

Hemociti u češljači *Aequipecten opercularis* s područja sjevernog Jadrana

Parić, Tina

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:137:370242>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

TINA PARIĆ

**HEMOCITI U ČEŠLJAČI *AEQUIPECTEN OPERCULARIS* S PODRUČJA
SJEVERNOG JADRANA**

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2021.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

TINA PARIĆ

**HEMOCITI U ČEŠLJAČI AEQUIPECTEN OPERCULARIS S PODRUČJA
SJEVERNOG JADRANA**

Završni rad

JMBAG: 0062076705, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Fiziologija morskih organizama

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Pula, 2021.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

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

Studentica:

U Puli, 11. lipnja 2021. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Tina Parić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "Hemociti u češljači *Aequipecten opercularis* s područja sjevernog Jadrana" koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnog pristupa znanstvenim informacijama.

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

U Puli, 11.lipnja 2021. godine

Potpis

ZAHVALA

Zahvaljujem Aquariumu Pula na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

Ovim putem zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ines Kovačić na savjetima te na posvećenom vremenu i strpljenju prilikom ispravljanja rada, kao i tijekom laboratorijskog rada.

Zahvaljujem mag. oecol. et prot. nat. Anti Žunecu na pomoći pri laboratorijskom radu.

Zahvaljujem svim profesorima Znanosti o moru na prenesenom znanju te kolegama na složnosti i lijepim uspomenama.

Također od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na stalnoj potpori.

Sadržaj

1. UVOD	7
1.1. Školjkaši	7
1.2. Češljača <i>Aequipecten opercularis</i>	3
1.3 Hemociti	14
1.4. Cilj istraživanja	15
2. MATERIJALI I METODE	16
2.1. Uzorkovanje češljače i smještaj u bazene	16
2.2. Mjerenje školjkaša	19
2.3 Određivanje broja hemocita u češljači	21
2.4. Statistička obrada rezultata	22
3. REZULTATI	23
3.1. Temperatura i pH	23
3.2. Morfološki parametri češljače	24
3.3 Ukupni broj hemocita u češljači	28
3.4. Korelacija parametara	31
4. RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	35
7. SAŽETAK	38
8. ABSTRACT	39

1. UVOD

1.1. Školjkaši

Školjkaši su izuzetno raznolika skupina unutar koljena mekušci (Mollusca) (Matoničkin i sur.1998).

Dijele se u dvije velike skupine, u potpunosti morsku Protobranchia i Autobranchia koja se pronalazi u morskim i slatkovodnim staništima. Autobranchia sadržava većinu poznatih školjkaša i sastoji se od dvije glavne skupine, Pteriomorphia (dagnje, kapice, kamenice, češljače itd.) i Heteroconchia (slatkovodni školjkaši). Svi navedeni su ektotermni, što znači da im je tjelesna temperatura kontrolirana temperaturom vanjskog okruženja (Ponder i sur., 2019).

Školjkaši su sjedilački ili polusjedilački organizmi. Staništa su im raznolika, neke vrste stvaraju hodnike u stijenama ili se zakopavaju, iako većina vrsta naseljava mekani sediment. Isto tako, neke vrste mogu biti nametničke ili u odnosu komenzalizma s drugim beskralježnjacima. Školjkaši imaju bilateralno simetrično, bočno spljošteno i dvodijelnom vapnenačkom ljušturu zatvoreno tijelo. Tijelo im je podijeljeno na glavu, utrobnu vreću i stopalo. Ljuštura je dvodijelna te građena od tri sloja: vanjski sloj od proteina - periostrakum, srednji sloj od vapnenca - oostrakum te unutarnji sloj od vapnenca - hipostrakum. Ljušturu izlučuje plašt te su bočne ljušture spojene i nazivamo ih školjkom, a životinju unutar nje školjkašem. Unutrašnjost ljušture prekrivena je plaštom, dok se plaštana šupljina nalazi se s unutarnje strane plašta, a sastoji se od: listatskih škriga koje služe za disanje i filtriranje hrane, usnih lapova i stopala za zakopavanje iznad kojeg se nalazi utroba. Školjkaši ovise o protoku vode kroz plaštanu šupljinu jer iz vode uzimaju hranu i kisik, dok u vodu izbacuju ugljikov dioksid, neprobavljene ostatke hrane, dušične ostatke i gamete. Mišić zatvarač skupa s ligamentom ima ulogu otvaranja i zatvaranja ljušture. Kod školjkaša kao skupine je došlo do decefalizacije, upravo zbog njihovog načina života te zaštite koju im pruža ljuštura. Na rubu plašta nalazi se većina osjetila, dok stopalo sadrži statociste (ravnotežni organi) i bisusnu žlijezdu kod nekih vrsta. Kod školjkaša se razlikuju izvanstanična i unutarstanična probava. Izvanstanična probava odvija se u želucu i crijevima. S druge strane, unutarstanična probava se odvija u

probavnoj žlijezdi i hemocitima koji zajedno sa enzimima imaju ključnu ulogu. Svi školjkaši imaju otvoren optjecajni sustav te srce od dvije pretkljetke i jedne kljetke. Kroz tijelo teče hemolimfa sa hemocitima, te se upravo njome kisik prenosi do svih stanica. Optjecajni sustav školjkaša služi za transport tvari te ima funkciju hidroskeleta. Školjkaši su većinom razdvojenog spola. Dvospolni školjkaši mogu biti simultani dvospolci ili sukcesivni gdje su malo mužjaci, a malo ženke. Oplodnja je vanjska, a razvoj teče preko trohoforme i veliger ličinke. Školjkaši imaju više uloga u okolišu, ekoloških ali i socioekonomskih. Ekološki gledano, školjkaši imaju ključnu ulogu u protoku energije u okolišu i u održavanju kvalitete vode filtriranjem (Matoničkin i sur. 1998).

Školjkaši svoju ulogu imaju kao bioindikator, budući da mogu koncentrirati morske toksine te tako ukazati na zagađenja u okolišu. Njihova važna uloga se očituje i u komercijalnoj upotrebi kao važne prehrambene namirnice. Školjkaši čine glavni sektor svjetske proizvodnje ribe i akvakulture, s više od 16 milijuna metričkih tona čija je vrijednosti iznosila gotovo 18 milijuna američkih dolara u 2015. godini, što je predstavljalo 15% ukupne proizvodnje akvakulture (Gerdol i sur., 2018).

1.2. Češljača *Aequipecten opercularis*

Aequipecten opercularis (Linnaeus, 1758) spada u porodicu Pectinidae (češljače), koja predstavlja jednu od najraznovrsnijih porodica školjkaša (Shumway i Parsons, 2016). Uobičajena je i raširena vrsta češljače (eng. *queen scallop*) na području istočnog Atlantika. Populacije joj se protežu od sjeverne Norveške pa sve do Mediterana, uključujući i Jadran, kao što je prikazano na Slici 1. Može se pronaći u morima prosječnog minimuma temperature 5°C, pa i u onima prosječnog maksimuma od 24 °C. *A. opercularis* se također javlja u značajnom rasponu dubina, sve do 200 metara. Nalazi se na raznim supstratima, od pjeskovitih i muljevutih pa sve do šljunka, te može biti djelomično ukopana u sediment ili bisusnim nitima pričvršćena za supstrat. Ima relativno kratak životni vijek, uglavnom do šest godina, kao i nagli pad rasta s godinama (Johnson i sur., 2015).



Slika 1. Prikaz rasprostranjenosti *A. opercularis* (preuzeto s <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1997>).

Kao i većina češljača, *A. opercularis* spada u simultane hermafrodite, što znači da istodobno ima muške i ženske spolne stanice (Gerdol i sur., 2018). Spolnu zrelost dostiže vrlo rano u usporedbi sa ostalim vrstama, nakon godinu dana i sa otprilike 20 milimetara (Shumway i Parsons, 2016).

Ličinke češljača su pelagične i njihovo kretanje ovisi o strujama. Ličinke razvijaju stopalo i bisusnu žlijezdu, koja izlučuje bisusne niti. Bisusne niti školjkaš koristi za pričvršćivanje. Postignuvši veličinu 4–8 mm, ličinke preuzimaju ulogu slobodnoživućih odraslih jedinki koje imaju sposobnost plivanja. Bisusna proizvodnja kod *A. opercularis* izuzetno je osjetljiva na uvjete okoliša, osobito na prisutnost onečišćivala, pa se može koristiti za praćenje morskih onečišćenja (Wong, 2016).

