

Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karakteristikama bioindikatora (*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora

Fiorentin, Claudia

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:911996>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

CLAUDIA FIORENTIN

**Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karakteristikama bioindikatora
(*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora**

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2016.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

CLAUDIA FIORENTIN

**Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karaktristikama bioindikatora
(*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora**

ZAVRŠNI RAD

JMBAG: 0303046484

Status: redoviti student

Kolegij: Stanična i molekularna biologija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafandžel

Pula, 2016.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Claudia Fiorentin, kandidatkinja za prvostupnicu (*baccalaurea*) znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojeg 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.

U Puli, 15. 09. 2016.

Student: Claudia Fiorentin



IZJAVA o korištenju autorskih djela

Ja, Claudia Fiorentin, dajem odbrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karaketristikama bioindikatora (*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora" koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjelovit 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, 15. 09. 2016.

Student: Claudia Fiorentin

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Maje Fafanđel, predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (*baccalaurea*) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao izv. prof. dr. sc. Maju Fafanđel.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maju Fafanđel

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel

Predsjednik: prof. dr. sc. Nevenka Bihari

Član: izv. prof. dr. sc. Nastjenjka Supić

Datum i mjesto obrane završnog rada: 15. rujna. 2016., u 09.00 sati u Centru za istraživanje mora Institut Ruđer Bošković u Rovinju.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Claudia Fiorentin

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Fafanđel na predloženoj temi, te na savjetima i pomoći tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem Centru za istraživanje mora Institut Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biološke karakteristike mediteranske dagnje <i>Mytilus galloprovincialis</i>	1
1.2. Mediteranska dagnja (<i>M. galloprovincialis</i>) kao bioindikator kvalitete mora	3
2. CILJEVI RADA.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1. MATERIJALI.....	7
3.1.1. Kemikalije.....	7
3.1.2. Područja uzorkovanja	7
3.2. METODE	10
3.2.1. Indeks kondicije (IK).....	10
3.2.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)	10
3.2.3. Preživljavanje na zraku (SOS test)	11
3.2.4. Toksičnost tkiva dagnje.....	11
3.3. Obrada podataka.....	12
4. REZULTATI.....	13
4.1. Indeks kondicije (IK)	13
4.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ).....	14
4.3. Preživljavanje na zraku	16
4.4. Toksičnost tkiva dagnje	18
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČCI	22
7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	233
8. BASIC DOCUMENTATION CARD	24
9. LITERATURA.....	255

1. UVOD

Meditranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) je široko rasprostranjena vrsta u Jadranu, te je od visoke ekonomske važnosti. U Hrvatskoj je najznačajnija vrsta školjkaša zbog uzgajanja i konzumne vrijednosti. Godišnja proizvodnja je oko 3000 t, a na njezin rast utječu ekološki čimbenici kao što su temperatura, salinitet, pH, količina otopljenog kisika i prozirnost morske vode (Gavrilović i sur., 2014). Vrsta uspješno nastanjuje područja u obalnoj zoni, koja je pod velikim antropogenim utjecajem, utjecajem industrije, urbanih sredina i turizma, te zbog toga može biti zagađena. Školjkaši su filtratori i mogu u sebi nakupiti razna zagađivala i zbog toga se smatraju bioindikatorima kvalitete mora, te se koriste u raznim "mussel watch" programima.

1.1. Biološke karakteristike mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Vrsta *Mytilus galloprovincialis* se taksonomski svrstava u:

Koljeno: *Mollusca*

Razred: *Bivalvia*

Red: *Mytiloida*

Porodica: *Mytilidae*

Rod: *Mytilus*

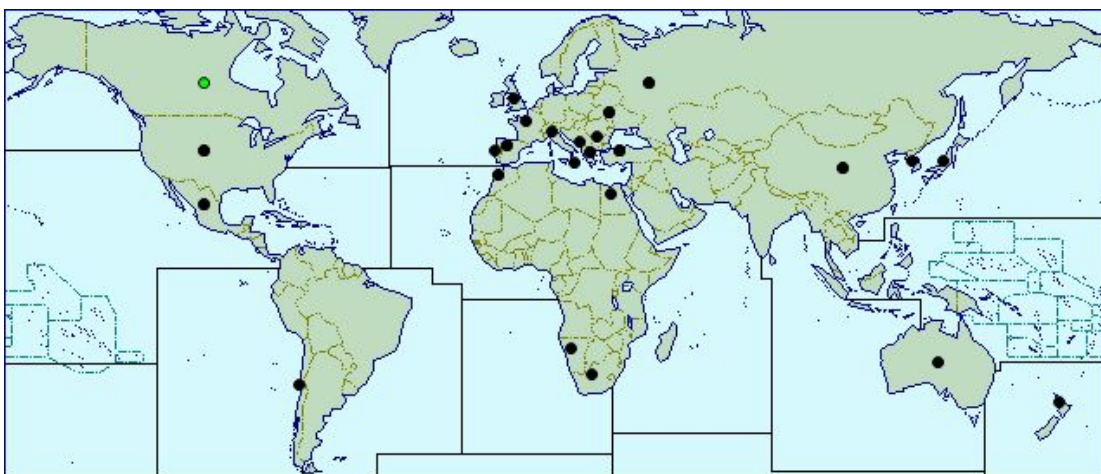
Vrsta: *Mytilus galloprovincialis*



Slika 1. Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis*.

Mediteranska dagnja je autohtona vrsta Jadranskog mora koja ponajviše nastanjuje obalna područja i zonu plime i oseke. Jedinke se pričvršćuju na kamenita dna pomoću bisusnih niti, te čine gusta naselja (Slika 1.). Ekonomski je značajna vrsta zbog svoje konzumne vrijednosti, ali njezina sposobnost lakog nastanjivanja novih područja predstavlja i problem obraštaja u lukama, brodovima i drugim vodenim strukturama (Župan i sur., 2014).

M. galloprovincialis ima ljušturu crne ili tamno-plave boje koja često može biti prekrivena raznim obraštajem. Ljušture su jednake i spojene aduktorom. Hrani se tako što filtrira morsku vodu i uklanja iz nje organsku tvar. Hranjive čestice se hvataju na škrgama i zatim ingestiraju. Svaki školjkaš filtrira i do 6 litara vode tokom perioda od jednog sata (Peharda i sur., 2007, Marušić i sur., 2009, Yildiz i sur., 2006). Školjkaši mogu narasti i do dužine preko 15 cm. Spol jedinki se može odrediti po bolji gonada koje se nalaze unutar ljušture. Mužjaci imaju gonade mliječno bijele boje, dok ženke imaju gonade narančasto crvenkaste boje (Bayne, 1976).



Slika 2. Mapa globalne rasprostranjenosti *Mytilus galloprovincialis*.

Meditranska dagnja je autohtona vrsta i na Sredozemlju, Crnom moru i obalama istočnog Atlantskog oceana (Slika 2.). Pronađena je i uz obale Sjeverne Amerike, Japana, Australije, Čilea i Južne Afrike gdje je unešena zbog antropogenih aktivnosti, te se smatra i invazivnom vrstom .

