

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Tea Malivuković

Učinak akutno povišenih koncentracija amonijaka
na parametre hemolimfe mediteranske dagnje
Mytilus galloprovincialis

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2015

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Tea Malivuković

Učinak akutno povišenih koncentracija amonijaka na
parametre hemolimfe mediteranske dagnje *Mytilus*
galloprovincialis

DIPLOMSKI RAD

Mentor:
doc. dr. sc. Ana Gavrilović

Komentor:
izv. prof. dr. sc. Željko Jakšić

Dubrovnik, 2015

Ovaj diplomski rad izrađen je pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Gavrilović i izv. prof. Željka Jakšića. Praktični dio rada odrađen je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju i Aquariumu u Puli.

ZAHVALA

Prvenstveno želim izraziti zahvalnost svojoj mentorici doc. dr. sc. Ani Gavrilović na korisnim savjetima i kritičkom osvrtu na moj rad. Njezini savjeti bili su od izrazite važnosti, kao i njezino razumijevanje i susretljivost tijekom cijelog tog perioda izrade Diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Željku Jakšiću iz Instituta Ruđer Bošković, Centra za istraživanje mora u Rovinju, koji je prenio svoje stručno znanje, omogućio izvođenje eksperimentalnog dijela rada i korištenje laboratorijske opreme te na korisnim savjetima tijekom izrade sve do konačnog oblikovanja rada pridonio njegovoј kvaliteti.

Također se zahvaljujem dr. sc. Mileni Mičić i Aquariumu Pula što su mi omogućili korištenje laboratorijske opreme, te stručnom i ljubaznom osoblju Aquariuma na pomoći i podršci.

Nastavnom osoblju Sveučilišta u Dubrovniku kao i znanstvenicima Instituta Ruđer Bošković, Centra za istraživanje mora u Rovinju zahvaljujem se na znanju koje su mi prenijeli, pomoći i instrukcijama.

Hvala svim kolegama s kojima sam dijelila studentske dane i s kojima je vrijeme proletijelo brzo i veselo.

Na kraju moram spomenuti svoju obitelj i prijatelje koji su bili uz mene tijekom svih godina studiranja. Posebno hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili da spoznam sebe i svoje mogućnosti.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Uzgoj školjkaša i trendovi u akvakulturi	2
1. 2. Amonijak kao produkt ekskrecije školjkaša	3
1. 2. 1. Amonijak u akvakulturi	3
1. 2. 2. Ekskrecija metabolita dušika kod školjkaša.....	5
1. 3. Mediteranska dagnja <i>Mytilus gallopravincialis</i> (Lamarck, 1819)	6
1. 3. 1. Geografska rasprostranjenost.....	6
1. 3. 1. Osnovne značajke vrste.....	7
1. 3. 4. Krvožilni sustav	8
1 .3. 3. Imunosni sustav.....	10
2. CILJ RADA	12
3. 1. SOS-test	13
3. 2. Uzorkovanje hemolimfe.....	14
3. 3. Protočna citometrija	15
3. 4. Određivanje biokemijskih parametara hemolimfe dagnji	17
3. 3. 1. Laktat dehidrogenaza	18
3. 3. 2. Mokraćna kiselina	18
3. 3. 3. Urea.....	19
3. 5. Statistička obrada podataka.....	20
4. REZULTATI.....	21
4. 1. Stres na stres	21
4. 2. Određivanje populacije hemocita.....	23
4. 3. Biokemijski parametri: laktat dehidrogenaza, mokraćna kiselina i urea	29
4. 3. 1. Laktat dehidrogenaza (LDH)	29
4. 3. 3. Urea.....	31
4. 4. Regresijska analiza.....	32
5. RASPRAVA	33
6. ZAKLJUČAK	38
7. LITERATURA	39

SAŽETAK

Učinak akutno povišenih koncentracija amonijaka na parametre hemolimfe mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Rad prikazuje modulacije parametara hemolimfe mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1919) uzrokovane izlaganjem jedinki akutnom stresu, tj. kratkotrajno povećanim koncentracijama amonijaka u uzgojnom mediju. Pored toga utvrdio se i postotak preživljavanja jedinki nakon izlaganja pokusnim koncentracijama amonijaka, stres na stres testom.

Tri pokusne skupine dagnji, bile su izložene 5 mM, 10 mM i 30 mM NH₄Cl tijekom 48 sati, dok je četvrtu skupinu dagnji činila kontrolna skupina u koju prethodno nije dodavan amonij klorid. Nakon izlaganja, u hemolimfi dagnji mjereni su biokemijski parametri: laktat dehidrogenaza, mokraćna kiselina i urea. Pored toga pokušalo se utvrditi dolazi li do promjena u broju hemocita, promjena u strukturi samih hemocita i/ili promjena strukture pojedinih frakcija hemocita uslijed izloženosti.

Iz rezultata provedenog stres na stres testa vidljiv je negativni utjecaj na kondiciju i preživljavanje jedinki. Ujedno su utvrđene promjene u sastavu hemolimfe, što se očituje u promijeni strukture pojedinih populacija hemocita. Nadalje, utvrđene promjene biokemijskih parametara krvi impliciraju na svojstven odgovor organizama na izloženost specifičnom zagađivalu, amonij kloridu. Konačno, uočena je značajna linearna korelacija ($y = -7,1393x + 85,461$; $R^2 = 0.97$) između smanjenja udjela R1 populacije hemocita i srednjih vrijednosti razine uree u hemolimfi ne izloženih (kontrolnih) i izloženih dagnji, koja upućuje na moguću funkciju R2 i R3 populacije hemocita u metabolizmu amonijaka i sintezi uree kao tvari kojom se višak amonij iona izlučuje iz organizma.

Ključne riječi:

amonijak / hemociti / laktat dehidrogenaza / *Mytilus galloprovincialis* / mokraćna kiselina / urea

ABSTRACT

The effect of acutely elevated concentrations of ammonia on Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* hemolymph parameters

This research describes the modulation of hemolymph parameters in Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1919) caused by acute stress induced with short term exposure to elevated ammonia concentrations. The percentage of survival following by exposure was also determined by use of Stress on stress test.

Three experimental groups of mussels were exposed to 5, 10 and 30 mM NH₄Cl for 48 hours, while fourth, control group was not exposed to elevated ammonium chloride concentration. After the exposure, biochemical parameters of hemolymph were measured: lactate dehydrogenase, uric acid and urea. In addition, determination of eventual changes in the hemocyte count, hemocyte structure and / or changes in the structure of different fractions was made.

Stress on stress test resulted in a visible negative impact on the mussel condition and survival, during which there was a change in their haemolymph reflected in haemolymph population change. Furthermore, the observed changes in haemolymph biochemical parameters implies the organism's inherent response to specific pollutants exposure. Finally, there was a significant linear correlation ($y=-7,1393x+85,461$; $R^2=0.97$) between reduction the population of R1 hemocytes and average values of urea levels in the hemolymph in not exposed (control) and exposed mussels. This findings suggests a possible function of R2 and R3 hemocytes populations in the ammonia and urea metabolism, and synthesis of urea as a substance by which an excess of ammonium ions is removed from the body.

Key words: ammonia / hemocytes / lactate dehydrogenase / *Mytilus galloprovincialis* / urea / ureic acid

1. UVOD

Dušik je esencijalan nutrijent za sve žive organizme. Nalazimo ga u proteinima, nukleinskim kiselinama, koenzimima i pigmentima (Hagopian i Riley, 1998). U akvakulturi ga, osim kao esencijalni nutritivni sastojak promatramo i kao sastavni dio otpadnih produkata metabolizma uzgajanih organizma koji značajno utječe na kvalitetu uzgojne sredine (Wheaton i sur., 1991).

Jedan od osnovnih produkata razgradnje dušičnih spojeva kod morskih organizama je amonijak (Wright, 1995), koji pri povećanoj koncentraciji u vodenom okolišu zbog svoje toksičnosti predstavlja opasnost za uzgajane organizme (Randall i Tsui, 2002). U akvakulturi problem nastaje u slučaju nagomilavanja velike količine otpadnih produkata metabolizma i nepojedene hrane u uzgojnoj sredini. To se najčešće javlja u slabije protočnim uzgojnim sustavima koje karakteriziraju visoke uzgojne gustoće te u superintenzivnim zatvorenim recirkulacijskim sustavima koje karakterizira nedovoljna kapacitiranost biofltra. U dosadašnjim istraživanjima uglavnom se pratio toksični učinak amonijaka na ribe, dok su istraživanja provedena na školjkašima malobrojna (Sadok i sur. 1995, 1997, 1999, Montresor i Miranda-Filho 2013). Primjena novih tehnologija i intenzifikacija uzgoja, kondicioniranje matičnih stokova u mrijestilištima te uzgoj ličinki ukazuje na potrebu boljeg poznavanja toksičnih učinaka amonijaka na školjkaše. Ta bi saznanja bila izuzetno važna za dizajn efikasnih biofiltracijskih komponenti intenzivnih uzgojnih sustava koji će pored smanjenja stresa i osiguranja dobrobiti organizama, polučiti i bolje proizvodne rezultate (Šarić i sur., 2010; Jug-Dujaković i sur., 2011).

Cilj ovog rada bio je utvrditi eventualne modulacije parametara hemolimfe (indikatore stresa) kod mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1919) uzrokovane izlaganjem jedinki akutnom stresu, tj. kratkotrajno povećanim koncentracijama amonijaka u uzgojnom mediju. Pored toga određivan je i postotak preživljavanja jedinki nakon izlaganja pokusnim koncentracijama amonijaka stres na stres (SOS) testom.

1. 1. Uzgoj školjkaša i trendovi u akvakulturi

Globalna akvakulturna proizvodnja zadnjih je pet desetljeća u stalnom porastu, te predstavlja najbrže rastući industrijski prehrambeni sektor (FAO, 2014). Uzgoj u morskom okolišu zauzima 57 % ukupne proizvodnje, od čega se 40 % odnosi na uzgoj mekušaca, a 13 % uzgoj karnivorne ribe (FAO, 2010). Marikultura kao gospodarska aktivnost danas predstavlja snažno razvijenu industriju s godišnjom stopom rasta od oko 8 % i visokom profitabilnošću, posebice u razvijenim zemljama. Ukupna svjetska akvakulturna proizvodnja je 2012. godine dosegla ukupno 90,4 milijuna tona uザgajanih vodenih organizama. Svjetskom marikulturom količinski dominira uzgoj ribe, školjkaša i rakova sa 66,6 milijuna tona, dok na morske alge otpada ostalih 23,8 milijuna tona. Neki se od uザgajanih organizama ne koriste za prehranu, već su dekorativne prirode, kao što su to npr. školjkaši koji se uザgajaju zbog biomineralizacijske tvorbe bisera, a čiji udio u proizvodnji iznosi 22 400 tona. Najrazvijenija i najobimnija akvakulturna djelatnost zabilježena je u Kini, čija je proizvodnja 2013. godine iznosila 43,5 milijuna tona ribljih proizvoda i 13,5 milijuna tona uザgajanih morskih algi. Ostali veliki proizvođači su Sjedinjene Američke Države, Španjolska, Francuska, Italija, Japan i Republika Korea (FAO, 2014). Akvakulturna proizvodnja Europske Unije iznosi 1,3 milijuna tona, ukupne vrijednosti 3,2 bilijuna eura (MPS, 2011). Međutim, usprkos snažnom porastu ulaganja u ovaj sektor, Europska Unija uvozi preko 60 % od ukupne količine proizvoda akvakulture za svoje potrebe. Marikultura Republike Hrvatske uključuje uzgoj bijele ribe, plave ribe i školjkaša. Ukupna godišnja proizvodnja iznosi oko 12 000 tona, ukupne vrijednosti oko 876 milijuna kn (120 milijuna eura). Nadalje, uzgoj školjkaša posebno je snažno razvijena djelatnost u cijelom svijetu, a u Europi i Hrvatskoj najveći udio uザgajanih morskih organizama predstavljaju upravo školjkaši. Uzgoj školjkaša uključuje uzgoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*) na pergolarima u posebno kontroliranim područjima kao što su to zapadna obala Istre, Novigradsko more, Velebitski kanal, ušće rijeke Krke, Malostonski zaljev i Malo more. Proizvodnja se temelji na sakupljanju mlađi iz prirode i iznosi oko 3 000 tone daganja i oko 1 milijun kamenica godišnje (MPS, 2011).

Uzgoj pojedinih vrsta školjkaša u pojedinim regijama svojstven je i odgovara njihovoj prirodnoj rasprostranjenosti. Pri tom su važni čimbenici izbora vrste jednostavnost uzgoja i stopa rasta, koji značajno doprinose ekonomičnosti i profitabilnosti uzgoja u marikulturi. Nadalje,

važni čimbenici su i zatvoreni reproduktivni ciklus te mogućnost proizvodnje mlađi u mrjestilištima što dodatno osigurava održivost uzgoja. Kako bi određenu vrstu plasirali na tržište važna je njena prepoznatljivost na tržištu i tradicija njezine konzumacije (potražnja). Vrste koje su najviše uzbijane u Europi i imaju dugu tradiciju u akvakulturi su školjkaši iz nadporodica *Ostreoidea* i *Mytilacea* (Spencer, 2002).

Uzgoj školjkaša uključuje nekoliko vremenski i prostorno uvjetovanih postupaka kao što su priprema i postavljanje kolektora za sakupljanje mlađi, vađenje kolektora nakon prihvata i sortiranje mlađi prema veličini, razrjeđenje početne nasadne gustoće, obrada i uzgoj mlađi do konzumne veličine, izlov konzumnih školjkaša i njihova priprema za tržište (Spencer, 2002). Za uspješan uzgoj školjkaša nužno je osigurati konstantu količinu mlađi, koja se u većini slučajeva, ukoliko postoje dostatne količine u prirodi, prikuplja iz prirodnih staništa, a ukoliko iz nekog razloga ne postoji dovoljno mlađi, ona se proizvodi u mrjestilištima. S ciljem dobivanja dostatne količine mlađi za vrijeme mriješćenja dagnje postavljaju se kolektori dovoljno velike površine, kako bi se nakon metamorfoze na njih prihvatile ličinke. Kolektori se također postavljaju i u mrjestilišta da bi se što veći broj proizvedenih ličinki iskoristio u sljedećim uzgojnim fazama (Spencer, 2002.). Jedan od problema u uzgoju školjkaša predstavlja praksa sakupljanja mlađi iz prirode, jer je nemoguće predvidjeti količinu jedinki koja će se u određenom periodu prikupiti s obzirom da količina mlađi u prirodi nije konstantna i ovisi o mnogim abiotičkim i biotičkim čimbenicima. Upravo iz tog razloga teži se k proizvodnji mlađi u mrjestilištima, pri čemu su uz pravilan dizajn sustava i pravilan odabir opreme nužni visoka stručnost zaposlenika, odlično poznavanje fiziologije svake pojedinačne vrste školjkaša te optimalnih parametara kvalitete uzgojne sredine koje ta vrsta zahtijeva (Helm i sur., 2004).