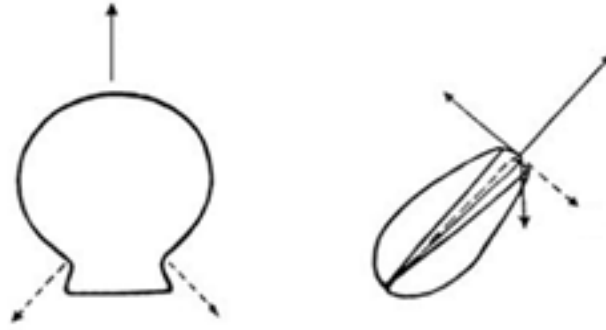
Ljuštura je vapnenačka te su njena dva dijela povezana ligamentom. Oko umba koji predstavlja najstariji dio ljušture, nalaze se linije prirasta (Jurinović, 2018). Obično im visina ljušture dosegne i 90 milimetara. Ljušture su nejednake, ali su oba ventila konveksna (Shumway i Parsons, 2016). Ljušture poprimaju različite boje, uglavnom od roze do narančaste, te mogu imati razne uzorke i mrlje po sebi (Slika 2). Isto tako, ljuštura je često obrasla spužvama (The Marine Life Information Network, 2021).

Obzirom na broj i položaj mišića, češljača je monomijarni tip školjkaša. Točnije, nedostaje joj prednji aduktor, dok je stražnji pomjeren i zauzima centralni položaj (Shumway i Parsons, 2016).



Slika 2. Prikaz *Aequipecten opercularis* (preuzeto s https://www.aphotomarine.com/bivalve_chlamys_opercularis_queen_scallop.html#).

Filtratorski je organizam koji se hrani fitoplanktonom, bentoskim algama i detritusom. Za ishranu su joj važne škrge, koje imaju i funkciju disanja (Jurinović, 2018). Češljača pokazuje prilagođen odgovor hranjenja obzirom na promjenu količine i kvalitete prehrane. Iako češljača ne može učinkovito filtrirati čestice manje od oko 7 μm u promjeru, u stanju je pumpati velike količine vode uz neznatan metabolički napor. Probavni sustav češljače sličan je kao kod ostalih školjkaša. Sastoji se od usta, jednjaka, želuca, kristalnog štapića, probavne žlijezde, crijeva, rektuma i anusa. Krvožilni sustav je otvoren te se cirkulacija može se podijeliti na arterijski i venski sustav. Srce je sastavljeno od dvije pretklijetke i jedne klijetke te se ne razlikuje od drugih školjkaša. Živčani sustav je složen u odnosu na druge vrste školjkaša. Najveća razlika je to da češljača ima desetke do stotine očiju koje oblikuju slike i koje su smještene uz rub plašta. Druga značajna karakteristika je sposobnost plivanja (Shumway i Parsons, 2016). Naime, *A. opercularis* spada među češljače koje predstavljaju jedine školjkaše s mogućnosti "plivanja na pogon" (Schmidt i sur., 2018). Koristeći oblik "mlaznog pogona", voda se oistiskuje iz mišićne šupljine te se organizam kreće u suprotnom smjeru, što pokazuje Slika 3. (Shumway i Parsons, 2016). Plivanje im omogućuje djelovanje ljuštura, mišića zatvarača (aduktora) i plašta. Faza plivanja se dijeli u tri faze. U prvoj fazi se češljača podiže s dna u vodeni stupac, dok se druga faza sastoji od horizontalnog plivanja i čestog otvaranja i zatvaranja ljuštura koje im omogućuje mišić zatvarač. Treća faza predstavlja ponovno spuštanje na dno (Schmidt i sur., 2018). Za razliku od ostalih školjkaša, koji od predatora bježe ukopavanjem ili dugim zatvaranjem ljuštura, češljače mogućnost plivanja iskorištavaju za bijeg od predatora (Shumway i Parsons, 2016). Uobičajeni predatori uključuju morske zvjezdače, rakove i hobotnice (Wong, 2016). Iako plivanje može biti učinkovit odgovor za bijeg na kratke udaljenosti, češljače nisu sposobne preplivati velike udaljenosti. Budući da se pokazalo da miozini češljača posjeduju jedinstvena fizička svojstva, predstavljaju model za proučavanje mišićne kontrakcije (Shumway i Parsons, 2016).



Slika 3. Prikaz tehnike plivanja kod *A. opercularis*. Isprekidane strelice pokazuju smjer strujanja, a pune strelice njihov smjer kretanja (Prilagođeno iz Shumway i Parsons, 2016).

Izlov *A. opercularis* uglavnom je smješten u sjeveroistočnom Atlantskom oceanu (Europa), najviše u području Ujedinjenog Kraljevstva i Francuske, iako postoji i manji izlov na Farskim otocima te na Mediteranu. Vrsta se lovi pomoću dredža (Slika 4.) i koča (Hinz i sur., 2008).



Slika 4. Prikaz pražnjenja dredža kojima se lovi češljača *A. opercularis* (Hinz i sur., 2008).

Češljače se komercijalno uzgajaju u Europi već cijelo stoljeće. Godišnji ulov *A. opercularis* varirao je između 7000 i 16.000 t dugo vremensko razdoblje, nakon čega je uslijedio pad 1995. i 1996. godine uzrokovan prelovom. Nadalje, ulov se značajno povećao na preko 30 000 t u 2013. godini, što predstavlja 31% ukupnog ulova češljača (Shumway i Parsons, 2016).

Komercijalni uzgoj češljača u svijetu je relativno nov, u uspoređivanju s ostalim vrstama školjkaša. Na Jadranu ne postoji kontrolirani uzgoj ove vrste, iako se izlovljava sezonski na maloj skali. Ova vrsta ima veliku komercijalnu vrijednost na tržištu te dobiva sve veću gastronomsku vrijednost među potrošačima (Kunica 2013). Pažnju među potrošačima daje im njihova hranjivost, točnije bogatstvo proteinima i glikogenom. Kako vrijeme prolazi, vidljiva je sve veća zainteresiranost za njihov uzgoj, te sve veća važnost daje istraživanjima vezanima za uzgoj ove vrste (Antolović i Antolović, 2012).

1.3. Hemociti

Hemociti su krvne stanice koje cirkuliraju kao glavne komponente unutar hemolimfe (analogna krvi kralježnjaka) koja pokriva sva tkiva kod češljača, ali i ostalih mekušaca (Vyacheslav, 2016). Češljače posjeduju samo urođenu imunološku obranu, gdje stanične i humoralne komponente djeluju sinergijski (Gonzalez i sur., 2020). Glavnu komponentu u imunološkom sustavu češljača predstavljaju upravo hemociti, te hemolimfa (Jin i sur., 2009). Osim u unutarnjoj obrani, hemolimfa sudjeluje u izmjeni plinova, osmoregulaciji, raspodjeli hranjivih sastojaka, uklanjanju otpada te služi kao hidroskelet. Češljače ne posjeduju cirkulirajuće respiratorne pigmente, što se smatra posljedicom sedentarnog načina života te njihove velike tjelesne površine (Shumway i Parsons, 2016). Češljače imaju samo jedan tip hemocita, točnije hijalinocite (agranulocite), za razliku od ostalih školjkaša koji imaju i drugi tip, granulocite (Lopez i sur., 1997). Hijalinociti su male stanice s hijalinskom citoplazmom koje sadrže malo ili nimalo granula i imaju okruglu, centriranu jezgru (Estrada i sur., 2013). Hemociti nisu prisutni samo u krvožilnom sustavu, već cirkuliraju i dolaze do svih tkiva, što je posljedica otvorenog krvotoka češljača (Shumway i Parsons, 2016). Hemociti imaju više važnih uloga, poput probave i transporta hranjivih tvari, otpuštanja enzima te proizvodnje

metabolita (Petrina, 2019). Mogu izravno sudjelovati i u izlučivanju apsorbiranjem otpada, prolazeći u lumen bubrega te van organizma. Nadalje, imaju ulogu i popravku ljuštura, gdje prenose kalcij i organski matriks iz probavne žlijezde na mjesto popravka (Shumway i Parsons, 2016). Važni su i zbog mogućnosti fagocitoze kod primarnog mehanizma obrane školjkaša (Petrina, 2019). Osim toga, hemociti interveniraju u popravku rana infiltracijom i začepljenjem rane, nakon čega slijedi popravak rane i fagocitoza nekrotičnih elemenata (Shumway i Parsons, 2016). Upravo se zbog svih navedenih funkcija hemociti koriste za procjenu statusa imunološkog odgovora školjkaša. Naime, vrši se procjena parametara poput broja hemocita, smrtnosti ili fagocitne aktivnosti hemocita, koji nam mogu puno toga reći o samom stanju organizma (Lin i sur., 2012).

