

Procjena prilagodbe dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) na genotoksični stres

Linardić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:637582>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marina Linardić

Procjena prilagodbe dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) na genotoksični stres

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj rad, izrađen na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom Prof. dr. sc. Görana I. V. Klobučara, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

Zahvale

Veliko hvala mojem mentoru prof. dr. sc. Göranu I. V. Klobučaru te sumentorici dr.sc. Anamariji Štambuk na ukazanom povjerenju, vremenu, potpori i pomoći oko izrade ovog diplomskog rada.

Također, od srca zahvaljujem dr.sc. Maji Šrut, mag. Dorotei Polović i mag. Vidu Bakoviću na bezuvjetnoj pomoći u terenskom radu, obradi podataka te ugodnom društvu.

Zahvaljujem se također svim volonterima Laboratorija za ekotoksikologiju koji su uspjeli izdvojiti vremena da mi pomognu u analizi podataka.

Također, zahvaljujem djelatnicima Instituta Ruđer Bošković koji su odradili analize teških metala kao dijela ovog diplomskog rada.

Posebno hvala Udruzi studenata biologije "BIUS" na nezaboravnim provodima te prilici da naučim mnogo više kroz brojna terenska istraživanja.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama Petri, Maji, Franki, Sani, Zrinki, Nikoli, Marku, Nevenu, Matiji, Ani, Steli, Mateji i Karmen na strpljenju, nezaboravnim putovanjima i provodima, kao i neophodnom last minute grupnom učenju, potpori i neizmjereno zabavnim druženjima u kantini "Medulić"...

Veliko hvala mojoj obitelji; roditeljima Nikici i Zoranu te sestri Ivani koji su uvijek bili uz mene, gurali me naprijed, pružali mi veliku podršku u svakoj situaciji te bili velika potpora na koju uvijek mogu računati.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Procjena prilagodbe dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) na genotoksični stres

Marina Linardić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Antropogeno djelovanje na okoliš između ostalog uključuje i onečišćenje, odnosno ispuštanje raznih anorganskih i organskih tvari u okoliš. Utjecaj onečišćenja na organizme može se najranije zamijetiti na molekularnoj i staničnoj razini. Mjerenja oštećenja DNA su od posebne važnosti za određivanje stresa uzrokovanog onečišćenjem i procjenu okolišnog rizika. U svrhu analize intenziteta genotoksičnog djelovanja detektirana su oštećenja DNA u hemocitima vrste *Mytilus galloprovincialis* iz nativnih i kavezno izlaganih populacija na postajama Pula - luka, Ičići, Limski kanal, Rijeka - luka, brodogradilište u Sjevernom Jadranu, Split - luka, Marina, Trogir - marina, Adriavini, Zadar Borik, Zadar – marina, Gruž - luka, Mali Ston, Ston, NP Mljet u jesen 2013. i proljeće 2014. godine, te izlaganjem dagnji s postaja Gruž i Marina bakru u mesokozmos eksperimentu. Za ovo istraživanje korištena je metoda komet-testa. Utjecaj onečišćenja na okoliš procijenjen je iz literaturnih podataka te kemijskih analiza metala u tkivu dagnji. Uzorkovane populacije pokazale su nizak do umjeren stupanj utjecaja onečišćenja. Najveće odstupanje pokazale su dagnje s postaja Gruž i Pula, za koje je izmjeren i značajno najviši genotoksični utjecaj. Analiza oštećenja DNA kavezno izlaganih jedinki pokazala je blago snižen integritet DNA u odnosu na kontrolnu postaju Marina, no jedino su jedinke s postaje Gruž imale statistički značajnu razliku. Sezonske fluktuacije na istraživanim postajama čine interpretaciju kemijskog onečišćenja vrlo kompleksnom, što se može zaključiti iz dobivenih podataka. Rezultati mezokozmos eksperimenta pokazali su veće oštećenje DNA kod dagnji s onečišćene postaje. Ovo istraživanje naglašava važnost razumijevanja ekoloških faktora (salinitet, temperatura, pH) u interpretaciji dobivenih podataka. Nadalje, adaptacija populacija na lokalno onečišćenje može igrati veliku ulogu u dobivenim rezultatima.

(49 stranica, 27 slika, 5 tablica, 95 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Mytilus galloprovincialis*, komet-test, genotoksičnost, oštećenje DNA, teški metali

Voditelj: Prof. dr. sc. Göran I. V. Klobučar

Neposredni voditelj: dr. sc. Anamaria Štambuk

Ocjenitelji: 1. Prof. dr. sc. Göran I. V. Klobučar

2. Doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić

3. Doc. dr. sc. Duje Lisičić

Rad je prihvaćen: 12.9.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Adaptation and acclimatisation of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) on genotoxic stress

Marina Linardić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Anthropogenic effect on the environment includes pollution, i.e. emission of various inorganic and organic substances into the ecosystem. The earliest effect of pollution on the organisms can be detected on the molecular and cell levels. Studies of genotoxicity biomarkers such as DNA damage are of great importance for understanding pollution related stress and environmental risk assessment. The genotoxic effect was studied on the *Mytilus galloprovincialis* haemocytes using comet assay. Native populations were sampled in fall 2013. and in spring 2013 on the locations: Pula - harbour, Ičići, Lim Bay, Rijeka - harbour, shipyard in the northern Adriatic, Split - harbour, Marina, Trogir - marina, Adriavil, Zadar Borik, Zadar – marina, Gruž - harbour, Mali Ston, Ston, NP Mljet. In addition, population Marina was cage exposed on six sites in transplant experiment, and populations Gruž and Marina were exposed to copper in mesocosm experiment. The pollution effect on the mussel populations was estimated by literature data and chemical analysis of heavy metals in the mussel tissue. These results indicated low to moderate level of pollution. DNA damage analysis in native populations did not show significant difference between all of the control and polluted stations. The biggest aberration was seen in the mussels from the locations Gruž and Pula, which had the highest genotoxic effect. DNA damage analysis in transplanted populations showed slightly decreased DNA integrity in respect to the control station Marina, and statistical significance was reached only for mussels exposed at site Gruž. Mesocosm experiment showed higher DNA damage in mussels from polluted site. Seasonal fluctuations of environmental conditions at the study sites make interpretation of pollution effect complex, as seen especially in the variability of the results on DNA damage. These investigations further stress the importance of understanding the effects of natural factors (salinity, temperature, pH) for the interpretation of the data obtained. In addition, adaptation and acclimatisation of populations to local pollution may play a role in some of the response patterns observed.

(49 pages, 27 figures, 5 tables, 95 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, Comet assay, genotoxicity, DNA damage, heavy metals

Supervisor: Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, Prof.

Assistant Supervisor: Dr. sc. Anamaria Štambuk

Reviewers: 1. Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, Prof.

2. Dr. sc. Zrinka Ljubešić, Ass. Prof.

3. Dr. sc. Duje Lisičić, Ass. Prof.

Thesis accepted: 12.9.2014.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Jadransko more	2
1.2. Biomarkeri	2
1.3. Genetička ekotoksikologija	4
1.4. Komet-test	5
1.5. Mediteranska dagnja - <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819).....	8
1.6. Cilj istraživanja	11
2. Materijali i metode.....	12
2.1. Opis istraživanja.....	12
2.2. Opis postaja	15
2.3. Hidrografski čimbenici.....	21
2.4. Kemijska analiza	22
2.5. Biološka analiza	23
2.6. Mjerenje oštećenja DNA	23
2.7. Mikroskopska analiza.....	24
2.8. Statistička analiza.....	24
3. Rezultati	25
3.1. Kemijske analize	25
3.2. Biološke analize	28
4. Rasprava.....	32
4.1. Kemijske analize i onečišćenost postaja	32
4.2. Oštećenje DNA	33
5. Zaključak.....	39
6. Literatura.....	41
7. Prilozi.....	VI
8. Životopis	IX

1. Uvod

Kontinuirani antropogeni pritisak duž obala svih, pa tako i Jadranskog mora, rezultira u stalnom unosu širokog obima različitih kemijskih tvari u morski okoliš. Te kemijske tvari utječu na zdravlje morskih ekosustava. Izravnim ispuštanjem, putem padalina ili ispiranjem tla, većina otpadnih tvari antropogenog porijekla najčešće dospijeva u kopnene vode i more, koji tako postaju krajnji primaoci većine onečišćenja i time su posebno ugroženi. Kemijske tvari akumuliraju se u organizmima te imaju potencijal da induciraju promjene na razini molekula, stanica i tkiva, pružajući razne signale upozorenja na događaje koji bi se mogli dogoditi na razini populacija, zajednica te ekosistema. Promjene u kemijskom sastavu mora u budućnosti bi mogle imati snažan negativni učinak na organizme koji nastanjuju ta područja, kao i na samu ljudsku populaciju (Ohe i sur. 2004).

Zadnjih se dvadesetak godina sve više razvijaju i upotrebljavaju metode za što ranije otkrivanje promjena u ekosustavima uzrokovanih onečišćenjem kako bi se u što većem postotku izbjegli događaji poput masovnog izumiranja vrsta te promjena u sastavu samih vrsta u morskim ekosustavima.

Globalne promjene u morskim ekosustavima i kontinuirano odlaganje genotoksičnih tvari povećavaju značaj monitoringa okolišnog onečišćenja i biomonitoring programa. Za samu procjenu izloženosti organizama potencijalnim toksikantima nije dovoljna kemijska analiza koja daje informaciju o njihovoj koncentraciji u ekosustavu, već je bitna stvarna izloženost organizama (Jha 2004). Kod praćenja stanja morskih sustava mora se u obzir uzeti i toksični te genotoksični utjecaj onečišćivača kao i emisija te razina onečišćivača u okolišu. Iako se za određivanje biološke raspoloživosti toksikanata koriste se i analize nakupljanja tvari u tkivima, stvarna izloženost nekog organizma ne može se prikazati samo kao direktni rezultat mjerenja bioakumulacije u organizmu (McCarthy i Shughart 1990). Osim toga, onečišćivači su u ekosustavima najčešće prisutni u mješavini, pa treba uzeti u obzir i njihova eventualna sinergistička, aditivna ili antagonistička međudjelovanja.