1.2. *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikator kvalitete mora

Meditranska dagnja odgovara definiciji dobrog bioindikatora kvalitete mora zbog laganog identificiranja i uzorkovanja, budući da se radi o sesilnom organizmu. Indikator je promjena u okolišu do kojih može doći zbog utjecaja raznih zagađivala poglavito nepoznatih, čiji se utjecaj reflektira na fitnessu, kondicijskom indeksu i vremenu preživljavanja bioindikatora (Volpi i sur., 2005, Jović i sur., 2011). Zbog filtriranja morske vode, dagnja, u sebi nakuplja razna zagađivala i toksine odražavajući prisutnost zagađivala u vodenom stupcu. Provođenjem stalnog monitoringa i raznih tzv. “mussel watch” programa može se utvrditi stanje ekosustava i kvaliteta morske vode što je od velike važnosti i za ljudsko zdravlje (Mubiana i sur., 2006).

Ujedno zbog široke rasprostranjenosti i dostupnosti često se koristi u raznim fiziološko-kemijskim, biokemijskim i genetičkim istraživanjima. Zbog velikog antropogenog utjecaja i stresa na morski ekosustav, pomoću raznih europskih direktiva uvedena je obaveza monitoringa okoliša. Antropogeni utjecaji su najizraženiji u zatvorenim okolišima kao što je Jadransko more. Stalnom analizom bioindikatora mogu se dobiti detaljne informacije o stanju okoliša, njegovoj kvaliteti,

te mogućim promjenama u njemu (Vukmirović i sur., 1994, Ramšak i sur., 2012). Za utvrđivanje kvalitete okoliša koriste se biološki pokazatelji (biomarkeri) koji su korišteni za identifikaciju fizičkih oštećenja ili poremećaja fizioloških procesa kod ljudi ili životinja. Biomarkeri koje smo mi pratili su: indeks kondicije (IK), indeks probavne žlijezde (IPŽ), vrijeme preživljavanja na zraku (SOS test), te toksičnost tkiva dagnje.

i) Indeks kondicije (IK) daje uvid u kvalitetu mesa dagnji za komercijalne svrhe, ali i stanje uzorkovanih organizama koje proizlazi iz njihovih fizioloških aktivnosti pod određenim okolišnim uvjetima (Pampanin i sur., 2005). U dagnji indeks kondicije varira ovisno o veličini jedinke, godišnjem dobu i lokalnim okolišnim uvjetima, a najviše o količini dostupne hrane i reproduktivnom ciklusu (Gosling, 1992). Također, prisutnost metala i organskih zagađivala utječe na rast dagnje i negativno je korelirana sa indeksom kondicije (Pampanin i sur., 2005). Prema Davenportu i Chen (1987) postoji 7 metoda izračunavanja indeksa kondicije (IK):

1. $IK = \text{masa prokuhanog mesa} / \text{ukupna masa ljuštore} \times 100$
2. $IK = \text{masa prokuhanog mesa} / \text{masa prokuhanog mesa} + \text{masa ljuštore} \times 100$
3. $IK = \text{masa mokrog mesa} / \text{ukupni volumen} - \text{volumen ljuštore} \times 100$
4. $IK = \text{masa sušenog mesa} / \text{ukupni volumen} - \text{volumen ljuštore} \times 100$
5. $IK = \text{masa sušenog mesa} / \text{masa ljuštore} \times 100$
6. $IK = \text{masa mokrog mesa} / \text{masa ljuštore} \times 100$
7. $IK = \text{volumen mokrog mesa} / \text{ukupni volumen} - \text{volumen ljuštore} \times 100$

ii) Indeks probavne žlijezde je ustanovljen kao pokazatelj ishranjenosti odnosno izgladnelosti školjakaša. Probavna žlijezda ima ulogu skladištenja rezervi metaboličke energije dagnji, te se njezin indeks (IPŽ) mijenja ovisno o promjeni godišnjeg doba ili ovisno o promjenama okolišnih uvjeta i parametara. Za vrijeme fiziološkog stresa karakterističnog za pojedina staništa, a koji uključuje visoke energetske zahtjeve mijenja se biokemijski sastav probavne žlijezde što utječe i određuje vrijednost ovog indeksa (Cartier i sur., 2004).

iii) Preživljavanje na zraku (SOS test) je jednostavan test koji pokazuje promjene u fiziologiji organizma, uslijed prirodnih ili antropogenih čimbenika, te je dobar pokazatelj onečišćenja okoliša. Ovaj test je široko primijenjen u laboratorijskim istraživanjima za praćenje kvalitete mora, iako je vjerojatnost da organizmi ostanu izloženi na zraku duži vremenski period vrlo mala. Kod Mediteranske dagnje, raznim

studijma, dokazana je smanjena sposobnost preživljavanja na zraku koja je povezana s akumulacijom toksičnih tvari u tkivima organizma (Hellou i Law, 2003).

iv) Određivanje toksičnosti standardiziranim Microtox[®] (Macharey Nagel, Njemačka) bakterijskim testom pored mjerenja toksičnosti sedimenta i vode omogućuje i testiranje bioloških uzoraka (Cotou i sur., 2002). Test koristi bioluminescentnu morsku bakteriju *Vibrio fischeri* kao test organizam. Testom se mjeri količina emitiranog svjetla luminescentnih bakterija prije i nakon izlaganja uzorku, te se razlika u količini emitiranog svjetla pripisuje utjecaju citotoksičnih tvari iz uzorka na test organizam. Test se uspješno koristi kao jednostavan test za utvrđivanje onečišćenih područja (Bihari i sur., 2007).

Na vrijednosti biomarkera mogu utjecati biometrijski parametri kao što su veličina, masa ljušture, masa mekog tkiva (Dragun i sur., 2006). Populacije mediteranske dagnje u Jadranskom priobalju čine jedinke različite biometrije, pa je važno imati saznanja da li i kako veličina jedinke utječe na odgovor biomarkera kako bi se pravilno uzorkovalo.

2. CILJEVI RADA

Ciljevi rada su sakupiti uzorke populacija dagnji *Mytilus galloprovincialis* duž zapadne obale Istre da bi se:

1. Odredio indeks kondicije, indeks probavne žlijezde, vrijeme prežiljavanja na zraku i toksičnost tkiva dagnje za tri veličinske kategorije.
2. Ustanovile razlike u ponašanju jedinki dagnje *Mytilus galloprovincialis* različitih veličina za pojedine pokazatelje kvalitete mora.
3. Ustanovila veličinska kategorija dagnje koja najbolje diskriminira lokacije pod antropogenim utjecajem.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

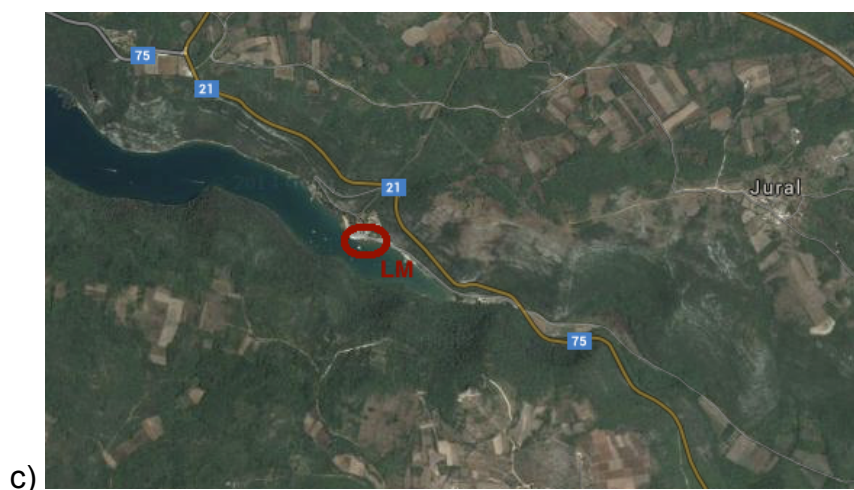
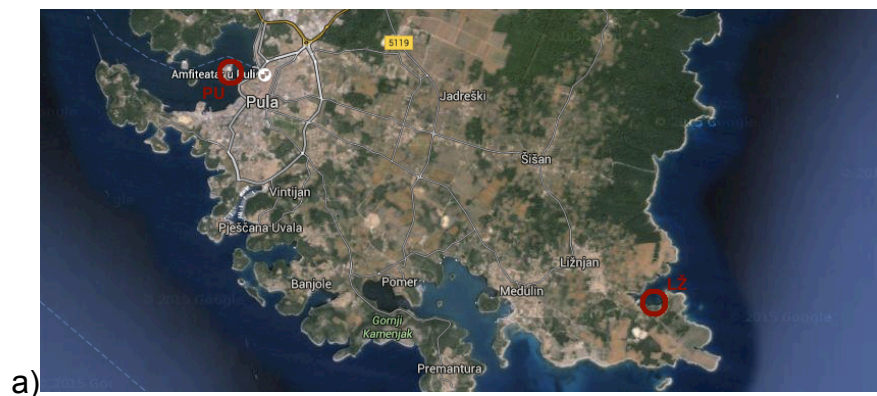
3.1.1. Kemikalije