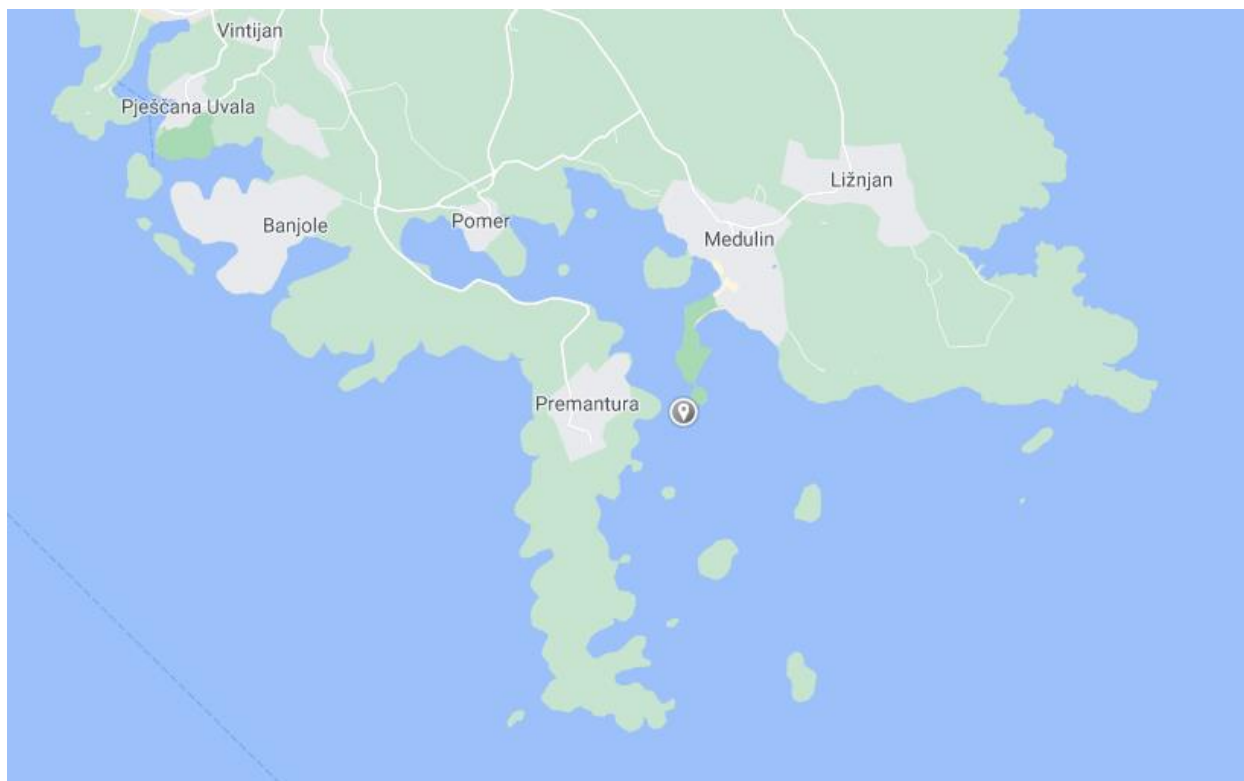
1.4. Cilj istraživanja

1. Utvrditi ukupni broj hemocita kod češljaše *Aequipecten opercularis*.
2. Usporediti ukupni broj hemocita kod češljače tijekom jesenskog perioda od tri mjeseca 2020. godine.
3. Analizirati utjecaj temperature i pH na kretanje ukupnog broja hemocita u češljači.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje češljače i smještaj u bazene

Češljače su uzorkovane 19. listopada 2020. godine kočarskim brodom 2 milje izvan Albaneža, unutar zone E2 (Slika 5).



Slika 5. Mjesto uzorkovanja češljače *Aequipecten opercularis* u sjevernom Jadranu 2 milje izvan Albaneža (izvor: www.google.hr/maps).

Prikupljeno je ukupno 161 jedinki, iako smo za potrebe našeg istraživanja uzorkovali, tj. pratili samo 10 jedinki. Jedinke su unutar sat vremena transportirane do laboratorija, gdje su zatim smještene u četiri četvrtasta te jedan okrugli akvarij. U četvrtaste akvarije, ukupnog volumena 720 litara (D x Š x V 200 x 60 x 60 cm) smješteno je ukupno 60 jedinki. S druge strane, u okrugli akvarij volumena 1900 litara (R x D 165 x 90 cm) smješteno je 100 jedinki (Slika 6).



Slika 6. Prikaz akvarija u kojima su smještene češljače.

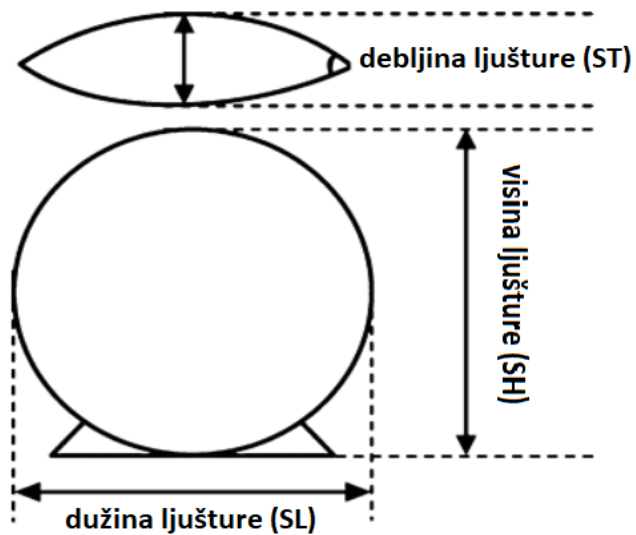
Akvariji nisu imali nikakvu podlogu te su se čistili svakodnevnim usisavanjem. Protok u akvarijima bio je 200 L/h. Češljače su od prvog dana njihovog smještanja u akvarije hranjene živom tekućom kulturom *Tetraselmis sp.* (četvrtasti akvariji po 2 litre, okrugli po 3 litre). Hrana se ubacivala u akvarije oko 9 sati ujutro te je hranjenje ukupno trajalo 6 sati, za koje je vrijeme protok vode u akvarijima bio zatvoren. Temperatura i pH mjereni su jednom dnevno, ujutro prije hranjenja. Korištena je višeparametarska sonda Hanna HI98194 (Slika 7).



Slika 7. Višeparametarska sonda Hanna HI98194 kojom su se svakodnevno vršila mjerenja.

2.2. Mjerenje školjkaša

Prije početka prvog mjerenja morfoloških obilježja, na ljušturu češljača zalijepili smo oznake sa brojevima u svrhu raspoznavanja, tj. praćenja jedinki. Za mjerenje dužine (SL), visine (SH) i debljine (ST) ljušture (Slika 8.) koristili smo digitalnu pomičnu mjerku (preciznost 0,01mm) (Slika 9.), dok smo za mjerenje mase cijelog školjkaša (TW) koristili vagu. Izmjereni podaci sistematizirani su u Excel tablicama.



Slika 8. Morfološka obilježja češljače (Prilagođeno iz : Schmidt, M. i sur. , 2008. Size and age-dependent changes of escape response to predator attack in the *Queen scallop*).



Slika 9. Prikaz mjerenja školjkaša pomoću digitalne pomične mjerke.

2.3 Određivanje broja hemocita u češljači

Jedinke za analizu broja hemocita su nasumično odabrane. Proces uzorkovanja započeo je pri spontanom otvaranjima ljuštura češljača, kako se ne bi naštetilo samim organizmima. Nakon njihovog otvaranja, uzorak hemolimfe iz mišića aduktora uzet je sterilnom injekcijom. Hemolimfa se zatim direktno stavlja u hemocitometar u Neubauerovu komoru. Hemocitometar je uređaj kojim mjerimo broj stanica, sastoji se od mikroskopskog stakla u kojemu razlikujemo dvije komore koje podržavaju određeni volumen stanica. Kako bi osigurali vjerodostojnost rezultata, komore smo prije unosa uzorka sterilizirali alkoholom. Zatim smo hemocite u Neubauerovoj komori promatrali i brojali pod svjetlosnim mikroskopom, povećanja 400X.