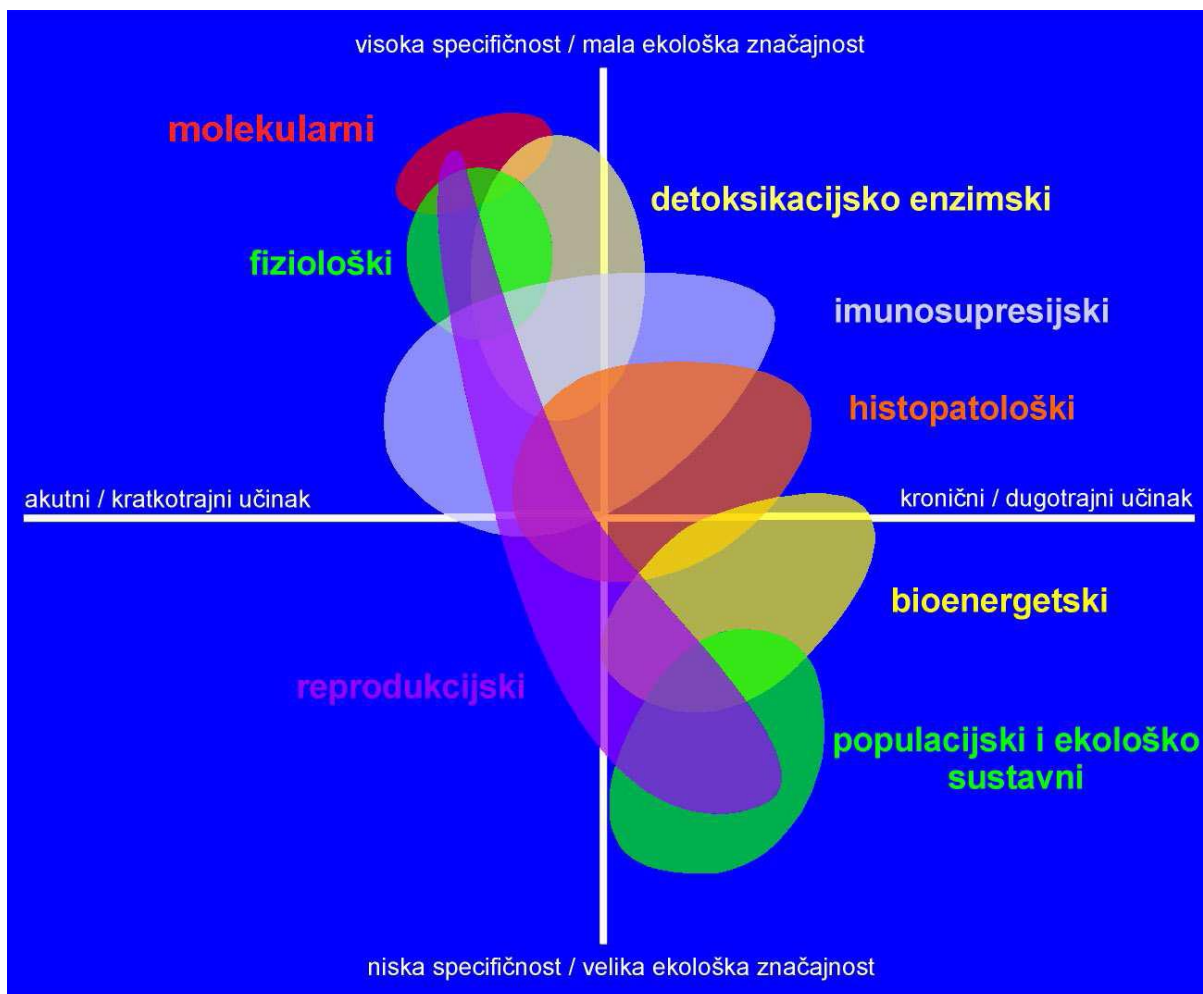
Biomonitoring (biološki nadzor) je zbir analiza biološke komponente okoliša i njenih reakcija koje koristimo za otkrivanje promjena u okolišu nastalih onečišćenjem. Biomonitoring je zadnjih dvadesetak godina postao sastavni dio programa monitoringa okoliša, kao nadogradnja do tada obično korištenih kemijskih analiza zagađivača u okolišu. Biološki i biokemijski učinci mogu povezati biološku raspoloživost tvari i njihovu koncentraciju u organima sa stvarnom toksičnošću.

1.1. Jadransko more

Jadransko more je sjeverni izdanak Sredozemnog mora (Mediterana), a čini samo 4,6% od njegove ukupne površine (Riđanović i sur. 1999). Jadransko more je pretežno plitko. Sjeverno od Pule mu dubina ne prelazi 50 m, a sjeverno od Zadra 100 m. Najdublji dio Jadrana je Južnojadranska kotlina čija je dubina veća od 200 m, a dostiže 1243 m. Jadransko more, kao poluzatvoreni dio Mediteranskog mora, od velikog je interesa kada se priča o procjenjivanju ulaska, obimu, sudbini i učinku onečišćivača. U posljednje vrijeme utjecaj genotoksičnih tvari također je postao vrlo važan aspekt onečišćenja morskih sustava. Jadransko more je umjereno toplo more. Srednja površinska temperatura istočnog dijela je 8-13 °C u veljači te 21-25 °C u kolovozu (Supić i Orlić 1992). Salinitet njegovog južnog dijela kreće se između 38,4 te 38,9 ‰, no u obalnoj zoni kao i u sjevernom dijelu salinitet je niži sa većim varijacijama (Gačić i sur. 2001). Sudbina onečišćivača u hrvatskom dijelu Jadranskom mora pod velikim je utjecajem morskih struja kao i pod utjecajem vjetra (Gačić i sur. 2001). Kvaliteta morskog okoliša duž hrvatske obale nedovoljno je istražena. Mnoga područja pod velikim su utjecajem urbanizacije, ispuštanja industrijskog i lučkog otpada, te je monitoring tih područja od vrlo velikog značaja za zdravlje cjelokupnih morskih ekosistema kao i za zdravlje ljudi.

1.2. Biomarkeri

Biomarkeri podrazumijevaju analize/mjerenja koje ukazuju na interakciju između biološkog sistema i potencijalno štetnog kemijskog, biološkog ili fizičkog djelovanja (WHO 1993). U užem smislu pod pojmom biomarkeri podrazumijevaju se biološki učinci na staničnoj i molekularnoj razini. Te promjene su uglavnom reverzibilne i često su dio homeostatskih sustava organizama. To znači da su niske ekološke značajnosti, no specifičnost biomarkera za utvrđivanje uzročno- posljedične veze između izlaganja nekom tipu zagađenja i biološkog učinka veća je nego na višim razinama, kao što su populacije i ekosustavi. Za razliku od nižih razina, promjene na višim razinama biološke organizacije imaju puno veću ekološku značajnost. S druge strane, promjene na razini molekula i stanica mnogo je lakše povezati sa specifičnim djelovanjem toksikanata.



Slika 1. Specifičnost i ekološka značajnost pokazatelja promjena na razinama biološke organizacije nakon akutnog i kroničnog učinka zagađenja (prema McCarthy i Shugart 1990)

Biomarkeri genotoksičnosti danas su sve češće sastavni dio seta biomarkera koji se koriste u biomonitoringu onečišćenja okoliša (Klobučar i sur. 2008, Kolarević i sur. 2013, Michel i sur. 2013, Štambuk i sur. 2013). Promjene na razini molekula i stanica najosjetljiviji su pokazatelji učinka i izlaganja organizma onečišćenju i trebali bi omogućiti rano upozorenje o predstojećim promjenama koje mogu dovesti do oštećenja stanica i tkiva, te pogoršanja zdravlja promatranih populacija i biocenoza. Prilikom same interpretacije biomarkera, kako bi se izbjegle pogreške, moraju se u obzir uzeti i biotički i abiotički čimbenici koji mogu imati potencijalni utjecaj na biološke učinke (Kleinjans i van Schooten 2002). Pogreške u interpretaciji lako nastaju ako se u obzir ne uzmu kompleksnost bioloških ekosistema te njihova sposobnost da kompenziraju stres (Bolognesi i Degan 2001). DNA ima veliku ulogu u homeostazi svakog organizama te u prijenosu genetičke informacije na sljedeće generacije. Zbog takvog velikog značaja, oštećenje DNA ima izravni utjecaj na održanje ravnoteže svih ekosustava. Posebna pažnja treba se obratiti na mjerenja oštećenja DNA koja su vrlo bitna za

određivanje stresa uzrokovanog onečišćenjem i procjenu okolišnog rizika (Klobučar i sur. 2003, Michel i sur. 2013, Rank i sur. 2007, Villela i sur. 2007). No, povezanost oštećenja DNA s genetičkim promjenama na razini organizma i populacije još uvijek je relativno slabo istražena. Ovisno o samom tipu djelovanja, antropogeni učinak može uzrokovati smanjenje ili povećanje genetičke varijabilnosti ili pak ne pokazati nikakav vidljiv učinak.

Općenito, antropogeni učinci koji mijenjaju uvjete okoliša, mogu uzrokovati povećanu selekciju i na taj način smanjiti genetičku varijabilnost. Takav rezultat očekuje se i kod onih učinaka koji djeluju u smjeru smanjenja veličine populacije i povećanja njene izoliranosti. Na taj se način povećava genetički drift i smanjuje genetička varijabilnost. Utjecaji koji uzrokuju povećanu ratu mutacije mogu i povećati genetičku varijabilnost (Bickham i sur. 2000, DiBattista 2008).