Za određivanje toksičnosti tkiva dagnje korištene su komercijalne luminescentne bakterije *Vibrio fischeri* i otopine: otopina za razrjeđivanje uzorka, otopina za rekonstrukciju bakterija i medij za bakterije (Macherey Nagel, Njemačka).

3.1.2. Područja uzorkovanja

Uzorci mediteranske dagnje za istraživanje prikupljeni su sa šest različitih područja. Dvije postaje su iz pulskog akvatorija, pulske luke (PU) i Ližnjana (LŽ) (Slika 3. a), a preostale četiri postaje su iz rovinjskog akvatorija, iz marine Rovinj (MR), uvale Valdibora u blizini tržnice (TR), uvale Valdibora u blizini bolnice (BO) (Slika 3.b) i Limskog zaljeva (LM) (Slika 3. c).

Sva područja osim postaja LŽ i BO su pod intenzivnim antropogenim utjecajem, odnosno u neposrednoj su blizini turističkih objekata (LM i PU), luka sa velikim pomorskim prometom (PU i MR), te u blizini ispusta otpadnih voda (PU i TR).



Slika 3. Postaje uzorkovanja *Mytilus galloprovincialis*. a) PU i LŽ, b) MR, BO i TR i c) LM.

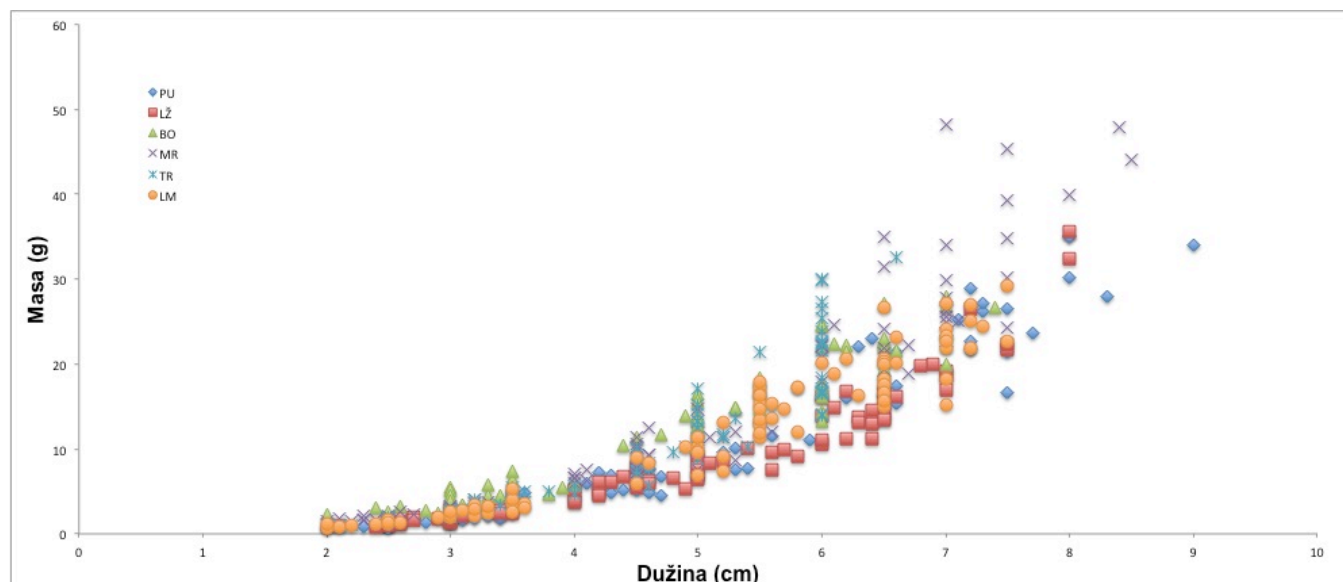
Za svaku postaju su uzorkovane jedinke raspodijeljene u tri veličinske kategorije: male (< 4 cm), srednje (od 4 do 6 cm) i velike (> 6 cm). Na svakoj postaji je

za svaku veličinsku kategoriju uzorkovano 50 jedinki. Organizmi su očišćeni od obraštaja, te su im izmjerene dužina, širina i visina. Osnovne biometrijske karakteristike uzorkovanih jedinki prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Osnovne biometrijske karakteristike uzorkovanih jedinki *Mytilus galloprovincialis*. Prikazane su srednje vrijednosti.

	< 4 cm		4 - 6 cm		> 6 cm	
	dužina (cm)	masa (g)	dužina (cm)	masa (g)	dužina (cm)	masa (g)
PU	3,08	2,15	4,60	6,78	7,15	23,11
LŽ	2,94	2,00	4,81	7,11	6,64	17,06
BO	3,17	4,26	5,30	14,38	6,53	22,07
MA	2,74	2,53	4,8	9,92	6,93	29,17
TR	3,22	3,40	4,99	11,65	6,03	22,10
LM	2,89	2,27	5,30	12,55	6,76	21,06

Odnos mase i dužine uzorkovanih dagnji po postajama prikazan je na Slici 4. Na slici je vidljivo da postoji razlika među populacijama u biometrijskim karakteristikama: najmanje i najlakše dagnje nalaze se na postaji LŽ, dok su najveće uzorkovane jedinke sa postaje MR.



Slika 4. Odnos mase i dužine dagnji *M. galloprovincialis* sa 6 postaja Sjevernog Jadrana.