1. 2. Amonijak kao produkt ekskrecije školjkaša

1. 2. 1. Amonijak u akvakulturi

Dušik je esencijalan nutrijent svih živućih organizama, i čini važnu komponentu proteina, aminokiselina, koenzima i ostalih biokemijskih spojeva. Međutim fiziološke potrebe organizma za dušičnim spojevima su ograničene, te se relativno brzo zadovoljavaju (Timmons i sur., 2002). Uz brojne razlike u metabolizmu dušikovih spojeva kod različitih organizama,

glavne produkte ovih kataboličkih reakcija predstavljaju amonijak, urea i mokraćna kiselina. Usprkos različitim kemijskim svojstvima, ovi se spojevi prenose kroz stanične membrane i aktivno odstranjuju iz organizma. Međutim, njihovo nakupljanje u krvi i tkivnim tekućinama negativno se odražava na acido-baznu ravnotežu i osmoregulaciju (Wright, 1995). Jedan od osnovnih produkata razgradnje dušičnih spojeva kod morskih organizama je amonijak (Wright, 1995), koji pri povećanju koncentracije u vodenom okolišu zbog svoje toksičnosti predstavlja opasnost za uzgajane organizme (Randall i Tsui, 2002). Kako bi se visoko toksični amonijak uklonio iz uzgojnog medija, on se tijekom procesa nitrifikacije posredstvom aerobnih kemosintetskih bakterija transformira do nitrata, pri čemu je posrednik ove reakcije nitrit:



Tako su bakterije roda *Nitrosomas* najvećim dijelom odgovorne za proces pretvorbe amonijaka do nitrita, dok bakterije roda *Nitrobacter* vode proces nitrifikacije od nitrita do nitrata (Timmons i sur., 2002). Neki rodovi anaerobnih gram-pozitivnih (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*) i gram-negativnih (*Pseudomonas*, *Achromobacter*) bakterija naknadno mogu procesom denitrifikacije pretvoriti nitrati u elementarni dušik, koji će u plinovitom stanju biti eliminiran iz sustava (Meade, 1976).

Kako se proces nitrifikacije odvija u prirodnim uvjetima, primjenjuje se i u izradi biofiltera za intenzivne i superintenzivne uzgojne sustave, s ciljem održavanja koncentracije amonijaka na prihvatljivim razinama (Meade, 1985). Iako je amonijak najtoksičniji dušični spoj u zatvorenom sustavu, prisutnost velike koncentracije nitrita također može predstavljati problem u uzgoju. Nitriti, kao posrednici procesa nitrifikacije se ponekad mogu javiti i u vrlo visokim koncentracijama u akvakulturnim sustavima, posebice u zatvorenom recirkulacijskom sustavu koji je po prvi puta napunjen vodom ukoliko odgovarajuće bakterije nisu kolonizirale biofilter ili su prisutne u suviše malim količinama te nedovoljno brzo metaboliziraju toksične ione novonastalih nitrita. Za razliku od nitrita, nitrati su u prirodnim vodama prisutni u niskim koncentracijama Uočeno je da bakterije roda *Nirosomonas* često brže naseljavaju filtere od onih roda *Nitrobacter*, pa se ponekad može dogoditi da u testovima kakvoće vode uz povećanu koncentraciju nitrita ne nailazimo na nakupljanje ni amonijaka ni nitrata (Timmons i sur., 2002).

U vodenom mediju amonijak je prisutan u dva oblika, ioniziranom (NH_4^+) i neioniziranom (NH_3). Propusnost plazma membrana za nabijene, ionizirane amonijeve ione (NH_4^+) je relativno niska, a NH_3 oblik je lipofilan, topiv u mastima te ovaj oblik vodenim organizmima lakše apsorbiraju, tj. lakše prolazi kroz biološke membrane, što ga čini biološki dostupnijim (Ip i Chew, 2010). Osnovni čimbenici o kojima ovisi oblik u kojem će amonijak biti prisutan u vodenom mediju su pH, temperatura i salinitet, tj. ionska jakost medija. Povećanjem pH ili temperature vodenog medija povećava se i koncentracija toksičnog neioniziranog NH_3 (Timmons i sur., 2002). U tvrdoj i slanoj vodi količina neioniziranog amonijaka je manja od ioniziranog oblika (Emerson i sur., 1975.) Međutim, kada govorimo o toksičnosti amonijaka treba sagledati i vrstu i stanje organizma. Stres, metabolička aktivnost organizma i dostupnost hrane utječe na manifestaciju toksičnosti u svakom pojedinom organizmu. Različite vrste akvatičnih organizama na različite načine metaboliziraju spojeve s dušikom te tako i različito toleriraju povišene koncentracije amonijaka (Randall i Tsui, 2002).

1. 2. 2. Ekskrecija metabolita dušika kod školjkaša

Suvišni dušik u školjkaša u najvećoj se mjeri izlučuje u obliku amonijaka (Hochachka, 1983). Međutim rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na varijacije ekskretornih produkata, te je uočeno da amonijak nije jedini produkt ekskrecije školjkaša, već u određenim količinama to mogu biti i urea, aminokiseline i mokraćna kiselina. Istraživanja provedena na kamenici *Crassostrea virginica*, kunjki *Mya arenaria* i dagnji *Mytilus edulis* pokazuju da ove vrste mogu izlučivati 4-28 % dušika u obliku uree, dok je kod ostalih školjkaša ta količina znatno manja (Hochachka, 1983). Okolišni uvjeti su, pokazalo se, bitan faktor o kojem ovisi u kojim će se količinama izlučivati pojedini dušikovi spojevi. Tijekom ljetnih mjeseci dagnja izlučuje čak 30% dušika u obliku aminokiselina, a ostatak čini većinom amonijak. Tijekom zime i proljeća udio izlučenih aminokiselina u ukupnoj količini dušikovih spojeva iznosi maksimalno 3.4 %, pri čemu udio amonijaka koji se izlučuje raste na 96,6 %. Međutim, Bayne i Scullard (1977) uočili su kako je izlučivanje amonijaka maksimalno u kasno proljeće i rano ljeto kada se dagnja intenzivno hrani, a minimalno zimi tijekom gametogeneze i mrijesta, kada je potreba za hranom niža. Nadalje, u dagnji koje su izgladnjele tijekom zime koncentracija izlučenog amonijaka u rano proljeće je narasla 5 do 10 puta kod manjih jedinki i nešto manje od 50 % kod većih jedinki. Uočeno je da su koncentracije izlučenog amonijaka i stope utrošaka kisika bile niže kod

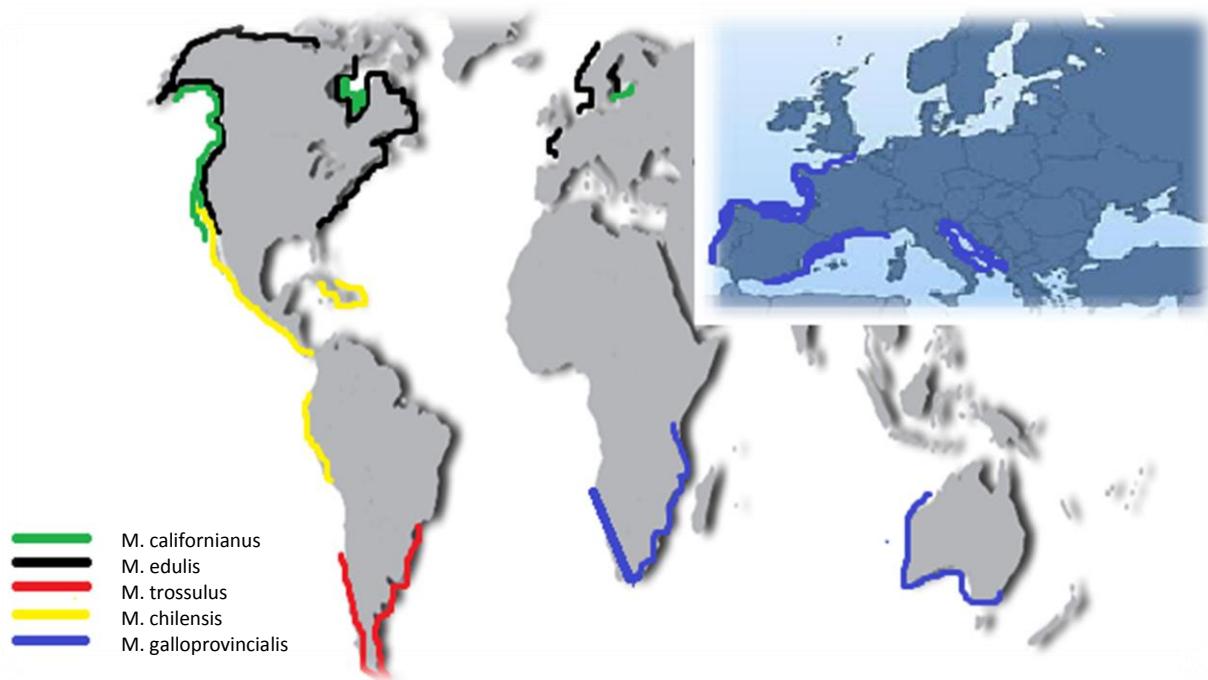
izgladnjelih u odnosu na dobro uhranjene jedinke (Bayne i Scullard, 1977). Salinitet je još jedan faktor koji utječe na stopu izlučivanja dušika, te je primijećeno prolazno povećanje izlučivanja amonijaka kod vrsta koje su premještene s područja visokog saliniteta u područje niskog saliniteta (Emerson, 1969). Navedeni rezultati ukazuju da promjena temperature, salinitet kao i ostali čimbenici kakvoće uzgojne sredine te reproduktivni ciklus znatno utječu na metaboličke puteve dušika u organizmu.

1. 3. Mediteranska dagnja *Mytilus gallopravincialis* (Lamarck, 1819)

Dagnje, roda *Mytilus* pripadaju najbrojnijim morskim mekušcima i sačinjavaju važan element ekologije obalnih voda. Kako imaju visoku energetsku vrijednost te sadrže za ljudsku prehranu vrijedne kemijske tvari, a također su i veoma ukusne, sedentarni način života čini ih idealnim kandidatima za uzgoj. S obzirom na njihovu prirodu sedentarnih filtratora dagnje akumuliraju i toksične tvari, te se danas često koriste i kao bioindikatori u biomonitoringu kvalitete morske vode (Gosling, 1992).

1. 3. 1. Geografska rasprostranjenost

Prirodno stanište Mediteranske dagnje *Mytilus gallopravincialis* je Sredozemno more (Slika 1). Galicija, pokrajina na sjeverozapadu Španjolske, je prvo zabilježeno stanište ove vrste. Uglavnom vrsta preferira umjereno zaštićene i blago izložene stjenovite obale, dok im muljevita i pješčana staništa ne odgovaraju (Hockey, Van Erkom, Schurink, 1992). Kako podnose velike promjene okolišnih uvjeta, mogu postati invazivne vrste u pojedinim područjima u kojima nisu uobičajene, pa je tako zabilježen primjer invazije na Južne obale Afrike (Van Erkom, Schurink i Griffiths, 1992).



Slika 1. Rasprostranjenost različitih vrsta školjkaša iz porodice *Mytilidae*

1. 3. 1. Osnovne značajke vrste

Mederanska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) veliki je crno-plavi školjkaš kojeg često možemo naći okupljenog u klastere (Slika 2). Prosječna duljina ljuštare, odraslih, spolno zrelih jedinki iznosi otprilike 5 cm, međutim mogu narasti do 12 cm. Ovo je brzorastuća vrsta koja već prvu godinu može narasti do 70 mm ukoliko se nalazi na odgovarajućem staništu (Picker i Griffiths, 2011). Uz brzi rast izuzetno je tolerantna na isušivanje. Optimalne temperature na kojima dagnja najbrže raste su između 10 i 20 °C (Van Erkom, Schurink i Griffiths, 1992). Uz rast, najbolju kvalitetu mesa ovaj školjkaš postiže na staništima umjereno izloženim tidalnim ciklusima (Steffani i Branch, 2003).



Slika 2. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Kao filtrator, dagnja pumpa vodu kroz škrge nalik na sito. Čestice hrane nakupljaju se na lamelama škrga te se zatim cilijarnim sortirnim putevima prenose preko usnih palpa do usta. Hrane se planktonom i česticama organske tvari (Gosling, 1992).

M. galloprovincialis je gonohorist, tj. razdvojenog je spola. Nakon što postignu spolnu zrelost nakon jedne do dvije godine, razmnožavaju se više puta godišnje (Van Erkom, Schurink i Griffiths, 1991). Gonade su smještene na plaštu i oko probavne žlijezde. Mliječne su boje kod mužjaka, a žuto-narančaste kod ženki. Tijekom mriješta oslobađa se i do nekoliko milijuna gameta, prilikom čega se oplođena jaja razvijaju u slobodno plivajuće planktonske ličinke, sposobne prevaliti velike udaljenosti (Picker i Griffiths, 2011). Po završetku ličinačkog stadija, bisusnim se nitima prihvataju za čvrstu podlogu (Hammond i Griffiths, 2004).

1. 3. 4. Krvožilni sustav

Školjkaši imaju jednostavan, otvoreni tip krvožilnog sustava. Srce pumpa hemolimfu kroz arterije koje se granaju u manje arteriole te potom otvaraju u sinuse. (Spencer, 2008). Hemolimfa se vraća u srce nakon re-oksidacije u škrzama. Ovo tekuće tkivo prenosi krvne stanice - hemocite kroz cijelo tijelo. Iako svi oblici nisu utvrđeni kod svih vrsta školjkaša, smatra se da postoji nekoliko tipova hemocita: granulociti, hijalinociti i serozne stanice, od kojih su prve dvije vrste sposobne fagocitirati čestice pomoću pseudopodija (Spencer, 2008). Hemociti imaju brojne funkcije, od kojih su najznačajnije: reparacija ljuštura, zarastanje rana, transport i probava nutrijenata, te sudjelovanje u imunološkom odgovoru organizma (Fisher, 1986). Granulociti su glavne su stanice odgovorne za fagocitozu kod mukušaca (Foley i Cheng, 1975). Stanice koje sadrže svega nekoliko ili uopće ne sadrže granulocite smatraju se nezrele prekursor stanice granulocita (Mix, 1976) ili se radi o zrelom tipu stanica koje pripadaju drugoj lozi (Cheng, 1981;

1984; Auffret, 1989). Hijalinociti su odgovorni za hemostazu i proizvodnju vanstaničnog matriksa tijekom zarastanja rana, a druge im funkcije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene (Suzuki i sur., 1991, Suzuki i Funakoshi, 1992). Kod vrste *Mytilus galloprovincialis* utvrđene su dvije vrste hemocita: hijalinociti i granulociti. Hijalinociti su agranulirane stanice u čijem se centru nalazi jezgra okružena relativno malom citoplazmom. Granulociti su veći i imaju manju jezgru. Opisane su tri vrste granulocita: acidofilni, bazofilni i heterofilni granulociti (sadrže i acidofilne i bazofilne granule). Hijalinociti pokazuju karakteristike nediferenciranih stanica; mali volumen citoplazme koja sadrži par organela, brojne slobodne ribosome i jezgru s obilnim kromatinom. Granulociti su više diferencirane stanice koje se mogu klasificirati prema veličini granula. U hemolimfi obične plave dagnje *Mytilus edulis*, Pipe (1990) je uočio granulocite koji su sadržavali veće ($0.5 - 1.5 \mu\text{m}$) i one koje su sadržavali manje ($0.2 - 0.3 \mu\text{m}$) granule. Granulociti s manjim granulama sadrže veću količinu mitohondrija i dobro razvijen hrapavi endoplazmatski retikulum. Kod granulocita s većim granulama nalazimo slabije razvijen hrapavi endoplazmatski retikulum, a često i sekundarne lizosome i rezidualna tijela kao rezultat njihove fagocitozne aktivnosti (Carballal i sur., 1997). Međutim, u istraživanju provedenom na dagnji *Mytilus galloprovincialis*, granule obje veličine pronađene su unutar iste stanice, iako su nađene i one stanice koje su sadržavale samo jedan tip granula. Ovi rezultati mogu upućivati na to da postoje različite faze diferencijacije ili sazrijevanja granulocita paralelno s rastom njihovih specifičnih granula (Cajaraville i Pal, 1995).