1.3. Genetička ekotoksikologija

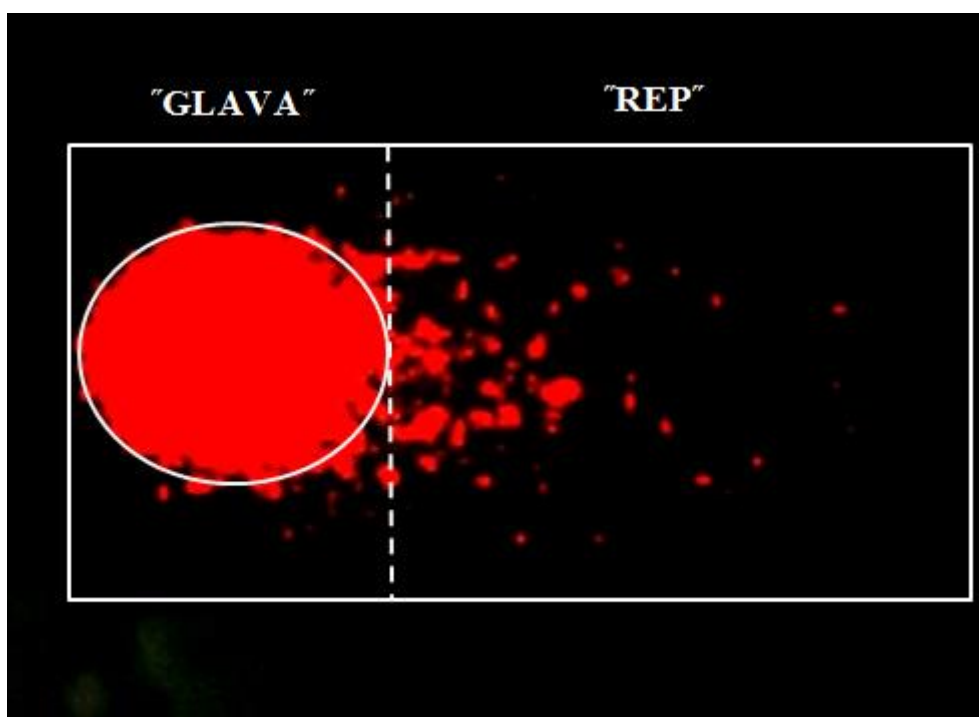
Genetička ekotoksikologija je multidisciplinarna znanost koja utvrđuje negativan učinak tvari na strukturu i funkciju genetičkog materijala. Može uključivati promjene u jedinkama, kao npr. oštećenja molekule DNA, ili učinke na razini populacije, kao što su promjene u genetičkoj raznolikosti ili učestalosti pojedinih gena ili lokusa (Theodorakis 2001). Iako se obično usmjerava na jedno od navedenih područja, integracija obje vrste istraživanja imala bi mnoge prednosti:

- a) Na razini populacije usporedba između promjena u genetičkoj strukturi populacije i oštećenja DNA može pružiti dokaz u kolikoj su mjeri promjene u genetičkoj strukturi populacije uzrokovane genotoksičnim djelovanjem.
- b) Veza između oštećenja DNA i određenih genotipova može ukazivati na genotoksikantima induciranu selekciju.
- c) Analiza protoka gena može ukazivati na procese koji uzrokuju da razlika između populacija na onečišćenom i referentnom staništu bude teško uočljiva.

1.4. Komet-test

Tijekom godina razvijeni su mnogi biomarkeri koji pružaju mogućnost ranog upozorenja izloženosti organizama onečišćenju i procjene njegovog utjecaja. Procjena oštećenja DNA je od najveće važnosti kada se određuje stres uzrokovan onečišćenjem u živim organizmima. Da bi se pratila genotoksičnost u morskim sustavima, u ovom istraživanju koristila se metoda komet-testa (eng. *"Single Cell Gel electrophoresis assay"*).

Komet-test je metoda koja se temelji na pokretljivosti oštećenih dijelova DNA u električnom polju, pri čemu dolazi do njihovog odvajanja od nukleoida (jezgra nakon liziranja proteina i membrane) imobiliziranih u agaroznom gelu. DNA se zatim boji DNA specifičnim bojama, a preparati se pregledavaju pod fluorescencijskim mikroskopom.



Slika 2. "Glava" i "rep" kometa

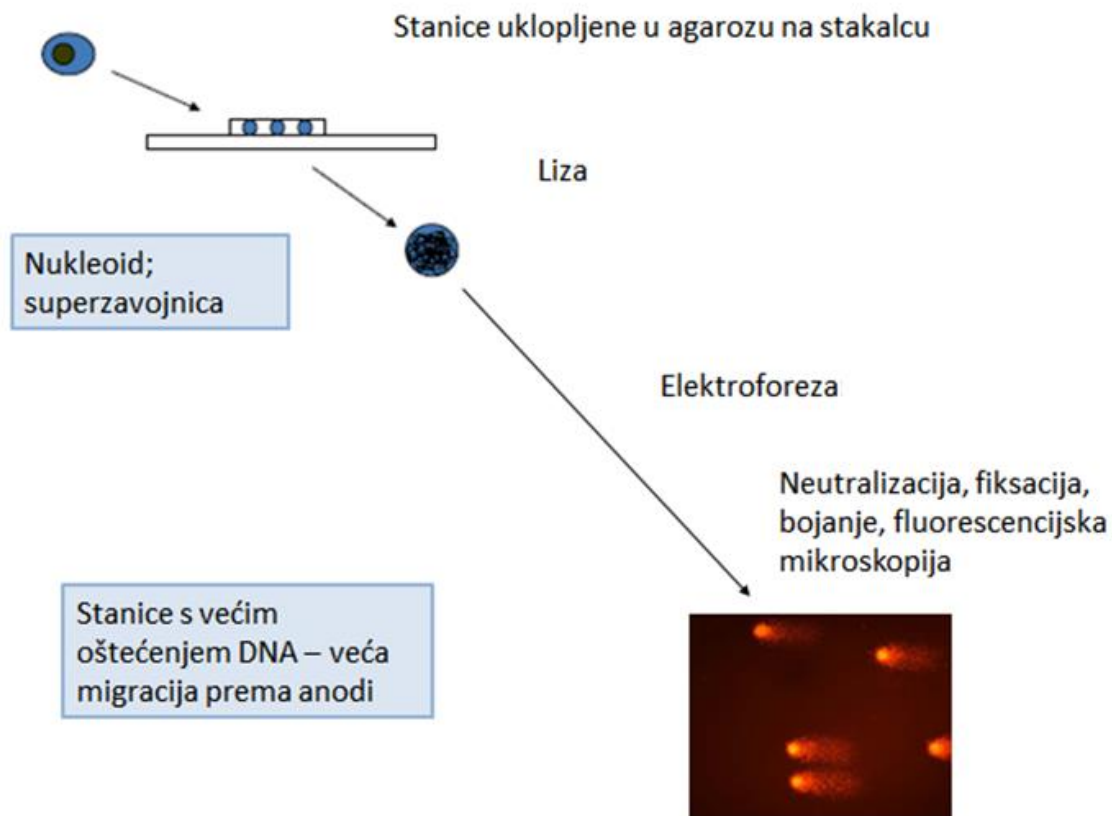
Zbog svoje brzine, jednostavnosti, osjetljivosti, te budući da zahtijeva mali broj stanica komet-test je predložen kao jedna od idealnih tehnika za određivanje genotoksičnog oštećenja. Pruža mogućnost utvrđivanja raznih oblika oštećenja u mnogim organizmima i raznim vrstama stanica. Omogućuje mjerenje oštećenja u pojedinačnim stanicama, s preduvjetom da stanice budu razdvojene, po čemu se razlikuje od ostalih metoda za detekciju lomova DNA. Osim toga, kako za detekciju oštećenja DNA komet-testom stanice ne moraju biti mitotski aktivne, to pruža dodatne prednosti ove metode pred metodama kao što su

analiza kromosomskih aberacija, izmjena sestrinskih kromatida i mikronukleus-test. Glavno ograničenje komet-testa jest mogućnost induciranja dodatnih oštećenja prilikom pripremanja suspenzije pojedinačnih stanica (Rojas i sur. 1999). Komet-testom moguće je detektirati jednolančane i dvolančane lomove DNA, unakrsne veze DNA-protein ili DNA-DNA te mjesta osjetljiva na lužnate uvjete (apurinska ili apurimidinska mjesta), ovisno o pH pufera tijekom denaturacije i elektroforeze DNA (Rojas i sur. 1999, Tice i sur. 2000).

Metoda alkalnog komet-testa sastoji se u uklapanju suspenzije pojedinačnih stanica između slojeva agaroze na predmetnom stakalcu. Preparati se zatim uranjaju u pufer za lizu visoke koncentracije soli i neionskih detergenata, što rezultira pucanjem stanične i jezgrine membrane te odmatanjem nukleosoma. Ono što preostaje je nukleoid, koji se sastoji od nuklearnog matriksa sastavljenog od DNA u obliku superzavojnice i male količine nehistskih proteina. Nakon lize slijedi denaturacija u puferu visoke pH-vrijednosti, što dovodi do odvajanja komplementarnih lanaca DNA, pa svaki lom uzrokuje odmatanje superzavojnice (Rojas i sur. 1999), a alkalni tretman degradira i RNA (Singh 2000).

Elektroforeza se provodi u istom puferu i tijekom nje se negativno nabijeni krajevi lomova i otpuštene DNA petlje kreću prema anodi, tvoreći "rep" koji izlazi iz nukleoida, odnosno "glave" kometa, pa stanice s većim oštećenjem DNA pokazuju veću migraciju prema anodi (Collins 2002, Rojas i sur. 1999). Pri manjim oštećenjima dolazi do izvlačenja slobodnih krajeva molekule iz nukleoida, dok je kod većeg broja lomova prisutno i putovanje samostalnih fragmenata (Tice i sur. 2000). Pri pH 12,1-12,3 alkalna denaturacija i elektroforeza omogućuju detekciju jednostrukih i dvostrukih lomova DNA i mjesta ekscizijskog popravka, dok se pri pH-vrijednosti većoj od 13 i mjesta osjetljiva na lužnate uvjete prevode u lomove DNA (Rojas i sur. 1999). Nakon elektroforeze slijedi neutralizacija. Za mikroskopsku analizu DNA se boji DNA-specifičnim bojama poput etidij bromida ili 4',6-diamidino-2-fenilindola.

Detektiranje oštećenja DNA ovisi o mnogim parametrima, kao što je koncentracija agaroze, pH-vrijednost, temperatura i vrijeme denaturacije, te pH-vrijednost, temperatura, jačina i napon struje i vrijeme trajanja elektroforeze (Hartmann i sur. 2003).



