

Utjecaj sezone na osjetljivost biomarkera obzirom na veličinu dagnje

Privileggio, Luca

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:137:376317>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

LUCA PRIVILEGGIO

Utjecaj sezone na osjetljivost biomarkera obzirom na veličinu dagnje

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2017.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

LUCA PRIVILEGGIO

Utjecaj sezone na osjetljivost biomarkera obzirom na veličinu dagnje

ZAVRŠNI RAD

JMBAG: 0303053748

Status: redoviti student

Kolegij: Stanična i molekularna biologija

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

Pula, 2017.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisan Luca Privileggio, kandidat za prvostupnika (*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, 15.09.2017.

Student: Luca Privileggio



IZJAVA

o korištenju autorskih djela

Ja, Luca Privileggio, dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "Utjecaj sezone na osjetljivost biomarkera obzirom na veličinu dagnje" 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, 15.09.2017.

Student: Luca Privileggio

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 prvostupnika (*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 2017., u 10:00 sati u Centru za istraživanje mora Institut Ruđer Bošković u Rovinju.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Luca Privileggio

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Fafandžel na strpljenju, pomoći i savjetima tijekom izrade završnog rada i provedbi eksperimenta.

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

Zahvaljujem kolegici Claudiji Fiorentin na prijedlozima pri odabiru teme i kolegi Matteu Benussiu na pomoći pri sakupljanju uzoraka.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Obilježja dagnje vrste <i>Mytilus galloprovincialis</i>	1
1.2. Stanište i rasprostranjenost mediteranske dagnje	2
1.3. Čimbenici koji utječu na prirast mediteranske dagnje tijekom sezona	3
1.4. <i>Mytilus galloprovincialis</i> kao bioindikator	4
1.4.1. Vrijeme preživljavanja na zraku (SOS test)	5
1.4.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)	5
1.4.3. Toksičnost tkiva dagnje (Microtox test)	5
2. CILJEVI RADA	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. Kemikalije	8
3.1.2. Područja uzorkovanja dagnji	8
3.2. METODE	10
3.2.1. Preživljavanje na zraku (SOS test)	10
3.2.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)	11
3.2.3. Toksičnost tkiva dagnje (Microtox test)	12
3.2.4. Obrada podataka	13
4. REZULTATI	14
4.1. Odgovor biomarkera u ljeti	14
4.1.1. Preživljavanje na zraku	14
4.1.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)	16
4.1.3. Toksičnost tkiva dagnje	17
4.2. Sezonske razlike u odgovoru biomarkera	18
4.2.1. Preživljavanje na zraku	18
4.2.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)	21
4.2.3. Toksičnost tkiva dagnje	24
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČCI	29
7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	30
8. BASIC DOCUMENTATION CARD	31
9. LITERATURA	32

1. UVOD

Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819), plava ili mediteranska dagnja je organizam koji se nastanjuje u obalnim područjima u umjereno toplim morima. Porijeklom je iz Sredozemnog mora ali pomoću balastnih voda je postala invazivna vrsta širom svijeta. Živi u kolonijama ukorijenjena bisusnim nitima na tvrdoj podlozi. Na životni vijek tog školjkaša utječe mnogo prirodnih ekoloških čimbenika, a i sam čovjek. Hrani se filtracijom morske vode što predstavlja prednost u određivanju količine toksikanata prisutnih u morskom okolišu.

1.1. Obilježja dagnje vrste *Mytilus galloprovincialis*

Mytilus galloprovincialis je školjkaš tamno plave, smeđe ili gotovo crne boje (Slika 1.). Građen je od dvije jednake, gotovo četverokutne ljušture. Ima tendenciju rasti više od ostalih vrsta školjkaša, pretežno 5-8 cm. U povoljnim uvjetima naraste i do 15 cm (Global Invasive Species Database, 2017). Mediteranska dagnja je organizam odvojenog spola, s većim udjelom mužjaka naspram ženki (54:46%) i s manjim udjelom hermafrodita (0,1%). Spol dagnje se razlikuje po boji tkiva. Spolno zreli mužjaci su bijele ili krem boje, dok su ženke crveno narančaste boje (Dardignac-Corbel, 1990).

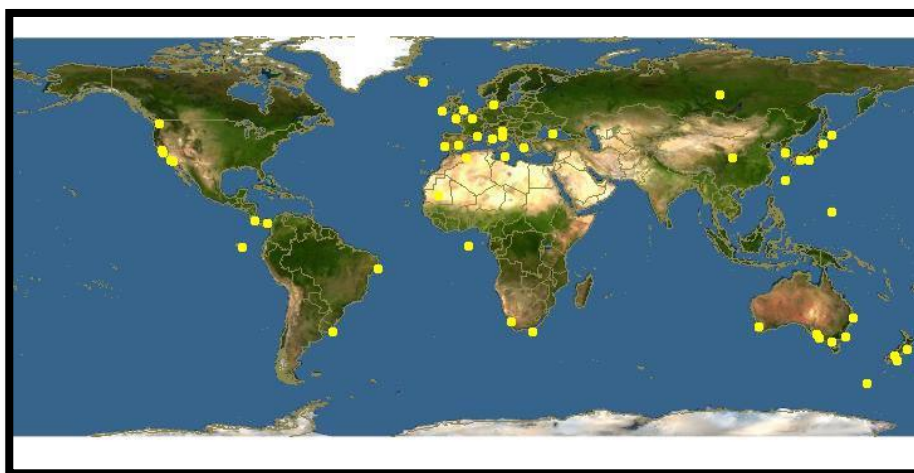


Slika 1. Kolonija mediteranske dagnje - *Mytilus galloprovincialis*

1.2. Stanište i rasprostranjenost mediteranske dagnje

Dagnje su pretežno prisutne u obalnim područjima i estuarijima te imaju široku geografsku distribuciju. Mediteranska dagnja živi na područjima plime i oseke u blizini obale: na kamenitoj i pješčanoj podlozi, na konopima, usidrenim brodovima, sidrima, plutačama i kavezima za uzgajalište. Pričvršćuje se za podlogu bisusnim nitima stvarajući kolonije.

Plava ili mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* je porijeklom s mediteranske obale, Crnog mora i Jadranskog mora (Branch i Stephanni, 2004). Područja najgušćeg prirodnog naseljavanja dagnje u Hrvatskoj su: Novigradsko i Karinsko more, Šibenski zaljev i kanal, Limski kanal te Malostonski i Pulski zaljev. (Gosling, 1992). U umjerenim područjima gdje postoje velike luke došlo je do velike kolonizacije te vrste. Carlton (1992), Robinson i Griffiths (2002) i Geller (1999) su ustanovili da su balastne vode uzrok širenja dagnji cijelim svijetom (Slika 2.) te svojom pojavom utječu negativno na druge autohtone vrste. Kada je *Mytilus galloprovincialis* alohtona vrsta u nekom području obično zahtjeva stjenovitu obalu s visokom stopom protoka vode (Carlton, 1992). Za razliku od ostalih 26 Azijskih i Atlantskih vrsta školjkaša koje su uvedene u Pacifička područja, samo se jedna uvedena vrsta, mediteranska dagnja, javlja u otvorenom dijelu obale; sve ostale vrste su ograničene na ušća i uvale (Global Invasive Species Database, 2017). Kao invazivna vrsta se pojavila uz obale Južne Afrike, Sjeverne i Južne Amerike, Japana, Australije i Novog Zelanda.



Slika 2. Globalna rasprostranjenost dagnje vrste *Mytilus galloprovincialis*

Dagnja, *Mytilus galloprovincialis* se uzgaja u većini mediteranskih zemalja te je u 2009. godini proizvodnja iznosila 119.964 tona dok je vrhunac postignut 2003. godine s proizvodnjom od 146.368 tona, s Grčkom i Španjolskom među najvećim proizvođačima (FAO, 2010). Hrvatska proizvodnja nije na rangu drugih zemalja u Europi, već je manja u iznosu od 3000 tona godišnje (Mišura i sur., 2008).

1.3. Čimbenici koji utječu na prirast mediteranske dagnje tijekom sezona

Meditranska dagnja je složeni organizam. Na njezin život utječe više čimbenika: njezin genotip, dob i mnoštvo ekoloških faktora (Gosling, 1992). Hrana je najvažniji ekološki čimbenik koji će doprinijeti razvoju i rastu dagnje i mora je biti u dovoljnoj količini i odgovarajućem sastavu (Wong i Levinton, 2004; Egzeta - Balić i sur., 2012). Mediteranska dagnja se hrani česticama u rasponu od 1 μm do 200 μm . Dagnje se hrane različitim tvarima u morskom okruženju, ali najvažniji izvor hrane su fitoplanktonski organizmi. Novija istraživanja su pokazala da organski detritus, bakterije, anorganske čestice, razgrađena organska tvar i neke skupine zooplanktona mogu imati značajnu ulogu u hranjenju dagnje (Sidari i sur., 1998; Egzeta-Balić i sur., 2012; Peharda i sur., 2012). Uz određenu količinu i sastav hrane za rast jedinke bitni su salinitet, temperatura, pH i izloženost zraku. Dotok slatke vode pospješuje rast dagnje zbog povećane količine hranjivih tvari, a ne zbog smanjenog utjecaja saliniteta, koji zapravo može imati negativan utjecaj na rast i u nekim slučajevima može biti letalan. Za umjeren rast dagnje salinitet mora biti između 25-28 ‰, iako mogu preživjeti u težim uvjetima pri 18 ‰ bez poteškoće (Gosling, 1992). Gustoća nasada može imati važan utjecaj na rast dagnji. U pregustim nasadima male jedinke ostaju zarobljene između većih jedinki i njihovih bisusnih niti što smanjuje njihovu sposobnost kompeticije za hranom (Župan i Šarić, 2014).