3.2. METODE

3.2.1. Indeks kondicije (IK)

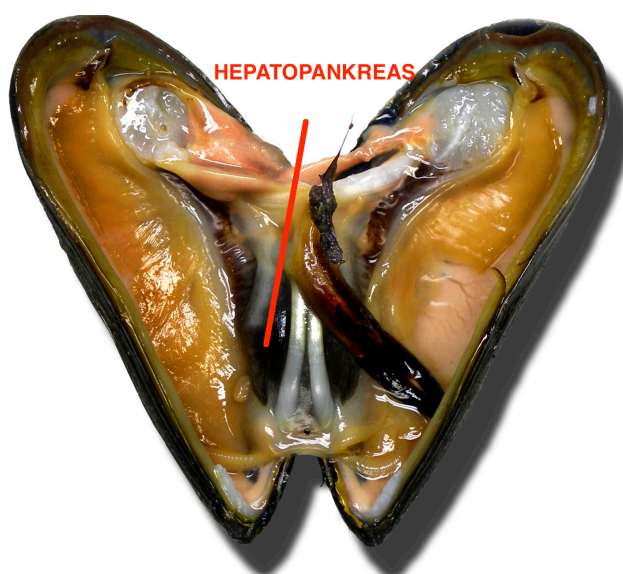
Razlikom ukupne mase školjkaša $m(\text{tkivo})$ i mase same ljuštura $m(\text{ljuštura})$ dobila se masa tkiva koja se iskoristila pri izračunavanju indeksa kondicije (IK) prema formuli (Davenport i Chen, 1987):

$$IK = \frac{m(\text{tkivo})}{m(\text{ljuštura})}.$$

3.2.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)

Za svaku postaju je odabrano 12 jedinki iz svih veličinskih kategorija, izmjerene su im dužina, širina i visina, te su otvorene i puštene da se iscijedi višak vode iz njih. Zatim se izvagala ukupna masa dagnje, te se odstranila probavna žlijezda (Slika 5.) i izvagala se njezina masa. Rezultati su prikazani kao masa probavne žlijezde/ukupna masa (Cartier i sur., 2004).

$$IP\check{Z} = \frac{m(\text{probavne žlijezde})}{m(\text{ukupna})}.$$



Slika 5. Probavna žlijezda (hepatopankreas) mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*.

3.2.3. Preživljavanje na zraku (SOS test)

Uzorkovane jedinke su očišćene od obraštaja te su im se izmjerile dužina, širina i visina. Zatim su postavljene u kadice i prekrivene prozirnom folijom (Slika 6.). Svakodnevno su se brojale uginule jedinke, te se vagala ukupna masa dagnje i masa prazne ljuštire (Eertman i sur., 1993). Rezultati testa su prikazani kao LT_{50} tj. vrijeme potrebno da uginu 50% jedinki.



Slika 6. Određivanje preživljavanja na zraku mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* (SOS test).

3.2.4. Toksičnost tkiva dagnje

Toksičnost tkiva dagnje određena je Microtox[®] (Macharey Nagel, Njemačka) testom koji koristi bioluminescentnu morsku bakteriju *Vibrio fischeri*.

Priprema uzorka. Za svaku veličinsku kategoriju je uzeto po tri dagnje čije se tkivo odvojilo od ljuštire. Za svaku kategoriju je uzeto najviše 3 g tkiva koje se homogeniziralo u puferu za razrijeđenje (Machery Nagel, Njemačka) u omjeru 1:3 (w/v). Zatim je uslijedilo centrifugiranje pri 4°C, 3000 okretaja/min tijekom 15 min. Na kraju je izdvojen supernatant. Supernatant je razrijeđen otopinom za razrijeđivanje u

omjeru 1:1 (v/v) u seriji od 8 razrjeđenja od kojih prvo sadrži 500 µl, a zadnje 4 µl. Za slijepu probu korištena je otopina za razrjeđivanje.

Priprema bakterija. Komercijalne liofilizirane bakterije su rehidrirane u rekonstrukcijskoj otopini po preporuci proizvođača (Macherey Nagel, Njemačka), te su stavljene na temperaturi od 16°C na predviđenja mjesta u instrument za mjerenje luminescencije.

Priprema reakcijske smjese. Za mjerenja svakog uzorka potrebno je 9 epruveta, po jedna za svako razrjeđenje i slijepu probu. U svaku od 9 epruveta se dodaje po 10 µL bakterija i 500 µL bakterijskog medija i pohrani na temperaturi od 16°C na predviđena mjesta u instrument za mjerenje luminescencije.

Mjerenje luminescencije bakterija vođeno je softverski nakon pokretanja programa za izvođenje testa. Prvo se izmjerila luminescencija bakterija bez uzorka u svim epruvetama, a zatim se prenio sadržaj svakog razrjeđenja u epruvete s bakterijama, te se ostavilo. Nakon 15 minuta izmjerena je luminescencija bakterija. Toksičnost, izražena kao EC₅₀ je izračunata pomoću programa (Microsoft Omni).

3.3. Obrada podataka

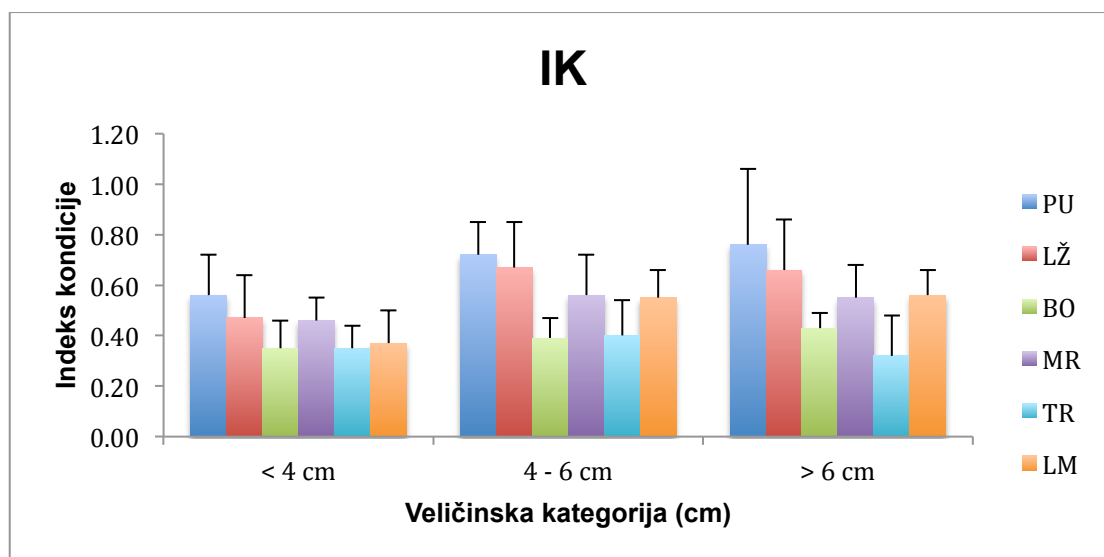
Statistička obrada podataka je uključila osnovne statističke parametre, a razlike između uzoraka testirane su ANOVA (Fischer-post hoc) testom.

4. REZULTATI

4.1. Indeks kondicije (IK)

Vrijednosti indeksa kondicije za sve postaje i veličinske kategorije prikazane u Slici 7. Najmanji indeks kondicije za dagnje < 4 cm je na postaji TR i iznosi 0,18, a najveći 0,70 na postaji PU. Za dagnje od 4–6 cm najmanji indeks kondicije iznosi 0,24 na postaji BO, a najveći 0,99 na postaji PU. Za dagnje > 6 cm najniži indeks kondicije 0,14 je na postaji TR, dok je najviši na postaji PU i iznosi 1,95.

Iz rezultata proizlazi da se kondicijski indeks povećava od kategorije malih dagnji do kategorije velikih dagnji.



Slika 7. Indeks kondicije (IK) sa 6 postaja Sjevernog Jadrana.

U Tablici 2. su prikazani rezultati statistički značajnih razlika između veličinskih kategorija. Za male dagnje postaje se dijele u tri grupe, u prvu spada postaja PU koja se statistički razlikuje od svih ostalih postaja, u drugu ulaze postaje LŽ i MR, a u treću postaje TR, BO i LM. Za srednje dagnje ponovno dolazi do podjele u tri grupe, u prvu ulaze postaje PU i LŽ, u drugu postaje LM i MR i u treću TR i BO. U zadnjoj veličinskoj kategoriji, velike dagnje, imamo podjelu na pet grupa, prva je postaja PU, druga je LŽ, treća su postaje LM i MR, četvrta je BO i peta je postaja TR.

