi-hazards approach for a better awareness of the current and future climate. *Frontiers in Climate*, 6, art. no. 1330299.

Filgueira, R., Guyondet, T., Comeau, L.A., Tremblay, R. (2016) Bivalve aquaculture-environment interactions in the context of climate change. *Global Change Biol.* 22 (12), 3901–3913.

Gavrilovic, A., Srebocan, E., Pompe-Gotal, J., Petrinc, Z., Prevendar-Crnica, A., Matasin, Z. (2007) Spatiotemporal variation of some metal concentrations in oysters

from the Mali Ston Bay, south-eastern Adriatic, Croatia - potential safety hazard aspect. *Veterinarni Medicina*, 52 (10), 457-463.

Goldberg, E.D. (1975) The mussel watch - A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6 (7), 111.

Gosling, E. (2003) How bivalves feed. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 87–130.

Griscom, S.B., Fisher, N.S. (2004) Bioavailability of sediment-bound metals to marine bivalve molluscs: an overview. *Estuaries* 27 (5), 826–838.

Hrs-Brenko, M. (1973) The relationship between reproductive cycle and index of condition of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* in the northern Adriatic Sea. *Stud. Rev. GFCM*. 52, 47, 52.

Ivanković D., Pavičić J., Erk M., Filipović-Marijić, Raspor B. (2005) Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* 50, 1303-1313.

Kaštelan, N. (2021) Usporedba indeksa kondicije kamenica, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva, Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Kljun, M. (2021) Usporedba indeksa kondicije mediteranske dagnje, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva, Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.

Lemus, M, Salazar, R, Lapo, B, Chung, K. (2017) Metallothioneins in marine bivalves. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*. 2017;44(2): 202-215.

Milun, V., Lušić, J., Despalatović, M. (2016) Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and trace metals in cultured and harvested bivalves from the eastern Adriatic coast (Croatia). *Chemosphere* 153, 18–27.

Posit Team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>

Perić, L., Burić, P. (2019) The effect of copper and chlorpyrifos co-exposure on biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 225, 126–134.

Perić, L., Nerlović, V., Žurga, P., Žilić, L., Ramšak, A. (2017) Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere* 174, 554–562.

Turk, T. (2011) Pod površinom Mediterana. Školska knjiga, 208-218.

Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Capelli, R., Orunesu, M. (1980) Effect of copper on the uptake of amino acids, on protein synthesis and on ATP content in different tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Environ. Res.* 4, 145–152.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M. (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C, 37–42.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I. (2000) Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407–417.

Viličić, D. (2014) Specific oceanological characteristics of the Croatian part of the Adriatic. *Hrvat. Vode* 22 (90), 297–314.

Žurga, P., Dubrović, I., Kapetanović, D., Orlić, K., Bolotin, J., Kožul, V., Nerlović, V., Bobanović-Čolić, S., Burić, P., Pohl, K., Marinac-Pupavac, S., Linšak, Ž., Antunović, S., Barišić, J., Perić, L. (2024) Performance of mussel *Mytilus galloprovincialis* under variable environmental conditions and anthropogenic pressure: A survey of two distinct

farming sites in the Adriatic Sea, *Chemosphere*, Volume 364, 143156, ISSN 0045-6535.

Webber, J.L., Tyler, C.R., Carless, D., Jackson, B., Tingley, D., Stewart-Sinclair, P., Artioli, Y., Torres, R., Galli, G., Miller, P.I., Land, P., Zonneveld, S., Austen, M.C., Brown, A.R. (2021) Impacts of land use on water quality and the viability of bivalve shellfish mariculture in the UK: a case study and review for SW England. *Environ. Sci. Pol.* 126, 122–131.

Wang W., Lu G. (2017) Chapter 21 - Heavy Metals in Bivalve Mollusks, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Chemical Contaminants and Residues in Food (Second Edition)*, Woodhead Publishing, 553-594.

World Health Organization (1994) Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas. Document ICP/ CEH: 041 (2,3,4), Copenhagen, WHO, Regional Office for Europe.

8. POPIS FOTOGRAFIJA

Slika 1. Dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) na lancu; Mali Lošinj. Izvor: Privatna arhiva, kolovoz 2024.

Slika 2. Dagnja iz tri perspektive. Izvor: Paiva, Filipa. (2014). "Ship transport of marine invasive species and its stress resistance". (pristupljeno i preuzeto 20. kolovoza 2024.)