1 .3. 3. Imunosni sustav

Osnovna uloga imunosnog sustava je zaštita organizma od patogenih organizama ili stranih potencijalno toksičnih tvari. Taj sustav obrane uključuje dva tipa imuniteta, stičeni ili specifični imunitet i urođeni (prirođeni) imunitet (Livingstone i sur. 2000). Urođeni imunitet omogućuje organizmu borbu protiv stranih tvari i organizama, bez prethodnog kontakta s njima. Stičeni imunitet omogućuje brzu i selektivnu zaštitu od određenog stranog tijela (antigen) kojemu je organizam prethodno bio izložen. Drugi kontakt s istim antigenom rezultira jačim imunosnim odgovorom, koji se ogleda u bržoj sintezi specifičnih antitijela, što je posljedica pamćenja antiga (Prieur i sur. 1990). I prirođeni i stičeni imunitet imaju stanične (cijela stanica) i humoralne (proizvod stanice) komponente. Ove se dvije komponente imunosnog odgovora međusobno nadopunjavaju.

Kod školjkaša, fagocitoza i infiltracija hemocita predstavljaju primarni stanični odgovor, dok mnoštvo faktora hemolimfe, kao što su lizini, aglutinini i enzimi (bilo normalno prisutni ili inducirani) predstavljaju humoralni obrambeni odgovor (Sindermann, 1990). Kod ovih su organizama do sada utvrđene su četiri vrste obrambenih reakcija: hemocitoza, fagocitoza, inkapsulacija i nekresacija. Hemocitoza je prvi odgovor na infekciju i uključuje mjerljivi porast broja cirkulirajućih hemocita koji tada infiltriraju inficirana ili ozlijedena tkiva (Gosling, 2004). Fagocitoza je sljedeći korak u procesu obrane, i može se podijeliti u nekoliko faza: kemotaksi, prepoznavanje, prianjanje, endocitoza i uništenje. Kada je invazivni organizam ili čestica prevelika za fagocitozu tada dolazi do inkapsulacije hemocitima. Omotnica koncentričnog sloja stanica okružuje patogena, uzrokuje njegovo uništenje prilikom čega dolazi do resorpcije staničnih ostataka. Još je jedan mehanizam obrane prisutan kod školjkaša, a razlikuje se od inkapsulacije. Kod pojedinih vrsta školjkaša dolazi do stvaranja sedefa oko nametnika ili strane tvari koja upadne između plašta i ljuštura školjkaša (Gosling, 2004).

Hemociti ili druge slične stanice izlučuju različite biološki aktivne molekule u hemolimfu, a vjeruje se kako takve aktivnosti igraju važnu ulogu u obrani organizma. Tijekom fagocitoze hidrolitički enzimi, npr. lizozim se izlučuje u hemolimfu, te pokazuje mikrobicidne učinke na bakterijske membrane (Cheng, 1996). Lecitin se također sintetizira u hemocitima, te se pojavljuje na površini stanice kao protein receptor za strane antigene, npr. bakterije. Vjeruje se da lecitini igraju ulogu u eliminaciji bakterija, inducirajući njihovu imobilizaciju, ili uništavajući

ih fagocitozom (Gosling, 2004). U odgovoru na patogene i različite polutante hemociti ispuštaju različite reaktivne intermedijere kisika (ROI). Iako su ROI važni kod fagocitozne aktivnosti kralješnjaka, njihova konkretna uloga u obrambenom sustavu školjkaša još nije definirana (Pipe i Coles, 1995). Danas je široko prihvaćeno mišljenje da izloženost jedinki toksičnim tvarima može potisnuti imunološki odgovor kod školjkaša (imunosupresija) i utjecati na veću podložnost bolestima (Dyrynda i sur., 1998). Villalba i sur. (2012) u istraživanju koje su proveli uspoređujući intra i inerspecijsku obranu školjkaša od bonamioze mjerili su različite parametre hemolimfe. Koristeći se usporedbom različitih imunoloških indikatora *O. edulis* i *C. gigas*, kao što su ukupan broj hemocita, fagocitozna aktivnost, razina oksidativnog stresa (superoksid aniona O_2^- i vodikovog peroksida H_2O_2) te proizvodnja dušikovog oksida (NO), dobili su značajne razlike u ukupnom broju hemocita i respiratornom arestu (razina oksidativnog stresa). Autori prepostavljaju da bi uzrok navedenome mogao biti povezan s razlikom u osjetljivosti na bonamiozu između vrsta. Slično istraživanje proveli su Alvarez i sur. (2011) stimulirajući hemocite kućice *Ruditapes decussatus* lipopolisaharidom (LPS), mješavinom različitih neaktivnih bakterija i oslabljenom bakterijom *Vibrio splendidus*. Rezultati su pokazali smanjenu funkciju stanica nakon akutne izloženosti oslabljenim bakterijama i *V. Splendidus*. Stimulacija hemocita lipopolisaharidom i različitim neaktivnim bakterijama inducira promijene u obrani stanica od stanične smrти, ekspresiji trombina, prosaposina, inhibitora apoptoze. Za razliku od imunoloških istraživanja koja su bila usmjerena na žive uzročnike bolesti kod beskralješnjaka, Gopalakrishnan i sur. (2008) izložili su petrovo uho *Haliotis diversicolor* toksičnom benzo (a) pirenu. Autori su također mjerili imunološke indikatore: ukupan broj hemocita te njihovu aktivnost, sadržaj proteina, razinu fenoloksidaze, fagocitoznu aktivnost i superoksid anion. Rezultati su pokazali značajan pad ukupnog broja hemocita, te promijene ostalih mjerenih indikatora u odnosu na jedinke koje nisu bile izložene ovom toksičnom spoju. Niz testova koji se temelje na promjenama u broju hemocita, fagocitozi, razini degradacije enzima i otpuštanju reaktivnih kisikovih metabolita, koriste se za mjerjenje sposobnosti imunološkog sustava (Volety i sur., 1999), ali isto tako i kao biomarkeri onečišćenja okoliša (Livingstone i sur., 2000).

2. CILJ RADA

Ciljevi ovog rada su:

1. Primjenom SOS – testa potvrditi hipotezu o značajnom smanjenju kondicije i sposobnosti preživljavanja dagnje koja je nakon stresa prouzročenog izlaganju akutnim koncentracijama NH₄Cl držana na zraku
2. Utvrditi modulacije biokemijskih parametara hemolimfe mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* izložene akutnim koncentracijama NH₄Cl
3. Utvrditi dolazi li do promjena u brojnosti hemocita i njihovoj nakon izlaganja jedinki akutnom stresu uzrokovanim povišenim koncentracijama NH₄Cl u uzgojnoj sredini.

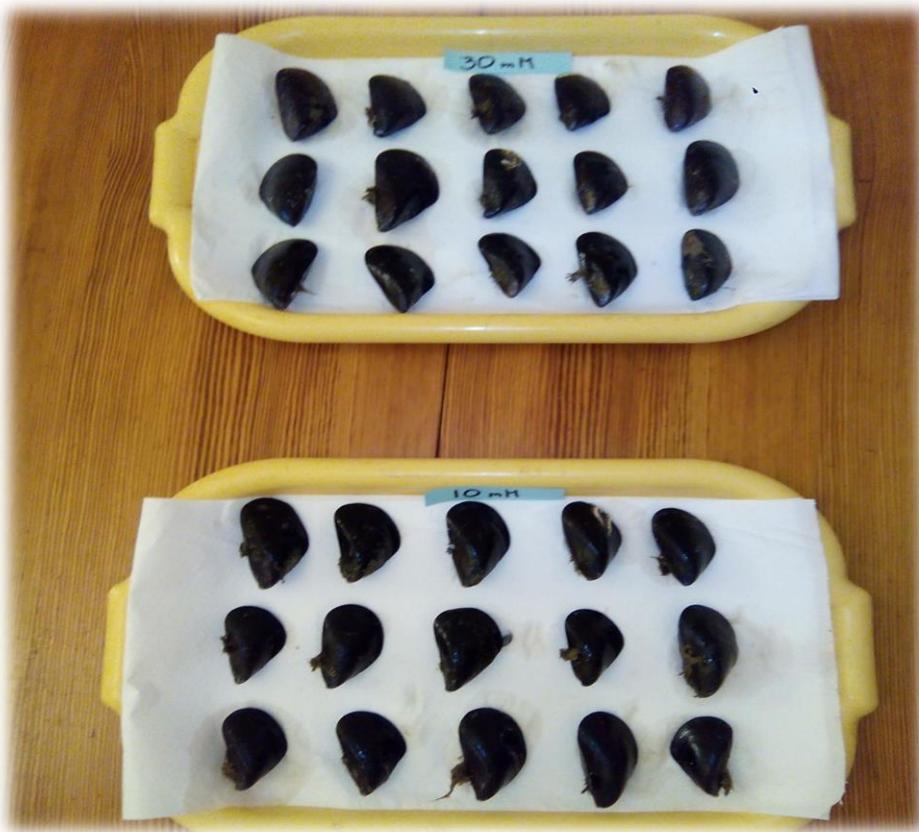
3. MATERIJALI I METODE

Dagnje su nabavljene iz uzgajališta Cromaris, iz uvale Lim, sjeverno od Rovinja ($45^{\circ}01'N$, $13^{\circ}01'E$). Smještene su u bazen s konstantnim protokom svježe morske vode, uz aeraciju tijekom sedam dana, kako bi se adaptirale na eksperimentalne uvijete. Tijekom perioda adaptacije uz prirodno dostupnu količinu hrane tj. fitoplanktona, nisu bile dodatno hranjene. Istraživanje se provodilo koristeći odrasle jedinke Mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*, prosječnih biometrijskih vrijednosti: duljine 57.7 ± 8.7 mm, širine 31.5 ± 5.1 mm, visine 21.5 ± 3.6 mm i mase 21.0 ± 6.3 g. Nakon perioda adaptacije, dagnje su podijeljene na pet pokušnih skupina od po dvadeset i pet jedinki. Pet jedinki iz svake skupine bilo je smješteno u tri-litarske bazene, te su svakoj pokušnoj skupini osigurani jednakim ambijentalnim uvjetima u kojima je jedinu varijablu predstavljala različita koncentracija NH_4Cl . Skupini dagnji kojima u eksperimentalne bazene nije dodavan amonij klorid predstavlja kontrolu dok su ostale četiri pokušne skupine bile izložene 5 mM, 10 mM i 30 mM NH_4Cl : tijekom 48 sati. Eksperimentalni bazeni nisu bili na protoku niti su bili aerirani, već je svakih 24 sata izmijenjena voda uz dodatak odgovarajućih količina NH_4Cl do željenih koncentracija. Temperatura i pH morske vode određivani su prije početka pokusa, te svakodnevno prije i nakon izmijene vode.

3. 1. SOS-test

SOS-test (engl. „Stress on Stress test“) je test izlaganja prethodno izloženih dagnji nekom stresnom čimbeniku, dodatnom stresu tj. njihovim izravnim izlaganjem na zraku. Dagnje se iz eksperimentalnih bazena ili prirodnog staništa jednostavno ostave na zraku u prostoriji s optimalnom i konstantnom temperaturom i vlažnošću te se određuje broj preživjelih dagnji koje odgovaraju na podražaj (zatvaranje) u pravilnim vremenskim razmacima (npr. 8, 12 ili 24 sata) tijekom nekoliko dana (Slika 3). Ovim se testom može doprinijeti poznavanju opće kondicije (engl. fitness) dagnji, te indirektno i utjecaj različitih stresora na metabolizam i konačno vrijeme preživljavanja dodatno opterećenih jedinki. Prepostavka je da što su dagnje u boljoj kondiciji, te što su manje izložene različitim stresorima to će njihovo preživljavanje na zraku biti dulje. Dagnje, ukupno 150 jedinki podijeljenih u 3 grupe po 50, su bile izlagane akutno povišenim koncentracijama (10 mM i 30 mM) NH_4Cl tijekom 3 dana uz svakodnevnu izmjenu vode. Nakon

toga ostavljene su na zraku, pri temperaturi 18.0 ± 1.0 °C u kadicama s navlaženim filter papirom. Svakodnevno se pratilo preživljavanje i evidentiralo uginule dagnje. Računski je određena prosječna brzina ugibanja kontrolnih i dagnji izloženih različitim koncentracijama NH₄Cl.



Slika 3. Dagnje *M. galloprovincialis* prethodno izložene 10 i 30 mM NH₄Cl, posložene u kadicama s filter papirom i ostavljene na zraku

3. 2. Uzorkovanje hemolimfe

Hemolimfa je iz mišića aduktora, koji se nalazi dorzalno unutar ljuštare, izvađena brizgalicom i iglom G21 neposredno prije te 3, 24 i 48 sati po izlaganju dagnji povećanim koncentracijama NH₄Cl (Slika 4). Iz svake dagnje uzrokovano je 200 µL hemolimfe i prebačeno u 1.5 mL Eppendorf tubice u koje je prethodno dodano 200 µL Alserves otopine (115,4 mM glukoza, 27,2 mM Na-citrat, 9,02 mM EDTA, 381,5 mM NaCl), koja služi kao antikoagulans. Od svakog takvog uzorka uzet je alikvot od 50 µL za pripravu kompozitnog uzorka za analizu

protočnim citometrom. Ostaci od 350 µL su zatim centrifugirani 10 min. pri 10 000 g. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant i pohranjen na -80 °C i korišten za biokemijsku analizu – određivanje uree, mokraćne kiseline i laktat dehidrogenaze.