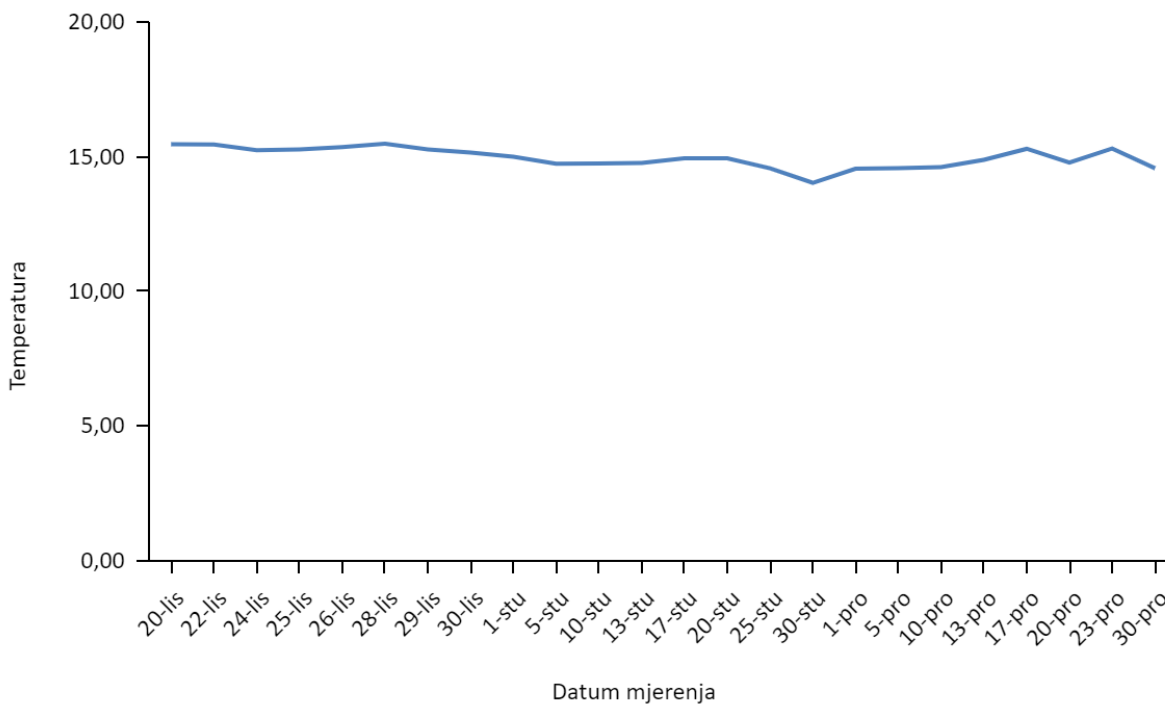
2.4. Statistička obrada rezultata

Za statističku analizu i grafičke prikaze korišten je program Statistica 9.0. Razlike između morfometrijskih parametara ili hemocita tijekom istraživanih mjeseci analizirane su ANOVA jednosmjernom analizom varijance. Kako na prvom stupnju nije utvrđena statistički značajna razlika među varijablama, daljnje analize nisu provedene. Koeficijenti korelacije za temperaturu, pH i morfometrijskih parametara školjkaša i hemocita određeni su pomoću Spearmanovog neparametrijskog testa korelacije, sa razinama značajnosti od $< 0,05$.

3. REZULTATI

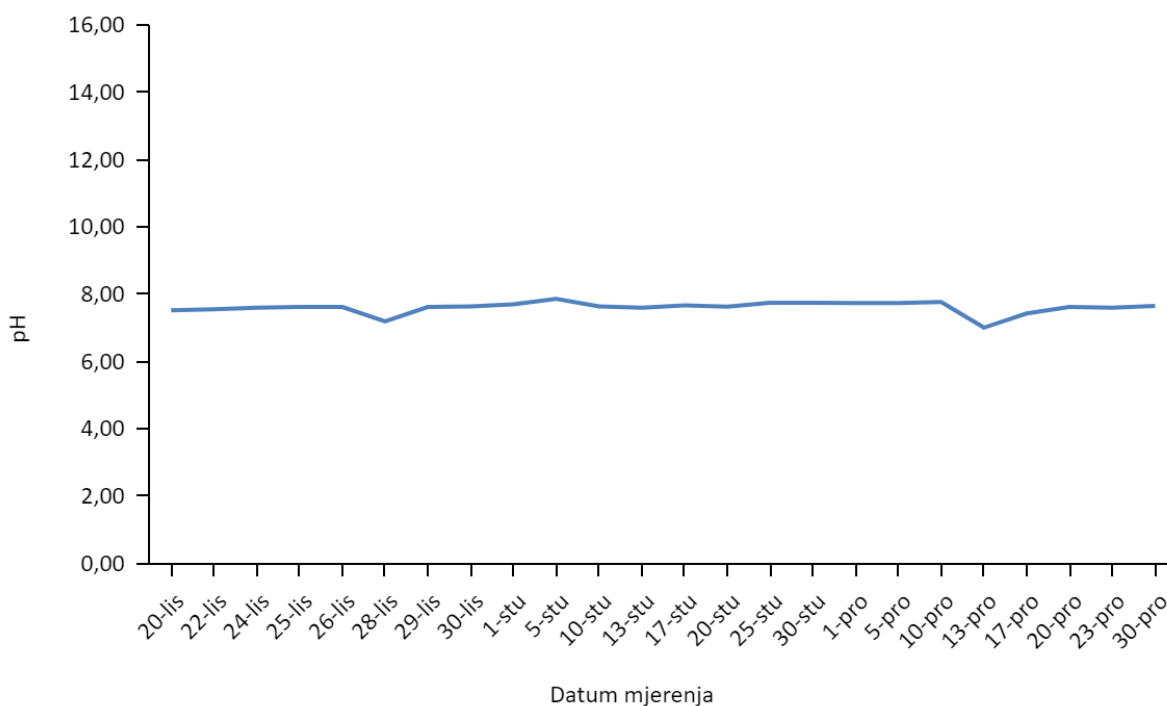
3.1. Temperatura i pH

Mjerenje temperature u akvarijima odvijalo se kroz tri mjeseca, od 20. listopada do 30. prosinca 2020. godine, kao što je vidljivo na Slici 10. Temperatura u akvarijima ovisi o vanjskoj okolišnoj temperaturi i temperaturi prostorije, što je razlog manjih izmjerenih dnevnih oscilacija. Raspon temperature se kretao od najniže koja je iznosila 14,03 °C izmjerene 30. studenog do najviše od 15,48 °C izmjerene 28. listopada.



Slika 10. Grafički prikaz kretanja temperature u bazenu sa školjkašima od listopada (lis) do prosinca (pro) 2020. godine.

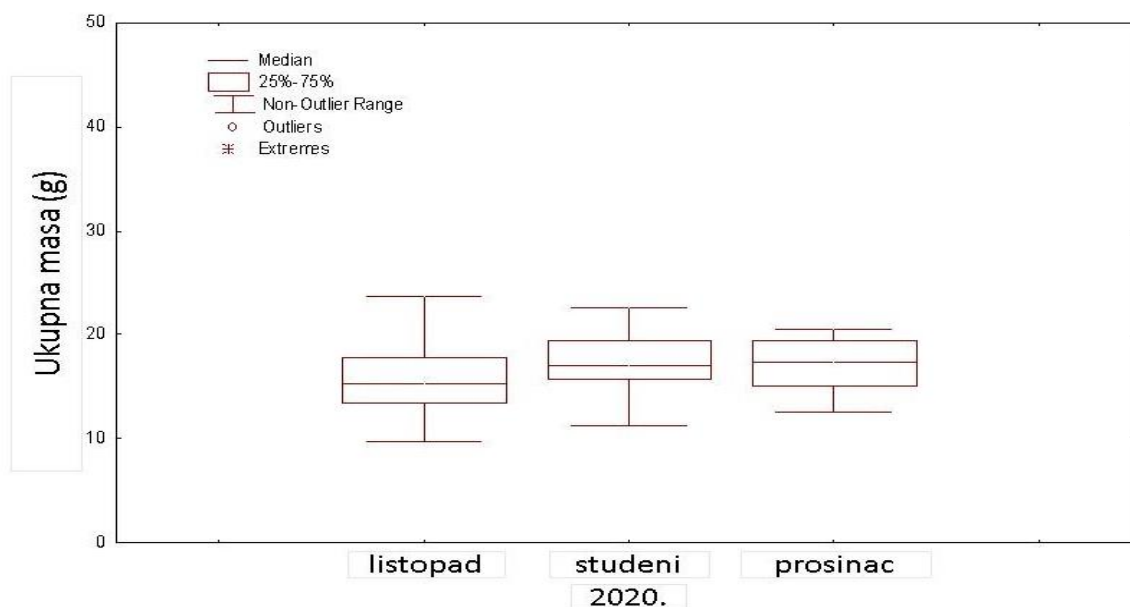
Mjerenje pH vrijednosti u akvarijima odvijalo se kroz tri mjeseca, od 20. listopada do 30. prosinca 2020. godine. Vrijednosti osciliraju ovisno o nekim uvjetima, poput količine kisika ili količine hrane u akvarijima u vrijeme mjerenja. Na slici 11. možemo vidjeti da su te oscilacije pH vrijednosti minimalne. Izmjerene vrijednosti su u rasponu 7,01 do 7,86. Najniža vrijednost izmjerena je 13. prosinca, dok je najviša izmjerena 5. studenog.