Temperatura i hrana su pozitivno korelirane. Kada se govori o raznim sezonama prvenstveno se misli na razlike u temperaturi koje utječu izravno na razvitak dagnji; no temperatura je usko povezana s količinom hrane u morskom okolišu. Kada bi razvitak dagnji bio izravno proporcionalan samoj temperaturi, njihova stopa rasta bila bi manja u hladnijim mjesecima (siječanj-travanj) a veća u toplijim (svibanj-kolovoz), no istraživanja dokazuju da je najveći razvitak jedinke pri temperaturama između 10-20°C zbog najveće količine hranjivih tvari (Peharda i sur., 2007). Period velikog razvoja

školjkaša se poklapa s povećanjem primarne proizvodnje u Jadranskom moru (Masarović i sur., 2005). Kada se radi o preživljavanju na zraku (SOS test), istraživanja kažu kako postoji negativna korelacija između preživljavanja i temperature. Najnižu toleranciju na anoksiju su imale dagnje uzorkovane u mjesecu kolovozu kada je temperatura mora bila najviša. Godine 1993. Eertman i suradnici su zaključili da je veća energetska potražnja, potaknuta temperaturom u periodu razvoja gonada, mogla sniziti sposobnost preživljavanja na zraku. *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu je u stanju gametogeneze tijekom ljeta, spreman za mriještenje u jesen (Hrs-Brenko, 1971).

1.4. *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikator

Meditranska dagnja je odličan indikatorski organizam zbog svoje sposobnosti filtracije morske vode kroz škrge. Na taj se način osigurava vremenski povezani odgovor na izloženost onečišćivala, toksikanata ili teških metala (Viarengo i Canesi, 1991). Dagnje cijeli život provedu na istome mjestu kao sedentarni organizmi te u vlastitim tkivima akumuliraju odgovarajuću količinu zagađivala određenog područja. Podnose veliki raspon ekoloških uvjeta uključujući velike količine mnogih vrsta zagađivala. Dagnje su takozvani „suspension-feeders“ što ukazuje na mogućnost pumpanja velike količine morske vode (6 litara u jednome satu) zbog hranjenja. Uz hranjive tvari dagnje mogu unijeti u svoj organizam toksične tvari i na taj način je moguće utvrditi tragove zagađivala iz morskog okoliša. U usporedbi s ribama i rakovima, školjkaši imaju nisku aktivnost enzima koji metaboliziraju organska zagađivala kao npr. aromatske ugljikohidrate i PCB, stoga koncentracija zagađivala ostaje ista u tkivima školjkaša kao i u morskom okruženju. Identifikacija promjena u organizmu dagnje ukazuje na lošu kvalitetu okoliša, što podrazumijeva područje pod utjecajem poljoprivrednog, industrijskog i kanalizacijskog ispusta, slučajnim ispuštanjem različitih kemikalija i atmosferskim padalinama. Jeftini uzgoj dagnji, stabilne i velike populacije pružaju podatke o količini zagađivala za kratkoročne i dugoročne vremenske promjene (Gosling, 1992).

Zbog održavanja morskog ekosustava i ljudskog zdravlja bitno je pratiti stanje morskog okoliša a korištenje mediteranske dagnje za mjerenje biomarkera ili bioloških pokazatelja stanja okoliša pospješuje napredak analiza za monitoring nekog područja.

Korišteni biomarkeri za procjenu mogućeg onečišćenja okoliša su: vrijeme preživljavanja na zraku (SOS test), indeks probavne žlijezde (IPŽ) i toksičnost tkiva dagnje (Microtox test) (Petrović i sur., 2004).

1.4.1. Vrijeme preživljavanja na zraku (SOS test)

Test preživljavanja na zraku (SOS-Stress on stress test) mjeri sposobnost preživljavanja dagnje u anaerobnim uvjetima izvan morske vode. Iako je vjerojatnost da će se dagnja naći izvan mora u prirodnim uvjetima više od nekoliko dana vrlo mala, metoda se koristi kako bi se testirao „fitness“ dagnje. Dokazano je da dagnje izložene zagađivalima ugibaju mnogo ranije na zraku nego jedinke preuzete iz čistog područja (Viarengo i sur., 1995; de Zwaan i sur., 1995; Thomas i sur., 1999a i Nesto i sur., 2004).

1.4.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)

Probavna žlijezda ima ulogu u skladištenju metaboličke energije kod dagnje koja se upotrebljava u stresnim i teškim uvjetima. Indeks probavne žlijezde se mijenja ovisno o fiziološkom stresu dagnje. Stres utječe negativno na probavnu žlijezdu mijenjajući njezin biokemijski sastav zbog uporabe zaliha metaboličke skladištene energije (Seed i Suchanek, 1992).

1.4.3. Toksičnost tkiva dagnje (Microtox test)

Mediterranska dagnja nastanjuje razna područja koja mogu biti podložna nekim zagađivalima. Uz hranjive tvari dagnje mogu unijeti u svoj organizam toksične tvari i na taj način je moguće utvrditi tragove zagađivala iz morskog okoliša. Microtox® je akutni test toksičnosti tkiva dagnje koji ukazuje na zagađena područja. Test koristi morsku luminescentnu bakteriju *Vibrio fischeri* (poznata kao *Photobacterium phosphoreum*) kao mjerilo. Ova bakterija emitira svjetlost kao rezultat normalnih metaboličkih procesa. Smanjenje luminescentne sposobnosti tijekom izlaganja zagađivalima uzima se kao mjera toksičnosti (Environmental Canada, 1992).

Analize provedene zimi na lokacijama u sjevernom Jadranu (Fiorentin C., 2016), ukazuju da veličina jedinki dagnje različito utječe na vrijednosti biomarkera u dagnji s tim da jedinke > 6 cm imaju veći raspon odgovora biomarkera i najlakše prepoznaju populacije koje žive u nepovoljnim uvjetima. Najveće promjene su opisane na postajama marina Pula i rovinjska tržnica zbog veće količine toksičnih tvari. Testom preživljavanja na zraku je ustanovljeno da veličina jedinki utječe na preživljavanje dagnji i da velike dagnje najduže preživljavaju u odnosu na sve tri veličinske kategorije. Na postajama marina Pula i rovinjska bolnica testovi ne ovise o veličini jer ukazuju na različitu kategoriju kvalitete mora. Za indeks probavne žlijezde je utvrđeno da testovi s jedinkama < 4 cm ne pokazuju postaje pod fiziološkim stresom. Testovi s većim jedinkama mogli su razlučiti okolišna područja pod različitim stupnjem stresa. Akumulacija toksičnih tvari u tkivima dagnji povećava se s njihovom veličinom, što ukazuje na veću akumulaciju toksikanata sa starošću dagnji. Toksično stanje jedinki nije u odnosu s veličinom dagnje već je ono mjesno specifično.

Pored antropogenog utjecaja, na ponašanje biomarkera utječu i priobalni čimbenici. Potrebno je istražiti kakav je utjecaj na ponašanje u ljeti kada su temperature visoke i dagnja metabolički najaktivnija.

2. CILJEVI RADA

1. Odrediti vrijeme preživljavanja na zraku, toksičnost tkiva dagnje i indeks probavne žlijezde za tri veličinske kategorije dagnje vrste *Mytilus galloprovincialis* uzorkovane na šest postaja u ljeti.
2. Ustanoviti da li ljeti postoji ovisnost o morfološkim karakteristikama i koja veličinska kategorija može najbolje poslužiti u razlikovanju postaja.
3. Ustanoviti da li postoji sezonska razlika (ljet-zima) u ponašanju različitih veličinskih kategorija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

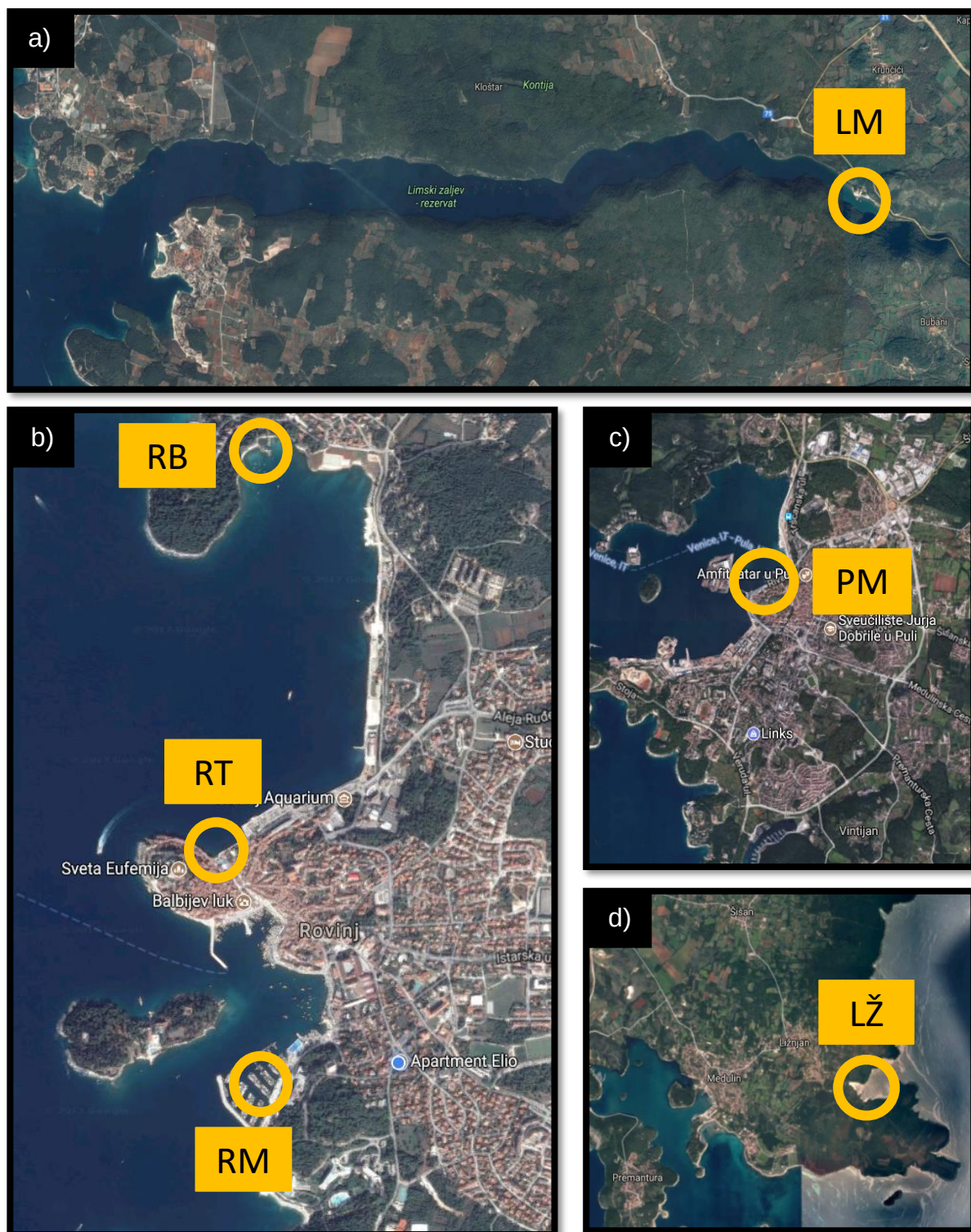
Sve kemikalije bile su analitičke čistoće. U sklopu Mikrotoks testa korištene su bioluminescentne bakterije *Vibrio fischeri* kako bi se odredila toksičnost tkiva uzorkovanih dagnji. Uz bakterije korištene su otopine: otopina za razrjeđivanje uzorka, otopina za rekonstrukciju bakterija i medij za bakterije (Macherey Nagel, Njemačka).