Slika 3. Postupak komet-test metode

Vrlo se brzo zaključilo da se komet-test može koristiti za monitoring popravka DNA kao i za oštećenja DNA: Ostling i Johanson (1984) te Singh i sur. (1988) pratili su sljublivanje DNA lomova induciranih ionizacijskom radijacijom. Alkalna verzija komet-testa danas je široko prihvaćena metoda koja se koristi na stanicama u kulturi, krvnim stanicama životinja i ljudi, hemolimfi školjkaša te insekata, spermiji, kvascima, biljnim jezgrama. Štoviše, moguće je producirati komete iz izoliranih kromosoma (Cortés-Gutiérrez et al. 2011). Sljedeća česta upotreba komet-testa odnosi se na procjenu antioksidativnog statusa stanica, kroz njihov otpor oštećenju reaktivnim kisikom (npr. H_2O_2). Četiri su glavna područja u znanosti u kojima je komet-test prohvraćen kao metoda. Koristi se u testiranjima genotoksičnosti, za određivanje potencijalne toksičnosti lijekova, kozmetike i ostalih kemikalija. Istraživanja se mogu provoditi *in vivo* (analizom tkiva različitih laboratorijskih životinja) ili *in vitro* (na kulturama stanica). Nadalje, primjena u biomonitoringu ljudske populacije: za određivanje učinaka izlaganja opasnim agensima na razini DNA, za proučavanje čimbenika koji pridonose bolestima, za otkrivanje individualnih varijacija (npr. sposobnost popravka DNA), za monitoring promjena uzrokovanih prehranom (npr. antioksidanti mikronutrijenti). Ekogenotoksikologija je treće područje primjene komet-testa –

koristeći velik broj organizama (školjkaši, gujavice, puževi, biljke i sl.) kao indikatore genetičkog oštećenja pod utjecajem onečišćivača. Na kraju, komet-test koristi se kao metoda u bazičnim istraživanjima mehanizama oštećenja i popravka DNA lanca.

Iako je trenutno u upotrebi veliki broj protokola koji se razlikuju od laboratorija do laboratorija, a ovise i o proučavanom organizmu ili vrsti stanica, većina ih je zapravo samo malo modificiran protokol po Singh i sur. (1988) (pregledni članci: Collins i sur. 2008, McKelvey-Martin i sur. 1993, Oliveira i sur. 2006, Rojas i sur. 1999)

Za kvantificiranje oštećenja upotrebljavaju se danas uglavnom računalni programi za analizu slike. Njima se mjeri intenzitet obojenja i veličina repa i glave kometa, a vrijednosti oštećenja iskazuju se uglavnom kao postotak DNA u repu, dužina repa i repni moment (%DNA u repu x duljina repa/100). Komet-test je vrlo osjetljiva metoda, s kojom je moguće detektiranje 1 loma na 10 Da (Gedik i sur. 1992), odnosno nekoliko stotina lomova po stanici (Collins i sur. 1997, McKelvey-Martin i sur. 1993). Ta osjetljivost je bitna jer su mutageni prisutni u okolišu uglavnom u niskim dozama (Wilson i sur. 1998).

Prema istraživanju Michel i sur. (2013) komet-test na školjkašima izlaganim u kavezima sa onečišćenim policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAU) može se uspješno koristiti za biomonitoring okolišnog onečišćenja. Izlaganje školjkaša poznatim genotoksikantima u laboratoriju često pokazuje pravilan učinak ovisan o dozi (Banni i sur. 2010, Štambuk i sur. 2008) što ukazuje na osjetljivost i primjenljivost metode. Mnoga istraživanja ukazuju na visoku sezonsku varijabilnost oštećenja DNA mjenog komet-testom kod nativnih populacija (Frenzilli i sur. 2001, Klobučar i sur. 2008, Shaw i sur. 2002, 2004, Štambuk i sur. 2013., Pisannelli i sur. 2009).

Vrste roda *Mytilus* su uspješno korištene u biomonitoringu genotoksičnog učinka okolišnog onečišćenja komet-testom u mnogim istraživanjima (Frenzilli i sur. 2001, Nigro i sur. 2006, Thomas i sur. 2010).

1.5. Mediteranska dagnja - *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

vrsta: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

porodica: Mytilidae

red: Mytilioida

koljeno: Mollusca



Slika 4. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (izvor: <http://www.swims.hku.hk/>)

U Europi su rasprostranjene tri vrste dagnji: plava dagnja *M. edulis*, mediteranska dagnja *M. galloprovincialis* i *M. trossulus*, koja jedina nije akvakulturna vrsta. U Mediteranu je rasprostranjena *M. galloprovincialis*, kao i u Crnom moru i uz južni dio zapadne obale Europe (Slika 5.). *M. trossulus* je rasprostranjena na području Baltičkog mora i Škotske, a uz Atlantsku obalu Europe od Francuske do Norveške rasprostranjena je *M. edulis* (Kijeovski i sur. 2010).



Slika 5. Rasprostranjenost vrste *Mytilus galloprovincialis* na području Mediterana (izvor: www.fao.org)

Trokutasta je oblika, čvrste građe, te asimetričnih jednakih ljuštura. Ljušture su crno-plave ili crno-smeđe boje, a periostracum je obično crn. Kljunovi su smješteni na prednjem kraju ljuštura. Na vanjskoj strani ljuštura ima jasno vidljive linije rasta.

Dagnje pokazuju razdvojenost spolova (gonohorizam) s manjim udjelom hermafrodita. Kod oba spola spolna žlijezda, je smještena u plaštu, a spol se može makroskopski odrediti na osnovi boje gonada - muške gonade su mliječno bijele ili krem boje, dok su ženske narančasto crvenkaste boje.

Ovisno o temperaturi i količini hrane dagnje se mogu pariti jednom ili više puta godišnje. Dva dana nakon oplodnje embriji se razvijaju u planktonsku ličinku veliger. U razvojnem ciklusu dagnje pelagička ličinka može biti nošena strujama i više tjedana. Ličinke se nakon 4 do 8 tjedna, kada dosegnu dužinu 250-300 μm pričvrste za podlogu (Bayne 1965, Beaumont i sur. 2007). Ako im je veličina manja od 2 mm mogu se još jednom premještati. Rasprostranjenje mlade dagnje nakon prvog pričvršćenja za podlogu osniva se na sekreciji posebne dugačke bisusne niti (bisusno jedro) i naziva se stoga bisusni drift (De Blok i Maas 1977).

Haploidni genom školjkaša sadrži između 0,65 i 5,4 gb (Gregory 2005), a *M. galloprovincialis* ima oko 1,85 gb (Saavedra i Bachère 2006), diploidni broj kromosoma je $2n=28$ (Martínez-Lage i sur. 2004). Zanimljivost dagnje je i što posjeduje dva odvojena mitohondrijska genoma, po majčinoj i očevoj liniji (Skibinski i sur. 2002).

Mediterranska dagnja nastanjuje zonu plime i oseke, a ograničena dubinska rasprostranjenost nije uvjetovana uvjetima u dubljim slojevima infralitorala, već biološkim čimbenicima predacije i kompeticije (Gosling 1992). *M. galloprovincialis* širi se prema sjeveru i zauzima teritorije na kojima se ranije nalazila samo vrsta *M. edulis* što se pripisuje globalnom zatopljenju (Beaumont i sur. 2007), te se stoga se smatra invazivnom vrstom (Kijewski i sur. 2009),

Mediterranska dagnja jedna je od najvažnijih akvakulturnih vrsta u Europi, s godišnjom proizvodnjom oko 800 000 t u Evropi (Gabín 2009). Akvakultura se zasniva na sakupljanju mladih jedinki iz prirodnih populacija te uzgoj nema nikakvog utjecaja na razmnožavanje. Takve mlade jedinke nasađuju se u mrežaste tube ili najlonske mreže gdje rastu do konzumne veličine. U Hrvatskoj, najveća uzgajališta na području su Limskog kanala, Pelješkog područja (Mali Ston, Ston) te duž obale u blizini estuarija krških rijeka. Minimalna dozvoljena dužina za sakupljanje ove vrste iznosi 6 cm (NN 96/2005), a tu dužinu školjkaš obično dosegne pri starosti od 1,5 do 2 godine.

Zbog svojih karakteristika školjkaši su vrlo često korišteni organizmi za praćenje utjecaja onečišćenja na organizme u vodenom okolišu. Oni su filtratori, pa akumuliraju značajne količine toksikanata iz okolne vode (Cajaraville i sur. 2000), a često su vrlo brojni i na onečišćenim postajama zbog njihove visoke tolerancije na zagađenje. Kako su u odraslom stadiju sesilni ili hemisesilni, te na taj način ne mogu izbjeći utjecaj onečišćenja migracijama, savršeni su modelni organizmi. Plava i Mediteranska dagnja vjerojatno su najčešće korišteni organizmi za biomonitoring morskih ekosustava na području Europe. U Jadranu dagnja je najistraživaniji organizam u području ekotoksikologije i korištena je u mnogobrojnim biomonitoring istraživanjima (Kanduč i sur. 2011, Klobučar i sur. 2008, Perić i sur. 2012, Štambuk i sur., 2013), uključujući i desetogodišnje istraživanje utjecaja onečišćenja na morski ekosustav na hrvatskoj strani Jadrana - "Projekt Jadran".

1.6. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je dobiti uvid u sezonske razlike razine oštećenja DNA (jesen/proljeće) u promatranim populacijama dagnji *Mytilus galloprovincialis* kao posljedice djelovanja onečišćenja. Također, usporedbom oštećenja u nativnim i kavezno izlaganim jedinkama procijenit će se prilagodba dagnji na promijenjene okolišne uvjete, te dobiti uvid u uzročno-posljedičnu vezu između izlaganja toksikantima i pojave oštećenja DNA.

2. Materijali i metode

2.1. Opis istraživanja

Tijekom jeseni 2013. godine i proljeća 2014. godine, na području istočne obale Jadranskog mora provedeno je istraživanje genotoksičnog djelovanja onečišćenja na kavezno izlagane i nativne populacije dagnji *M. galloprovincialis*. Oštećenje DNA mjereno je u hemocitima dagnji komet-testom.