Slika 11. Grafički prikaz kretanja pH u bazenu sa školjkašima od listopada (lis) do prosinca (pro) 2020. godine.

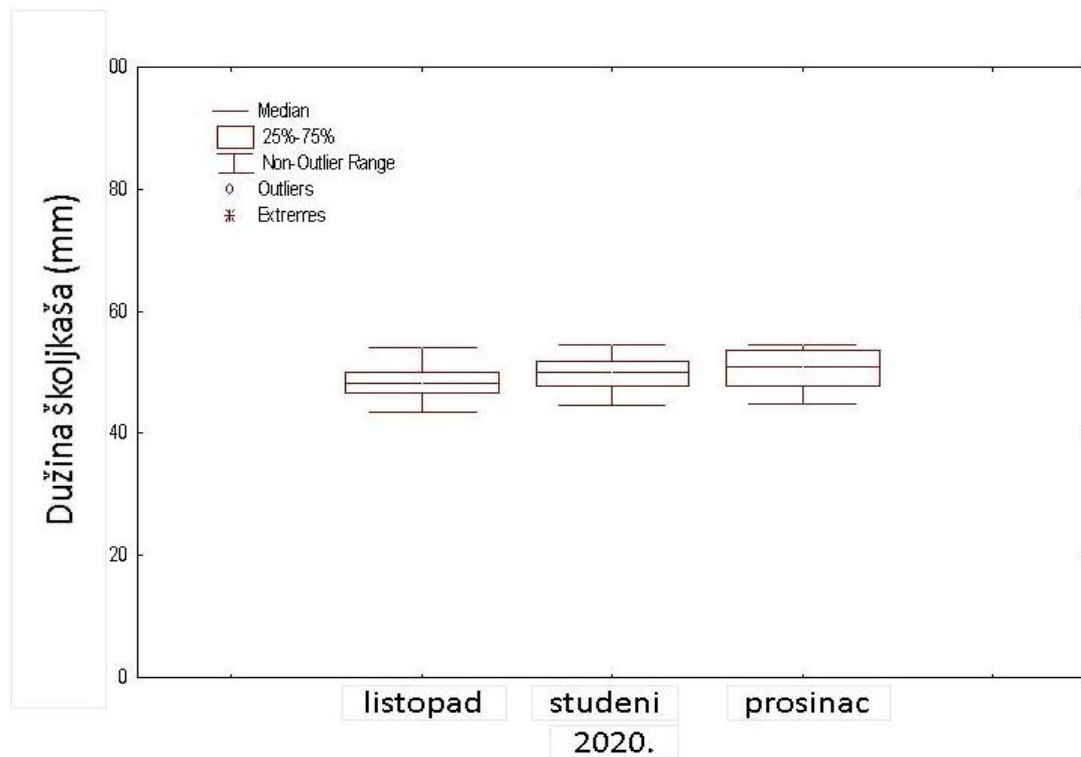
3.2. Morfološki parametri češljače

Rezultati mjerenja mase dobiveni pomoću vage pokazali su da je masa jedinki tijekom istraživanja rasla. Najniža vrijednost ukupne mase iznosila je 9,73 grama u listopadu, dok je najviša vrijednost iznosila 23,71 grama također u listopadu. Prema medijanu najveća izmjerena masa češljače zabilježena je u prosincu. Između pojedinih ukupnih masa nema statistički značajne razlike (ANOVA, $df=2$, $MS=5,108$, $F=0,4113$, $p=0,668042$). Navedeni podaci prikazani su na Slici 12.



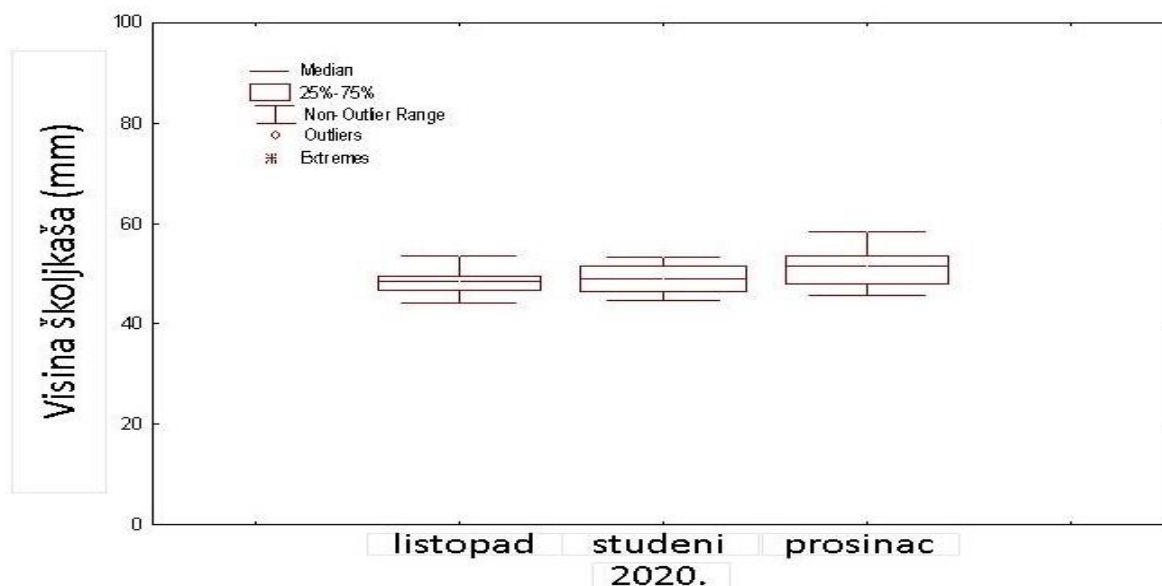
Slika 12. Grafički prikaz ukupne mase češljača od listopada (lis) do prosinca (pro) 2020. godine.

Na Slici 13. prikazani su rezultati mjerenja dužine jedinki pomoću digitalne pomične mjerke (preciznost 0,01 mm). Najmanja izmjerena dužina iznosila je 43,42 milimetra u listopadu, dok je najviša izmjerena 54,48 milimetra u prosincu. Medijalna vrijednost dužine češljača najveća je u prosincu. Između pojedinih dužina nema statistički značajne razlike (ANOVA, $df=2$, $MS=9,00$, $F=0,865$, $p=0,435562$).