3.1.2. Područja uzorkovanja dagnji

Uzorkovanje dagnji vrste *Mytilus galloprovincialis* bilo je na šest raznih postaja s Istarskog priobalja (Slika 3). Od sjevera prema jugu jedinice se uzorkovane sa područja Limskog kanala (LM) (Slika 4. a), rovinjske bolnice u uvali Valdibora (RB), rovinjske tržnice u uvali Valdibora (RT), rovinjske marine (RM) (Slika 4. b), pulske marine (PM) (Slika 4. c) i ližnjanske obale (LŽ) (Slika 4. d) kao što je vidljivo na Slici 3.



Slika 3. Postaje uzorkovanja dagnje vrste *Mytilus galloprovincialis* na području Istre: LM, RB, RT, RM, PM, LŽ.



Slika 4. Postaje uzorkovanja dagnje vrste *Mytilus galloprovincialis*. a) LM, b) RB, RT, RM, c) PM, d) LŽ.

Postaja LM se nalazi u blizini uzgajališta riba i školjaka. U rovinjskom akvatoriju, postaje u blizini uvale Valdibora (RT i RB) su pod utjecajem prerađivačke riblje industrije tvornice Mirna i kanalizacije, dok je postaja RM pod utjecajem pogonskog goriva za plovidbu zbog blizine benzinske crpke kao i postaja PM u Puli. Uspoređujući postaje, postaja na Ližnjanskoj obali (LŽ) izložena je malom antropogenom utjecaju.

3.2. METODE

3.2.1. Preživljavanje na zraku (SOS test)

Test preživljavanja na zraku je proveden na 30 jedinki dagnje, vrste *Mytilus galloprovincialis*, za tri veličinske kategorije (<4 cm, 4-6 cm, >6 cm) sa šest postaja. Dagnje su postavljene u plastične posude i pokrivene aluminijskom folijom, održane na konstantnoj temperaturi i vlazi (Slike 5.a. i 5.b.). Jednom dnevnom, u jutarnjem terminu, provjeravala se smrtnost dagnji. Dagnje se smatraju uginulim kada se njihove ljušture ne zatvore nakon fizičkog dodira (Kaplan i Meier, 1958). Rezultat SOS testa je prikazan kao LT₅₀ (Lethal time 50) odnosno vrijeme potrebno da uquine 50% jedinki.



Slika 5.a. Tri veličinske kategorije dagnji vrste *M. galloprovincialis*, postavljene za određivanje preživljavanja na zraku (SOS test).



Slika 5.b. Dagnje vrste *M. galloprovincialis* u laboratorijskim uvjetima za određivanje sposobnosti preživljavanja na zraku (SOS test).

3.2.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)

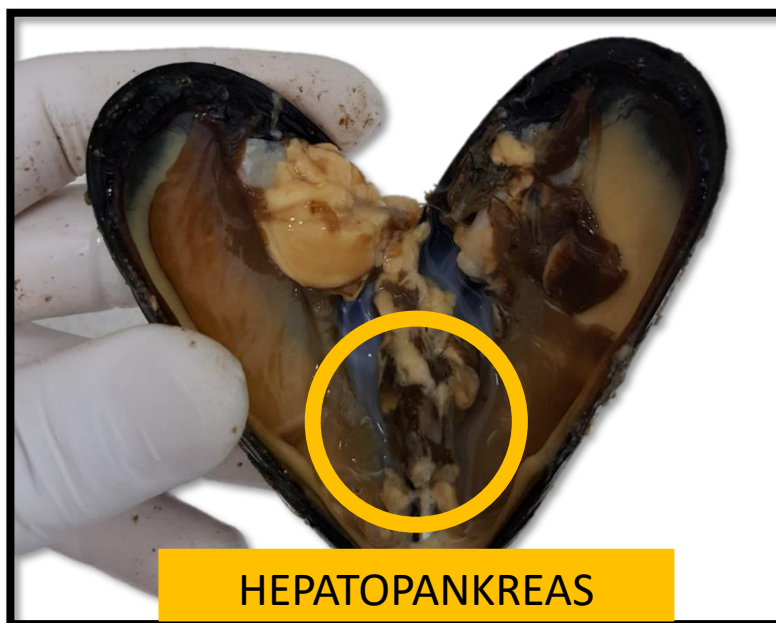
Za analizu indeksa probavne žlijezde odabrano je 11 dagnji, poredane su po veličini, kako bi se dobio raspon duljine (Slika 6.). Mjerena je posebno duljina, širina i visina svake jedinice. Vagana je ukupna masa dagnje i masa probavne žlijezde koja je odstranjena od tkiva (Slika 7.); (Cartier i sur., 2004.).



Slika 6. Dagnje poredane po veličini radi mjerenja indeksa probavne žlijezde

Indeks probavne žlijezde se računa kao odnos između mase probavne žlijezde i ukupne mase dagnje (Cartier i sur., 2004.):

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



Slika 7. Anatomski prikaz probavne žlijezde (hepatopankreasa) dagnje vrste *M. galloprovincialis*.

3.2.3. Toksičnost tkiva dagnje (Microtox test)

Za određivanje toksičnosti tkiva dagnje korišten je Microtox® (Macharey Nagel, Njemačka) test (Cotou i sur., 2002). Sa svih postaja uzete su po tri dagnje za svaku veličinsku frakciju. Iz ljuštura dagnji je odstranjeno tkivo, zatim je isjeckano i pomiješano međusobno. Od cijele mase tkiva bilo je potrebno uzorkovati točno 1 g tkiva i pomiješati s puferom za razrjeđivanje (Machery Nagel, Njemačka) u omjeru 1:3 (w/v). Uzorak se homogenizira i razdvaja u dvije epruvete koje su spremne za centrifugiranje pri 4°C, 2000 okretaja/min na 15 min. Izdvojeni supernatant se razrijedi otopinom za razrjeđivanje u omjeru 1:1 (v/v). Ukupno ima 8 razrjeđenja među kojima prvo sadrži 500 µl, a posljednje 4 µl. Prije početka testa izmjerena je slijepa proba s otopinom za razrjeđivanje. Komercijalne bakterije, koje služe kao mjerilo, moraju se rehidrirati u rekonstrukcijskoj otopini jer dolaze u liofiliziranom obliku. Zatim su postavljene u instrument za mjerenje luminescencije pri temperaturi od 16°C. Ukupno

ima 9 epruveta, 8 epruveta za svako razrjeđenje i 1 epruveta za slijepu probu. U svakoj epruveti se dodaje 10 μL bakterija i 500 μL bakterijskog medija te se postavljaju u instrument za mjerenje luminescencije. Softverski program vodi analizu epruveta i mjeri luminescenciju bakterija za svaki uzorak te nakon 15 min dođe do rezultata, tj. razine toksičnosti, koja je izražena kao EC_{50} .

3.2.4. Obrada podataka

Za obradu podataka korištene su osnovne statističke metode u programu „Microsoft Office Excell“. Razlike između podataka testirane su ANOVA (Fischer-post hoc) testom. Razlike između dva pravca izračunate su internetskim programom „Free Statistics Calculators“.

3.2.4.1. PROBIT analiza

Probit analiza se obično koristi u toksikologiji za određivanje toksičnosti kemikalija na živi organizam. Testiranjem odgovora organizma pod djelovanjem različitih koncentracija određenih kemikalija, uspoređuju se koncentracije na kojima se susreće odgovor. Odgovor je uvijek binoman što označava smrt ili preživljavanje organizma. Odnos između odgovora i raznih koncentracija je uvijek karakteriziran logističkom funkcijom. Probit analiza pretvara logističku funkciju u linearnu funkciju, zatim se provodi regresija nad njihovim odnosom (Vincent, 2017.). Cilj analize je izračunati LC_{50} (Letal Concentration), koji označava potrebnu koncentraciju kod koje 50% uzoraka ugiba, te CI (Confidence Interval) tj. raspon koncentracije pri kojoj organizam ugiba s vjerojatnošću od 95%.

Probit analiza može se provesti pomoću jedne od tri metode: a) korištenje tablica za procjenu probita i povezivanje međusobnih odnosa, b) ručno izračunavanje probita, koeficijenta regresije i intervala pouzdanosti, c) pomoću statističkog programa.