Slika 4. Uzorkovanje hemolimfe dagnje *M. galloprovincialis*

3. 3. Protočna citometrija

Protočna citometrija je analitička metoda koja na osnovu specifične fluorescencije pojedinih stanica omogućava uvid u njihove karakteristike: veličina, oblik, postojanje specifičnih fluorokroma, te makromolekula koje na sebe specifično vežu pojedine probe označene fluorokromima. Kontinuiranim prolaskom stanica kroz protočnu kivetu, omogućava se kvantitativno i kvalitativno određivanje te izdvajanje iz uzorka. Osim brojnosti, moguće analizirati strukturne i funkcionalne karakteristike svake pojedine stanice, te se može primijeniti i kao precizna tehnika za proučavanje svojstva DNA i karakterizaciju genoma u stanicama (Shapiro, 2003).

Princip rada protočnog citometra je hidrodinamičko fokusiranje suspendiranog uzorka (najčešće kulture stanica) protokom fluida nosača. Laminarni tok fluida, čijim središtem protječu čestice uzorka, omogućava analizu gotovo svake pojedine čestice zasebno. Optički instrumenti uključuju izvore svjetla, niz filtera i ogledala koji dijele i usmjeravaju emitirano svjetlo. Kako

bi se pobudila fluorescencija uzorka kao izvor svjetla koristi se živina lampa, Laser (engl. light amplification by stimulated emission of radiation) ili tzv. Laser dioda koja emitira svjetlost točno određenih valnih duljina. Argon-ion laser je najzastupljeniji izvor svjetla u protočnim citometrima. Argon laser emitira zračenje specifične valne duljine 488 nm, koristi se za obasjavanje čestica koje protječe kroz kivetu te u kontaktu s laserskom zrakom dio te svjetlosti rasipaju u različitim smjerovima, a dio adsorbiraju te ponovno emitiraju svjetlost nižih energija i većih valnih duljina (Shapiro, 2003). Fotomultiplikatori, kao sastavni dio uređaja, konvertiraju intenzitet svjetla u električni napon, pri čemu je magnituda pulsa napona za svaku stanicu proporcionalna njenoj veličini (FSC - engl. forward scatter), strukturi površine i unutarnjoj strukturi (SSC - engl. side scatter) ili količini pobuđenog specifičnog fluotrokroma. Uloga sustava optičkih filtera i zrcala je emitirano svjetlo određenih valnih duljina usmjeriti na određene detektore. Dobiveni signali konvertiraju se u digitalizirane podatke koji se pohranjuju u računalu, te naknadno analiziraju. Rezultati intenziteta fluorescencija za svaku detektiranu česticu grafički se prikazuju kao histogrami ili 2D-dijagrami (Shapiro, 2003). Za određivanje brojnosti populacija hemocita dagnje korišten je Partec PAS protočni citofluorimetar (Slika 5).



Slika 5. Partec PAS protočni citofluorimetar

Na osnovu specifične fluorescencije pojedinih stanica omogućava se uvid u njihove karakteristike, kao što su; veličina, oblik, postojanje specifičnih fluorokroma, te makromolekula koje na sebe specifično vežu pojedine probe označene fluorokromima. Rezultati intenziteta

fluorescencija za svaku detektiranu česticu grafički se prikazuju kao histogrami ili 2D – dijagrami. Sferične mikročestice od lateksa (Symsex Calibration Beads 3 μm , Symsex Partec GmbH, Njemačka) i polistirena (10 μm Flow-Check Flourospheres, Beckman Coulter Inc., Kalifornija, SAD.) korištene su za kalibraciju instrumenta i uspostavu parametara akvizicije .

3. 4. Određivanje biokemijskih parametara hemolimfe dagnji

U hemolimfi dagnje *Mytilus galloprovincialis* određivana su: urea, mokraćna kiselina i laktat dehidrogenaza. Uzorci supernatanta kompozitnih uzoraka hemolimfe dagnji pohranjeni u zamrzivaču na -80 °C, ostavljeni su na sobnoj temperaturi 15-20 minuta da se polagano odmrznu. Tako odmrznuti uzorci spremni su za daljnju analizu te se Ependorff tubice s uzorcima postavljaju u karusel autosamplera, sa standardnim otopinama i reagensima unutar DyaSys respons® 910 instrumenta za kliničko određivanje biokemijskih parametara u tjelesnim tekućinama (Slika 6).



Slika 6. DyaSys respons® 910

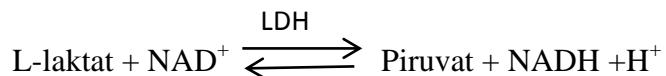
Računalno upravljeni DyaSys respons® 910, po postavljanju radne liste uzoraka i potrebnih analiza, a u zavisnosti od ukupnog broja uzoraka, vrsta potrebnih analiza i replikata mjerena izračunava i optimizira ukupno vrijeme potrebno za određivanje svih zadanih

parametara u uzorcima i njihov redoslijed izvođenja. Instrument samostalno pipetira uzorak i pojedine reagense u čiste mikrokivete u kojima se odvijaju kemijske reakcije i u kojima se na koncu spektrofotometrijski kvantitativno određuju pojedini parametri.

3. 3. 1. Laktat dehidrogenaza

Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim koji je prisutan kod životinja, biljaka i prokariota. Od medicinske je važnosti iz razloga što njegovo pretjerano otpuštanje u tjelesna tkiva, kao što je srce ili krvne stanice, označava oštećenje tkiva, ozljedu ili bolest.

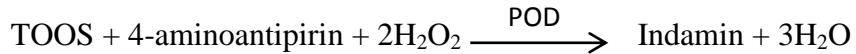
LDH katalizira reakciju prijelaza piruvata u laktat i obratno uz koenzim NADH, te dehidrogenaciju 2-hidroksibutirata. Za određivanje LDH koristi se UV- test. Količina reduciranog koenzima jednaka je koncentraciji laktata, a apsorpcija NADH prati se spektrofotometrijski na 340 nm.



3. 3. 2. Mokraćna kiselina

Mokraćna kiselina je heterociklički spoj ugljika, dušika, kisika i vodika, čija je formula $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$, te je produkt metaboličkog raspada purina. Poznato je da u nekim specifičnim uvjetima školjkaši mogu izlučivati neznatne količine mokraćne kiseline. Koja je njezina uloga kod školjkaša nije još dovoljno istraženo.

Metoda određivanja mokraćne kiseline je enzimatski fotometrijski test sa TOOS (N-etyl-N-(hidroksi-3-sulfopropil)-m-toluidin). Mokraćna kiselina oksidira u alantoin posredstvom enzima urikaze, a nastali vodikov peroksid uz djelovanje peroksidaze reagira sa 4-aminoantipirinom i TOOS-om pri čemu se razvija ljubičasto-plava boja indamina. Intenzitet boje koja nastaje direktno je proporcionalna koncentraciji mokraćne kiseline, a određuje se povećanjem apsorbancije na 552 nm.



3. 3. 3. Urea

Urea kao diamid ugljične kiseline, glavni je produkt deaminacije aminokiselina kod sisavaca i nekih riba. Iako se amonijak smatra glavnim produktom ekskrecije kod školjkaša, brojne studije pokazuju kako ovisno o određenim čimbenicima, školjkaši ponekad mogu izlučivati i ureu. Razlog toj promijeni uglavnom je izloženost organizma određenoj vrsti stresa, kao što je promjena temperature, sezone, reproduktivnog ciklusa ili izloženost određenim toksinima (Hochachka, 1983). Osim promijene u prehrani, sezone, temperature, reproduktivnog i razvojnog stadija, do porasta uree u hemolimfi školjkaša, također dolazi uslijed raznih okolišnih stresora, kao što su izloženost zraku, anaerobni uvjeti, promijene osmotskog tlaka, onečišćenje i parazitizam.

Urea se u hemolimfi određuje enzimatskim UV testom, posredstvom ureaze (urea amidohydrolase; EC3.5.1.5) i glutamat dehidrogenaze (L-glutamate:NAD(P) oxidoreductase (deaminating); GLDH; EC1.41.3). Amonij ion nastao djelovanjem ureaze veže se za 2-oksoglutarat pri čemu nastaje L-glutamat uz istovremenu oksidaciju i utrošak NADH (nicotinamid adenine dinucleotid) koja se prati (smanjenje adsorbancije) spektrofotometrijski pri 340 nm. Količina utrošenog NADH proporcionalna je količini uree u uzorku.



3. 5. Statistička obrada podataka

Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (aritmetičkih sredina) udjela pojedinih populacija hemocita, aktivnosti laktat dehidrogenaze, koncentracije mokraćne kiseline i uree u odnosu srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka dobivene su analizom varijance (ANOVA) Bonferonijevom metodom, a pritom je korišten računalni program Systat 10.2 (Systat Software, Inc., San Jose, CA USA).

4. REZULTATI

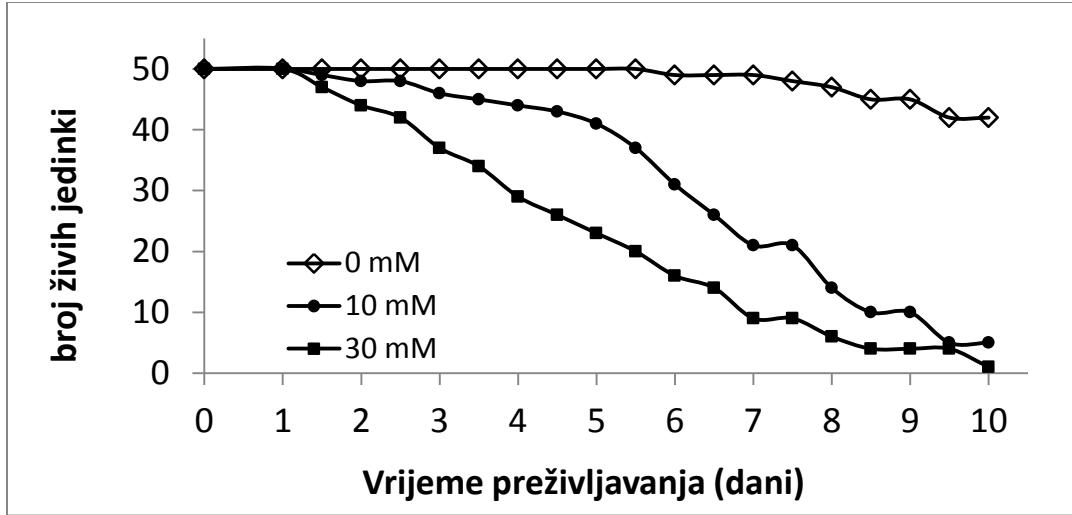
U eksperimentalnim bazenima u kojima su dagnje *Mytilus galloprovincialis* izlagane akutnim koncentracijama NH₄Cl mjereni su temperatura i pH prije početka pokusa, te svakodnevno prije i nakon izmijene vode. Temperatura morske vode u eksperimentalnim bazenima tijekom izlaganja dagnji *M. galloprovincialis* akutno povišenim koncentracijama NH₄Cl održavana je konstantnom i iznosila je oko 18 °C, a pH vrijednost morske vode ovisila je o koncentraciji otopljenog NH₄Cl. U tablici 1. navedene su srednje vrijednosti, standardne devijacije, maksimalne i minimalne vrijednosti temperature i pH morske vode tijekom eksperimenta.

Tablica 1. Srednje vrijednosti, standardne devijacije, maksimalne i minimalne vrijednosti temperature i pH morske vode u eksperimentalnim bazenima tijekom izlaganja dagnji *M. galloprovincialis* akutnim koncentracijama NH₄Cl.

	0 mM NH ₄ Cl		10 mM NH ₄ Cl		20 mM NH ₄ Cl		30 mM NH ₄ Cl	
	Temp. (C)	pH	Temp. (C)	pH	Temp. (C)	pH	Temp. (C)	pH
Srednja vrijednost	18,4	8,04	18,4	7,77	17,8	7,74	17,9	7,60
Stand. devijacija	0,5	0,13	0,5	0,17	0,6	0,19	0,6	0,11
Maksimum	19,0	8,17	19,0	7,94	19,0	7,94	19,0	7,69
Minimum	18,0	7,84	18,0	7,54	17,0	7,41	17,0	7,38

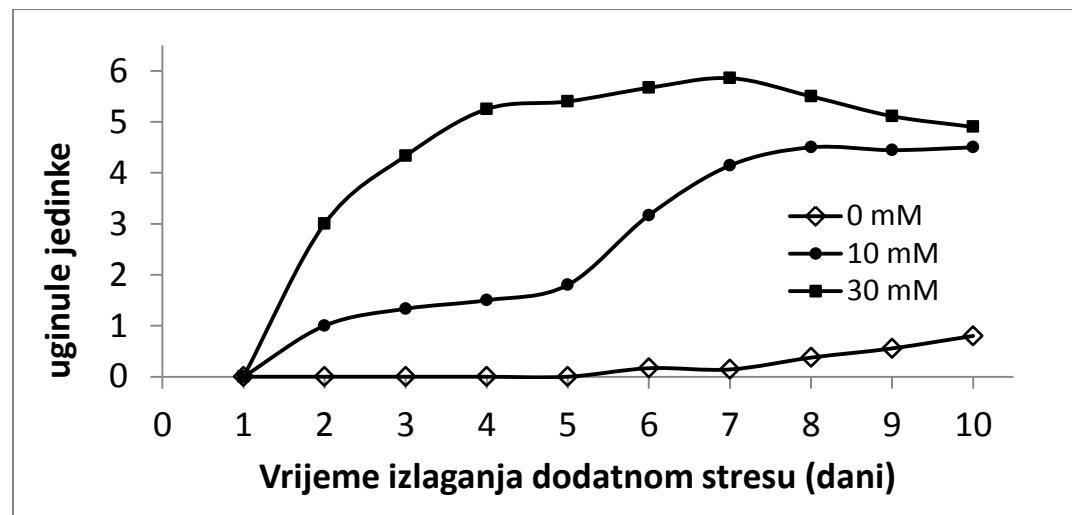
4.1. Stres na stres

Preživljavanje na zraku kontrolnih i dagnji *M. galloprovincialis* prethodno izlaganih akutnim koncentracijama (10 i 30 mM) NH₄Cl prikazano je na slici 7. Jedinke koje nisu bile prethodno izlagane NH₄Cl (kontrolna skupina) počele su ugibati nakon petog dana, dok su jedinke prethodno izlagane 10 i 30 mM počele ugibati već drugog dana izlaganja dodatnom stresu.