Tablica 2. Rezultati statističke analize (ANOVA) indeksa kondicije (IK) po postajama.

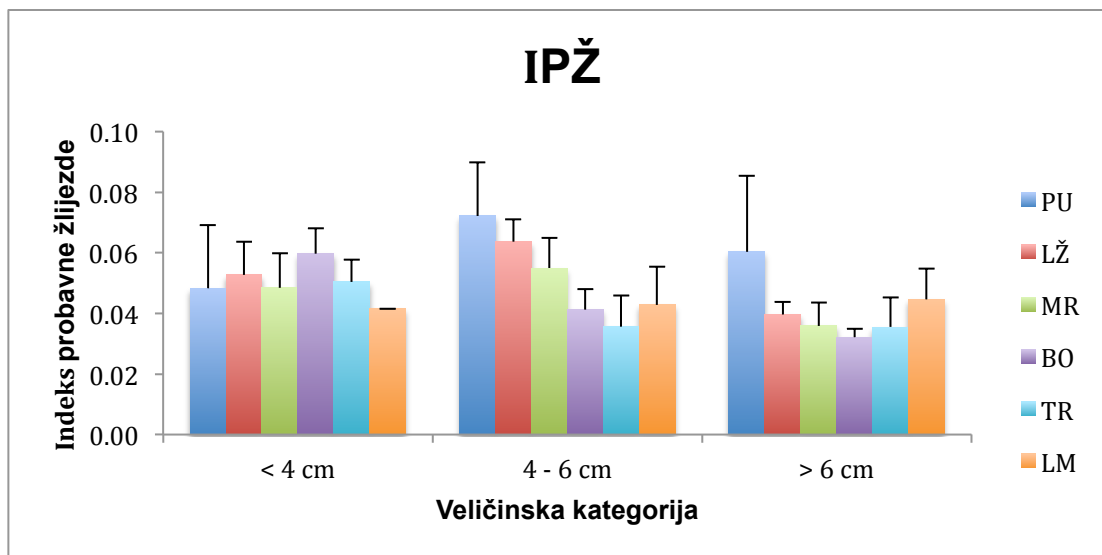
“=” - nema statističke razlike između veličinskih kategorija, “≠” - postoji statistička razlika između veličinskih kategorija. V (> 6 cm), S (4-6 cm) i M (< 4 cm).

Postaja	Razlike	Nema razlika
PU	M ≠S, M ≠V	S = V
LŽ	M ≠S, M ≠V	S = V
BO	M ≠S, M ≠V	S =M, V= M
MR	M ≠S, M ≠V	S = V
TR		S = V, V= M
LM	M ≠S, M ≠V	S = V

IK ovisi o veličini jedinke, na svim postajama je najniži u jedinkama < 4cm, raste s veličinom jedinke i to mjesno-specifično osim na postaji TR gdje nema razlike u kondicijskom indeksu jedinki različitih veličina (Tablica 2.) Shodno tome, najveće razlike između postaja u IK su utvrđene za jedinke > 6cm.

4.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)

Slika 8. prikazuje indeks probavne žlijezde (IPŽ) za sve uzorkovane postaje. Najveći IPŽ za male dagnje je na postaji BO, za kategoriju srednjih i velikih je na postaji PU. Najmanji udio za kategoriju malih dagnji je na postaji LM, za kategoriju srednjih je na postaji TR i za kategoriju velikih je BO.



Slika 8. Indeks probavne žlijezde jedinki *M.galloprovincialis*. sa 6 postaja Sjevernog Jadrana.

Statistička analiza pokazala je da se IPŽ za male dagnje ne razlikuje po postajama, dok za srednje i velike dagnje se IPŽ na postaji PU razlikuje od IPŽ na ostalim postajama. Srednje vrijednosti pojedinih kategorija prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Srednje vrijednosti (SV) indeksa probavne žlijezde za 6 postaja Sjevernog Jadrana. "SD" - standardna devijacija

Indeks probavne žlijezde	LŽ, BO, TR, MR, LM (SV ± SD)	PU (SV ± SD)
Male	0,051 ± 0,010*	
Srednje	0,048 ± 0,014	0,071 ± 0,15
Velike	0,038 ± 0,008	0,060 ± 0,025

* uključuje i PU

IPŽ ovisi o veličini jedinke za postaje LŽ, BO, MR i TR dok na postajama PU i LM je isti za sve veličinske kategorije (Tablica 4.). IPŽ u malim dagnjama ne diskriminira postaje.

Tablica 4. Rezultati statističke analize (ANOVA) indeksa probavne žlijezde (IPŽ) po postajama.

“=” - nema statističke razlike između veličinskih kategorija, “≠” - postoji statistička razlika između veličinskih kategorija. V (> 6 cm), S (4-6 cm) i M (< 4 cm).

Postaja	Razlike	Nema razlika
PU		M = S = V
LŽ	M ≠ V, S ≠ V	M = S
BO	M ≠ V, S ≠ V	S = M, S = V
MR	M ≠ V	S = M, S = V
TR	M ≠ V	S = M, S = V
LM		M = S = V

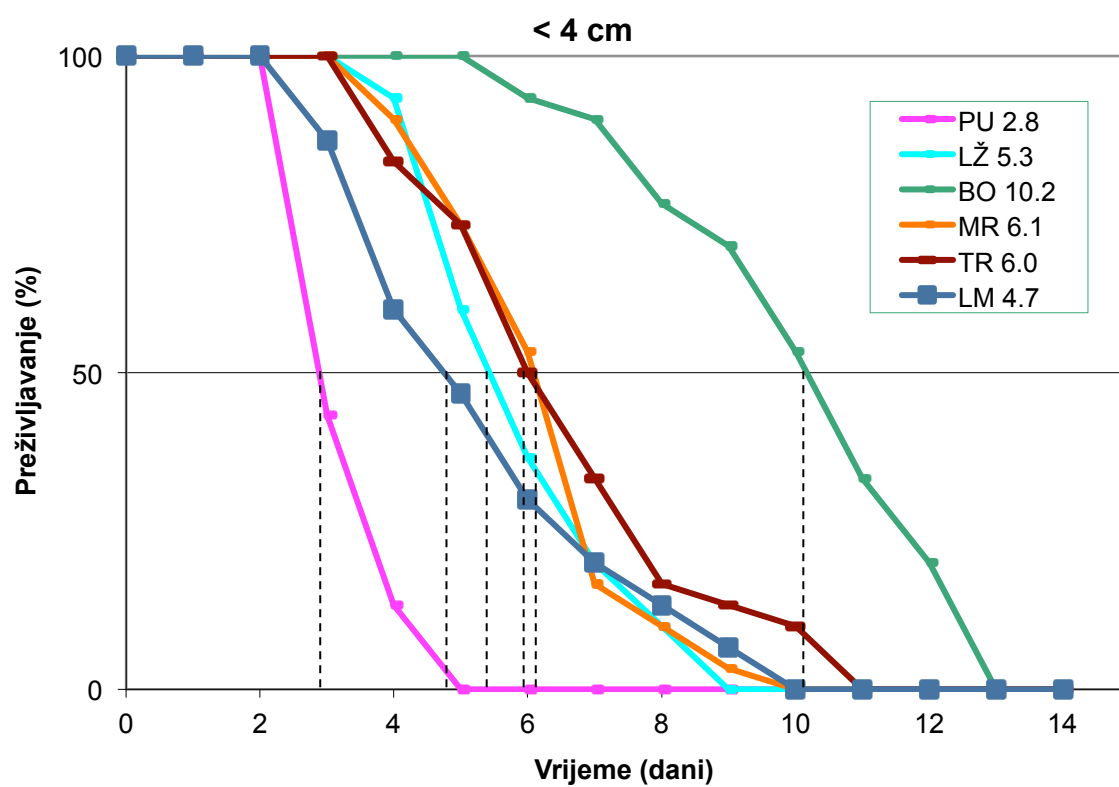
4.3. Preživljavanje na zraku

Rezultati testa preživljavanja na zraku za tri veličinske kategorije na šest uzorkovanih postaja, te vrijeme potrebno da 50% jedinki uginu (LT_{50}) prikazani su u Slici 9. Iz krivulja je vidljiva razlika u ponašanju različitih veličinskih kategorija.