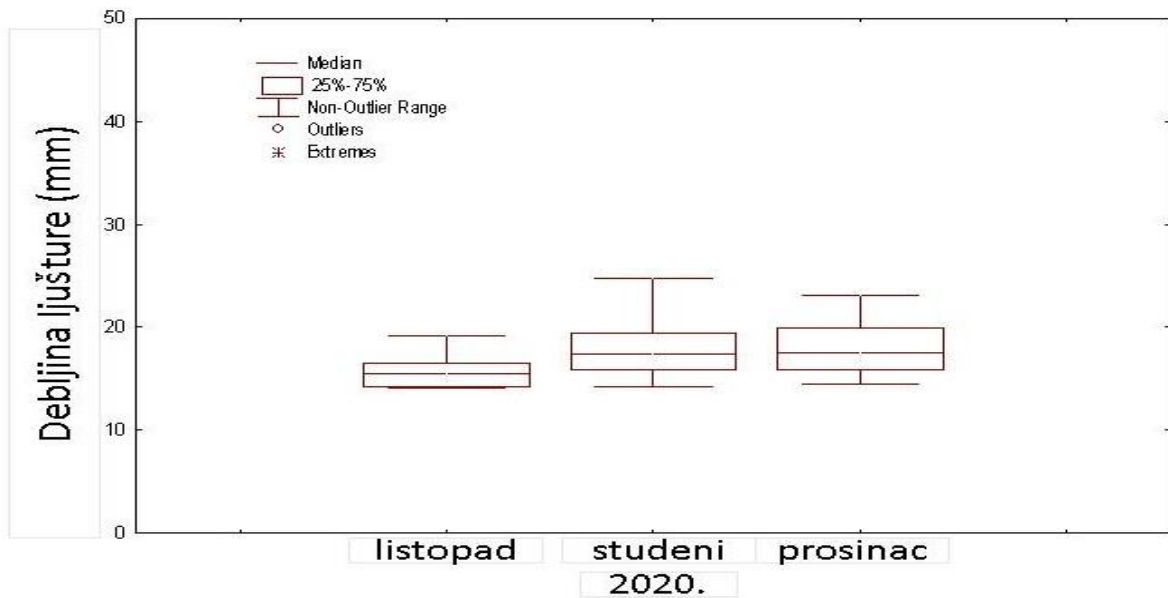
Slika 13. Grafički prikaz ukupne dužine češljača od listopada (lis) do prosinca (pro) 2020. godine.

Rezultati mjerenja visine dobiveni pomoću digitalne pomične mjerke (preciznost 0,01 mm) prikazani su na Slici 14. Najniža vrijednost visine iznosila je 44,21 milimetra u listopadu, dok je najviša vrijednost iznosila 58,4 milimetra u prosincu. Prema medijanu najveća izmjerena visina zabilježena je u prosincu. Između pojedinih visina nema statistički značajne razlike (ANOVA, $df=2$, $MS=19,14$, $F=1,726$, $p=0,202375$).



Slika 14. Grafički prikaz ukupne visine češljača od listopada (lis) do prosinca (pro) 2020. godine.

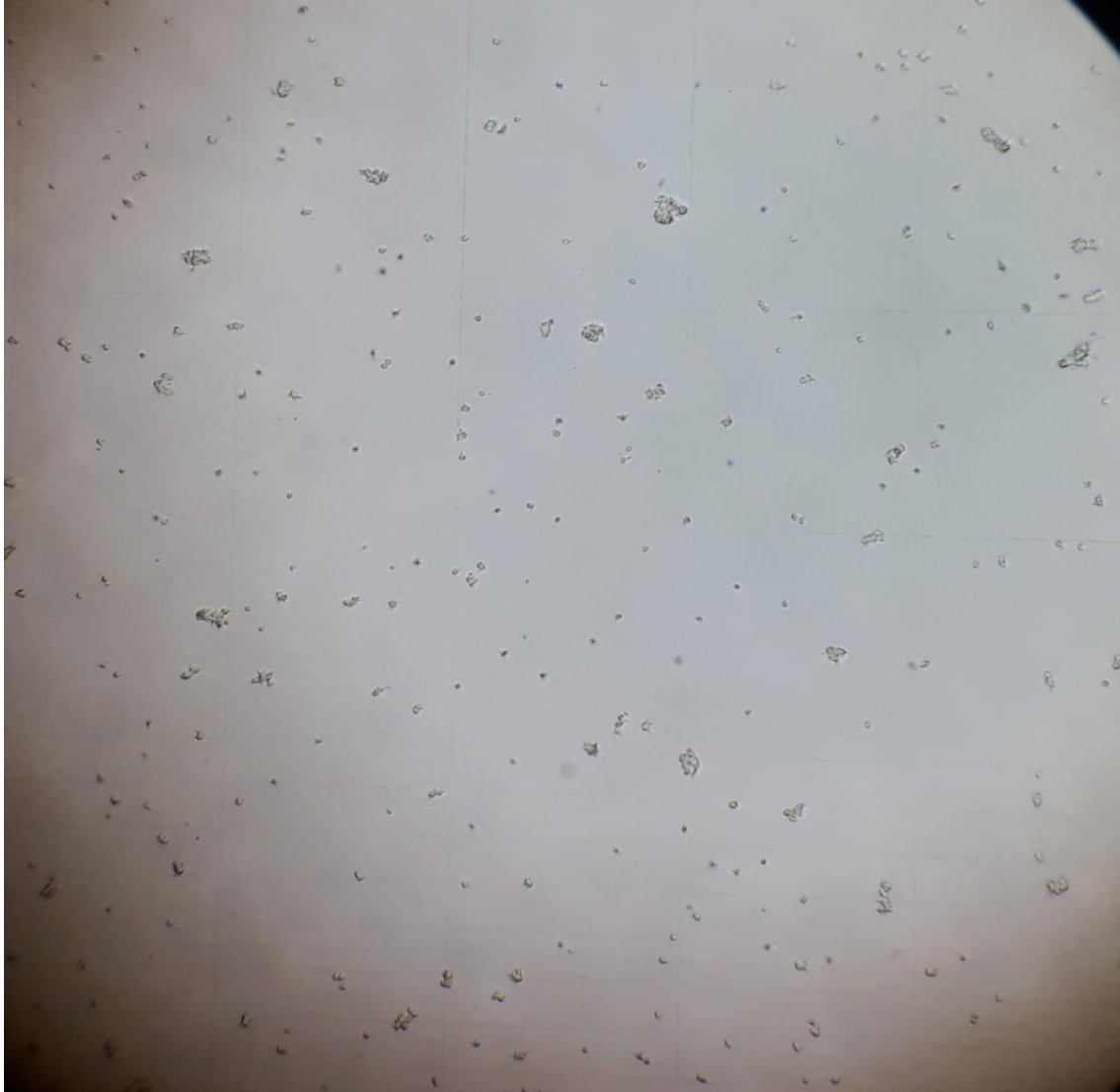
Rezultati mjerenja debljine ljuštore dobiveni pomoću digitalne pomične mjerke (preciznost 0,01mm) pokazuju nam povećanje do studenog u vrijednosti od 2,225 milimetra. Zatim vidimo smanjenje u prosincu u vrijednosti od 0,265 milimetra. Prema medijanu najveća izmjerena debljina ljuštore zabilježena je u studenom. Najniža vrijednost debljine ljuštore iznosila je 14,13 milimetra u listopadu, dok je najviša vrijednost iznosila 24,7 milimetra u studenom. Navedeni podaci su bez statistički značajnih razlika (ANOVA, $df=2$, $MS=13,832$, $F=1,9277$, $p=0,170361$, a prikazani su na Slici 15.



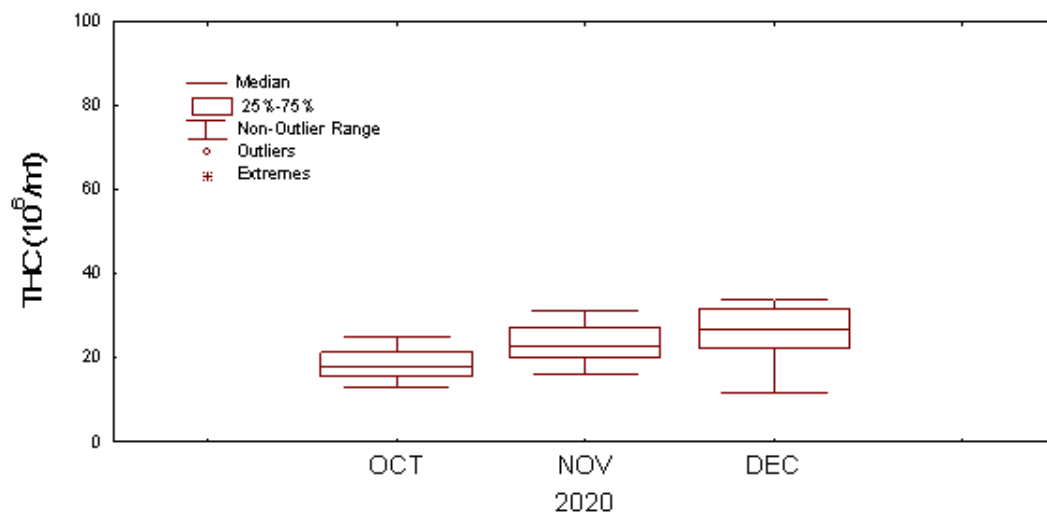
Slika 15. Grafički prikaz ukupne debljine ljuštore češljača od listopada (lis) do prosinca (pro) 2020. godine.