Slika 7. Preživljavanje ne izloženih (kontrolnih) i dagnji *M. galloprovincialis* predhodno izloženih akutnim koncentracijama (10 i 30 mM) NH₄Cl tijekom izlaganja na zraku (Stres na stres test)

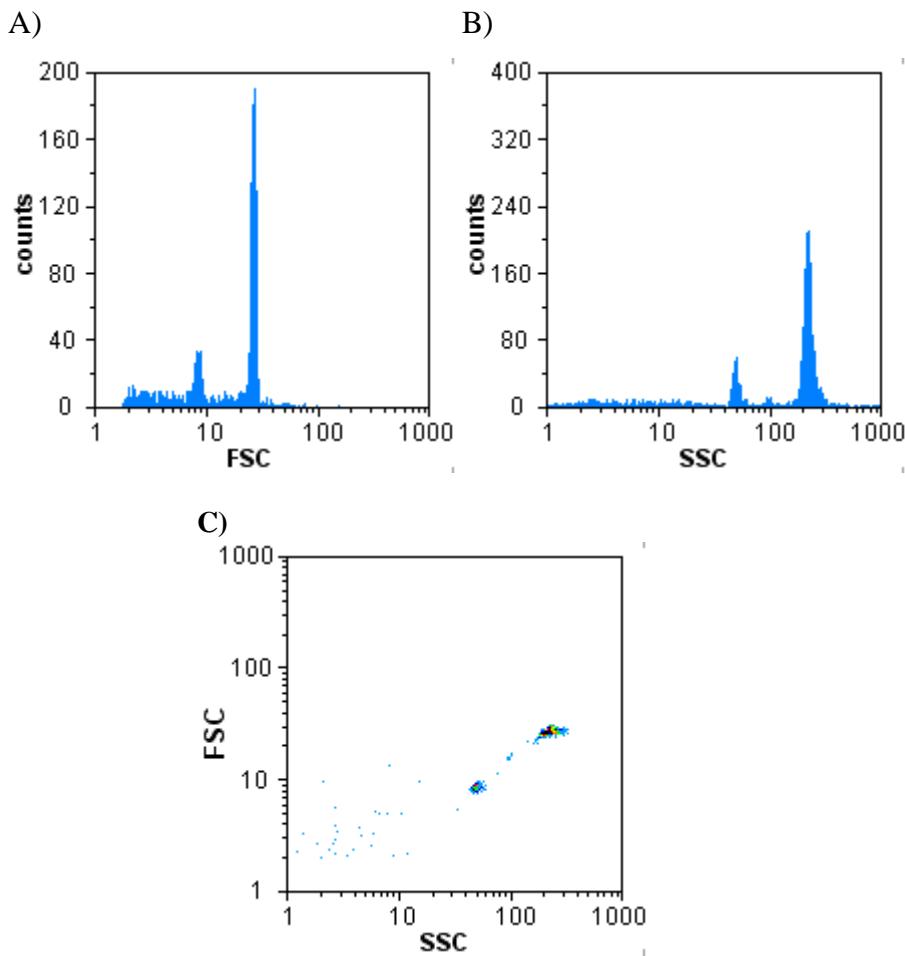
Prosječan broj uginulih jedinki tijekom desetodnevnog izlaganja na zraku prikazan je na slici 8. Dnevni broj uginulih dagnji prethodno izloženih 10 i 30 mM NH₄Cl dostiže svoj maksimum nakon sedmog odnosno četvrtog dana izlaganja na zraku.



Slika 8. Dneni broj uginulih ne izloženih (kontrolnih) i dagnji *M. galloprovincialis* predhodno izloženih akutnim koncentracijama (10 i 30 mM) NH₄Cl tijekom izlaganja na zraku (Stres na stres test)

4. 2. Određivanje populacije hemocita

Na Slici 9. Prikazani su histogrami tzv. „forward scattering signal“ (FSC) i „side scattering signal“ (SSC), te 2D-dijagrami SSC i FSC kalibracijskih čestica od 3 i 10 μm . Instrumentalni parametri akvizicije sferičnih čestica od 3 i 10 mm koristile su se pri analizi uzoraka hemolimfe dagnji *M. galloprovincialis* izloženih akutno povišenim koncentracijama NH₄Cl.



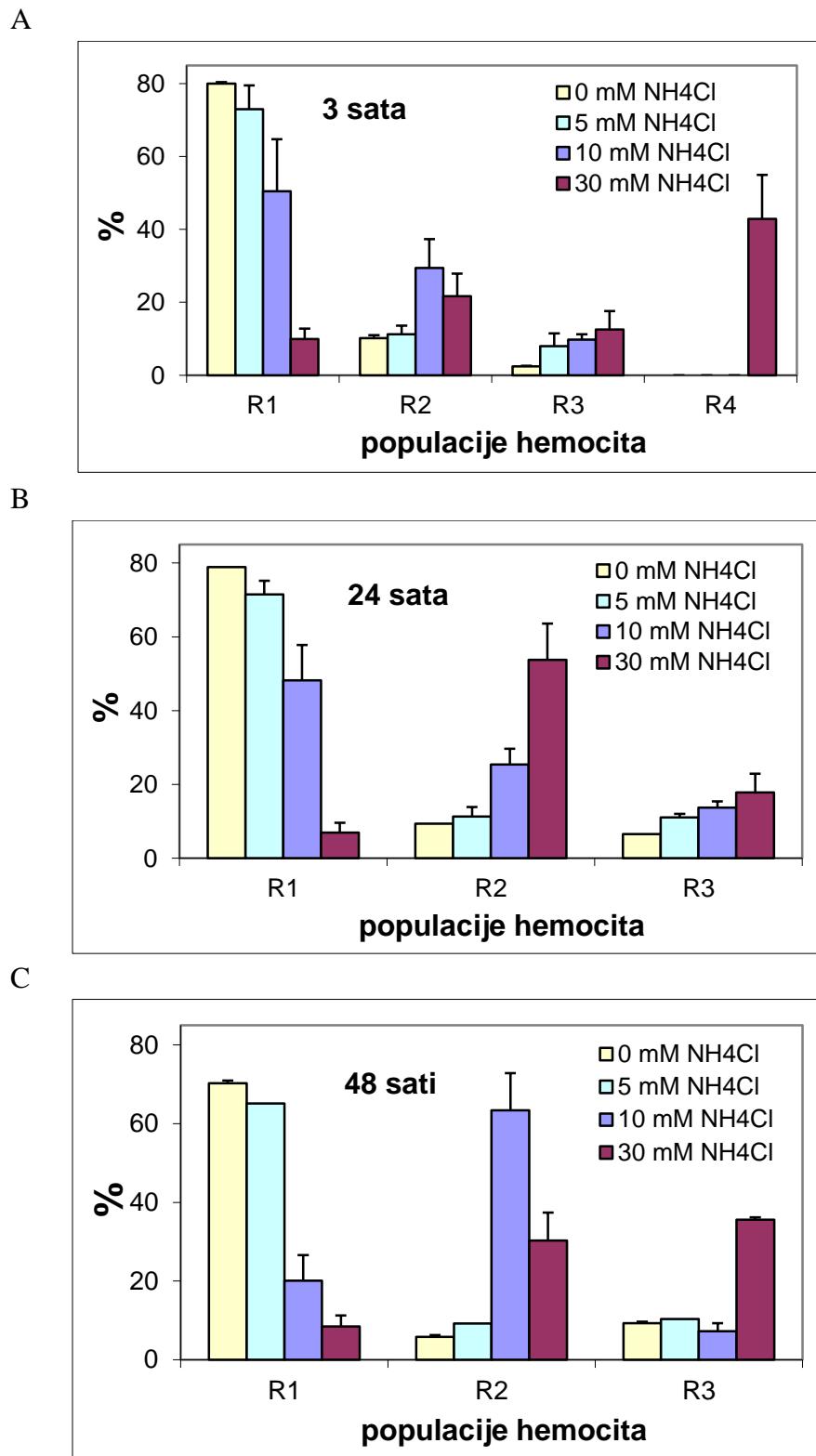
Slika 9. Histogrami, tzv. "forward scattering signal" - FSC (A) i "side scattering signal" – SSC (B), te 2D-dijagram SSC vs. FSC (C) kalibracijskih čestica od 3 i 10 μm .

Izlaganjem dagnji *M. galloprovincialis* 5, 10 i 30 mM NH₄Cl uočene su tri populacije (R1, R2 i R3) hemocita, a njihov se relativni udio u hemolimfi mijenja ovisno o vremenu izlaganja i koncentracijama NH₄Cl (Tablica 2). U dagnjama izlaganim 30 mm NH₄Cl nakon tri sata pojavljuje se specifična populacija (R4) hemocita velikoj količini.

Tablica 2. Relativna količina populacija hemocita R1, R2, R3 i R4 u hemolimfi kontrolnih i dagnji nakon 3, 24 i 48 sati izloganja akutno povišenim koncentracijama (5, 10 i 30 mM) NH₄Cl.

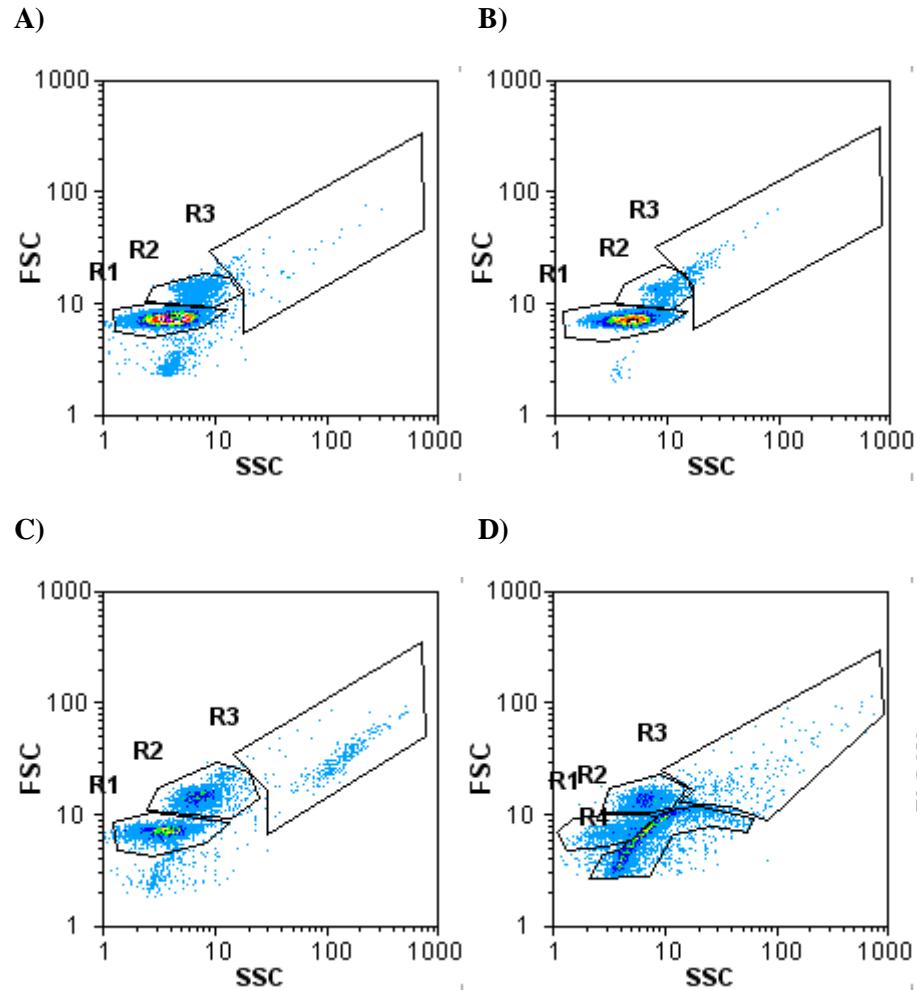
NH₄Cl	3 sata				24 sata				48 sati		
	mM	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	86,4	11,0	2,6		83,2	9,9	6,9	82,3	6,8	10,9	
5	79,2	12,2	8,6		76,2	12,0	11,8	76,8	10,9	12,2	
10	56,3	32,8	10,9		55,2	29,1	15,7	22,1	69,8	8,0	
30	11,4	24,9	14,4	49,3	8,9	68,4	22,7	11,4	40,8	47,9	

Uočljivo je da izlaganjem dagnji većim koncentracijama NH₄Cl dolazi do smanjenja broja R1 populacije hemocita, a raste broj stanica u R2 i R3 skupini. Nadalje, povećanjem vremena izloženosti uočeno je smanjenje broja R1 i R2 populacija uz istovremeni rast broja R3 populacije hemocita (Slika 10).

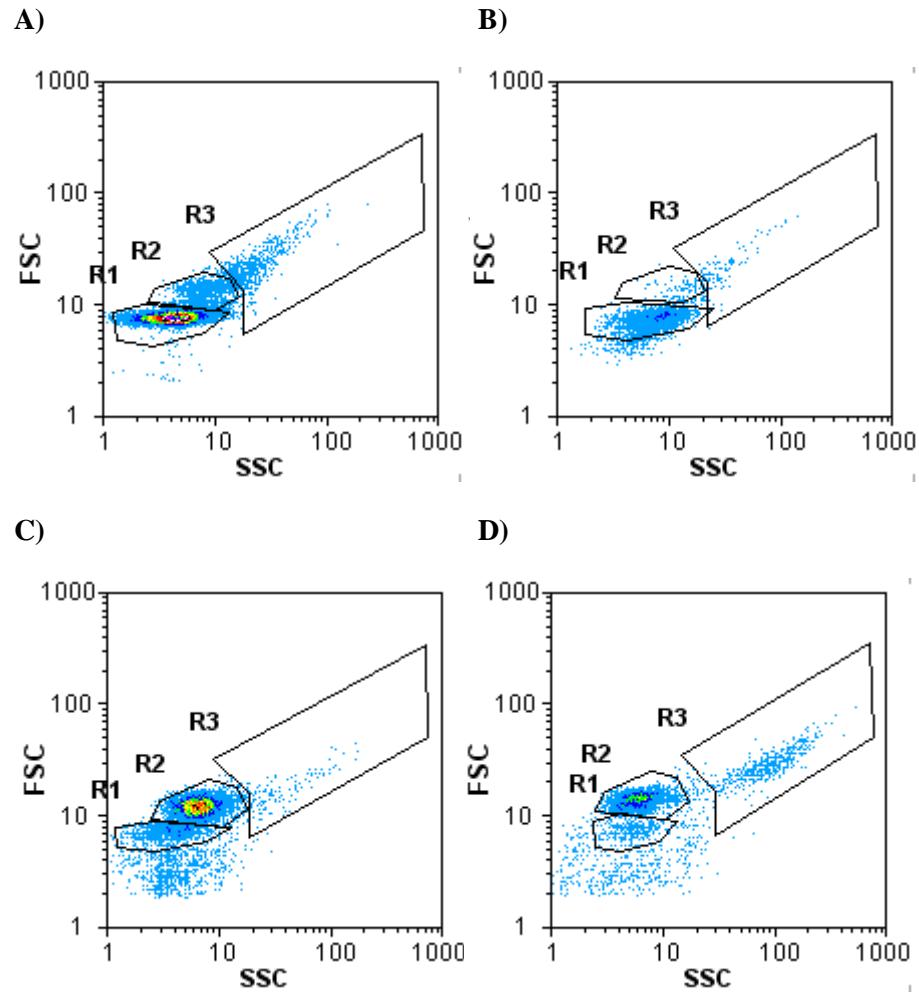


Slika. 10 Relativne količine populacija hemocita R1, R2, R3 i R4 kontrolnih i dagnji *M. galloprovincialis* nakon (A) 3, (B) 24 i (C) 48 sati izlaganja akutnim koncentracijama (5, 10 i 30 mM) NH₄Cl.