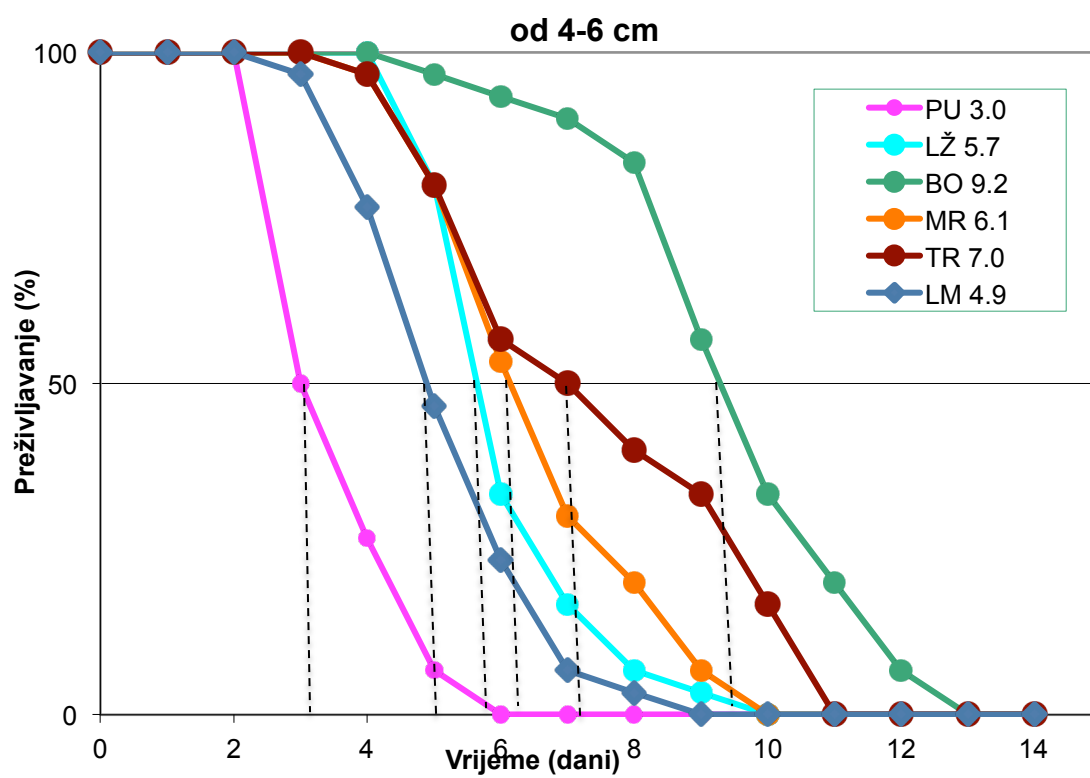
Za jedinke < 4cm LT_{50} se kreće od 2.8 (PU), preko 4.7 (LM), 5.2 (LŽ), 6.0 (TR), 6.1 (MR) do 10.2 (BO). Za jedinke od 4 do 6cm LT_{50} je nešto veći na svim postajama, od 3.0 (PU), preko 4.9 (LM), 5.7 (LŽ), 6.0 (TR), 6.1 (MR) do 9.2 (BO) zadržavajući isti redoslijed.

LT_{50} za jedinke veće od 6 cm ne zadržava isti redoslijed: kreće se od 3.1 (PU), preko 5.3 (LŽ), 5.5 (LM), 6.5 (MR) i 7.5 (TR) do 9.0 (BO). Iz toga slijedi da rezultati LT_{50} ovise o veličini jedinke, a najveći raspon LT_{50} i najbolja moć razlučivanja postaja je za jedinke manje od 4 cm.

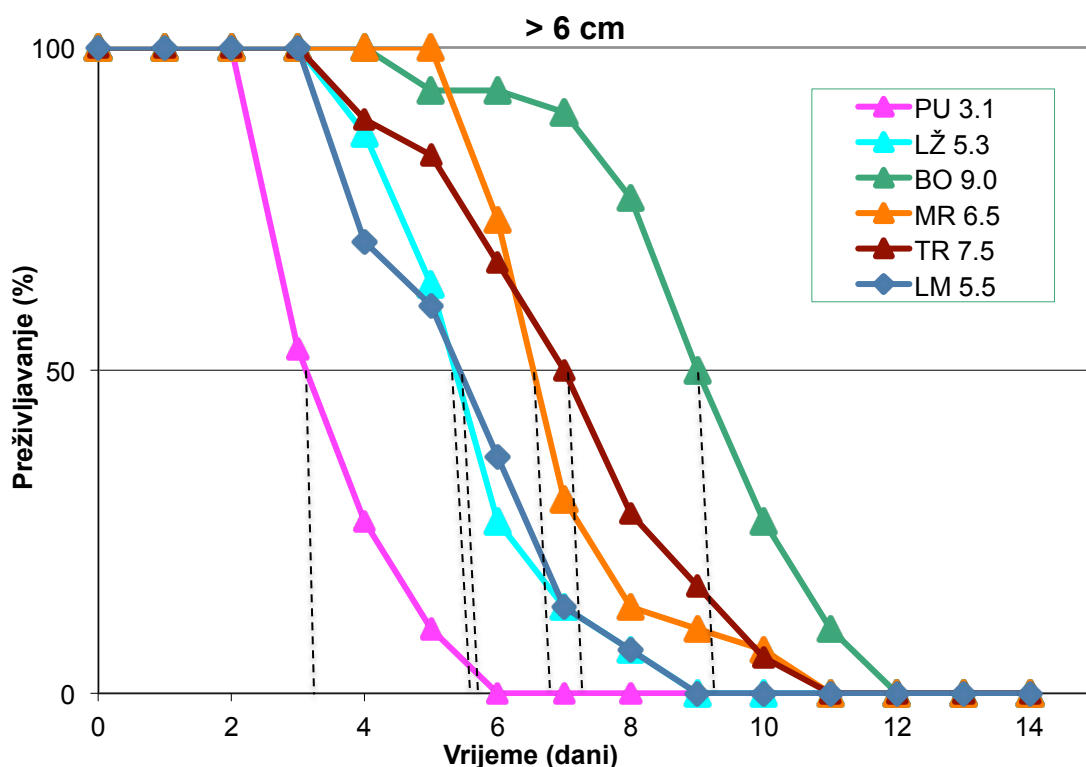
a)



b)



c)



Slika 9. Preživljavanje na zraku (SOS test). a) preživljavanje na zraku za veličinsku kategoriju malih dagnji (< 4 cm), b) preživljavanje na zraku za kategoriju srednjih dagnji (4 – 6 cm) i c) preživljavanje na zraku za kategoriju velikih dagnji (> 6 cm).