Nativne dagnje sakupljane su na 15 postaja duž hrvatskog dijela jadranske obale: od sjevernog Jadrana (Pula - luka, Ičići, Limski kanal, Rijeka - luka, brodogradilište u Sjevernom Jadranu), srednje Dalmacije (Split - luka, Marina, Trogir - marina, Adriavinil, Zadar Borik, Zadar - marina) do južne Dalmacije (Gruž - luka, Mali Ston, Ston, NP Mljet); od čega se četiri postaje smatraju kontrolnima (NP Mljet, Mali Ston, Ston (samo u proljeće), Limski kanal, Marina) zbog niskog antropogenog utjecaja, a ostalih jedanaest su postaje različitog stupnja onečišćenja. Dagnje su sakupljane s obale, pomoću metalnog grabila, s dubine 0.5-0.8m.

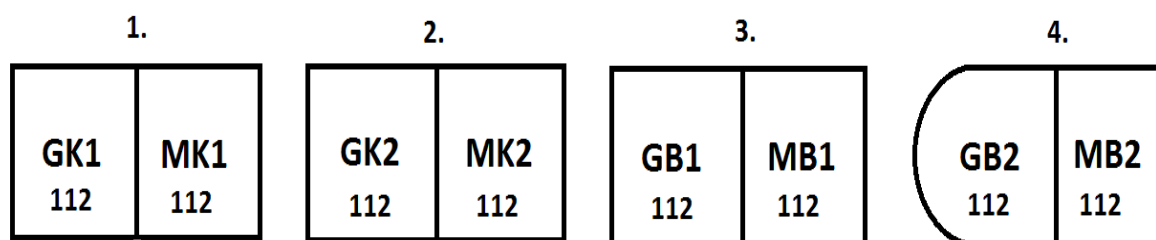
Nativna populacija dagnji sa postaje Marina bila je kavezno izložena tijekom mjesec dana (u razdoblju travanj-svibanj 2014.) na postajama: Gruž - luka, Ston - uzgajalište, Pula - brodogradilište, Limski kanal - uzgajalište, Zadar - marina, Seline - uzgajalište. Te dagnje bile su izlagane u kavezima koji su bili građeni od drvenih letvi (okvir) te polietilenske mreže sa gornje i donje strane koja je bila učvršćena pomoću ribarskog flaksa. U svakom kavezu je izlagano 100-njak jedinki na dubini od 1,5 m. Izlaganje je trajalo nešto manje od 30 dana, što se pokazalo kao optimalni period u drugim istraživanjima (Regoli i sur. 2004).

Za komet-test analizirano je 10 jedinki po postaji.



Slika 6. Dagnje pripremljene za kavezno izlaganje

Mezokozmos ekperiment provodio se u Akvariju u Puli gdje su se dagnje izlagale bakru u kontroliranim uvjetima tijekom travnja i svibnja 2014. godine. Dagnje s postaje Gruž (625 jedinki) i postaje Marina (620 jedinki) prebačene su u akvarije na aklimatizaciju 6 tjedana pod kontroliranim uvjetima gdje je režim svjetla i tame bio 12h/12h, na temperaturi od 17⁰C, u aeriranim akvarijima.



Slika 7. Nacrt akvarija korištenih za mezokozmos eksperiment (GK1, GK2 - Gruž kontrola, MK1, MK2 – Marina kontrola, GB1, GB2 – Gruž bakar, MB1, MB2 – Marina bakar)

Izlaganje bakru ukupno je trajalo 8 dana. Prvi dan dagnje su postrugane i stavljene u akvarije. Akvarijima s kontrolama svakog dana mijenjano je $\frac{1}{2}$ volumena vode novom, svježom morskom vodom. U akvarij broj 3. i 4. (Slika 7.) drugi dan dodan je bakar ($c=100\mu\text{g/L}$) te 1.5 ml hrane (suspenzija algi). Svaki sljedeći dan $\frac{1}{2}$ volumena promijenjena je novom svježom vodom te je dodavano 7,5 ml bakra i 1,5 ml hrane.



Slika 8. Karta istraživanih postaja (plavo – referentne postaje, crveno – onečišćene postaje)

Tablica 1. Geografske koordinate istraživanih postaja

postaja	geografska dužina (E)	geografska širina (N)
Lim	13,67	45,13
Pula	13,84	44,87
Ičići	14,28	45,31
Rijeka	14,44	45,33
Brodogradilište SJ	14,48	45,32
Zadar Marina	15,23	44,12
Seline	15,52	44,27
Marina	16,16	43,52
Trogir Marina	16,25	43,51
Adriavinil	16,44	43,54
Split	16,44	43,50
Mljet	17,36	42,78
Mali Ston	17,70	42,85
Ston	17,73	42,84
Gruž	18,09	42,66

2.2. Opis postaja

Limski kanal

Limski zaljev ima status posebnog rezervata u moru od 1979. godine. U Limskom kanalu, uzgoj dagnje počeo je 1888., a danas se u kanalu uzgajaju i lubin, komarča te se polako ulazi i u uzgoj kamenica.

U studiji „Određivanje prijelaznih i priobalnih voda za školjkaše“ (2008) kemijske analize organohalogenih tvari u tkivu dagnji pokazale su vrlo niske vrijednosti, niže od većine ostalih ispitivanih postaja. Vrlo su niske bile i koncentracije metala mjerene u dagnjama tijekom četiri godine. Jedino je na vanjskom dijelu zaljeva nađena povećana koncentracija koliformnih bakterija. U projektu Jadran zabilježeni su toksični učinci u dagnjama iz unutrašnjosti, no zbog nemjerljivog onečišćenja ova postaja odabrana je za referentnu postaju u sjevernom dijelu Jadranskog mora. Postaja Limski kanal korištena je kao referentna i u nekim drugim istraživanjima utjecaja onečišćenja na dagnje (Petrović i sur. 2004, Štambuk i sur. 2013).



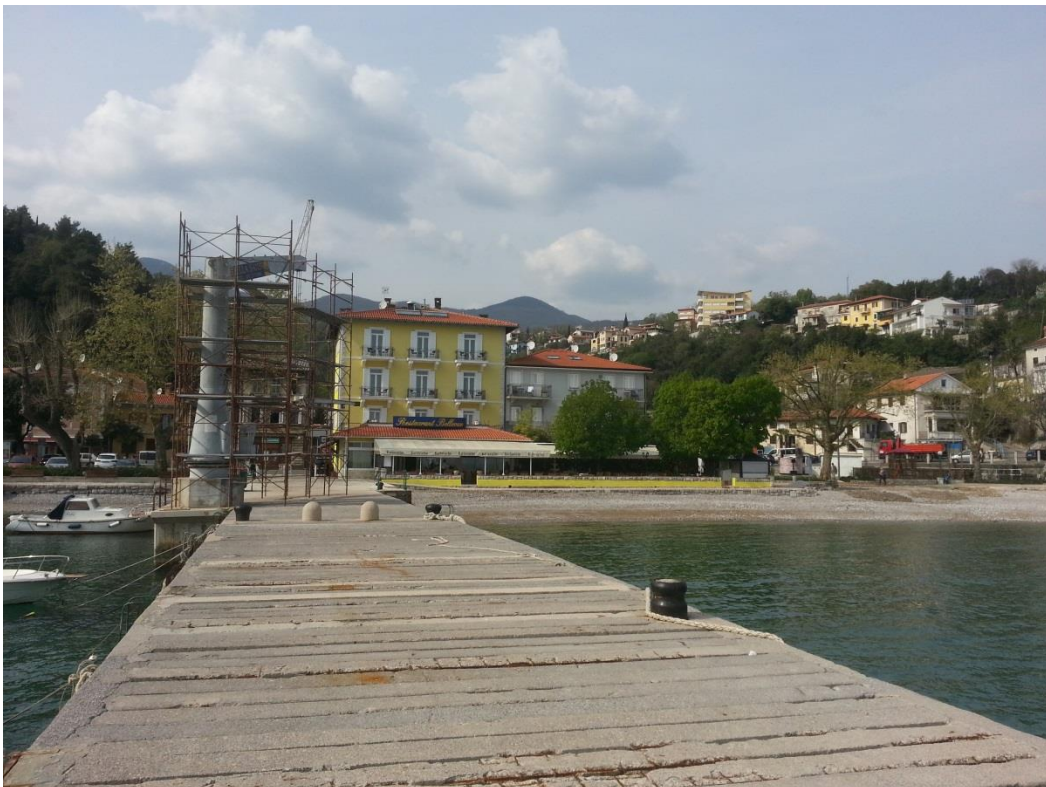
Slika 9. Uzgajalište dagnji na postaji Limski kanal

Pula

Grad Pula najveći je grad u Istarskoj županiji u kojem živi oko 100 000 stanovnika. Na području Pule u more se izljevaju ispusti postrojenja Uljanik Pula, Uljanik Strojogradnja i Luka Pula. Iako se komunalne otpadne vode pročišćavaju u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) Peroj i Valkane, njima se vrši samo pročišćavanje prethodnog stupnja. Lučki promet također uvelike pridonosi zagađenju.

Ičići

Ičići su malo mjesto na opatijskoj rivijeri sa samo 800 stanovnika. Mjesto ima marinu za velike jahte te malu luku za lokalne brodice. Vrlo blizu Ičića nalazi se ACI Marina. Onečišćenje pretežito postoji zbog velikog broja brodica i jahti, ali je također poznato da onečišćenje potječe iz podzemnoga džepa, odnosno vrulja koje se putem izvorišta Vrutki ponad Opatije slijevaju u more. Ičići su, iako kao manje naseljeno mjesto, postaja s niskim ali postojećim intenzitetom antropoloških aktivnosti i aktivnosti morskog prometa. Uređaj za pročišćavanje otpadnih voda (u daljnjem tekstu UPOV) izgrađen je u sklopu Projekta zaštite od onečišćenja voda u priobalnom području (Projekt Jadran). Postrojenje osigurava I. stupanj pročišćavanja.