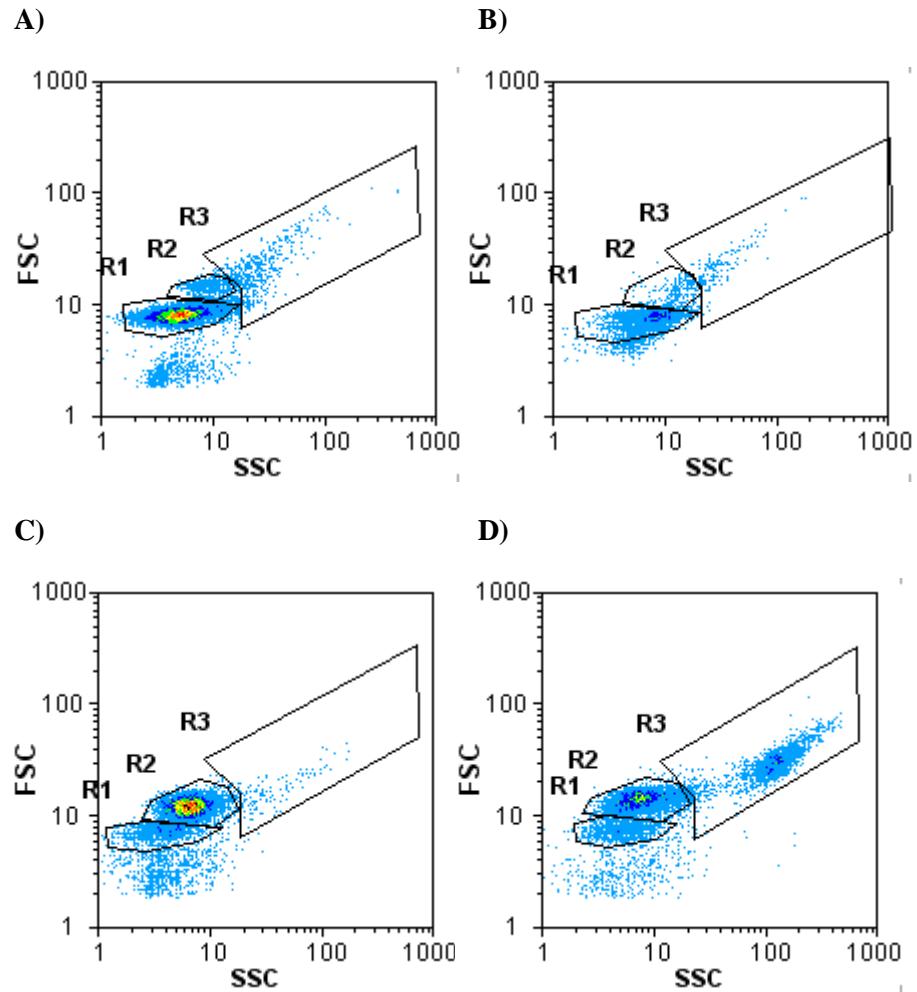
2D-dijagrami populacija stanica hemolimfe kontrolnih (ne izloženih) dagnji i dagnji izloženih 5, 10 i 30 mM NH₄Cl 3, 24 i 48 sati prikazani su na slikama 11, 12 i 13. Na dijagramima se lako uočavaju i razlikuju populacije označena kao R1, R2 i R3. Pri izlaganju dagnji 30 mM NH₄Cl, nakon 3 sata pojavljuje se značajan broj stanica hemolimfe sa zasebnim značajkama – populacije označena kao R4, koja kasnije pri višim vremenima izlaganja nije uočena (Slika 11D).



Slika 11. 2D-dijagrami populacija (R1, R2, R3 i R4) hemocita kontrolnih (A) i dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih 5 mM (B), 10 mM (C) i 30 mM NH₄Cl (D) 3 sata.



Slika 12. 2D-dijagrami populacija (R1, R2 i R3) hemocita kontrolnih (A) i dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih 5 mM (B), 10 mM (C) i 30 mM NH₄Cl (D) 24 sata.



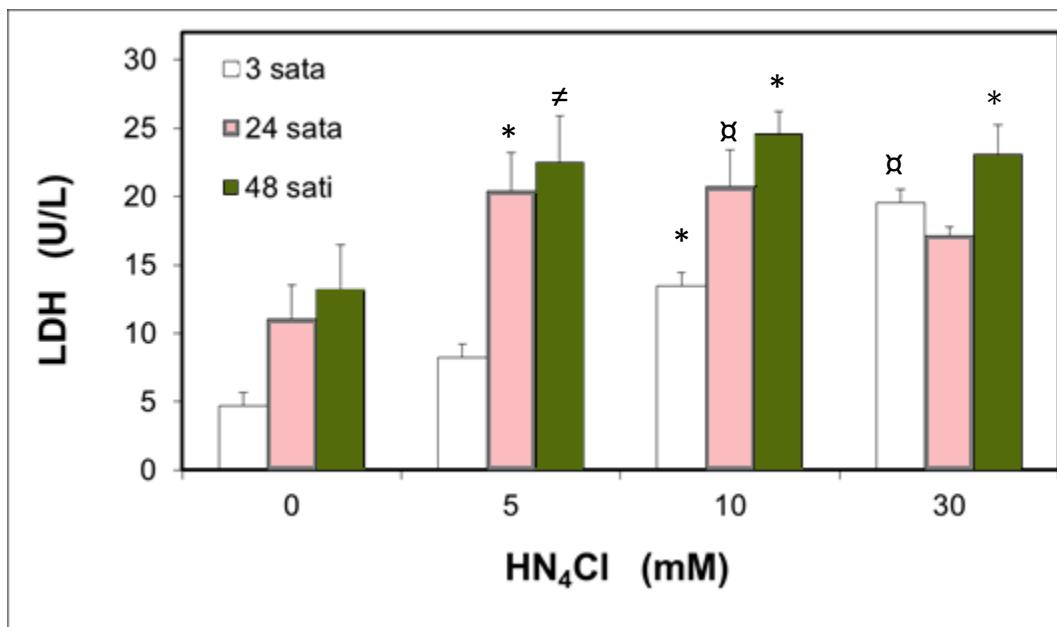
Slika 13. 2D-dijagrami populacija (R1, R2 i R3) hemocita kontrolnih (A) i dagnji *M. galloprovincialis* izlaganih 5 mM (B), 10 mM (C) i 30 mM NH_4Cl (D) 48 sati.

4. 3. Biokemijski parametri: laktat dehidrogenaza, mokraćna kiselina i urea

4. 3. 1. Laktat dehidrogenaza (LDH)

LDH katalizira reakciju prijelaza piruvata u laktat uz redukciju koenzima NAD^+ do NADH i obratno, te dehidrogenaciju 2-hidroksibutirata. Za mjerjenje razine LDH primjenjuje se spektrofotometrijsko određivanje količine nastalog reduciranih koenzima mjerenjem apsorpcije UV-svjetla valne duljine 340 nm.

S povećanjem koncentracije NH_4Cl dolazi do povećanja koncentracije LDH u hemolimfi dagnji. Međutim, produljenjem vremena izlaganja u hemolimfi dagnji izloženih 30 mM NH_4Cl zabilježena je maksimalna vrijednost LDH nakon 48 sata izlaganja i nešto niža vrijednost nakon 3 sati izlaganja, a minimalna vrijednost zabilježena je nakon 24 sata. Nadalje, važno je uočiti prisutan porast LDH vrijednosti kontrolnog uzorka tijekom izlaganja (Slika 14).

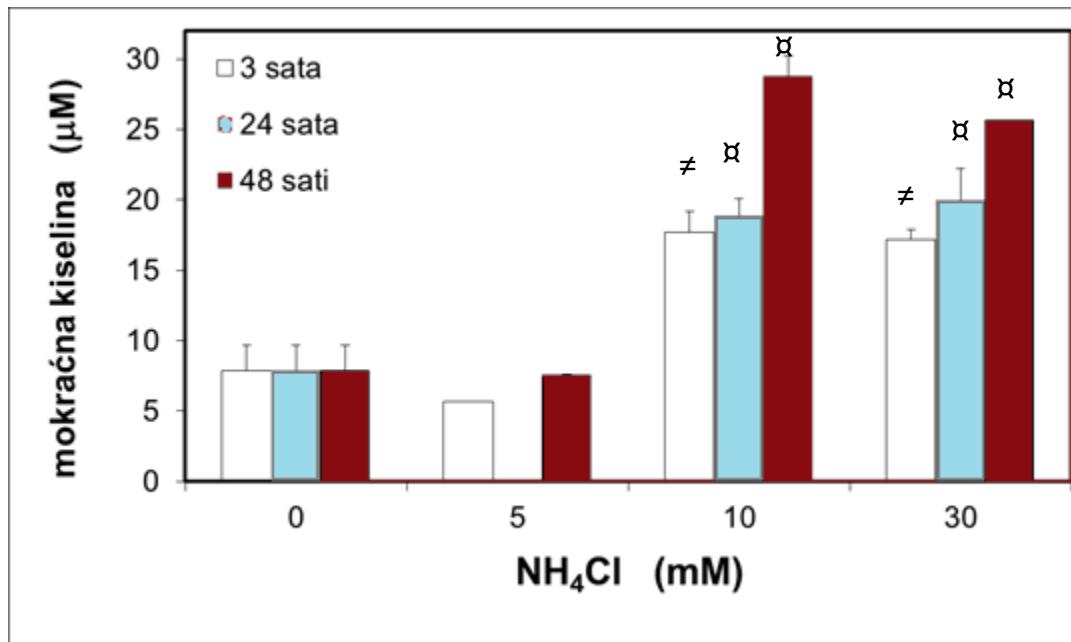


Slika 14. Laktat dehidrogenaza (LDH, U/L) hemolimfe dagnji *M. galloprovincialis* izloženih akutnim koncentracijama (5, 10 i 30 mM) NH_4Cl tijekom 48 sati. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata s pripadajućom standardnom devijacijom. Statistički značajne razlike označene su * $p<0.05$, # $p<0.01$ i ## $p<0.001$.

4. 3. 2. Mokraćna kiselina

Mokraćna kiselina određuje se enzimatskim fotometrijskim testom sa TOOS reagensom. Mokraćna kiselina najprije, posredstvom urikaze, oksidira u alantoin pri čemu nastaje i vodikov peroksid koji, uz djelovanje peroksidaze, reagira sa 4 – aminoantipirinom i TOOS-om. Ovom reakcijom razvija se ljubičasto-plava boja indamina, a intenzitet te boje direktno je proporcionalan koncentraciji mokraćne kiseline (povećanje apsorbancije na 522 nm).

Porast koncentracije mokraćne kiseline u hemolimfi dagnji uočen je u dagnjama izloženim 10 i 30 mM NH₄Cl već nakon 3 sata te je rasla s porastom vremena izlaganja. Kontrolna skupina nije pokazala promijene s obzirom na vrijeme izloženosti (Slika 15.).

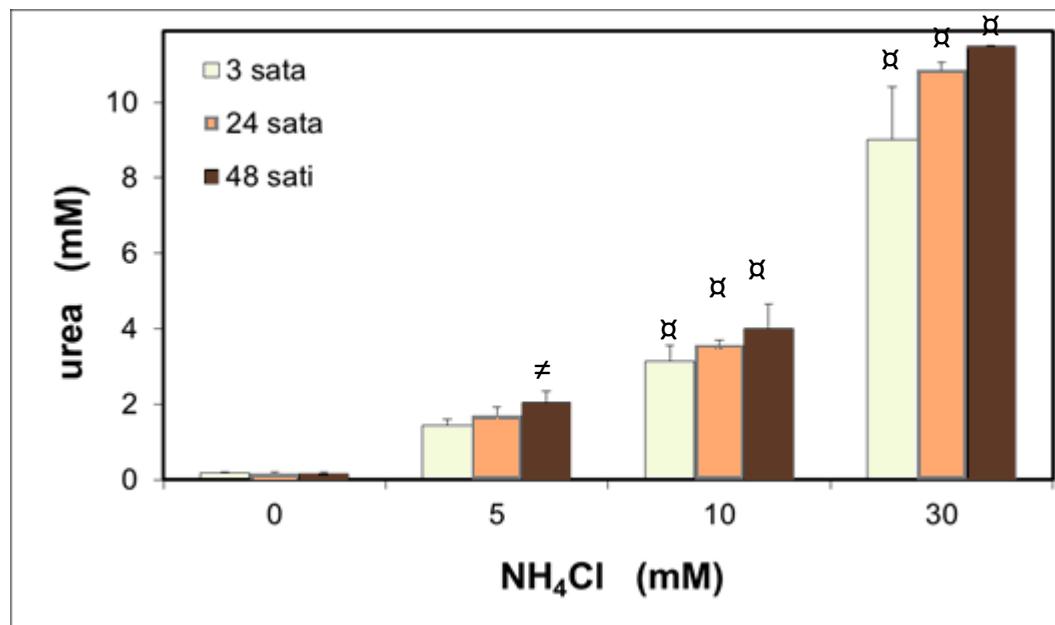


Slika 15. Mokraćna kiselina (μM) hemolimfe dagnji *M. galloprovincialis* izloženih akutnim koncentracijama (5, 10 i 30 mM) NH₄Cl tijekom 48 sati. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata s pripadajućom standardnom devijacijom. Statistički značajne razlike označene su * $p<0.05$, # $p<0.01$ i ## $p<0.001$.

4. 3. 3. Urea

Urea se u hemolimfi određivala enzimatskim UV testom, posredstvom ureaze i glutamat dehidrogenaze pri čemu nastaje L – glutamat, te pritom dolazi do oksidacije i utroška NADH, što se prati spektrofotometrijski na 340 nm.

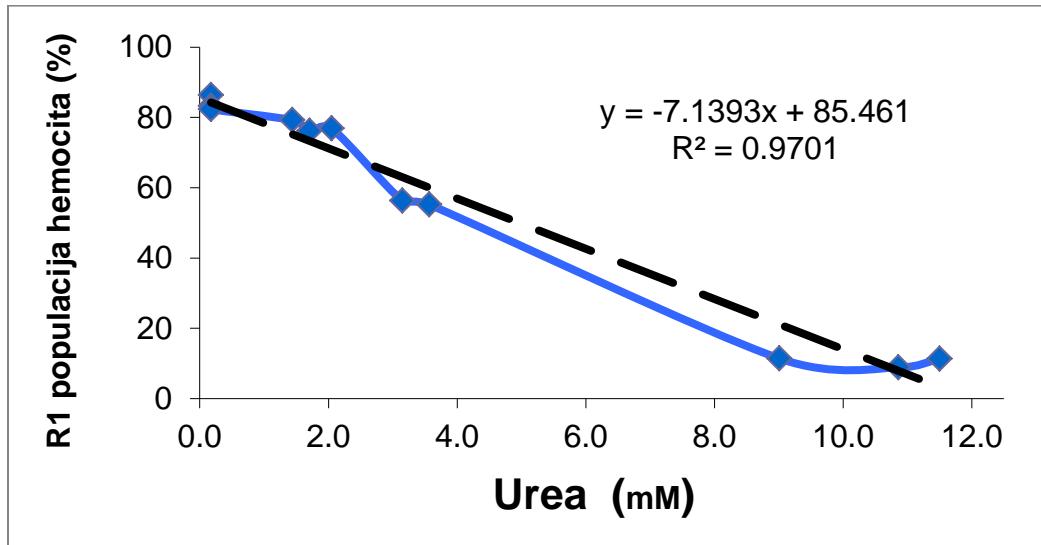
Iz priloženih rezultata može se uočiti trend povećanja koncentracije uree u hemolimfi dagnje s povećanjem koncentracije NH₄Cl. Što su dagnje dulje bile izložene određenim koncentracijama NH₄Cl, koncentracija uree u hemolimfi se također povećavala. Kontrolni uzorak nije pokazao promjene u koncentraciji uree u hemolimfi (Slika 16.).