Bez obzira na veličinu najkraće vrijeme preživljavanja imaju dagnje sa lokacije PU, a najduže one sa lokacije BO.

4.4. Toksičnost tkiva dagnje

Vrijednosti EC_{50} prikazani su u Tablici 5. Iz podataka vidljivo je da ne postoji opći odnos toksičnosti i veličine dagnje, nego je on mjesno-specifičan pa su tako male dagnje postaje LŽ, srednje dagnje postaja PU i BO, te velike dagnje postaja PU i TR najtoksičnije.

Na postaji LM nema razlika u toksičnosti među jedinkama različitih veličina, dok na ostalim postajama postoji razlika u toksičnosti među jedinkama različitih veličina, ali nema pravilnosti u odnosu veličine i toksičnosti. Na postajama PU i TR toksičnost raste s veličinom, na postajama LŽ i MR pada s veličinom, dok na postaji BO srednje jedinke su najtoksičnije.

Tablica 5. Potencijalna toksičnost tkiva *M. galloprovincialis* sa 6 postaja Sjevernog Jadrana izražena kao EC₅₀ za tri veličinske kategorije (crveno - toksično, ružičasto – umjereno toksično).

Postaje	EC ₅₀		
	< 4 cm	4 - 6 cm	> 6 cm
PU	29 (21 – 40)	12 (8 – 16)	< 3
LŽ	(0 – 40)	33 (23 – 48)	30 (19 – 46)
BO	236 (131 – 425)	16 (13 – 20)	100 (82 – 122)
MR	28 (22 – 35)	113 (92 – 138)	217 (171 – 217)
TR	57 (45 – 72)	24 (14 - 40)	6 (16 – 42)
LM	28 (14 - 55)	26 (23 - 29)	21 (17 - 25)

5. RASPRAVA

Meditranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* široko je upotrebljavani bioindikatorski organizam tamo gdje se promjena parametara bioloških sustava koristi za utvrđivanje kvaliteteorskog okoliša. Kako su fiziološki procesi i morfologija struktura školjkaša vezani uz veličinu individua važno je utvrditi kako veličine uzorkovanih individua utječu na ponašanje pokazatelja kvalitete mora. Jedinke analizirane u ovom radu pripadaju populacijama pod različitim pritiscima stanja okoliša, a njihova veličina se kretala od 2 cm do 9 cm dužine čime je obuhvaćen raspon prisutan u prirodnim populacijama istočne jadranske obale (Hrs-Brenko, 1968). Istraživani biološki pokazatelji (indeks kondicije, indeks probavne žlijezde, vrijeme preživljavanja na zraku, toksičnost tkiva) temelje se na fiziološkim ili morfološkim karakteristikama dagnji (Bihari i sur., 2007). Dobiveni rezultati pokazuju da indeks kondicije ovisi o veličini dagnje što je u skladu s odnosom već utvrđenim za školjkaše (Filgueira i sur., 2008). Međutim odnos indeksa kondicije i veličine se razlikuje po postajama ukazujući utjecaj lokalnih uvjeta na prirast mase obzirom na rast. Razvrstavanje postaja po stupnju okolišnog pritiska je najbolje ukoliko se određuje indeks kondicije u jedinkama većim od 6 cm.

Sličan obrazac utvrđen je i za indeks probavne žlijezde gdje se pokazalo da jedinke manje od 4 cm ne pokazuju postaje pod fiziološkim stresom tj. imaju sličan IPŽ na svim postajama dok veće jedinke iskazuju mjesno-specifičan odgovor omogućujući razlikovanje okoliša pod različitim pritiskom (Cartier i sur., 2004).

Testom preživljavanja na zraku utvrđeno je da veličina jedinke dagnje utječe na vrijeme preživljavanja, na način da velike dagnje imaju duže vrijeme preživljavanja od malih dagnji. Budući da skraćeno vrijeme preživljavanja može uzrokovati prisutnost zagađivala ili neki drugi oblik okolišnog stresa duže vrijeme preživljavanja velikih jedinki ukazuje na to da su odrasle jedinke bolje nose sa zahtjevima okoliša (Bihari i sur., 2007). Razlike u okolišnim uvjetima među postajama ogledaju se u različitim vremenima preživljavanja, ali za ekstremne uvjete (postaje PU i BO) ne ovise o veličini. Bez obzira na veličinu najkraće vrijeme preživljavanja imaju dagnje sa lokacije PU, a najduže one sa lokacije BO, što ukazuju na različitu kategoriju kvalitete morske vode na ovim postajama koja se iskazuje u jedinkama svih veličina.

Toksičnost tkiva dagnje pokazuje razliku u prisutnosti toksičnih tvari obzirom na veličinu uzorkovanih jedinki. Najveće količine toksičnih tvari su zabilježene u

srednje velikim i velikim dagnjama, što ukazuje da se akumulacija povećava sa starošću dagnji. Nije uočen opći odnos toksičnosti i veličine dagnje, nego je on mjesno-specifičan pa su tako na jednoj postaji male dagnje najtoksičnije (LŽ), a nekima srednje (BO) ili velike (PU i TR). LŽ je postaja koja nije pod opterećenjem toksikanata (Lipanić Landeka, 2010), pa su male jedinke najosjetljivije na eventualne prisutnosti toksikanata, dok su postaje PU (Pulska luka) i TR (Valdibora-Rovinjska tržnica) pod opterećenjem i velike jedinke imaju akumuliranu najveću količinu toksičnih tvari (Bihari i sur., 2006, Lipanić Landeka, 2010).

Na temelju svih rezultata može se zaključiti da veličina jedinki dagnje različito utječe na vrijednosti istraživanih parametara, ali analizom jedinki < 6 cm najlakše je prepoznati populacije koje žive u nepovoljnim uvjetima okoliša. Od 6 istraživanih postaja najveće promjene utvrđene biomarkerima zabilježene su u populacijama na postajama PU i TR uz koje su vezane ljudske aktivnosti kao što su pomorski promet i otpust otpadnih voda, pa je količina prisutnih toksičnih tvari veća.

6. ZAKLJUČCI

1. Svi promatrani parametri (indeks kondicije, indeks probavne žlijezde, preživljavanje na zraku, toksičnost tkiva) pokazali su da veličina dagnje utječe na razinu odgovora pojedinog pokazatelja kvalitete mora.

2. Za većinu pokazatelja (indeks kondicije, indeks probavne žlijezde, toksičnost tkiva) jedinke veće od 6 cm najbolje razlučuju lokacije pod različitim okolišnim utjecajem, a upotreba velikih jedinki i u SOS testu razlučiti će jednako postaje pod nepovoljnim utjecajem uvjeta okoliša.