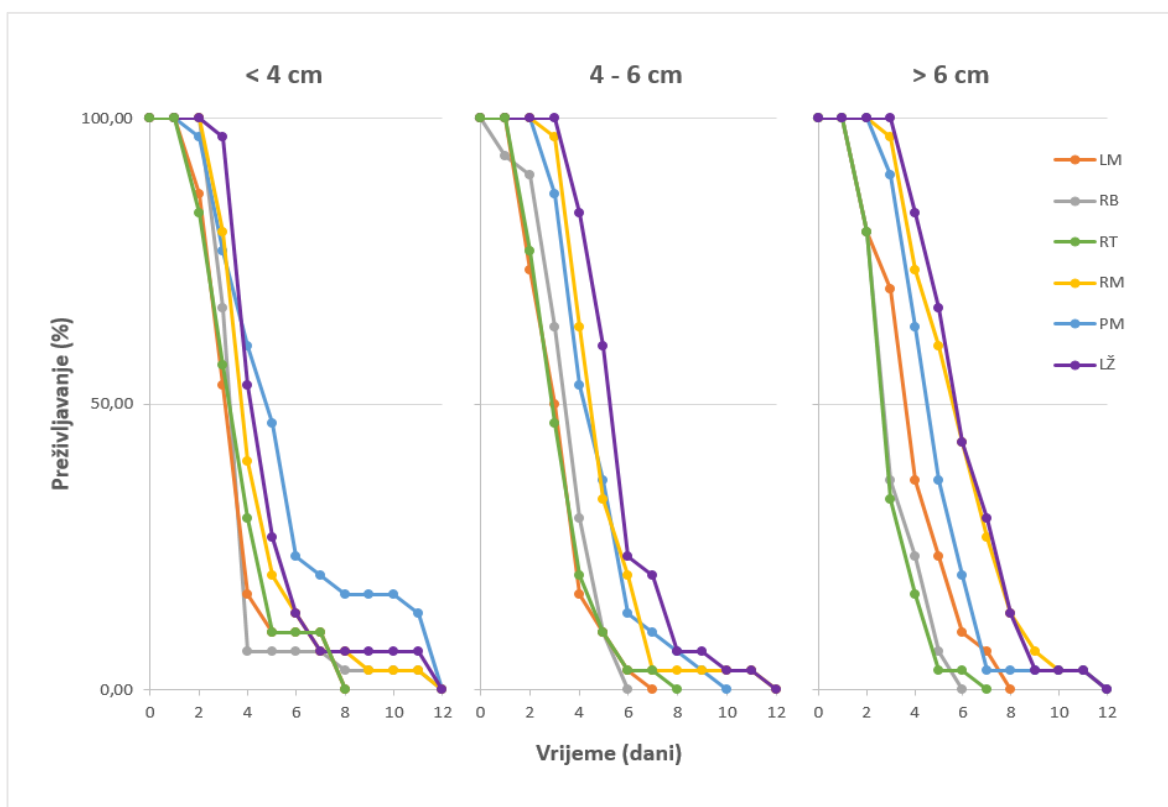
U ovome radu Probit analiza nije korištena za ispitivanje toksične koncentracije neke kemikalije već za izračun vremena, u danima, pri kojem 50% dagnja ugiba pri svakoj lokaciji za svaku veličinsku kategoriju. Umjesto koncentracije (LC_{50}) koristi se mjerilo vremena u danima (LT_{50} - Lethal Time).

4. REZULTATI

4.1. Odgovor biomarkera u ljeti

4.1.1. Preživljavanje na zraku

Fiziološko stanje dagnji tijekom preživljavanja na zraku je prikazano krivuljama na Slici 8. Pretežno svi uzorci preživljavaju prva 2-3 dana ali ugibaju nakon 12 dana. Za jedinke < 4 cm LT_{50} je u rasponu od 2,3 (RB) preko 3,1 (LM), 3,1 (RT), 3,5 (RM), 4,6 (LŽ) do 4,7 (PM). Za jedinke veličine između 4 - 6 cm LT_{50} je u rasponu od 2,6 (RB) preko 2,8 (LM), 2,8 (RT), 4,4 (PM), 4,5 (RM) do 5,3 (LŽ). Za jedinke > 6 cm LT_{50} je u rasponu od 2,7 (RT) preko 2,8 (RB), 3,3 (LM), 4,4 (PM), 5,5 (RM) do 5,6 (LŽ). Uzimajući u obzir vrijednosti LT_{50} svih veličinskih kategorija najkraće su preživjeli uzorci sa postaje RB a najdulje uzorci sa postaje LŽ.



Slika 8. Preživljavanje dagnji u anaerobnim uvjetima za tri veličinske kategorije (< 4 cm, 4 - 6 cm, > 6 cm) sa šest postaja.

Uzorci s postaja RM i LŽ ukazuju na bolju mogućnost preživljavanja na zraku s povećanjem veličine dagnje. Postaje RB, PM, LM i RT ne slijede takav trend već se njihova sposobnost preživljavanja na zraku smanjuje s povećanjem veličine dagnje ili ostaje približno ista kroz sve tri veličinske kategorije što ukazuje da trend ovisi o postajama (Tablica 1). Dagnje > 6 cm iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja zbog najvećeg raspona LT_{50} , zatim slijede dagnje veličine između 4-6 cm i dagnje < 4. Takav rezultat ukazuje na rastući trend diskriminacije postaja s povećanjem veličine dagnji.

Tablica 1. Vrijednosti $LT_{50}(IP)$, 95% za tri veličinske kategorije sa šest postaja.

POSTAJE	$LT_{50}(IP)$, 95%		
	< 4 cm	4 - 6 cm	> 6 cm
LM	3,1 (2,5 - 3,8)	2,8 (2,3 - 3,3)	3,3 (2,7 - 4,1)
RB	2,3 (/ - /)	2,6 (2,1 - 3,3)	2,8 (2,4 - 3,2)
RT	3,1 (2,6 - 3,9)	2,8 (2,3 - 3,5)	2,7 (2,3 - 3,2)
RM	3,5 (2,6 - 4,8)	4,5 (3,6 - 5,7)	5,5 (4,6 - 6,5)
PM	4,7 (3,7 - 6,1)	4,4 (3,7 - 5,1)	4,4 (3,7 - 5,3)
LŽ	4,6 (3,8 - 5,6)	5,3 (4,5 - 6,2)	5,6 (4,8 - 6,5)

Ako se krivulje pojedinih veličinskih kategorija uspoređuju međusobno za svaku postaju, primjećuje se da nema značajnih statističkih razlika na tri postaje kao što je prikazano u Tablici 2. Male (M) i srednje (S) dagnje se razlikuju na postaji PM, male (M) i velike (V) na postajama PM, RM, LŽ te srednje (S) i velike (V) dagnje na postaji RM.

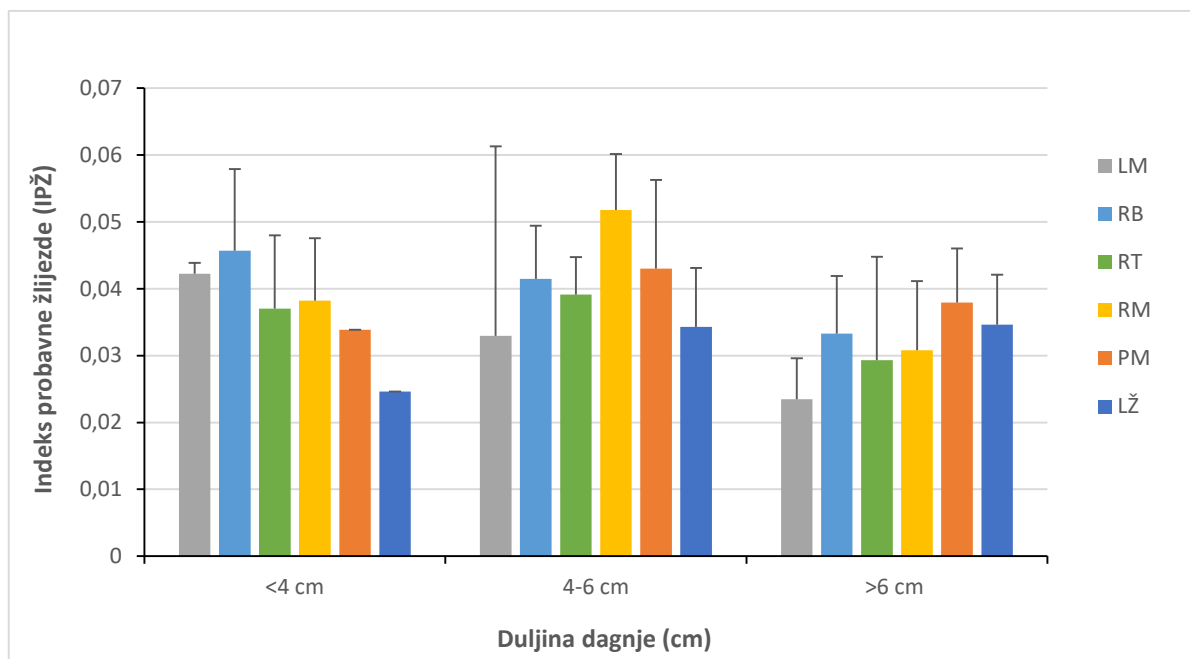
Tablica 2. Razlike u preživljavanju u anaerobnim uvjetima između tri veličinske kategorije dagnji s istih postaja u ljeti. M (< 4 cm), S (4 - 6 cm), V (> 6 cm). „=“ - nema statističke razlike između veličinskih kategorija, $p > 0,05$; „≠“ - ustanovljena je statistička razlika između veličinskih kategorija, $p < 0,05$; „/“ - nedovoljan broj podataka za daljnju obradu.

Postaje	(ANOVA, $P < 0,05$)		
LM	M = S	M = V	S = V
RB	/	/	S = V
RT	M = S	M = V	S = V
RM	M = S	M ≠ V	S ≠ V
PM	M ≠ S	M ≠ V	S = V
LŽ	M = S	M ≠ V	S = V

4.1.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)

Histogram na Slici 9. prikazuje srednje vrijednosti indeksa probavne žlijezde (IPŽ) za svaku veličinsku kategoriju sa šest postaja u ljeti. Najnižu vrijednost IPŽ-a za dagnje < 4 cm imaju uzorci s postaje LŽ (0,025) dok za dagnje između 4-6 cm (0,033) i > 6 cm (0,023) s postaje LM. Najvišu vrijednost IPŽ-a za dagnje < 4 cm imaju uzorci s postaje RB (0,046), za dagnje između 4-6 cm s postaje RM (0,052) i za dagnje > 6 cm s postaje PM (0,038).

Postaje LM i RB imaju opadajući trend indeksa probavne žlijezde sa povećanjem veličine dagnje, postaje RT, RM i PM imaju rastući trend sve do veličine dagnja od 4-6 cm i nakon toga opadajući. Postaja LŽ ima rastući trend sa povećanjem veličine dagnje. Dagnje veličine > 6 cm iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja.



Slika 9. Indeks probavne žlijezde uzoraka dagnji sa šest postaja, za tri veličinske kategorije.

Vrijednosti indeksa probavne žlijezde statistički se ne razlikuju (ANOVA, $p > 0,05$) između veličinskih kategorija pojedinih postaja, osim za postaje LM gdje se vrijednosti indeksa razlikuju za male i velike dagnje i MR gdje se indeksi razlikuju između srednjih i velikih (ANOVA, $p < 0,05$). Uspoređujući međusobno postaje za sve veličine zaključuje se da se postaje PM i LM razlikuju (ANOVA, $p < 0,05$) kada se promatraju velike dagnje. Sve ostale postaje se međusobno statistički ne razlikuju (ANOVA, $p > 0,05$) unutar veličinskih kategorija.