Slika 10. Postaja Ičići

Brodogradilište Sjeverni Jadran

Brodogradilište SJ osnovano je 1896. godine i bilo je jedno od prvih u svijetu koji su se bavili nadogradnjom i produljivanjem brodova. Također je jedno od najvećih hrvatskih brodogradilišta sa već poznatim negativnih utjecajem na morski okoliš, te se stoga smatra za onečišćenu postaju.

Rijeka

Na području grada Rijeke (~145 000 stanovnika) u more se izljevaju ispusti industrijskih postrojenja INA Rafinerija Mlaka te Proizvodnja maziva i bitumena, a njihove se otpadne vode pročišćavaju na Dekantatoru i UPOV Krofta. Komunalne vode prolaze samo prethodni stupanj pročišćavanja na UPOV Delta. Rijeka je najveća hrvatska luka s godišnjim prometom robe od više od 6 milijuna tona. U Hrvatskoj su iznenadna onečišćenja mora najčešća na području Rijeke, a u luci Rijeka najviše je i prometa opasnim teretima (AZO 2007).

Seline

Seline su naselje sjeverne Dalmacije smješteno na obali Velebitskog kanala, 3 km južno od Starigrada. Ne postoji nikakav značajan izvor antropogenog onečišćenja na ovoj postaji, a osim toga na toj se postaji uzgajaju dagnje za ljudsku prehranu, te se ona smatra referentnu postaju.



Slika 11. Postaja Seline – uzgajalište dagnji

Zadar – marina

Postaja Zadar – marina nalazi se u gradu Zadru (~75 000 stanovnika). Zadar je jedna od najvećih trajektnih luka u srednjem Jadranu. U Zadru se nalazi i prijevozna kompanija Tankerska plovidba d.d. sa 15-ak tankera i brodova za prijevoz suhog tereta. Marina, sa 300-tinjak vezova, predstavlja postaju sa određenom razinom onečišćenja. Boje koje se koriste za antivegetativne premaze sadrže bakrene komponente te ostale organske bioaktivne tvari. Otpadne vode pročišćavaju se kroz dva Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda – Borik (prethodno pročišćavanje i I. stupanj pročišćavanja) i Centar (prethodno pročišćavanje i II. stupanj pročišćavanja). Dagnje su na ovoj postaji bile izložene direktno ispod pralištra u centru marine.



Slika 12. Postaja Zadar-marina; mjesto postavljanja kaveza

Marina

Marina je uzgajalište dagnji na zapadnoj strani Trogirskog zaljeva bez mjerljivog utjecaja antropogenog onečišćenja te kao takva predstavlja referentnu postaju.



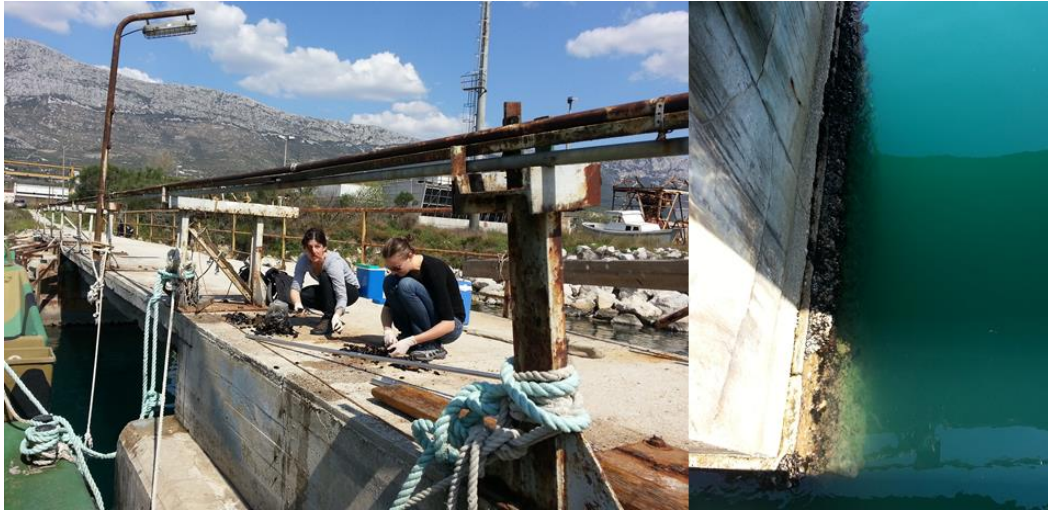
Slika 13. Postaja Marina

Trogir

Postaja Trogir nalazi se u nautičkoj luci u gradu Trogiru. Obzirom da se u marini nalazi više od 200 vezova, smatra se za onečišćenom postajom. Dodatno onečišćenje povezano je sa neposrednom blizinom brodogradilišta Trogir.

Adriavinil

Postaja Adriavinil nalazi se u Kaštelanskom zaljevu, u blizini tvornice polivinil-kloridnih masa Adriachem, čiji se ispust otpadnih voda nalazi u blizini. U razdoblju 1949.-1990. na tom području radilo je još jedno postrojenje, Adriavinil (ranije Jugovinil), u kojem se izvodila klor alkalna elektroliza i procjenjuje se da je tijekom desetljeća u Kaštelanski zaljev iz tog postrojenja dospjelo oko 200 t žive (Zvonarić 1991).



Slika 14. Postaja Adriavinil

Split

Split je sa svojih 250 000 stanovnika drugi po veličini grad u Hrvatskoj, a luka Split je treća luka na Mediteranu po putničkom prometu, s godišnjim prometom od otprilike 3 000 000 ljudi i 600 000 vozila (Kasum i sur. 2008). Do 1999. g. na tom se području nalazio i ispust komunalnih voda grada Splita. Na području Splita još uvijek se nalazi nekoliko ispusta komunalnih voda, od kojih ispust Katalinića Brig ima mehanički uređaj za pročišćavanje, a sam ispust je na 1300 m od obale, dok manji ispusti u luci i ispust Lora nemaju uređaja za pročišćavanje.

NP Mljet

Postaja Mljet smještena je na području Nacionalnog Parka Mljet, kod Babinih Kuća u uvali Saplunara. S obzirom na nepostojanje bilo kakvih izvora onečišćenja ova se postaja smatra za referentnu. Ovo je ujedno jedina referentna postaja na kojoj nema uzgajališta dagnji.

Ston

Postaja Ston nalazi se u Malostonskom zaljevu, u najvećem uzgajalištu dagnji u Jadranu. Kao i kod prethodne postaje Limskii kanal, u studiji „Određivanje prijelaznih i priobalnih voda za školjkaše“ (2008) kemijske analize organohalogenih tvari i metala u tkivu dagnji pokazale su vrlo niske vrijednosti. Ova postaja se također smatra za referentnu postaju.

Mali Ston

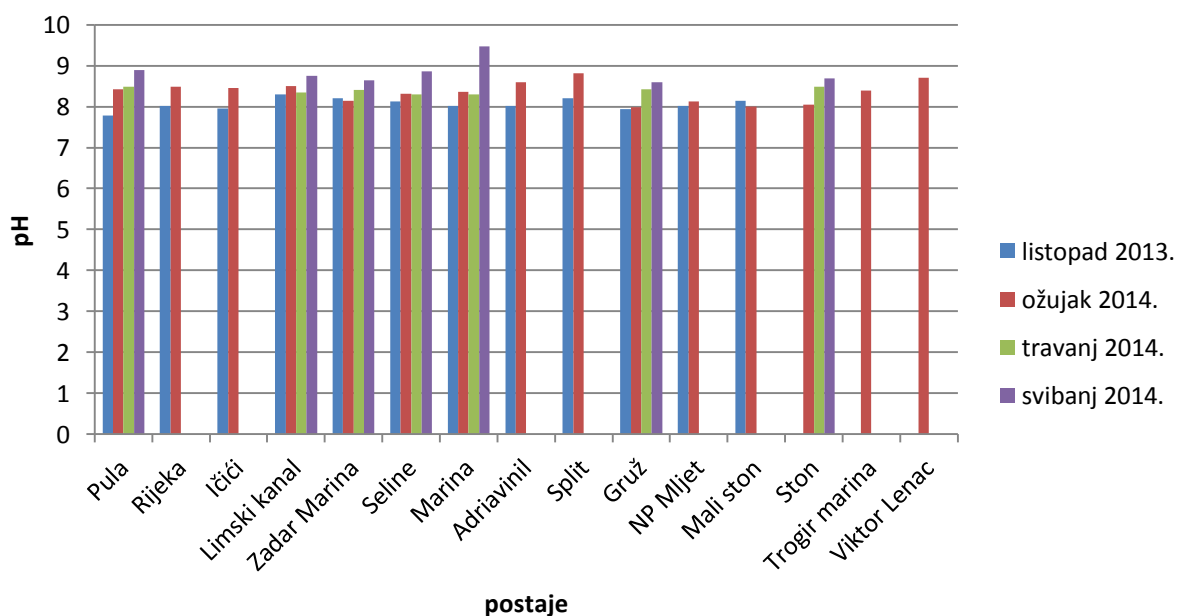
Postaja Mali Ston također se nalazi u Malostonskom zaljevu, čije je uzgajalište osim dagnji poznato i po uzgoju kamenica. Mali Ston ima par desetaka vezova za lokalne brodove te postoji antropogeni utjecaj, iako je vrlo nizak. Kako na ovoj postaji ipak nema znakova postojanja većeg onečišćenja, smatra se još jednom referentnom postajom.