3. Na temelju svih promatranih pokazatelja u dagnji, postaja PU je pod najvećim utjecajem nepovoljnih uvjeta okoliša.

7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karaktristikama bioindikatora (*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora

Claudia Fiorentin

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

SAŽETAK

Mediterranska dagnja je dobar bioindikator kvalitete mora i često se koristi u raznim znanstvenim istraživanjima kao i raznim monitoring studijama okoliša koje utvrđuju stres u morskom ekosustavu koristeći biološke pokazatelje (biomarkere). Na vrijednosti biomarkera mogu utjecati biometrijski parametri kao što su veličina dagnje, masa ljuštore ili masa mekog tkiva. Kako bi se ustanovila razlika u ponašanju jedinki dagnje različitih veličina za pojedine pokazatelje odredile su se vrijednosti za indeks kondicije, indeks probavne žlijezde, vrijeme preživljavanja na zraku i toksičnost tkiva dagnje za tri veličinske kategorije dagnji (< 4 cm, 4-6 cm i > 6 cm). Za većinu pokazatelja (indeks kondicije, indeks probavne žlijezde i toksičnost tkiva dagnje) jedinke veće od 6 cm najbolje upućuju na lokacije pod različitim okolišnim utjecajem, ali će upotreba velikih jedinki i u SOS testu najbolje razlučiti postaje pod nepovoljnim utjecajem uvjeta okoliša.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli i Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Izvornik je na hrvatskom jeziku (26 stranica, 13 slika, 5 tablica, 24 literaturnih navoda).

Ključne riječi: dagnja *Mytilus galloprovincialis*, indeks kondicije, indeks probavne žlijezde, toksičnost dagnje, preživljavanje na zraku

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel, viša znanstvena suradnica, IRB

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Nevenka Bihari, znanstveni savjetnik, IRB

Izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel, viša znanstvena suradnica, IRB

Izv. prof. dr. sc. Nastjenjka Supić, viša znanstvena suradnica, IRB

Datum obrane: 15. rujna 2016.

8. BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Impact of morphometric characteristics to biomarker response in sea quality bioindicator (*Mytilus galloprovincialis*)

Claudia Fiorentin

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

ABSTRACT

The Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) is a good bioindicator of seawater quality. It is often used in researches and various environment monitoring programs aimed to assess the stress in a marine environment using biomarkers. The value of the biomarkers may be affected by biometric parameters such as the size of the mussels, mass of the shell and a soft tissue mass. In order to establish the difference in the mussel response, among specimens of various sizes was investigated condition index, digestive gland index, survival in air and tissue toxicity in mussels of three size categories (< 4 cm, od 4-6 cm i > 6 cm) we determined. Majority of biomarkers (condition index, index of digestive glands and tissue toxicity) determined in organisms larger than 6 cm discriminated locations under different environmental impacts. Specimens < 4 cm were the most sensitive in SOS test although, large animals also singled out the locations with most disturbing environmental conditions.

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrila University of Pula and Ruđer Bošković Institute in Rovinj. Original in Croatian (26 pages, 13 figures, 5 tables, 24 references).

Key words: mussel *Mytilus galloprovincialis*, condition index, digestive gland index, mussel toxicity, survival in air

Supervisor: Maja Fafanđel, PhD, IRB

Reviewers: Nevenka Bihari, PhD, IRB

Maja Fafanđel, PhD, IRB

Nastjenjka Supić, PhD, IRB

Thesis defence: 15.09.2016.

9. LITERATURA

Bayne, B. L. (1976) Marine mussels: their ecology and physiology. Institute for Marine Environmental Research, 121-159.

Bihari, N., Fafandjel, M., Hamer, B., Kralj-Bilen, B. (2006) PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. Science of the Total environment 366:602-611.

Bihari, N., Fafandjel, M., Piškur V., (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52: 379-387.

Cartier, S., Pellerin, J., Fournier, M., Tamigneaux, E., Girault, L., Lemaire, N. (2004) Use of index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. Aquaculture 241: 633-654.

Catsiki, V. A., Florou, H. (2006) Study on the behavior of the heavy metals Cu, Cr, Ni, Zn, Fe, Mn and ¹³⁷Cs in an estuarine ecosystem using *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species: the case of Thermaikos gulf, Greece. Journal of Environmental Radioactivity, 86: 31-44.

Cotou, E., Papathanassious, E., Tsangaris, C. (2002) Assessing the quality of marine coastal environments: comparison of scope for growth and Microtox® bioassay results of pollution gradient areas in eastern Mediterranean (Greece). Environmental Pollution, 119: 141-149.

Dragun, Z., Raspor, B., Erk, M., Ivanković, D., Pavičić, J. (2006) The influence of biometric parameters on metallothionein and metal level in the heat-treated cytosol of the whole soft tissue of transplanted mussels. Environmental Monitoring and Assessment, 114: 49.

Eertman R. H. M., Wagenvoort A. J., Hummel H., Smaal A.C., (1993) "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170(2): 179-195.

Filgueira, R., Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M.J. (2008) Effect of condition index on allometric relationships of clearance rate in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(2): 391-398.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Conides, A., Kunica, V., Ljubičić, A. (2014) Rast i preživljavanje danje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) u dva različita uzgojna sustava. str. 462-466

Gosling, E. (1992) The mussel *Mytilus*: eology, physiology, genetics and culture. *Developments in aquaculture and fisheries science*, 25: 589.

Hellou, J., Law, R.J., (2003) Stress on stress response of wild mussel, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, as an indicator of ecosystem health. *Environmental Pollution*, 126: 407-416.

Hrs-Brenko M. (1968) Biometrical analyses of the mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) along the Eastern coast of the Adriatic. *Thalasia Jugoslavica* IV: 19-30.

Jović, M., Stanković, A., Slavković-Beskoski, L., Tomić, I., Degetto, S., Stanković, A., (2011) Mussels as bio-indicator of the environmental quality of the coastal water of the Boka Kotorska Bay (Montenegro). *J. Serb. Chem. Soc.*, 76 (6): 933-946.

Marušić, N., Vidaček, S., Medić, H., Petrak, T. (2009) Indeks kondicije dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u uvali Budava i u zaljevu Raša. *Ribarstvo*, 67 (3): 91-99.

Lipanovać Landeka, H. Opterećenost Pulskog zaljeva metalima i njihov učinak na dagnju *Mytilus galloprovincialis* L. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu. 2010.

Mubiana, V. K., Vercauteren, K., Blust, R. (2006) The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. Environmental Pollution 144: 272-279.

Pampanin, D. M., Volpato, E., Marangon, I., Nasci, C. (2005) Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. Comparative Biochemistry and Physiology, 140: 41-52.

Peharda, M., Župan, I., Bavčević, L., Franković, A., Klanjšček, T. (2007) Growth and condition index of mussel *Mytilus galloprovincialis* in experimental integrated aquaculture. Aquaculture Research, 38: 1714-1720.

Ramšak, A., Ščančar, J., Horvat, M. (2012) Evaluation of Metallothioneins in Blue Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as a Biomarker of Mercury and Cadmium Exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): A Long-term Field Study. ACTA ADRIAT., 53(1): 71 – 86.

Sukhotin, A. A., Lajus, D. L., Lesin, P. A. (2003) Influence of age and size on pumping activity and stressresistance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 284: 129-144.

Volpi Ghirardini, A., Losso, C., Arizzi Novelli, A., Baugrave, A., Edouard, H., Ghetti, P. F. (2005) *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). Chemistry and Ecology, 21(6): 455-463.

Vukmirović, M., Bihari, N., Zahn, R. K., Muller, W. E. G., Batel, R. (1994) DNA damage in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of environmental contamination. Mar. Ecol. Prog. Ser., Vol. 109: 165-171.

Yildiz, H., Palaz, M., Bulut, M. (2006) Condition Indices of Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis* L. 1819) Growing on Susspended Ropes in Dardanelles. Journal of Food Technology, 4: 221–224.

Župan, I., Šarić, T. (2014) Prirast i indeks kondicije – dva važna čimbenika u uzgoju dagnji. MESO, XVI: 255 – 259.