4.1.3. Toksičnost tkiva dagnje

Vrijednosti toksičnosti tkiva dagnji za pojedinu veličinsku kategoriju sa šest mjernih postaja prikazani su u Tablici 3. Jedinke < 4 cm pokazuju najveću toksičnost na postaji MR (32 (18-55)) a najnižu na postaji LM (174 (115-265)). Jedinke veličine između 4-6 cm imaju najveću toksičnost na postaji RM (10 (4-15)) a najmanju na postaji LM i TR (> 500). Jedinke > 6 cm pokazuju najveću toksičnost na postaji RM (42 (22-81)) a najmanju na postaji LM (339 (210-547)).

Tablica 3. Toksičnost tkiva dagnji pojedinih veličinskih kategorija sa šest postaja izražena kao EC₅₀. „NO DATA“ - nedovoljno podataka za daljnju obradu. **Crveno** - toksično.

Postaje	EC ₅₀		
	< 4 cm	4 - 6 cm	> 6 cm
LM	174 (115 - 265)	> 500	339 (210 - 547)
RB	96 (71 - 130)	83 (69 - 100)	220 (130 - 374)
RT	72 (36 - 141)	> 500	113 (53 - 242)
RM	32 (18 - 55)	10 (4 - 15)	42 (22 - 81)
PM	111 (62 - 111)	140 (92 - 214)	457 (193 - 1017)
LŽ	NO DATA	216 (95 - 492)	NO DATA

Na postaji RM toksičnost tkiva dagnje raste do veličine između 4-6 cm a zatim opada s povećanjem veličine. Na postajama LM i RT toksičnost tkiva dagnje opada do veličine između 4-6 cm a zatim raste s povećanjem veličine dok postaja PM ukazuje na opadajući trend toksičnosti s povećanjem veličine dagnje. Jedina toksična vrijednost izmjerena je u srednjim dagnjama postaje RM (10 (4-15)), sve ostale vrijednosti nisu toksične. Jedinke veličine između 4-6 cm iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja, zatim slijede dagnje > 6 cm i < 4 cm.

4.2. Sezonske razlike u odgovoru biomarkera

4.2.1. Preživljavanje na zraku

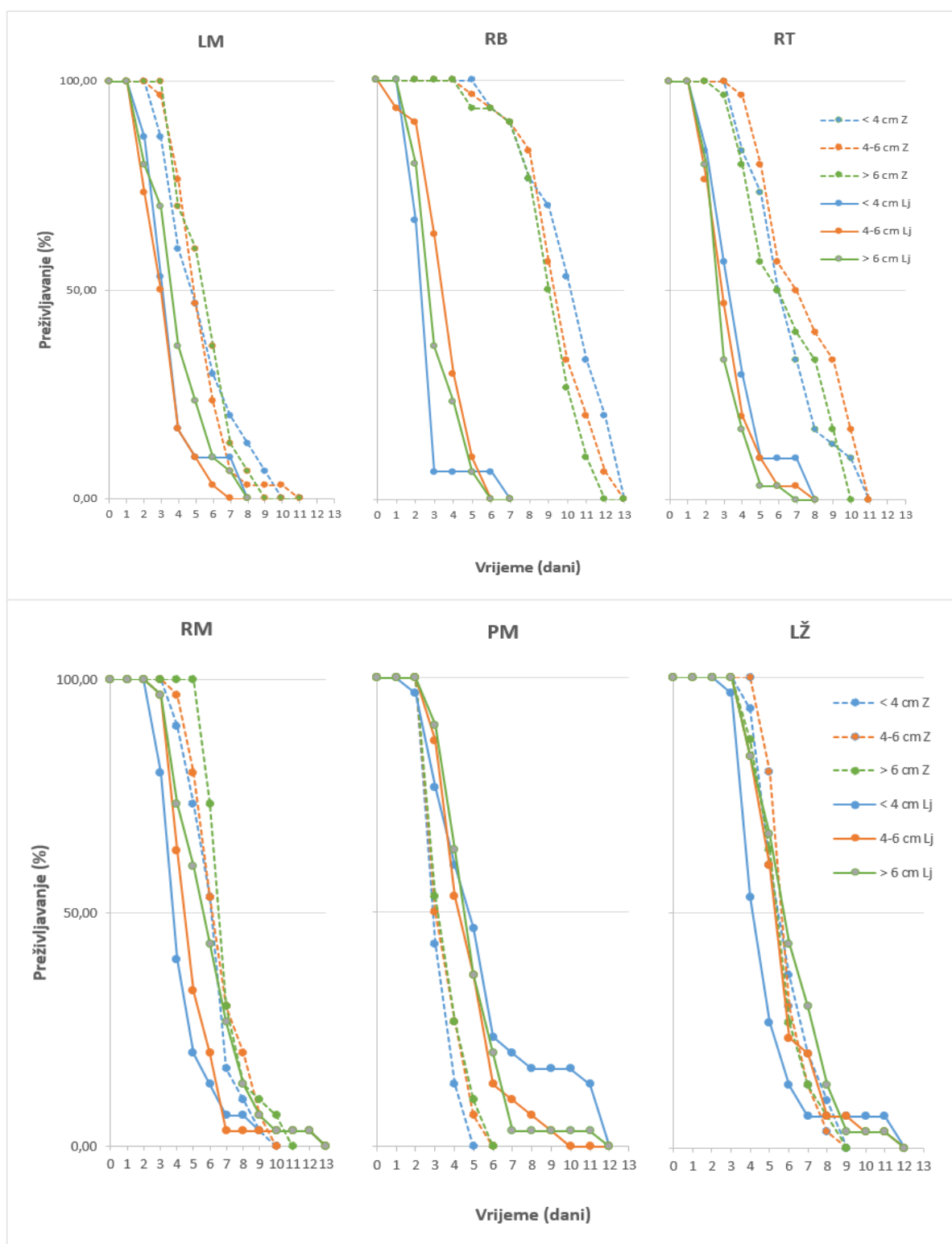
U tablici 4. prikazane su vrijednosti LT₅₀ (IP), 95% za tri veličinske kategorije (< 4 cm, 4-6 cm, > 6 cm) sa šest postaja kroz dvije sezone (Z-zima; Lj-ljeto). U zimi i ljeti uzorci pretežno preživljavaju u potpunosti prva 3-4 dana te ugibaju u potpunosti nakon 13 dana. Zimi, uzimajući u obzir sve tri veličinske kategorije, najkraće su preživjele dagnje s postaje PM do 3 dana a najduže s postaje RB 8-9 dana, za razliku od ljeta gdje su dagnje s postaje RB preživjele najkraće 2-3 dana a najduže dagnje s postaje LŽ 5-6 dana. Razlike u vremenu preživljavanja kroz dvije sezone prikazane su grafički na Slici 10.

Tablica 4. Vrijednosti LT_{50} (IP), 95% za tri veličinske kategorije sa šest postaja za dvije sezone (Z - zima; Lj - ljeto).

Duljina	Postaje						
		LM	RB	RT	RM	PM	LŽ
< 4 cm	Z	4,7 (3,9 - 5,6)	9,1 (8,2 - 40,2)	5,9 (5,0 - 6,8)	5,7 (5,1 - 6,3)	2,9 (/ - /)	5,5 (5,0 - 6,1)
	Lj	3,1 (2,5 - 3,8)	2,3 (/ - /)	3,1 (2,6 - 3,9)	3,5 (2,6 - 4,8)	4,7 (3,7 - 6,1)	4,6 (3,8 - 5,6)
4 - 6 cm	Z	4,1 (3,4 - 5,0)	8,6 (7,7 - 9,6)	6,7 (5,9 - 7,7)	6,1 (5,5 - 6,8)	3 (/ - /)	5,6 (/ - /)
	Lj	2,8 (2,3 - 3,3)	2,6 (2,1 - 3,3)	2,8 (2,3 - 3,5)	4,5 (3,6 - 5,7)	4,4 (3,7 - 5,1)	5,3 (4,5 - 6,2)
> 6 cm	Z	5,1 (4,5 - 5,7)	8,2 (7,4 - 9,1)	6,3 (5,6 - 7,2)	6,5 (/ - /)	3,1 (/ - /)	5,4 (/ - /)
	Lj	3,3 (2,7 - 4,1)	2,8 (2,4 - 3,2)	2,7 (2,3 - 3,2)	5,5 (4,6 - 6,5)	4,4 (3,7 - 5,3)	5,6 (4,8 - 6,5)

Za jedinke < 4 cm LT_{50} zimi je u rasponu od 2.8 (MP), preko 4.7 (LM), 5.2 (LŽ), 6.0 (RT), 6.1 (RM) do 10.2 (RB) dok ljeti od 2,3 (RB) preko 3,1 (LM), 3,1 (RT), 3,5 (RM), 4,6 (LŽ) do 4,7 (PM). Za jedinke između 4 - 6 cm LT_{50} zimi je u rasponu od 3.0 (PM), preko 4.9 (LM), 5.7 (LŽ), 6.0 (RT), 6.1 (RM) do 9.2 (RB) dok ljeti od 2,6 (RB) preko 2,8 (LM), 2,8 (RT), 4,4 (PM), 4,5 (RM) do 5,3 (LŽ). Za jedinke > 6 cm LT_{50} zimi je u rasponu od 3.1 (PM), preko 5.3 (LŽ), 5.5 (LM), 6.5 (RM) i 7.5 (RT) do 9.0 (RB) dok ljeti od 2,7 (RT) preko 2,8 (RB), 3,3 (LM), 4,4 (PM), 5,5 (RM) do 5,6 (LŽ). Rezultati ukazuju na različito rangiranje postaja zimi i ljeti.

Uspoređujući zimu i ljeto, postaje predstavljaju negdje iste a negdje različite trendove vrijednosti LT_{50} za tri veličine dagnje. Postaja LM i RM imaju isti trend zimi i ljeti, LM s najmanjom vrijednošću LT_{50} kod dagnja veličine između 4-6 cm, a RM gdje LT_{50} raste s veličinom dagnje. Postaje RB, PM, LŽ i RT imaju različiti trend zimi i ljeti. Zimi na postaji RB vrijednosti LT_{50} opadaju sa veličinom dagnje dok ljeti rastu s veličinom. Zimi na postaji PM vrijednosti LT_{50} rastu s veličinom dagnje dok ljeti opadaju s veličinom. Zimi postaja LŽ ima linearan trend kroz sve tri veličine dok se ljeti trend povećava s veličinom. Zimi postaja RT ima najveću vrijednost LT_{50} kod dagnji veličine između 4-6 cm a ljeti ona opada s veličinom. Takvo što upućuje na zaključak da zimi dagnje < 4 iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja dok ljeti to čine dagnje > 6 cm.