Gruž

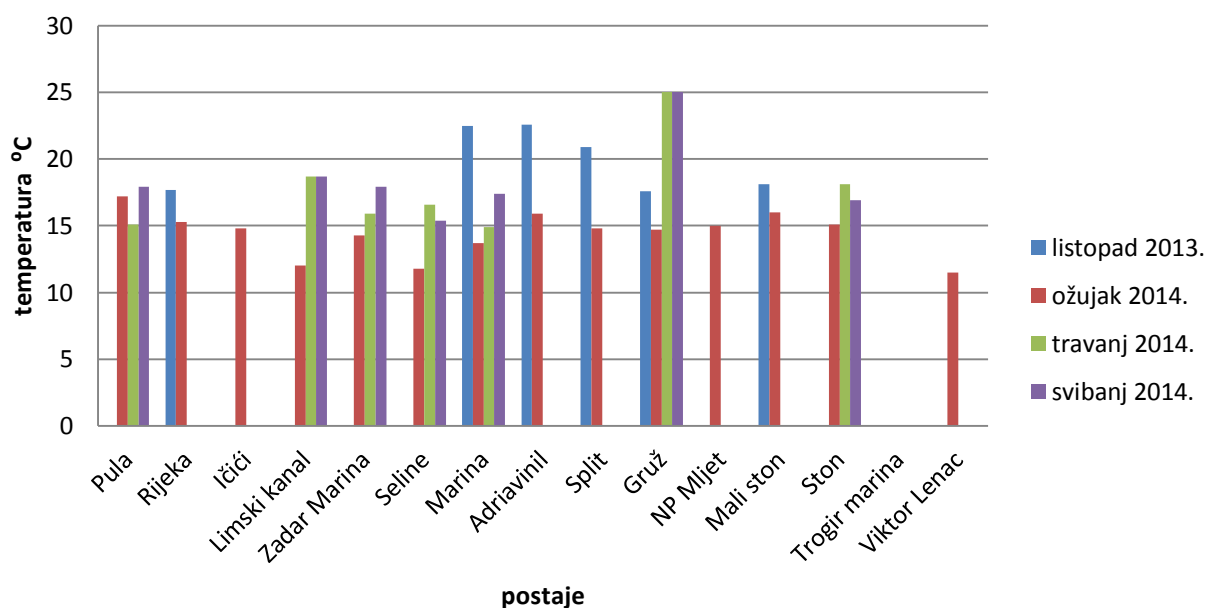
Postaja Gruž nalazi se u Dubrovniku (~50 000 stanovnika), u luci Gruž čiji je promet godišnje oko 850 000 ljudi. Na području grada Dubrovnika izljevaju se komunalne otpadne vode, koje prolaze samo kroz proces mehaničkog pročišćavanja.

2.3. Hidrografski čimbenici

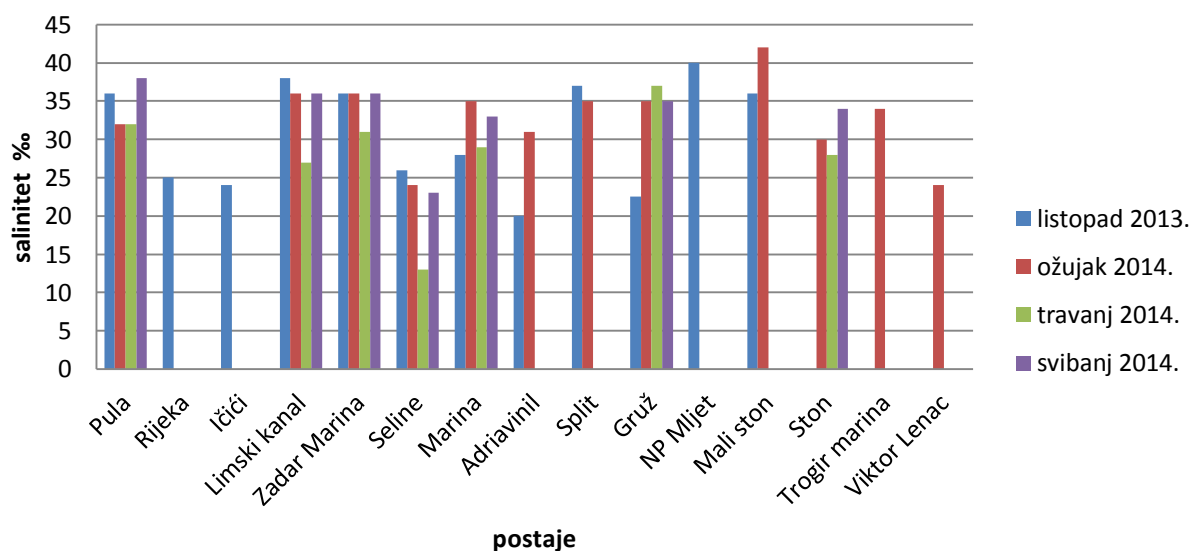
Tijekom uzorkovanja izmjerene su vrijednosti pH, temperature mora te saliniteta na svakoj istraživanoj postaji (Slika 15-17). U pojedinim razdobljima uzorkovanja, nisu uzimani podaci za sve parametre, te kao takvi u grafovima nisu prikazani.



Slika 15. pH mora na istraživanim postajama kroz 4 razdoblja uzorkovanja (jesen-listopad 2013., proljeće-ožujak 2014., postavljanje kaveza-travanj 2014., skupljanje kaveza-svibanj 2014.).



Slika 16. Temperatura mora na istraživanim postajama kroz 4 razdoblja uzorkovanja (jesen-listopad 2013., proljeće-ožujak 2014., postavljanje kaveza-travanj 2104., skupljanje kaveza-svibanj 2014.).



Slika 17. Salinitet mora na istraživanim postajama kroz 4 razdoblja uzorkovanja (jesen-listopad 2013., proljeće-ožujak 2014., postavljanje kaveza-travanj 2104., skupljanje kaveza-svibanj 2014.).

2.4. Kemijska analiza

Za analize metala, homogenizirani uzorci tkiva (0,1 g) stavljeni su u kivetu zajedno sa 10 mL "aqua regia" (omjer 1:3 nitratna kiselina:HCl) u mikrovalnu pećnicu (Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria). Nakon digestije, uzorci su razrijeđeni Milli-Q vodom do

optimalne koncentracije za mjerenje ICPMS (masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom). Prije mjerenja indij ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) dodan je u konačne otopine kao interni standard. Multielementalna analiza pripremljenih uzoraka rađena je pomoću masene spektrometrije visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (HR ICPMS) koristeći instrument Element2 (Thermo, Bremen, Njemačka). Mjerenja određenih izotopa rađena su na tri različite rezolucije: niska rezolucija (${}^7\text{Li}$, ${}^{107}\text{Ag}$, ${}^{111}\text{Cd}$, ${}^{120}\text{Sn}$, ${}^{208}\text{Pb}$, ${}^{209}\text{Bi}$), srednja rezolucija (${}^{51}\text{V}$, ${}^{52}\text{Cr}$, ${}^{59}\text{Co}$, ${}^{60}\text{Ni}$, ${}^{63}\text{Cu}$, ${}^{66}\text{Zn}$, ${}^{121}\text{Sb}$) te visoka rezolucija (${}^{27}\text{Al}$, ${}^{39}\text{K}$, ${}^{56}\text{Fe}$).

Kemijske analize metala napravljene su u suradnji sa dr.sc. Nevenkom Mikac (Laboratorij za anorgansku geokemiju okoliša, Institut Ruđer Bošković, Zagreb).

2.5. Biološka analiza

Uzimanje uzoraka hemolimfe

Dagnje su odmah po sakupljanju držane na ledu, te prenesene u najbliže raspoložive laboratorije u regiji istraživanja. Uzorci su obrađivani u privremenom laboratoriju na Mljetu (stara vojarna, jesen) i Žuljanama na Pelješcu (proljeće), u Istraživačkoj stanici Martinska te u Centru za istraživanje mora u Rovinju.

Hemolimfa školjkaša vađena je injekcijom (igla za subkutane injekcije) iz stražnjeg mišića zatvarača, u količini od oko $200 \mu\text{L}$. Odmah nakon vađenja hemolimfa je prebačena u mikroeprovete na led. Nakon desetak minuta započela je obrada uzoraka za komet-test. Za komet-test analizirani su hemociti 10 jedinki po postaji.

2.6. Mjerenje oštećenja DNA

Komet-test

Komet-test je primijenjen na jezgrama hemocita vrste *M. galloprovincialis* po metodi Singh i sur. (1988), s manjim izmjenama. Na djelomično brušeno predmetno stakalce nanesen je prvi sloj agaroze uranjanjem u otopinu 1% agaroze normalnog tališta (NMP, Sigma) u fosfatnom puferu (PBS) ($1,45 \text{ M NaCl}$, $60 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $40 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$; pH 7,0). Nakon skrtnjavanja gela pri sobnoj temperaturi na stakalca je zatim nanešeno $100 \mu\text{L}$ mješavine 0,8% agaroze niskoga tališta (LMP, Sigma) i hemolimfe u omjeru 1:1. Sloj je pokriven pokrovnicom, a stakalca su ostavljena 2,5 min. u hladnjaku pri -1°C , da se agarosa skruti. Nakon uklanjanja pokrovnice, nanesen je treći sloj od $80 \mu\text{L}$ 0,5% agaroze (LMP), koji je također prekriven pokrovnicom i ostavljen 2,5 min. u hladnjaku na -1°C . Nakon uklanjanja pokrovnice preparati su uronjeni u pufer za lizu stanica ($2,5 \text{ M NaCl}$, 100 mM EDTA , 10 mM

TRIS-HCl, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) u kojem su stajali 1 sat pri 4⁰C, u mraku. Nakon lize preparati su isprani destiliranom vodom, te stavljeni u kadicu za elektroforezu i preliveni svježe priređenim, hladnim puferom za elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13). U puferu za elektroforezu provedena je alkalna denaturacija DNA kroz 15 minuta pri 4⁰C. Elektroforeza je provedena u istom puferu i u istim uvjetima, pri jakosti struje od 300 mA, te naponu od 35 V (1,16 V/cm) kroz 15 min. Po završetku elektroforeze preparati su neutralizirani ispiranjem u neutralizacijskom TRIS-HCl puferu (pH 7,5), u kojem su i ostavljeni 5 minuta. Preparati su zatim fiksirani 15 minuta u mješavini metanola i ledene octene kiseline (3:1) i osušeni na sobnoj temperaturi. Tako fiksirani preparati pohranjeni su u mraku na sobnoj temperaturi i više mjeseci.