Slika 16. Urea (□M) hemolimfe dagnji *M. galloprovincialis* izloženih akutnim koncentracijama (5, 10 i 30 mM) NH₄Cl tijekom 48 sati. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti kvadriplikata s pripadajućom standardnom devijacijom. Statistički značajne razlike označene su *p<0.05, [#]p<0.01 i ^{**}p<0.001.

4. 4. Regresijska analiza

Rezultat regresijske analize, usporedbe srednjih vrijednosti udjela R1 populacije hemocita i srednjih vrijednosti razina uree u hemolimfi ne izloženih (kontrolnih) i izloženih dagnji *M. galloprovincialis* prikazana je dijagramom raspršenja pri čemu je učena je njihova linearna korelacija ($R^2=0.97$) (Slika 17).



Slika 17. Dijagram raspršenja srednjih vrijednosti udjela R1 populacije hemocita (Y os) i koncentracije uree (X os) u hemolimfi dagnji *M. galloprovincialis*.

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi modulacije nekih biokemijskih parametara hemolimfe mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* izložene akutnim koncentracijama NH₄Cl. Pored toga pokušalo se utvrditi dolazi li do promjena u populacijama hemocita, promjena u strukturi samih hemocita i/ili promjena strukture populacije hemocita uslijed izloženosti. Prethodno je uz primjenu SOS-testa, potvrđena pretpostavljena hipoteza o značajnom smanjenju kondicije i sposobnosti preživljavanja uslijed izloženosti na zraku dagnji koje su prethodno bile izložene akutnim koncentracijama NH₄Cl u odnosu na ne izložene (kontrolne) dagnje.

Stres na stres testom utvrđena je opća kondicija dagnji, odnosno indirektni utjecaj dodatnog stresora, izloženost na zraku, na metabolizam i vrijeme preživljavanja dodatno opterećenih jedinki. Najvišu stopu preživljavanja tijekom izlaganja dodatnom stresu, izloženosti nakon deset dana imale su jedinke koje nisu bile prethodno izlagane NH₄Cl i ona je iznosila 84 %, odnosno nakon 10 dana, od 50 jedinki preživjele su 42. Jedinke koje su prethodno bile izlagane 10 mM NH₄Cl, pokazale su značajno nižu stopu preživljavanja, te je nakon 10 dana preživjelo njih 5, tj. svega 10 % jedinki. Kao što je bilo i očekivano jedinke koje su bile izložene najvišoj koncentraciji, 30 mM NH₄Cl, pokazale su najnižu stopu preživljavanja s tek jednom preživjelom jedinkom (2 %) nakon 10 dana izlaganja na zraku. Između petog i sedmog dana izlaganja na zraku, u skupinama koje su prethodno bile izložene NH₄Cl, uginulo je oko 50 % jedinki, dok je u tom istom periodu uginulo svega 2 % jedinki iz kontrolne skupine. Dobiveni rezultati SOS-testa kao i primijenjena doza zagađivala kojom su dagnje bile prethodno izložene (10 i 30 mM NH₄Cl tijekom 3 dana) su uz potvrđenu hipotezu o negativnom učinku na kondiciju i sposobnost preživljavanja dagnji, poslužile za odabir i uspostavu i primjenu eksperimentalnih uvjeta, koncentracije NH₄Cl i vremena izlaganja dagnji, tijekom kojih će se izučavati učinak akutno povišenih koncentracija amonijaka na parametre hemolimfe mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Stoga su dagnje bile izlagane koncentracijama od 5, 10 i 30 mM NH₄Cl tijekom 3, 24 i 48 sati uz izmjenu medija svakih 24 sata.

Populacije hemocita dagnji određene su temeljem prikaza parova specifičnih FSC i SSC fluorescentnih signala svake pojedine stanice hemolimfe dagnji 2D-dijagramima. U uzorcima hemolimfe jasno se razlikuju tri populacije hemocita (R1, R2, R3), koje su ovisno o vremenu izlaganja i koncentraciji NH₄Cl u uzorcima prisutne u različitim omjerima. Najviše stanica

hemolimfe kontrolnih dagnji uočeno je u populacija R1, dok je onih u R3 populaciji bilo vrlo malo, svega 2,6 % (Slika 10). Uočeno je da se broj hemocita R1 populacije smanjivao s povećanjem koncentracije NH₄Cl, pa je tako udio R1 populacije hemocita, kod skupine koja je bila izložena 5 mM NH₄Cl bio 8,4 % manji, a kod skupine izložene 30 mM 86,8 % manji u odnosu na njihov udio u hemolimfi kontrolne skupine, nakon 3 sata izlaganja. Za razliku od R1 populacije hemocita, R2 i R3 populacije hemocita s povećanjem koncentracije NH₄Cl, povećavaju svoj udio u ukupnoj populaciji, pa je tako kod jedinki izloženih 30 mM NH₄Cl, udio R2 populacija hemocita porasao 55,8 % u odnosu na udio R2 populacije hemocita u kontrolnoj skupini, dok je udio R3 populacije hemocita porasao za 81,5 %. Kod dagnji izloženih 30 mM NH₄Cl 3 sata, u uzorcima je uočena pojava dodatne, R4 populacije hemocita, s udjelom u ukupnoj populaciji stanica hemolimfe od 49,3 %. Međutim kasnije u uzorcima izloženim 24 i 48 sati, R4 populacija hemocita nije uočena. S produljenjem vremena izloženosti, uočen je trend smanjenja udijela R1 i R2 populacija hemocita, dok se udio R3 populacija hemocita povećava. Zabilježena su i pojedina odstupanja od tog trenda, tako npr. kod jedinki izloženih 24 sata 30 mM NH₄Cl, R2 populacija hemocita raste za čak 63,6 %, da bi se nakon 48 sati smanjila za 40,3 % u odnosu na njihov udio u hemolimfi kontrolne skupine (Tablica 2).

Osim što se razlikuju u brojnosti, populacije stanica (R1, R2 i R3) pokazuju razlike u veličinskim frakcijama, pa su tako hemociti populacije R1 najmanji i jednostavnije strukture (niže FSC i SSC vrijednosti), dok su oni iz populacije stanica R3 znatno veći i širih raspona veličina te kompleksnije strukture (više FFS i SSC vrijednosti). Tako su Carballal i sur (1997) podijelili stanice Mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* ovisno o njihovoj veličini i strukturi na dvije skupine: halinociti, zaobljene stanice veličine do $8,73 \pm 0,54 \mu\text{m}$, s centralno smještenom jezgrom i malenom citoplazmom bez granula, te granulociti koji su brojniji i veći od halinocita, složenije strukture. Populacija granulocita podijeljena je u tri subpopulacije: granulociti s acidofilnim granulama, granulociti s bazofilnim granulama, te subpopulaciju granulocita koja sadrži oboje, i bazofilne i acidofilne granule. Granulocite karakterizira znatno manji omjer između veličine njihove jezgre i citoplazme (znatno veća citoplazma iako im je jezgra veća od jezgre halinocita), te su većih dimenzija – acidofilni granulociti veličine $49,08 \pm 0,70 \mu\text{m}$, bazofilni granulociti $43,70 \pm 0,91 \mu\text{m}$, te granulociti koji sadrže obije skupine granulocita $44,70 \pm 1,34 \mu\text{m}$ (Carballal i sur., 1997). Pipe i sur. (1990) su centrifugiranjem u gradijentu gustoće uspjeli razlučiti hemocite obične (plave) dagnje *Mytilus edulis* na tri sloja u

kojima su uočeni: u gornjem sloju bazofilni agranulirani hemociti, u srednjem sloju obitavali su i bazofilni i eozinofilni granulociti, a doljni sloj sadržavao je eozilne granulocite većih i manjih dimenzija kako granula ($0,2 - 0,3$ i $0,5 - 1,5$) tako i samih stanica. Naknadno su, Noel i sur. (1994) utvrdili da bazofilni granulociti *M. edulis* odgovaraju granulocitima s manjim granulama, dok acidofilni granulociti odgovaraju onim s većim granulama. Još 1985. Ramussen i sur. zaključili su da granulociti obične dagnje *M. edulis* s tijekom vremena sazrijevanja postaju sve veći te sadržavaju veće granule, pa stoga prisutnost granulocita koje sadrže i velike i male granule kod Mediteranske dagnje *M. galloprovincialis*, upućuje na srođan mehanizam razvoja hemocita jedinki ove vrste. Nadalje, moguće je da granulociti koji sadrže oba tipa granula sintetiziraju nove granulocite ili funkcionalno drugačiju subpopulaciju.

Prema iznesenim rezultatima (Slika 11, 12 i 13) dobili smo tri, odnosno četiri populacije hemocita (R1, R2, R3 i R4), različitih dimenzija i unutrašnje strukture, koja u prvom redu ukazuje na granulaciju, a ovisno o koncentraciji NH_4Cl i vremenu izloženosti, različitih omjera među populacijama hemocita. Kod kontrolne skupine, najveći je udio u ukupnoj populaciji hemocita zauzimala upravo R1 populacija stanica, jednostavne strukture (agranulirane i/ili stanice s manjim brojem granula). Nadalje, rastom doze, odnosno koncentracije NH_4Cl i vremena izloženosti, opažen je pad udjela R1 i porast udjela R2 i R3 populacija hemocita, koje pripadaju nešto većim veličinskim frakcijama, a R3 populacija karakterizirana je i složenijom unutrašnjom strukturu (izraženija granuliranost), što vodi pretpostavke o stresom potaknutom razvoju zrelih stanica nešto složenije strukture.

U hemolimfi Mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* određivana su; laktat dehidrogenaza, mokraćna kiselina i urea. Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim prisutan kod životinja, biljaka i prokariota, a njegovo pretjerano otpuštanje u tjelesna tkiva, kao što je srce ili krvne stanice, označava oštećenje tkiva, ozljedu ili bolest. Dobiveni rezultati (Slika 14) upućuju na statistički značajan ($*p<0.05$, $^{\#}p<0.01$ i $^{**}p<0.001$) porast vrijednosti LDH u hemolimfi dagnji izloženih 10 i 30 mM NH_4Cl već nakon 3 sata, dok je za koncentraciju od 5 mM NH_4Cl , statistički značajno ($*p<0.05$) povećanje LDH vrijednosti zabilježeno tek nakon 24 sata po izlaganju. Te povišene vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak zabilježene su i nakon 24, odnosno 48 sati. Vrijednosti LDH koje upućuju na prisustvo stresa u organizmu, hemocitima, su u hemolimfi dagnji već nakon 3 sata izloženosti 30 mM NH_4Cl dosegle vrijednosti veće od 20 jedinica po litri, dok su vrijednosti LDH aktivnosti u dagnji izloženih 10 mM NH_4Cl bile nešto

niže. Za dagnje izložene 5 mM NH₄Cl, uočen je svojstven porast LDH aktivnosti s vremenom izlaganja, koji je, međutim, uočen i kod kontrolnih dagnji.

Mokraćna kiselina je produkt metaboličkog raspada purina, te njezino nakupljanje u tjelesnim tekućinama može uzrokovati poremećaje u sustavu za izlučivanje. Statistički značajne razlike ([#]p<0.01 i [¤]p<0.001) u količini mokraćne kiseline u hemolimfi dagnji izloženih 10 i 30 mM NH₄Cl u odnosu na kontrolne dagnje uočene su već nakon 3 sata izlaganja, te su vrijednosti rasle s porastom vremena izlaganja, tijekom sljedećih 45 sati (Slika 15). Kontrolna skupina nije pokazala promijene s obzirom na vrijeme izloženosti, za razliku od LDH, gdje su vrijednosti kontrolne skupine rasle s produljenjem vremena izlaganja.

Urea je glavni produkt deaminacije aminokiselina kod sisavaca i nekih riba. Ovisno o nekim čimbenicima i školjkaši u određenim slučajevima mogu izlučivati ureu. Razlog toj promijeni uglavnom je izloženost organizma određenoj vrsti stresa, kao što je promjena temperature, sezone, reproduktivnog ciklusa ili izloženost određenim toksinima. Statistički značajan porast ([#]p<0.01) koncentracije uree u hemolimfi uočen je kod dagnji izloženih 5 mM NH₄Cl nakon 48 sati u odnosu na kontrolne dagnje. U dagnjama izloženim 10 mM NH₄Cl uočene su još nešto više i statistički značajno drugačije ([#]p<0.01) vrijednosti uree u odnosu na kontrolu nakon 3, 24 i 48 sati izlaganja, a u hemolimfi dagnji izloženim najvišoj koncentraciji, 30 mM NH₄Cl, vrijednosti uree nakon 3, 24 i 48 sati izlaganja bile su vrlo visoke i uz vrlo visoku statistički značajnu razliku ([¤]p<0.001) od kontrolnih dagnji (Slika 16). Stoga se je upravo razina uree pokazala kao izuzetno dobar i siguran pokazatelj izloženosti Meditearanskih dagnji *M. galloprovincialis* akutno povišenim razinama amonijaka u vodenom stupcu tj. uzgojnem mediju.

Saloua i sur. (1995 , 1997) pratili su promijene u hemolimfi obične (plave) dagnje *M. edulis*, nakon što je držana u morskoj vodi obogaćenoj amonijakom. Rezultati koje su dobili ukazuju na visoku toleranciju, obične dagnje *M. edulis*, na akutno povišene koncentracije amonijaka u mediju. Chen je (1993) rezultatima svoga rada pokazao da za razliku od ostalih beskralješnjaka, pa čak i riba, dagnje mogu preživjeti i do 10 sati izložene 50 mM u mediju obogaćenom amonijakom. Za razliku od dagnji, izlaganje kozica 8-10 sati 7.1 mM amonijaku pokazalo se letalnim za tu vrstu (Chen, 1993), a većina ribljih vrsta ugiba kod pri izlaganju 20 mM amonijaku (Campell, 1991). Razlog tome, vjerorojatno leži u biologiji vrste, odnosno sposobnosti dagnje da se uslijed nepovoljnih uvjeta zatvori u svoju ljušturu i do 24 sata, i

izbjegne nepovoljne uvijete. Za to vrijeme ona se ne hrani, niti filtrira vodu u kojoj se nalazi potencijalno toksična tvar. Međutim, dagnja dugoročno nije sposobna preživjeti visoke koncentracije amonijaka u mediju. Ona će se zbog potrebe da provjeri jesu li se stabilizirali okolišni uvjeti nakon nekog vremena otvoriti i akumulirati morsku vodu i time narušiti svoju opću kondiciju. . Tako su Saloua i suradnici (1995) uočili da je razina amonijaka u hemolimfi dagnje veća nakon 5 min izlaganja NH₄ – N, nego nakon 2 sata. Kada su dagnje izložili izrazito visokim koncentracijama amonijaka, i razina amonijaka i razina ninhidrin pozitivnih supstanci, naročito nekih aminokiselina, u hemolimfi dagnji statistički je značajno porasla.