Slika 10. Preživljavanje dagnji na zraku za tri veličinske kategorije (< 4 cm, 4 - 6 cm, > 6 cm) sa šest postaja, za dvije sezone (Z - zima; Lj - ljeto). Isprekidana crta - Z (zima); puna crta - Lj (ljeto).

Uspoređujući zasebno svaku veličinsku kategoriju s istih postaja kroz dvije sezone, dobivaju se rezultati u Tablici 5. Male (M) i srednje dagnje (S) s postaje LM su dokazano iste, bez značajnih statističkih razlika (ANOVA, $p > 0,05$). Odnos srednjih (S) i velikih dagnji (V) s postaje RB, velikih (V) s postaje LM, malih (M) i srednjih (S) s postaje RM, malih (M) s postaje LŽ i svih tri veličina s postaje RT ukazuje na statističku razliku u vremenu preživljavanja dagnji između ljeta i zime (ANOVA, $p < 0,05$). Ustanovljeno je da postoji razlika između postaja zimi i ljeti.

Tablica 5. Razlike u preživljavanju u anaerobnim uvjetima za tri veličinskih kategorija dagnji, s istih postaja, između dvije sezone (Z - zima; Lj - ljeto). M (< 4 cm), S (4 - 6 cm), V (> 6 cm). „=“ - nema statističke razlike između sezona; „≠“ - ustanovljena je statistička razlika između sezona, $p < 0,05$; „/“ - nedovoljan broj podataka za daljnju obradu.

Postaje	Sezonske razlike ($p < 0,05$)		
LM	M = M	S = S	V ≠ V
RB	/	S ≠ S	V ≠ V
RT	M ≠ M	S ≠ S	V ≠ V
RM	M ≠ M	S ≠ S	/
PM	/	/	/
LŽ	M ≠ M	/	/

4.2.2. Indeks probavne žlijezde (IPŽ)

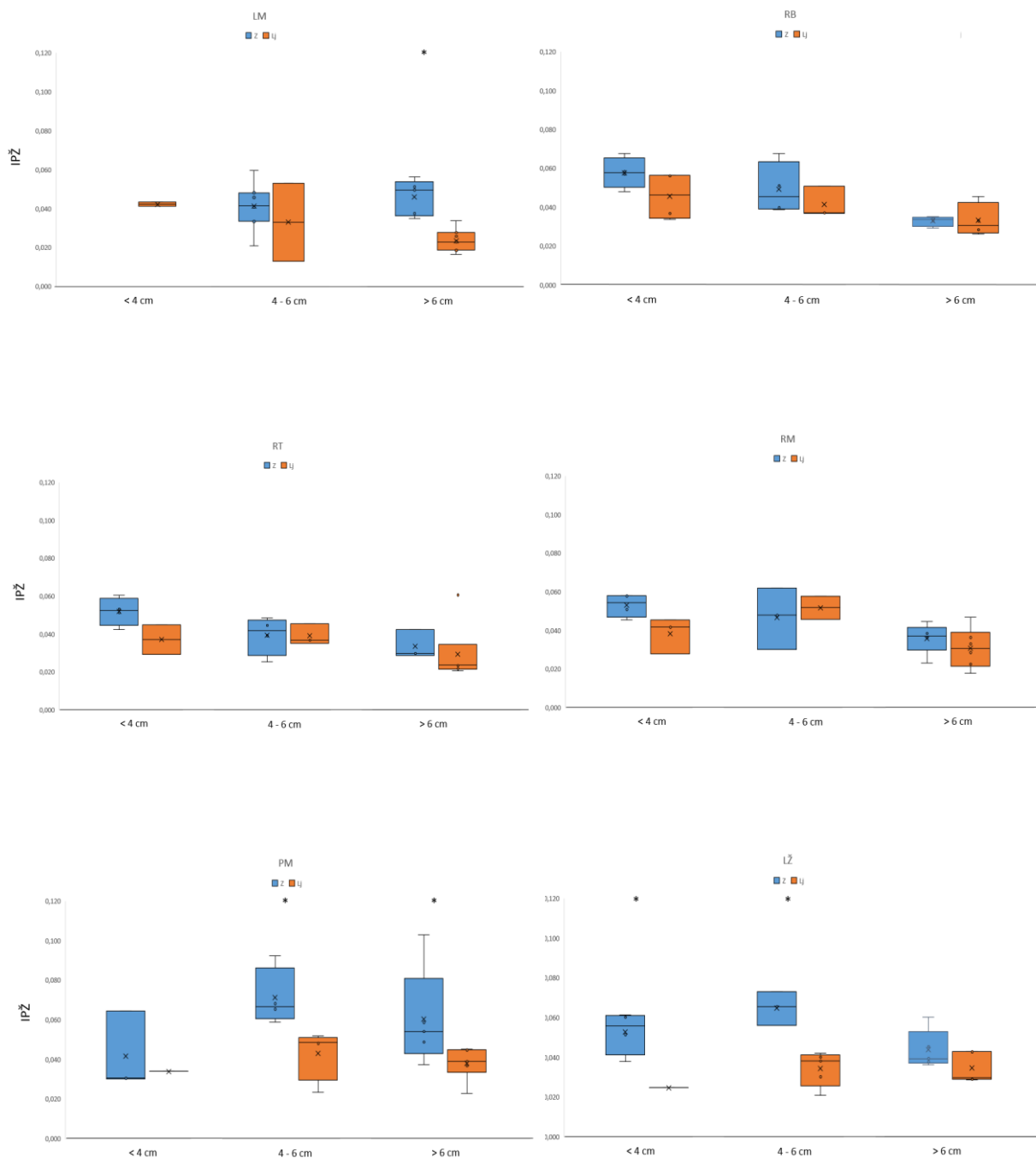
U Tablici 6. zapisane su vrijednosti indeksa probavne žlijezde (srednja vrijednost i standardna devijacija uzoraka dagnji sa šest postaja za tri veličinske kategorije kroz dvije sezone (Z-zima; Lj-ljeto). Najnižu vrijednost IPŽ-a tokom zime za dagnje < 4 cm poprimaju uzorci s postaje LM (0,042), za veličinu između 4-6 cm s postaje RT (0,039) i za dagnje > 6 cm s postaje RB (0,032); tokom ljeta dagnje < 4 cm s postaje LŽ (0,025) dok za dagnje između 4-6 cm (0,033) i > 6 cm (0,023) s postaje LM. Najvišu vrijednost IPŽ-a zimi za dagnje < 4 cm imaju uzorci s postaje RB (0,060), dok za dagnje između 4-6 cm (0,072) i > 6 cm (0,060) s postaje PM; ljeti dagnje < 4 cm s postaje RB (0,046), za dagnje između 4-6 cm s postaje RM (0,052) i za dagnje > 6 cm s postaje PM (0,038).

Tablica 6. Indeks probavne žlijezde, IPŽ (SV $\pm$ SD), dagnji sa šest postaja za tri veličinske kategorije za dvije sezone (Z-zima; Lj-ljeto).

Duljina	Postaje						
		LM	RB	RT	RM	PM	LŽ
< 4 cm	Z	0,042	0,060 $\pm$ 0,008	0,052 $\pm$ 0,008	0,048 $\pm$ 0,011	0,048 $\pm$ 0,021	0,053 $\pm$ 0,011
	Lj	0,042 $\pm$ 0,002	0,046 $\pm$ 0,012	0,037 $\pm$ 0,011	0,038 $\pm$ 0,009	0,034	0,025
4 - 6 cm	Z	0,041 $\pm$ 0,013	0,041 $\pm$ 0,007	0,039 $\pm$ 0,010	0,055 $\pm$ 0,010	0,072 $\pm$ 0,018	0,064 $\pm$ 0,004
	Lj	0,033 $\pm$ 0,028	0,041 $\pm$ 0,008	0,039 $\pm$ 0,006	0,052 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,013	0,034 $\pm$ 0,009
> 6 cm	Z	0,045 $\pm$ 0,010	0,032 $\pm$ 0,004	0,034 $\pm$ 0,008	0,036 $\pm$ 0,008	0,060 $\pm$ 0,025	0,040 $\pm$ 0,004
	Lj	0,023 $\pm$ 0,006	0,033 $\pm$ 0,009	0,029 $\pm$ 0,015	0,031 $\pm$ 0,010	0,038 $\pm$ 0,008	0,035 $\pm$ 0,008

Postaje RB, PM i RM imaju isti trend zimi i ljeti. Postaja RB ima uvijek opadajući trend s povećanjem veličine dagnje, dok postaje PM i RM imaju najveću vrijednost IPŽ-a kod dagnji veličine između 4-6 cm. Različiti trend imaju postaje LM, LŽ i RT. Zimi na postaji LM trend opada s veličinom a ljeti raste s veličinom. Zimi na postaji LŽ dagnje između 4-6 cm imaju najveću vrijednost IPŽ-a a ljeti trend raste s veličinom. Zimi na postaji RT trend pada s veličinom a poprima najveću vrijednost kod dagnja veličine između 4-6 cm. Zimi i ljeti dagnje između > 6 cm iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja.

Na Slici 11. (a-f) prikazane su razlike između sezona, za svaku postaju, za sve veličine. Na postajama RB, RM i RT se statistički ne razlikuje IPŽ za niti jednu veličinsku kategoriju (ANOVA, $p > 0,05$). Na postaji LM razlikuje se vrijednost IPŽ-a samo kod velikih dagnji, na postaji LŽ kod malih i srednjih te na postaji PM kod srednjih i velikih dagnji ($p < 0,05$).



Slika 11. Indeks probavne žlijezde uzoraka dagnji za tri veličinske kategorije sa šest postaja, kroz dvije sezone (Z-zima; Lj-ljeto). „*“ - ustanovljena je statistička razlika između veličinskih kategorija dagnji, $p < 0,05$ (ANOVA).