Slika 3. Kamenice (*Ostrea edulis*) na muringu, konopu; Mali Lošinj. Izvor: Privatna arhiva, kolovoz 2024.

Slika 4. Otvorena kamenica, Izvor: privatna arhiva, kolovoz 2024.

Slika 5. Uzgajalište školjkaša u Malom stonu. Autor fotografije: dr. sc. Lorena Perić

Slika 6. Uzgajalište školjkaša u Limskom zaljevu. Autor fotografije: dr. sc. Lorena Perić

Slika 7. Geografski položaj Limskog zaljeva (LZ) i Malostonskog zaljeva (MZ).

Mapa izrađena u programu Datawrapper (Datawrapper GmbH;

<https://www.datawrapper.de/>, 2024.) (Žurga, P., Dubrović, I., Kapetanović, D., Orlić, K., Bolotin, J., Kožul, V., Nerlović, V., Bobanović-Čolić, S., Burić, P., Pohl, K., Marinac-Pupavac, S., Linšak, Ž., Antunović, S., Barišić, J., Perić, L. (2024)

Performance of mussel *Mytilus galloprovincialis* under variable environmental conditions and anthropogenic pressure: A survey of two distinct farming sites in the Adriatic Sea, Chemosphere, Volume 364, 143156, ISSN 0045-6535)

Slika 8. Reakcija Ellmanovog reagensa (DTNB) sa tiolnom skupinom proteina (R-S⁻) (Preuzeto iz Nieri et al, 2017)

Slika 9. Varijacije koncentracije proteina metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva.

Slika 10. Varijacije koncentracije proteina metalotioneina u probavnoj žlijezdi kamenice *Ostrea edulis* iz Limskog zaljeva i Malostonskog zaljeva.

9. SAŽETAK

Promjene prirodnih uvjeta i unos antropogenih zagađivala, samih ili u kombinaciji, predstavljaju značajan izazov za obalne populacije školjkaša. Osjetljivost ekonomski važnih školjkaša na potencijalne stresore u njihovom uzgojnom okruženju nije dovoljno istražena, unatoč povećanju antropogenog pritiska duž obale i značajnom zagrijavanju morske vode posljednjih godina. Stoga je cilj ovog istraživanja bio procijeniti stanje dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) s dva važna uzgojna mjesta u istočnom Jadranu, Malostonskom zaljevu (MZ) i Limskom zaljevu (LZ). Utvrđeni su složeni sezonski obrasci antropogenih onečišćujućih tvari specifični za mjesto, s razinama metala u tkivima koje su uvelike usporedive s onima prethodno prijavljenima za mediteransku regiju. Značajno više koncentracije metalotioneina otkrivene su u tkivima malostonskih dagnji. Koncentracije metalotioneina općenito su bile stabilne tijekom cijelog razdoblja ispitivanja.

Dobiveni rezultati predstavljaju temelj za daljnja istraživanja vezana uz stres kod uzgojenih školjkaša uzrokovan oscilacijama čimbenika okoliša i povećanjem antropogenog pritiska duž obale.

(27 stranica, 10 slika, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: metalotioneini, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, Limski zaljev, Malostonski zaljev

10. ABSTRACT

Changes in natural conditions and introduction of anthropogenic pollutants, alone or in combination, represent a significant challenge for coastal bivalve populations. The sensitivity of economically important bivalves to potential stressors in their breeding environment has not been sufficiently investigated, despite the increase in anthropogenic pressure along the coast and the significant warming of seawater in recent years. Therefore, the goal of this research was to assess the condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) from two important breeding sites in the eastern Adriatic, the Mali Ston Bay (MZ) and the Lim Bay (LZ). Complex site-specific seasonal patterns of anthropogenic pollutants were found, with tissue metal levels broadly comparable to those previously reported for the Mediterranean region. Significantly higher concentrations of metallothionein were detected in the tissues of Maloston mussels. Metallothionein concentrations were generally stable throughout the study period.

The obtained results represent the basis for further research related to stress in farmed shellfish caused by oscillations of environmental factors and an increase in anthropogenic pressure along the coast.

(27 pages, 10 pictures, original language: Croatian)

Key words: metallothioneins, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, Lim Bay, Mali Ston Bay