Iz rezultata provedenog stres na stres testa je vidljiv negativni utjecaj na kondiciju i sposobnost preživljavanja jedinki, prilikom čega dolazi do promijene u njihovoј hemolimfi, što se očituje u promijeni populacija hemocita, pri čemu dolazi do induciranoг bržeg sazrijevanja mlađih i još nepotpuno diferenciranih i granuliranih hemocita. Nadalje, uočene promijene u biokemijskim parametrima u krvi impliciraju na svojstven odgovor organizama na izloženost specifičnom zagađivalu, amonij kloridu. Takva jedinka ukoliko i preživi, sporije će rasti i teže se razmnožavati. Konačno, uočena značajna linearна korelacija ($y=-7,1393x+85,461$; $R^2=0.97$) smanjenja udjela R1 populacije hemocita i srednjih vrijednosti razina uree u hemolimfi ne izloženih (kontrolnih) i izloženih dagnji upućuje na moguću funkciju R2 i R3 populacije hemocita u metabolizmu amonijaka i sintezi uree kao tvari kojom se višak amonij iona izlučuje iz organizma.

6. ZAKLJUČAK

1. Izlaganje dagnji *M. galloprovincialis* akutno povišenim koncentracijama od 10 i 30 mM NH₄Cl uzrokuje značajno smanjenje njihove sposobnosti preživljavanja pri izlaganju na zraku - dodatnom stresu.
2. Akutno povišene koncentracije NH₄Cl uzrokuju promjene u populaciji hemocita, prilikom čega se smanjuje udio još nepotpuno razvijenih i negranuliranih hemocita, a povećava udio zrelih, nešto većih i granuliranih stanica u ukupnoj populaciji hemocita
3. Aktivnost LDH u hemolimfi dagnji se povećava s vremenom izloženosti dagnji te povećanjem koncentracije NH₄Cl u vodenom mediju.
4. Izlaganjem dagnji 10 i 30 mM NH₄Cl, značajno se povećava i koncentracija mokraćne kiseline u hemolimfi dagnje već nakon 3 sata te se povećava s duljinom vremena izlaganja.
5. Koncentracija uree u hemolimfi značajno se povećava s povećanjem koncentracije i vremena izloženosti NH₄Cl, te je stoga razina uree u hemolimfi dagnji izuzetno dobar i siguran pokazatelj izloženosti dagnji akutno povišenim razinama amonijaka u uzgojnog mediju.
6. Uočena je značajna linearna korelacija smanjenja udjela R1 populacije hemocita i srednjih vrijednosti razine uree u hemolimfi ne izloženih (kontrolnih) i izloženih dagnji.
7. Modulacija populacijske strukture hemocita te povećanje vrijednosti ispitivanih biokemijskih parametara hemolimfe Mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* mogu biti korišteni kao biomarkeri izloženosti akutno povišenim koncentracijama amonijaka u uzgojnom mediju.

7. LITERATURA

- Auffret, M. 1989. Comparative Study of the Hemocytes of Two Oyster Species: The European Flat Oyster, *Ostrea edulis* (Linneus, 1750) and The Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). J. Shellfish Res. 8: 367 - 373
- Bavičević L., Glamuzina B., Marguž D. 2009. Integralni planovi razvoja školjkarstva, područja Malostonskog zaljeva, ušća rijeke Krke i akvatorija sjeverozapadnog dijela Zadarske županije
- Bayne, B. L., and Scullard, C. 1977. Rates of Nitrogen Excretion by Species of *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 57: 355 – 369.
- Bayne, C. L. 1990. Phagocytosis and non-self Recognition in Invertebrates. Biosci. 40: 723 – 731
- Cajaraville, M., P., Pal, S., G. 1995. Morphofunctional Study of the Hemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis of the Endolysosomal Compartment. Cell Structure and Function. 20: 355 – 367
- Campell, J. W. 1991. Excretory Nitrogen Metabolism. In: Prosser L (ed) Environmental Animal Physiology, Comparative Animal Physiology, 4 th edn. Willey – Lis, New York, 277 - 324
- Carballal, M. J., Lopez, C. M., Azevedo, C., Villalba, A. 1997. Hemolymph Cell Types of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Diseases of Aquatic organisms. 29 : 127 – 135
- Chen, J. C. 1993. Accumulation of Ammonia in the Hemolymph of *Peneaus monodon* Exposed to Ambient Ammonia. Aquaculture. 109: 177 - 185
- Cheng, T. C. 1981. Bivalves. In Invertebrata Blood Cells (Ratcliffe, N. A. And Rowley, A. F., eds.) Acad. Press, London, 233 – 300
- Cheng, T. C. 1984. A Classification of Molluscan Hemocytes Based on Functional Evidences. In Comparative Pathobiology, Invertebrate Blood Cells and Serum Factors (Cheng, T. C., ed.). Plenum, New York. 6: 111 – 146

- Cheng, T. C. 1996. Hemocytes: Form and Function. In: The Eastern Oyster *Crassostrea virginica* (eds. V. S. Kennedy, R. I. E. Newell i A. F. Eble) Maryland Sea Grant, College Park, Maryland, 299 – 333
- Dyrynda, E. A., Pipe, R. K., Burt G. R., Ratcliffe, N. A. 1998. Modulations in the Immune Defences of Mussels (*Mytilus edulis*) from Contaminated Sites in the UK. *Aquat. Toxicol.* 42: 85 – 169
- Emerson, D. N. 1969. Influence of Salinity on Ammonia Excretion Rates and Tissue Constituents of Eurihaline Invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 20: 45 - 53
- Emerson, K., Thurston, R. V., Russo, R. C. 1975. Aqueous Ammonia Equilibrium – Tabulation of Percent Un – ionized Ammonia. Monticello Ecological Research Station Environmental Research Laboratory – Duluth Monticello, Minnesota 55362
- FAO, 2010. The state of world Fisheries and Aquaculture. Rome 2010
- FAO, 2014. The state of world Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. Rome 2014
- Fisher, W. S. 1986. Structure and Function of Oyster Hemocytes. *Immunity in Invertebrates*. Springer – Verlag, Berlin, 25 – 35
- Foley, D. A. i Cheng, T. C. 1975. A Quantitative Study of Phagocytosis by Hemolymph cells of the Pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Invert. Pathol.* 25: 189 – 197
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W. B., Wang, K., J. 2008. Immunomodulation in the Marine Gastropod *Haliotis diversicolor* Exposed to Benzo(a)pyrene. *Chemosphere*. 75: 389–397
- Gosling, E., 1994. The mussel *Mytilus*. Ecology, Physiology, Genetics and Culture, (ED) Elsavier, Amsterdam – London – New York – Tokyo, 1 – 589

- Hagopian, D. S. i Riley, J. G. 1998. A Closer Look at the Bacteriology of Nitrification. Aquaculture Eng. 18: 223 – 244
- Hammond, W. i Griffiths, C. L. 2004. Influence of Wave Exposure of South African Mussel Beds and Their Associated Infaunal Communities. Marine Biology. 144: 547 – 552
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery Culture of Bivalves. A practical manual. (Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Hochachka, P. W. 1983. The Mollusca; Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics. Zoology Department University of British Columbia Vancouver, British Columbia, Canada, 243 – 327
- Hockey, P. A. R. i Van Erkom Schiurik, C. 1992. The Invasive Biology of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* on the Southern African Coast. Transactions of the Royal soxiety of South Africa. 48: 123 – 139
- Ip, Y. K., Chew, S. F. 2010. Ammonia Production, Excretion, Toxcity and Defense in Fish. Frontirs in physiology. Front. Physio, 1 - 134
- Jug-Dujaković, J., Gavrilović, A., Van Gorder, S. (2011). The Efficiency of Rotating Biological Contactors in a Closed Recirculating Fish Culture System. Proceedings of the 5th International Conference „Aquaculture anf Fishery“, Belgrade, 1-3. June 2011. Zoran Marković (ed.) Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun, Serbia, 174-179
- Livingstone, D. R., Chipman, J. K., Lowe, D. M. i sur. 2000. Development of Biomarkers to Detect the Effect of Organic Pollution on Aquatic Invertebratas: Recent Molecular, Genotoxic, Cellular and Immunological Studies on the Common Mussel (*Mytilus edulis* L.) and Other Mytilidis. Int. J. Environ. Pollut. 13: 56 - 91
- Meade, J. W. 1985. Allowable ammonia for Fish Culture. Prog. Fish – Cult. 47 (3) : 135- 145
- Mix, M. C. 1976. A General Model for Leucocyte Cell Renewal in Bivalve Mollusks. U.S. Natl. Mar. Fish. Rew. 38: 37 – 41

Montresor, C. I. Miranda – Filho, C. 2013. Short – term Toxicity of Ammonia, Sodium Hydroxide and Commercial Biocide to Golden Mussel *Limnoperna Fortunei*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 92: 150 – 154

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprava Ribarstva, Akvakultura, 2011,
<http://www.mps.hr/ribarstvo/default.aspx?id=14>,

Noel, D., Pipe, R., Elston, R., Bachere, E., Mialhe, E. 1994. Antigenic Characterization of Hemocyte Subpopulations in the Mussel *Mytilus edulis* by Means of Monoclonal Antibodies. Mar Biol. 119: 549 – 566

Prado-Alvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios S., Novoa, B. and Figueras, A. 2011. Morphological Characterization and Functional Immune Response of the Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Hemocytes after Bacterial Stimulation. Fish and Shellfish Immunology, 1-39

Picker, M. D. i Griffiths, C. L. 2011. Alien and Invasive Animals – A South African Perspective. Randomhouse/ Struik Cape Town, str. 240.

Pipe, R. K. 1990. Differential Binding of Lecitines to Hemocytes of the Mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J. 22: 595 – 693

Pipe, R. K. i Coles, J. A. 1995. Environmental Contaminants Influencing Immune Function in Marine Bivalve Molusks. Fish Shellfish Immunol. 5: 95 - 581

Prieur, D., Nicolas, J. L., Plusquellec, A., Vigneulle, M. 1990. Interactions between Bivalve Mollusks and Bacteria in the Marine Environment. Oceanogr. Mar. Ecol. 28: 277 - 352

Ramussen, L.P.D., Hage, E., Karlog, O. 1985. An Electron Microscope Study of the Circulating Leucocytes of the Marine Mussel *Mytilus edulis*. J. Invertebr. Pathol. 45: 158 - 167

Randal, D. J. and Tsui, T. K. N. 2002. Ammonia Toxcity in Fish. Marine pollution, Bulletin. 45: 17 – 23

Sadok, S., Uglow, R., Haswell, S. J. 1995. Fluxes of Hemolymph Ammonia and Free Amino Acids in *Mytilus edulis* Exposed to Ammonia. Mar. Ecol. Prog. Ser. University of Hull, United Kingdom. 129: 177 – 187

- Sadok, S., Uglow, R., Haswell, S. J. 1997. Hemolymph and Mantle Fluid Ammonia and Ninhydrin Positive Substances Variations in Salinity – Challenged Mussels (*Mytilus edulis*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. University of Hull, United Kingdom. 212: 195 – 212
- Sadok, S., Uglow, R., Haswell, S. J. 1999. Some Aspects of Nitrogen Metabolism in *Mytilus edulis*: Effects of Aerial Exposure. Marine Biology. 135, 297 – 305.
- Shapiro, H. M. 2003. Practical Flow Cytometry, 4 rd ed. Wiley, New York, 412 – 425
- Sindermann, C. 1990. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish, 2nd edn. Vol. 2. Academic Press, San Diego, California
- Spencer, B. E. 2002. Molluscan Shellfish Farming. First Published. Fishing News Books, a division of Blackwell Publishing, Osney Mead, Oxford Ox2 OEL, UK, str. 269
- Spencer, B. E. 2008. Molluscan Shelfish Farming. Tehnology and Engineering, str. 296
- Spote, S. 1979. Fish and Invertebrate Culture. Wiley – interscience Publication, John Wiley i Sons, NY, NY
- Steffani, C. N. i Branch, G. M. 2003. Growth Rate, Condition and Shell Shape of *Mytilus galloprovincialis*: Responses to Wave Exposure. Marine Ecology Progress series. 246: 197 – 209
- Suzuki, T. i Funakoshi, S. 1992. Isolation of a Fibronectin – like Molecule from a Marine Bivalve, *Pinctada fucata*, and its Secretion by Amebocytes. Zool. Sci. 9: 541 – 555.
- Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., Wanda, K. 1991. Extracellular Matrix Formation by Amebocytes During Epithelial Regeneration in the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. Cell. Tiss. Res. 266: 75 – 82
- Šarić, I., Brailo, M., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J. (2010). Biološki filtri u akvakulturi. Ribarstvo. 68: 117-132
- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., Vinci, B. J. 2002. Aquaculture Systems 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, 01 – 002

- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., Vinci B. J. 2001. Recirculating Aquaculture Systems. Cayuga Aqua Ventures. Itaca, NY, str. 647
- Van Erkom Schurik, C. i Griffiths, C. L. 1991. A Comparison of Reproductive Cycles and Reproductive Output in Four Southern African Mussel Species. *Marine Ecology Progress Series*. 76: 123 – 134
- Van Erikom Schurik, C. i Griffiths, C. L. 1992. Physiological Energetic of Four South African Mussel Species in Relation to Size, Ration and Temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101: 779 – 789
- Villalba, A., Comesana, P., Casas, S. M., Cao, A., Abollo, E., Arzul, I., Morga, B. 2012. Comparison of Hemocytic Parameters among Flat Oyster *Ostrea edulis* Stocks with Different Susceptibility to Bonamiosis and the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109: 274 - 286
- Volety, A. K., Oliver, L.M., Gentner, F. J., Fisher, W. S. 1999. A rapid Tetrazolium Dye Reduction Assay to Assess the Bacterial Activity of Oyster (*Crassostrea virginica*) Hemocytes Against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 172: 22 – 205
- Wheaton, F. W., Hochheimer, J. N., Kaiser, G. E., Kranes, M. J. 1991. Principles of Biological Filtration, Proceedings from the Aquaculture symposium. Cornel University. Itaca, New York, April, 4 – 6
- Wright, P. A. 1995. Nitrogen Excretion: Three end Products, Many Physiological Roles. *The Journal of Experimental Biology*. 198: 273 – 281