4.2.3. Toksičnost tkiva dagnje

Usporedba toksičnosti tkiva dagnje prikazana je u Tablici 7. Ljeti jedinke < 4 cm pokazuju najveću toksičnost na postaji LŽ (0-40) a najnižu na postaji RB (236 (131-425)) dok zimi najveću toksičnost poprima postaja RM (32 (18 - 55)) a najnižu postaja LM (174 (115-265)). Ljeti jedinke veličine između 4-6 cm imaju najveću toksičnost na postaji PM (12 (8-16)) a najnižu na postaji RM (11392-138)) dok zimi najveću toksičnost poprima postaja RM (10 (4-15)) a najmanju postaja LM i RT (> 500). Ljeti jedinke > 6 cm pokazuju najveću toksičnost na postaji PM (<3) a najmanju na postaji RM (217 (171-217)) dok zimi najveću toksičnost poprima postaja RM (42 (22-81)) a najmanju postaja LM (339 (210-547)). Postaje RB i LM imaju isti trend toksičnosti tkiva kroz tri veličine dagnji zimi i ljeti. Postaja RB ima najveću toksičnost kod srednjih dagnji 4-6 cm, a postaja LM ima najnižu toksičnost kod srednjih dagnji 4-6 cm. Postaje PM, RM, LŽ i RT imaju potpuno različiti trend zimi i ljeti, kao što je vidljivo u Tablici 7.

Tablica 7. Toksičnost tkiva pojedinih veličinskih kategorija dagnji sa šest postaja za dvije sezone (Z - zima; Lj - ljeta) izražena kao EC50. „NO DATA“ - nedovoljno podataka za daljnju obradu. **Crveno** - toksično.

Duljina	Postaje						
		LM	RB	RT	RM	PM	LŽ
< 4 cm	Z	28 (14 - 55)	236 (131 - 425)	57 (45 - 72)	28 (22 - 35)	29 (21 - 40)	0 - 40
	Lj	174 (115 - 265)	96 (71 - 130)	72 (36 - 141)	32 (18 - 55)	111 (62 - 111)	NO DATA
4 - 6 cm	Z	26 (23 - 29)	16 (13 - 20)	24 (14 - 40)	113 (92 - 138)	12 (8 - 16)	33 (23 - 48)
	Lj	> 500	83 (69 - 100)	> 500	10 (4 - 15)	140 (92 - 214)	216 (95 - 492)
> 6 cm	Z	21 (17 - 25)	100 (82 - 122)	6 (16 - 42)	217 (171 - 217)	< 3	30 (19 - 46)
	Lj	339 (210 - 547)	220 (130 - 374)	113 (53 - 242)	42 (22 - 81)	457 (193 - 1017)	NO DATA

Primjećuje se da ljeti toksičnost ovisi o veličini dagnje, tj dagnje > 4 cm imaju u sebi najmanju količinu toksina dok zimi ne postoji opći odnos toksičnosti i veličine dagnje. Najbolju moć razlučivanja raspona toksičnosti po postajama imaju dagnje > 6 cm a ljeti srednje dagnje između 4-6 cm.

Vidljivo je da je toksičnost tkiva u zimi povećana u usporedbi s ljetom. U zimi su toksične male dagnje s postaje LŽ (0-40), srednje dagnje s postaje RB (16 (13-20)) i PM (12 (8-16)) te velike dagnje s postaje PM (< 3) i RT (6 (16-42)), dok u ljeti nisu. Ljeti su toksične jedino srednje dagnje s postaje RM (10 (4-15)). Niti jedna postaja nije toksična i zimi i ljeti.

5. RASPRAVA

Dagnja, *Mytilus galloprovincialis* je jedan od najboljih bioindikatorskih organizama zbog njegove jednostavne uporabe i odličnog odgovora na promjene ekoloških faktora koji ukazuju na kvalitetu morskog okoliša. Zbog uzorkovanja i potrebe utvrđivanja kvalitete morskog okoliša, bitno je ustanoviti koje veličinske kategorije mogu najbolje poslužiti za razlučivanje postaja pod utjecajem nekih čimbenika, da li postoji ovisnost o morfološkim karakteristikama i na koji način godišnje doba utječe na odgovor biomarkera. U ovom radu su istraživane dagnje u rasponu veličine od 2 cm do 9 cm ljeti (srpanj) i uspoređene s rezultatima zimi (ožujak) na 6 lokacija u sjevernom Jadranu.

Ljeti rezultati testa preživljavanja na zraku pokazuju da na dvije postaje, RM i LŽ, preživljavanje ovisi o veličini dagnje, tj. da veće dagnje imaju bolju mogućnost preživljavanja u anaerobnim uvjetima. Dagnje s postaje RB, LM i RT ne ukazuju na takvo što, već njihova sposobnost preživljavanja ostaje ista kroz sve tri veličinske kategorije ili kao kod postaje PM gdje se sposobnost preživljavanja smanjuje s veličinom, tj. raste kod manjih jedinki. Može se zaključiti da ljeti ne postoji ovisnost o morfološkim karakteristikama dagnji već ona djelomično ovisi o uvjetima na postajama. Ne uzimajući u obzir veličinu, zaključuje se da ne postoji korelacija između preživljavanja na zraku i toksičnosti tkiva dagnje jer su dagnje s postaje RB najkraće preživjele dok su dagnje s postaje LŽ preživjele najduže, sa sličnom količinom toksikanata u tkivima. Dagnje > 6 cm iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja. Na temelju testa preživljavanja na zraku (SOS test) kroz zimu i ljetu ustanovljeno je da postoje sezonske varijacije u ponašanju različitih veličinskih kategorija na postajama RB, RM, LŽ, RT i PM. Dagnje s postaje PM i LŽ preživjavaju duže ljeti što ukazuje na anomaliju u njihovom ponašanju jer su Petrović S. i sur. (2004) u Jadranskom moru i Eertman i sur. (1993) u Sjevernom moru ustanovili da dagnje općenito kraće preživjavaju u anaerobnim uvjetima ljeti, kada je temperatura mora najviša zbog razvijanja gonada prije mriještenja u jesen. U skladu s takvim činjenicama su i postaje LM, RB, RM i RT. S druge strane, Pampanin D.M. i sur. (2005) i Nesto i sur. (2004) u Venecijanskom zaljevu su zaključili da ljeti, visoka temperatura mora i niska koncentracija kisika mogu stvoriti preadaptaciju u dagnjama povećavajući njihovu sposobnost preživljavanja na zraku. Zaključuje se da duže

preživljavanje ljeti na postajama PM i LŽ ovisi o mjesno specifičnom utjecaju postaje. U svim postajama osim LM sezone se razlikuju međusobno u svim veličinskim kategorijama stoga se može zaključiti da ne postoji ista ovisnost morfoloških karakteristika kroz zimu i ljetu. Zimi veličina jedinke utječe na vrijeme preživljavanja dok ljeti nije takav slučaj već preživljavanje ovisi o uvjetima na postajama.

Istraživanja indeksa probavne žlijezde tijekom ljeta su ustanovila da dagnje > 6 cm iskazuju najbolju razliku u odgovoru koji omogućuje razlikovanje postaja koje su pod različitim uvjetima okoliša dok jedinke ostalih veličinskih kategorija pokazuju sličnu vrijednost IPŽ-a na svim postajama. Jedino velike dagnje sa postaje PM i LM se razlikuju što ukazuje na specifične uvjete na tim postajama. Na postaji PM dagnje imaju visoki metabolizam zbog velike količine zagađivala u području dok je postaja LM manje kontaminirana stoga je indeks probavne žlijezde niži. Ljeti nema dovoljnih odstupanja da bi se zaključilo da postoji ovisnost o morfološkim karakteristikama. Uspoređujući dvije sezone za indeks probavne žlijezde primjećuje se da nema velikih razlika između veličinskih kategorija zimi i ljeti. Postaje RB, RM i RT nemaju nikakve razlike zimi i ljeti dok postaje PM, LM i LŽ ukazuju na razlike s nižim indeksom ljeti. Takvi rezultati se ne slažu sa zaključkom Cartiera S. i sur. (2004) u zaljevu Qaspe (Quebec) koji opisuje povećane vrijednosti indeksa probavne žlijezde u ljeti u periodu prije mriještenja. Isti slijed je potvrđen u Newfoundlandu, Kanada, kod školjkaša *Placopecten magellanicus* (Penney i McKenzie, 1996). Zaključuje se da se sezonske vrijednosti ne poklapaju jer se radi o različitim morima (zaljev Qaspe i Jadransko more) i zbog uporabe različitih vrsta bioindikatorskih organizama (*Placopecten magellanicus* i *Mytilus galloprovincialis*). Ljeti i zimi dagnje > 6 cm imaju najbolju moć razlučivanja raspona toksičnosti po postajama što ukazuje da nema razlike u sezonama.

Toksičnost tkiva dagnja ljeti ovisi o veličini jedinka jer dagnje veće od 6 cm imaju bolju sposobnost metaboliziranja toksina u morskom okolišu. Najtoksičniju vrijednost poprimaju dagnje između 4-6 cm na postaji RM (10 (4-15)), sve ostale se ne smatraju toksičnima. Očito je da je postaja RM opterećenija toksičnim tvarima. Srednje dagnje veličine između 4-6 cm imaju najbolju sposobnost razlikovanja postaja od svih veličinskih kategorija zbog ravnoteže između akumulacije i eliminacije toksina. Razlike u toksičnosti tkiva su vidljive u količini toksikanata skupljenih u dagnjama. Zimi male dagnje na postaji LŽ, srednje na postaji RB i PM te velike na postaji RT i PM ukazuju

na toksičnost tkiva koja nije uočena ljeti. Jedino su srednje jedinke (između 4-6 cm) s postaje RM toksične tokom ljeti. Kroz dvije sezone dagnje pokazuju da postoji ovisnost o morfološkim karakteristikama i toksičnosti, zimi najveće količine toksičnih tvari su zabilježene u srednje velikim i velikim dagnjama dok ljeti u malenim. Uostalom zimi dagnje > 6 cm najbolje razlikuju postaje na temelju razine toksičnosti tkiva dok ljeti to čine dagnje veličine između 4-6 cm. Takve razlike tumače da je došlo do promjene u količini toksikanata u područjima postaja i/ili su jedinke razvile bolju mogućnost tolerancije i izbacivanja toksičnih tvari iz tkiva sa starošću. Uspoređujući rezultate toksičnosti ljeti i zimi na istarskoj obali i zimi u riječkom zaljevu (Bihari i sur., 2006) primjećuje se da postoji razlika. Zimi na istarskoj obali i u riječkom zaljevu se primjećuju više vrijednosti toksičnosti tkiva dagnja nego ljeti, stoga se zaključuje da se sezone razlikuju zbog moguće razlike u količini toksičnih tvari u okolišu, što ovisi o postajama i zbog različite razine bioakumulacije i metabolizma toksikanata u tkivima dagnje (Bihari., 2006).