3.3 Ukupni broj hemocita u češljači

U svim kvadratićima Neubauerove komore mjerimo stanice, točnije po svakom kvadratiću, tj. polju izbrojimo vidljive stanice (Slika 16). Svaki kvadratić ima površinu od 1 mm² i dubinu od 0,1 mm, što daje ukupni volumen od 0,1 mm³. Zatim preračunavamo broj izmjerenih stanica kako bi dobili ukupni broj hemocita po mililitru. Preračunavamo na način da uzmemo prosječan broj izmjerenih stanica od svakog polja. Iznos koji dobijemo na kraju predstavlja ukupni broj hemocita u mililitru originalnog uzorka.



Slika 16. Hemociti u češljači *Aequipecten opercularis* uslikani pod svjetlosnim mikroskopom, povećanje 400X.



Slika 17. Grafički prikaz ukupnog broja hemocita u češljači od listopada (oct) do prosinca (dec) 2020. godine.

Najveći ukupni broj hemocita kod jedinke zabilježen je u zadnjem mjesecu mjerenja, prosincu kada je njihova vrijednost iznosila $20 \cdot 10^6$ hemocit/ml. Kod istih je jedinke prvi izmjereni broj hemocita u listopadu iznosio $18 \cdot 10^6$ hemocit/ml. Općenito možemo reći da je ukupni broj hemocita rastao u razdoblju od listopada do prosinca 2020. godine, kao što je prikazano na Slici 17. Na početku istraživanja je njihov broj bio nešto manji, vjerojatno zbog prilagodbe školjkaša laboratorijskim uvjetima. Dalje, ukupni broj hemocita se očekivano povećao, no ne značajno (ANOVA, $df=2$, $MS=148400$, $F=2,3223$, $p=0,122700$). Sve to govori da su se školjkaši dobro prilagodili na novu okolinu.

3.4. Korelacija parametara

Tablica 1. Korelacijski koeficijenti parametara.

	Ukupna masa	Dužina	Visina	Debljina	Broj hemocita
Temperatura	-0,148516	-0,056943	-0,095104	-0,450335	-0,213320
pH	0,405272	0,353285	0,324702	0,391276	-0,079657

Temperatura kao abiotički čimbenik pokazuje negativnu korelaciju sa parametrima promatranih morfoloških obilježja (ukupna masa, dužina, visina, debljina) i brojem hemocita. Što znači da se temperatura s tim varijablama nalazi u obrnutom odnosu. Točnije, više vrijednosti temperature povezane su s nižim vrijednostima morfoloških obilježja i manjim brojem hemocita. Najveću negativnu korelaciju temperatura pokazuje sa debljinom ljuštore, te iznosi -0,450335. Dok je najslabija negativna korelacija zabilježena kod dužine ljuštura u vrijednosti od -0,056943. Navedene korelacije očitali smo iz Tablice 1.

pH vrijednost je drugi abiotički čimbenik čiji su korelacijski odnosi prikazani u Tablici 1. Korelacijski koeficijenti morfoloških obilježja (ukupna masa, dužina, visina, debljina) pokazuju pozitivnu korelaciju s vrijednošću pH, dok jedino broj hemocita ima negativnu korelaciju u iznosu od -0,079657. Pozitivnom korelacijom nazivamo odnos u kojem porast jedne varijable prati i porast druge. Morfološko obilježje koje pokazuje najveću pozitivnu korelaciju s pH u iznosu od 0,40527 je ukupna masa. Najmanju pozitivnu korelaciju s temperaturom ima parametar visine od 0,32470.

Tablica 2. Korelacijski koeficijenti parametara.

Parametri	Dužina	Visina	Debljina
Ukupna masa	0,865690	0,780784	0,561758
Dužina		0,907399	0,634531
Visina			0,575655

Tablica 2. pokazuje korelaciju parametara morfoloških obilježja. Bitno je napomenuti kako je među svim parametrima korelacija pozitivna te uglavnom visoka. Ukupna masa pokazuje najveću korelaciju sa dužinom u iznosu 0,865690, a najmanju sa debljinom od 0,561758 te sa visinom u iznosu 0,780784. Dužina ljuštore ima najveću korelaciju sa visinom od 0,907399 te najmanju sa debljinom u iznosu 0,634531. Posljednji korelacijski odnos je između visine i debljine ljuštore, te iznosi 0,575655. Sve to nam skupa sa prethodnim grafovima (Graf 1.,2.,3.) u kojima smo primijetili da skoro svi parametri bilježe medijalni rast, govori da školjkaši rastu.

4. RASPRAVA

Klimatske promjene predstavljaju aktualni problem i prijetnju svim organizmima. Neki od uvjeta klimatskih promjena su povišena temperatura, zbog povećanog udjela tzv. stakleničkih plinova u atmosferi. Prisutno je i smanjenje pH vrijednosti mora i oceana, točnije proces zakiseljavanja oceana, zbog otapanja ugljikovog dioksida (Schalkhausser i sur., 2013). Navedeni parametri klimatskim promjenama utjecat će na rast školjkaša ali i na količinu hemocita u hemolimfi školjkaša potrebnih za prehranu i imunološku obranu školjkaša (Lin i sur., 2012). Zbog toga je od iznimne važnosti pratiti rast i razvoj školjkaša, primjerice češljače koja je ekološki važna vrsta u Jadranskom moru, ali i komercijalno važna vrsta školjkaša u Mediteranu.

U ovom radu provedeno je istraživanje na jedinkama češljače *A. opercularis*, prikupljene nedaleko od Pule. Promatran je ukupni broj hemocita tijekom vremenskog razdoblja od tri mjeseca, točnije od listopada do prosinca 2020. godine. Analiziran je utjecaj temperature i pH na vrijednosti ukupnog broja hemocita. Istovremeno, promatrane su i promjene morfoloških karakteristika školjkaša (ukupna masa, dužina, visina, debljina ljušture). Napravljeni su uvjeti klimatskih promjena u akvarijima. Vrijednosti temperature su povišene, a pH vrijednosti smanjene u odnosu na uvjete u kojima su se promatrani školjkaši nalazili u divljini. Temperatura i pH pokazale su manje dnevne oscilacije. Temperatura u akvarijima kretala se od 14,03 °C do 15,48 °C, dok se pH vrijednost kretala u rasponu 7,01 do 7,86.

Hemociti češljača imaju razne funkcije, dok je u ovome radu fokus stavljen na njih kao glavne komponente imunološkog sustava češljača. Ukupni broj hemocita predstavlja jedan od najčešće korištenih parametara za procjenu stanja školjkaša, budući da se pokazalo kako se broj i udio hemocita mijenja u stresnim situacijama za organizam (Mydlarz i sur., 2006). Imunološka obrana organizma direktno trpi posljedice vanjskih uvjeta okoliša, poput povišene temperature i smanjene pH vrijednosti (Gerdol i sur., 2018). U ovome se radu ukupni broj hemocita povećao, prema očekivanju, što sve pokazuje kako su se školjkaši dobro prilagodili novim uvjetima u akvarijima. Treba

napomenuti da je ukupni broj hemocita na početku istraživanja bio nešto niži, vjerojatno kao posljedica aklimatizacije, no privikavanjem na nove uvjete ukupni broj je rastao.

Proučavane su korelacije abiotičkih čimbenika temperature i pH s ukupnim brojem hemocita te sa promatranim morfološkim obilježjima. Među svim promatranim parametrima nije zabilježena statistički značajna razlika. Temperatura pokazuje negativnu korelaciju sa ukupnim brojem hemocita i parametrima promatranih morfoloških obilježja. Korelacijski koeficijenti morfoloških obilježja pokazuju pozitivnu korelaciju s vrijednošću pH, dok ukupni broj hemocita ima negativnu korelaciju. Negativna korelacija hemocita sa temperaturom i pH pokazuje da je broj hemocita manji pri višim temperaturama i nižim pH vrijednostima..

Istraživanja hemocita školjkaša postaju sve češća tek zadnjih nekoliko godina. Međutim, jako ih je malo provedeno na porodici Pectinidae (češljače) (Weizhu i sur., 2005). Paul (1980) proveo je istraživanje preživljavanja gornje granice temperature, točnije toleranciju *A. opercularis*. Otkrio je povećanje gornje granice smrtonosnih temperatura u rasponu 19-25 °C. Također je pokazao između tri grupe različitih veličina jedinki, da su one najmlađe češljače bile najotpornije na visoke temperature (Paul, 1980). Također, Schalkhauser i sur. (2013) u svom su istraživanju pokazali kako smanjenje pH vrijednosti dovodi do slabijih odgovora na bijeg kod vrste *Pecten maximus*. Samo je za pretpostaviti da bi i kod naše vrste, *A. opercularis* došlo do isto tako slabijeg plivanja kao odgovora na predatore.

Dobiveni rezultati u ovome radu pokazuju rast među jedinkama *A. opercularis* te se on može pratiti u svim promatranim parametrima, kao i među hemocitima koji su bili glavni parametar u ovome radu. Bilo bi zanimljivo vidjeti imunološki odgovor *A. opercularis* u nekom dužem vremenskom razdoblju ili razliku među starosnim skupinama. Svakako je potrebno provesti još detaljnija istraživanja na ovu temu, pogotovo obzirom na činjenicu da se temperatura mora samo povećava, a pH sve više smanjuje.

5. ZAKLJUČAK

1) Najveći ukupni broj hemocita izmjeren je kod jedinke češljače *Aequipecten opercularis* u prosincu u iznosu od $20 \cdot 10^6$ hemocit/ml, čiji je početni broj u listopadu bio $18 \cdot 10^6$ hemocit/ml.

2) Ukupni broj hemocita kod češljače *A. opercularis* pokazuje rast tijekom jesenskog perioda od tri mjeseca 2020.godine.

3) Temperatura i pH pokazuju negativnu korelaciju s ukupnim brojem hemocita u češljači *A. opercularis*, tj. više temperature i niži pH utječu na smanjenje ukupnog broja hemocita.

6. LITERATURA

Antolović, M., Antolović, N., 2012. Biološke i ekološke karakteristike male kapice (*Chlamys varia* LIN., 1758) - osnova kontroliranog uzgoja, *Ribarstvo*, 70, (1), 31-40.

Aphotomarine, 2021. *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) - Queen scallop (Marine bivalves). Internet, raspoloživo na:

https://www.aphotomarine.com/bivalve_chlamys_opercularis_queen_scallop.html# (pristupljeno 25.06.2021.).

Bianchi VA., Castro JM., Rocchetta I., Bieczynski F., Luquet CM., 2014. Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (*Diplodon chilensis*) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian lake. *Fish Shellfish Immunology* (42).

Estrada, N., Velázquez, E., Rodríguez-Jaramillo, C., Ascencio F., 2013.

Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Immunobiology* 218, 1093–1103.

Gerdol, M., Gomez-Chiarri, M., Castillo, G., Figueras, A., Fiorito, G., Moreira, R., Novoa, B., Pallavicini, A., Ponte, G., Roumbedakis, K., Venier, P., Vasta, R., 2018. Immunity in Molluscs: Recognition and Effector Mechanisms, with a focus on Bivalvia, *Advances in Comparative Immunology*, pp. 231.

González R, Gonçalves AT, Rojas R, Brokordt K, Rosa RD and Schmitt P., 2020. *Host Defense Effectors Expressed by Hemocytes Shape the Bacterial Microbiota From the Scallop Hemolymph*. *Front. Immunol.* 11:599625.

Hinz, H., Murray, L., Fraser, M., Kaiser, M., 2012. The environmental impacts of three different queen scallop (*Aequipecten opercularis*) fishing gears, *Marine Environmental Research*, 73, 85-95.

- Jin, H., Song, J., Chul, M., Park, S., 2009. *Effects of water temperature change on immune function in surf clams *Macra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae)*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 102, .30-35.
- Johnson, A., Hickson, A., Swan, J., Brown, M., Heaton, T., Chenery, S., Balson, P., 2015. *The Queen Scallop *Aequipecten opercularis*: a new source of information on late Cenozoic marine environments in Europe*, Division of Earth Sciences, University of Derby, 177., 425-439.
- Jurinović, J., 2018. *Uzgoj češljača*, Sveučilište u Dubrovniku.
- Kunica, V., 2013. *Komercijalna kvaliteta male kapice *Chlamys varia* (Linnaeus, 1758) uzgajane u raznim tehnološkim sustavima*, Sveučilište u Dubrovniku.
- Lin T., Zhou, K., Lai, Q., Yao, Z., Li, Z., Ying, J., 2012. *Seasonal variations of water temperature, food availability, size and reproduction on the hemocyte parameters in the scallop *Chlamys Farreri**. *Journal of Shellfish Research*, 31(3), 663-670.
- Lopez, C., Carballal, M., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. *Morphological Characterization of the Hemocytes of the Clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia)*, *Journal Of Invertebrate Pathology* 69, 51-57.
- Matoničkin, I., Habdija, I., Primc- Habdija, B., 1998. *Beskralješnjaci- biologija nižih avvertebrata*, III. prerađeno i dopunjeno izdanje. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Školska knjiga, Zagreb.
- Mydlarz L.D., Jones L.E., Harvell C.D. 2006. *Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37.
- Paul, J.D. 1980. *Salinity-temperature relationships in the queen scallop *Chalamys opercularis** . *Marine Biology* 56, 295–300.
- Petrina, P., 2019. *Genotoksični učinak farmaceutika na školjkaše* Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Ponder, F., Lindberg, R., Ponder, J., 2019. *Biology and Evolution of the Mollusca*, CRC Press, Volume 1, 925 pp.

Schalkhauser B., Bock C., Stemmer K., Brey T., Ponter H., Lannig G. 2013. Impact of ocean acidification on escape performance of the king scallop, *Pecten maximus*, from Norway. *Marine Biology* 160:1995–2006.

Schmidt, M., PPhilipp R., Abele, D., 2008. *Size and age-dependent changes of escape response to predator attack in the Queen scallop Aequipecten opercularis*, *Marine Biology Research*, 442-450.

Shumway, E., Parsons, G., 2016. *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*, Third Edition, Volume 40, 1216 pp.

The Marine Life Information Network, 2021. Queen scallop (*Aequipecten opercularis*). Internet, raspoloživo na: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1997> (pristupljeno 17.06.2021.).

Vyacheslav, A., 2016. *Hematopoiesis in Bivalvia larvae: Cellular origin, differentiation of hemocytes, and neoplasia*, *Developmental and Comparative Immunology*.

Weizhu Z., Xinzhong W., Jingfeng S., Dengfeng L. 2005. Morphological and functional characterization of the hemocytes of the scallop, *Chlamys Farreri*. *Journal of Shellfish Research*, 24(4):931-936.

Wong, C., 2016. *Nutrition and reproductive condition of wild and cultured New Zealand scallops (Pecten novaezelandiae)*, Faculty of Health and Environmental Sciences.

7. SAŽETAK

Hemociti su cirkulirajuće krvne stanice raznih funkcija, od probave i transporta tvari, pa sve do otpuštanja enzima te unutarnje obrane organizma. U ovome je radu stavljen naglasak na hemocite kao glavne komponente imunološkog sustava školjkaša. Ispitivan je učinak temperature i pH vrijednosti na promjene ukupnog broja hemocita u češljači *Aequipecten opercularis* tijekom jesenskog perioda od tri mjeseca u laboratorijskim uvjetima. Kontinuirano je mjereno ukupni broj hemocita. Osim toga, određivane su promjene morfoloških obilježja (ukupna masa, dužina, visina, debljina ljuštore) pomoću pomične mjerke i vage. Rezultati pokazuju rast ukupnog broja hemocita, kao i rast promatranih morfoloških obilježja. Utvrđena je negativna korelacija hemocita sa temperaturom i pH vrijednosti, što znači da se njihov broj smanjuje pri višim temperaturama i nižim pH vrijednostima, kao posljedica prilagodbe organizma. Rezultati istraživanja ukazuju na dobru prilagodbu jedinki češljače u uvjetima uzgoja i prihrane u akvariju.

8. ABSTRACT

Hemocytes are circulating blood cells of various functions, from digestion and transport of substances to the release of enzymes and the body's internal defenses. In this research, emphasis is placed on hemocytes as the main components of the bivalve immune system. The effect of temperature and pH on changes in total hemocyte count in the *Aequipecten opercularis* was investigated during the autumn period of three months under laboratory conditions. The number of hemocytes was continuously measured in the same scallops. In addition, changes in morphological characteristics (total mass, length, height, shell thickness) were determined using a movable scale and weighing scale. The results show an increase in the total number of hemocytes, as well as an increase in the observed morphological features. A negative correlation of hemocytes with temperature and pH values was found, which means that their number decreases at higher temperatures and lower pH values, as a consequence of the organism adaptation. The results of the research indicate a good adaptation of scallop individuals to aquarium and feeding conditions.