Uzimajući u obzir rezultate dobivene ljeti zaključuje se da ne postoji ovisnost o morfološkim karakteristikama u analizama indeksa probavne žlijezde i testa preživljavanja na zraku, što nije u skladu sa zaključkom dobivenim zimi gdje takvi parametri ukazuju ovisnost o veličini. Kroz zimu i ljeto vrijednosti indeksa probavne žlijezde su vrlo slični bez velikih razlika i dagnje > 6 cm najbolje diskriminiraju postaje za obje sezone. Ljeti toksičnost tkiva dagnje ukazuje da veličina jedinke utječe na razinu odgovora pojedinog pokazatelja kvalitete mora kao i zimi, ali za dvije različite veličine. Teško je ustanoviti koja veličinska kategorija najbolje diskriminira postaje pod raznim ekološkim uvjetima jer za svaki test tokom ljeta je dobivena drugi odgovor. Po zimi dagnje > 6 cm najbolje razlučuju područja od svih ostalih za djelomično sve parametre ali ljeti dagnje > 6 cm su najbolji odabir za test preživljavanja na zraku i za indeks probavne žlijezde, dagnje između 4 - 6 cm za toksičnost tkiva. Zaključuje se da je ljeti potreban širi veličinski raspon veličinske kategorije za korektnu analizu. Ljeti, postaje RM i RB, su pod najvećim pritiskom što ukazuje na područja s najvećom ljudskom aktivnošću ili određenim ekološkim uvjetima među svim postajama dok zimi, na toj poziciji se nalaze postaje PM i RT zbog istih razloga. Moguće je da su postaje mjestimično smanjile ili povećale količinu zagađivala ili da su se dagnje adaptirale na teške uvjete.

6. ZAKLJUČCI

1. Ljeti preživljavanje na zraku i indeks probavne žlijezde ne ovise o morfološkim karakteristikama, dok kod toksičnosti tkiva dagnje ovise o duljini dagnje.

2. Ustanovljeno je da postoje sezonske razlike (ljet-zima) u odgovoru različitih veličinskih kategorija na uvjete okoliša i to specifične za svaki parametar. Za preživljavanje na zraku zimi su osjetljivije male dagnje dok ljeti velike, za toksičnost tkiva dagnje zimi su osjetljivije velike a ljeti srednje dagnje. Zimi i ljeti velike dagnje su najosjetljivije za određivanje indeksa probavne žlijezde što ne ukazuje na razlike u sezonama. Ne može se utvrditi jedna veličinska kategorija koja najbolje razlučuje postaje.

3. Uzimajući u obzir sve veličinske kategorije ljeti, rovinjska marina je lokacija s najvećim utjecajem nepovoljnih uvjeta okoliša.

7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Utjecaj sezone na osjetljivost biomarkera obzirom na veličinu dagnje

Luca Privileggio

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

SAŽETAK

Mytilus galloprovincialis, mediteranska dagnja je jedan od najboljih bioindikatora za određivanje područja koja su pod velikim prirodnim ili češće antropogenim utjecajem, što utječe na stres nad jedinkama. Parametri koji analiziraju stres nad dagnjama su: indeks probavne žlijezde, vrijeme preživljavanja na zraku i toksičnost tkiva dagnje. Uzorci su sortirani na tri veličinske kategorije (< 4 cm, 4-6 cm i > 6 cm) kako bi se ustanovilo postoji li ovisnost o morfološkim karakteristikama i koja kategorija najbolje razlikuje postaje. Analize su provedene nad šest postaja u sjevernom Jadranu tijekom zime (ožujak) i ljeta (srpanj) kako bi se opisale moguće razlike u sezonama na temelju veličinskih kategorija. Zaključilo se da ljeti neki parametri ovise o morfološkim karakteristikama na razinu odgovora pokazatelja kvalitete mora a neki ne, te da ne postoji jedna najbolja veličinska kategorija koja razlučuje postaje. Ustanovljeno je da postoji sezonska razlika (ljet-zima) u ponašanju različitih veličinskih kategorija.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli i Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Izvornik je na hrvatskom jeziku (35 stranica, 11 slika, 7 tablica, 32 literaturnih navoda).

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

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 2017.

8. BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Seasonal influence on the sensibility of biomarkers due to the size of the mussel

Luca Privileggio

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

ABSTRACT

Mytilus galloprovincialis, the Mediterranean mussel is one of the best bioindicators for determining areas that are under great natural or more often anthropogenic influences, affecting stress on individuals. Parameters that analyze stress over the mussels are: digestive index, air survival time, and mussels tissue toxicity. Samples were sorted into three size categories (< 4 cm, 4-6 cm and > 6 cm) to determine whether there is any dependence on morphological characteristics and which category distinguishes the stations best. Analyzes were conducted over six stations in the northern Adriatic during the winter (March) and summer (July) to describe possible seasonal differences based on the size categories. It has come to the conclusion that some parameters in the summer depend on the morphological characteristics of the level of the quality response indicator and some do not have one of the best size categories that distinguishes the stations. There is a seasonal difference (summer to winter) in the behavior of different size categories.

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrila University of Pula and Ruđer Bošković Institute in Rovinj. Original in Croatian (35 pages, 11 figures, 7 tables, 32 references).

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

Supervisor: Maja Fafandjel, PhD, IRB

Reviewers: Nevenka Bihari, PhD, IRB

Maja Fafandjel, PhD, IRB

Nastjenjka Supić, PhD, IRB

Thesis defence: 15.09.2017.

9. LITERATURA

Bihari N., Fafandel M., Piškur V., (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulg of Rijeka, the Adriatic sea, Croatia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, str. 380-387.

Branch, G.M. and Steffani, C.N. (2004) Can we predict the effects of alien species. A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 300:189-215.

Carlton, J.T. (1992) Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end-of-the-20th-century perspective. Journal of Shellfish Research. 11 (2): 489-505.

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.

Cotou E, Papathanassiou 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). Environ Poll 119:141-149.

Dardignac-Corbel, M.J. (1990.): Traditional mussel culture; Aquaculture Vol. I, D.G. Barnabe, (Ed.), Ellis Horwood Chichester, str. 284-341.

de Zwaan, A., Cortesi, P., Cattani, O., (1995) Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. Sci. Total Environ. 171, 121-125.

Egzeta - Balić, D., M. Najdek, M. Peharda, M. Blažina (2012): Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves. Aquaculture, 334 - 337, 89-100.

Eertman, R.H.M., Wagenvoort, A.J., Hummel, H., Smaal, A.C., (1993) „Survival on 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, 179-195.

Environmental Canada. (1992) Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria. Report EPS 1/RM/24.

FAO (2010): The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy, FAO, 218 str.

Fiorentin C. (2016) Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karakteristikama bioindikatora (*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora, Završni rad, str. 1-22.

Geller, J.B. (1999) Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. Conservation Biology. 13 (3): 661-664.

Global Invasive Species Database (2017) Species profile: *Mytilus galloprovincialis*. Preuzeto sa: <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Mytilus+galloprovincialis> (11.09.2017.).

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

Hrs - Brenko, M., (1971) The reproductive cycle of the *Mytilus galloprovincialis* Lamk. In the Northern Adriatic Sea. Thalassia Jugoslavica 7, 533-542.

Kaplan, E.L., Meier, P., (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations, J. Am. Stat. Assoc. 53, 457-481.

Masarović I. Ninčević Ž., Kušpilić G., Marinović S. & Marinov S. (2005) Long - term changes of basic biological and chemical parameters at two stations in the middle Adriatic. Journal of sea research 54, 3-14.

Mišura A., I. Jahutka, N. Skakelja, J. Suić, V. Franičević (2008): Hrvatsko ribarstvo u 2997. godini. Ribarstvo, 66(4), 157-175.

Nesto, N., Bertoldo, M., Nasci, C., Da Ros, L., (2004) Spatial and temporal variation of biomarkers in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy, Mar. Environ. Res. 58, 287-291.

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 indeks; Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 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.

Penney, R.W., McKenzie, C.H., (1996) Seasonal changes in the body orhans of cultured sea scallop, *Placopecten magellanicus*, and coincidence of spawning with water temperature, seston, and phytoplankton community dynamics. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., 2104, 22 pp.

Petrović S., Semenčić L., Ozretić B., Ozretić M. (2004) Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia), Marine Pollution Bulletin 49: 713 - 720

Robinson, T.B. and Griffiths, C.L. (2002) Invasion of Langebaan Lagoon, South Africa, by *Mytilus galloprovincialis*: Effects on natural communities, African Zoology 37(2): 151-158.

Seed, R., Sunchanek, T.H., (1992) Population and community ecology of *Mytilus*. In: Gosling, E. (Ed.), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elsevier, New York, NY, str. 87-169.

Sidari, L., P. Nichetto, S. Cok, S. Sosa, A. Tubaro, G. Honsell, R. Della Loggia (1998): Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. Mar. Biol., 131, 103-111.

Thomas, R.E., Harris, P.M., Rice, S.D., (1999a) Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. Comp. Biochem. Physiol. C 122, 147-152.

Viarengo, A., Canesi L., (1991) Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture 94, 225, 225-243.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Marcinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., (1995) Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. Mar. Environ. Res. 39, 245-248.

Vincent K. (2017) Probit Analysis. Preuzeto sa: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=568fd8f95f7f7180998b45a1&assetKey=AS%3A315648058560514%401452267769784> (03.09.2017.).

Župan I., Šarić T., Prirast i indeks kondicije - dva snažna čimbenika u uzgoju dagnji (stručni rad), Vol. XVI (2014), svibanj - lipanj, broj 3, 255-259.

Wong, W.H., J.S. Levinton (2004): Culture of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) fed both phytoplankton and zooplankton: a microcosm experiment. Aquac. Res., 35, 965-969.