2.7. Mikroskopska analiza

Neposredno prije mikroskopske analize preparati su rehidrirani redestiliranom vodom 10 minuta, te bojani nakapavanjem 10 µg/mL otopine fluorescencijske boje etidij bromida (EtBr, Sigma). Suvišak EtBr ispran je redestiliranom vodom i preparati su prekriveni pokrovnicom. Tako pripremljeni preparati pregledavani su uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa Zeiss Axioplan (filter 09: ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija kod valne duljine 610 nm). Jezgre su fotografirane kod povećanja objektiva 40x pomoću digitalne kamere. Mjerenja dužine repa i postotka DNA u repu kometa provedena su pomoću računalnog programa Komet 5 Kinetic Imaging Ltd.. Uzimane su vrijednosti manje od 50% oštećenja DNA s pretpostavkom da stanice s oštećenjem većim od 50% nisu bile žive tokom analize.

2.8. Statistička analiza

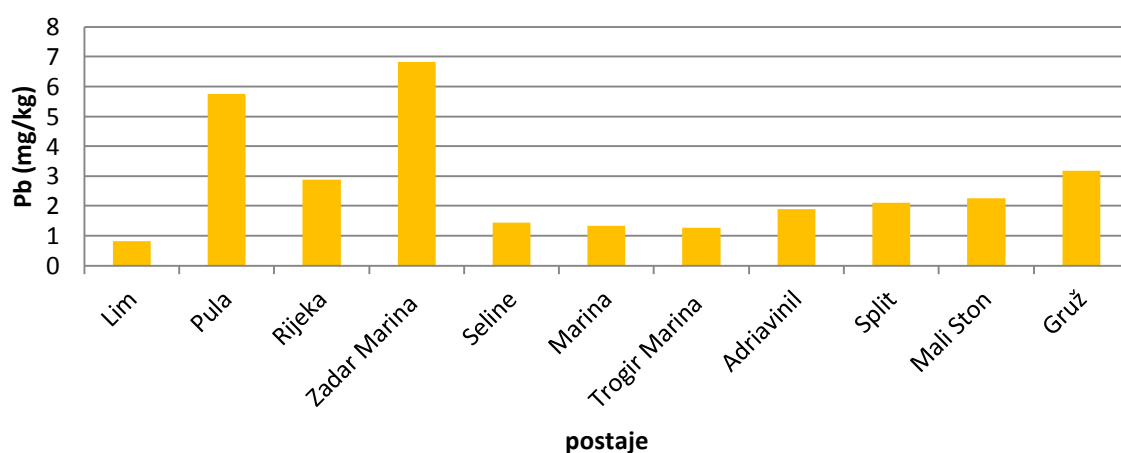
Izračunate su srednje vrijednosti oštećenja 50 i više DNA hemocita za svaku jedinku. Rezultati komet-testa prikazani su kao srednja vrijednost (\pm st. greška) svih jedinki po pojedinoj postaji, a podaci su obrađeni neparametrijskim Mann-Whitney U-testom. Statistička analiza rađena je u programu Statistica 12 (StatSoft, Inc.)

3. Rezultati

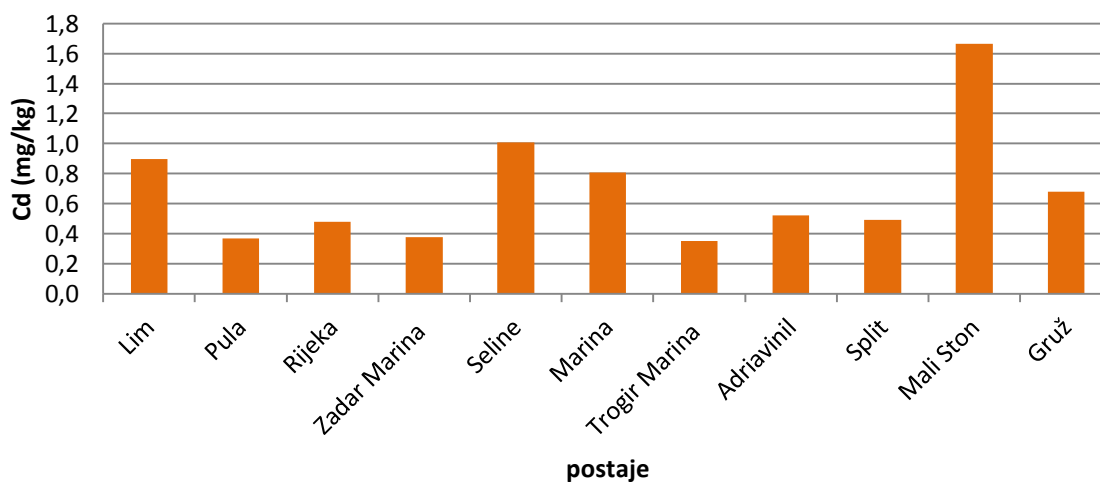
3.1. Kemijske analize

Na svim onečišćenim postajama izmjerene su koncentracije olova veće od najveće dopuštene količine (NDK) prema "Pravilniku o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjkaša" (N.N. 117/2004). Koncentracije Pb na kontrolnim postajama bile su niže od koncentracija na onečišćenim te, osim postaje Mali Ston, nisu prelazile granicu od 1.5 mg/kg (Slika 18).

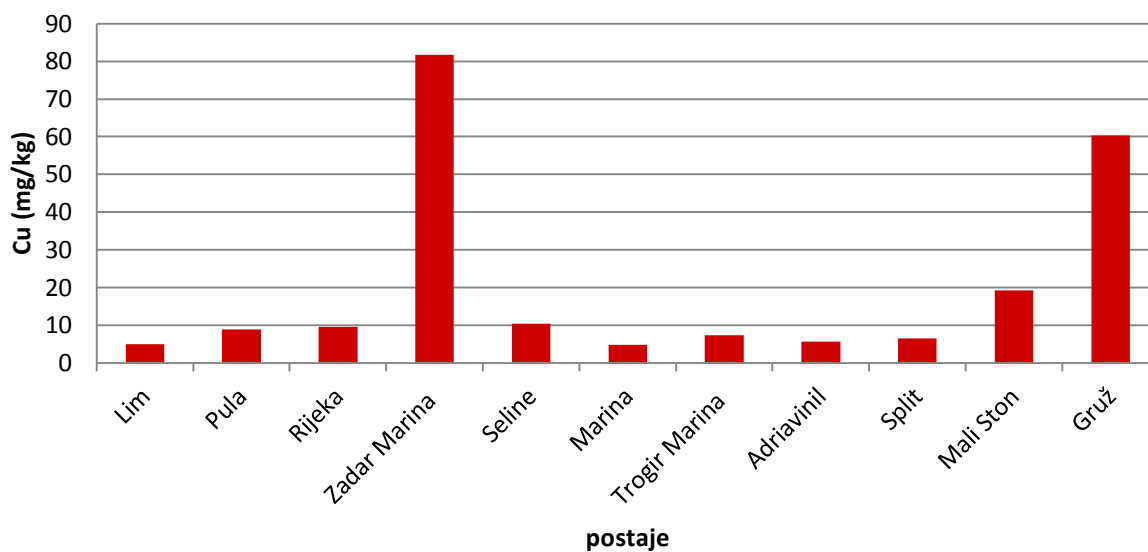
Koncentracija Cd zadržavala se ispod NDK na svim postajama osim postajama Seline te Mali Ston (1 mg/kg; N.N. 117/2004) (Slika 19.).



Slika 18. Koncentracija Pb određena masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama



Slika 19. Koncentracija Cd određena masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama



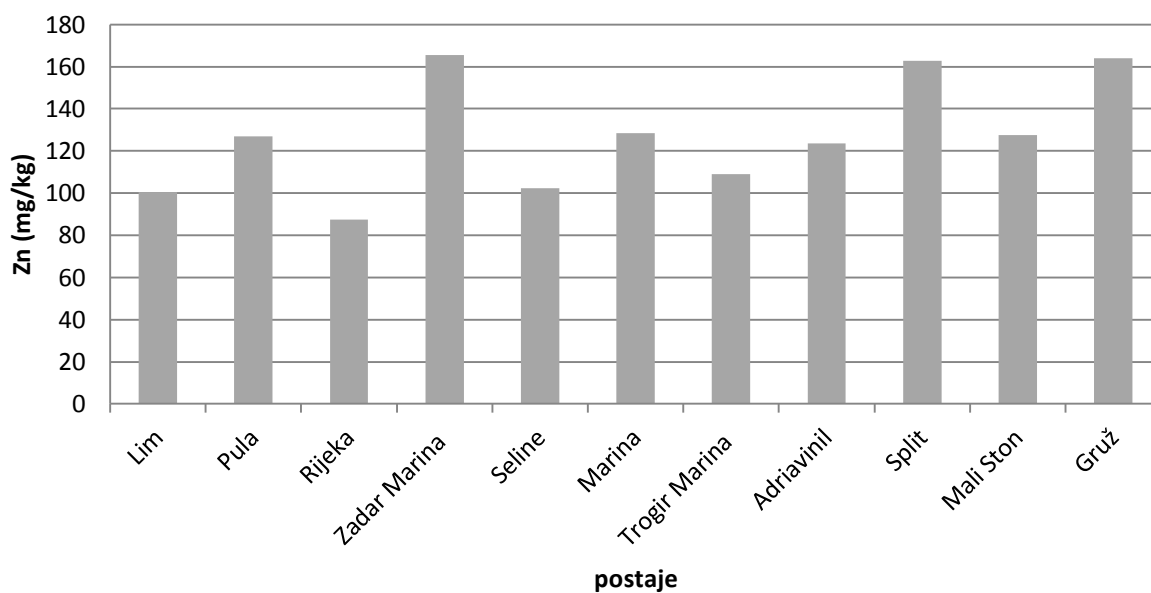
Slika 20. Koncentracija Cu određena masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama

Bakar je izmjeren u koncentracijama povećanim u odnosu na referentne postaje na Malom Stonu, Gružu te postaji Zadar Marina (Slika 20.). U RH nije regulirana NDK Cu u tkivima školjkaša. Ako pogledamo škotske standarde za procjenu kakvoće mora na uzgajalištima NDK za Cu je 3 mg/kg iznad čije se vrijednosti nalaze sve koncentracije izmjerene na svim postajama. U Španjolskoj NDK za Cu iznosi 20 mg/kg, te se iznad tih vrijednosti nalaze koncentracije za postaje Gruž te Zadar Marina 1 i 2.

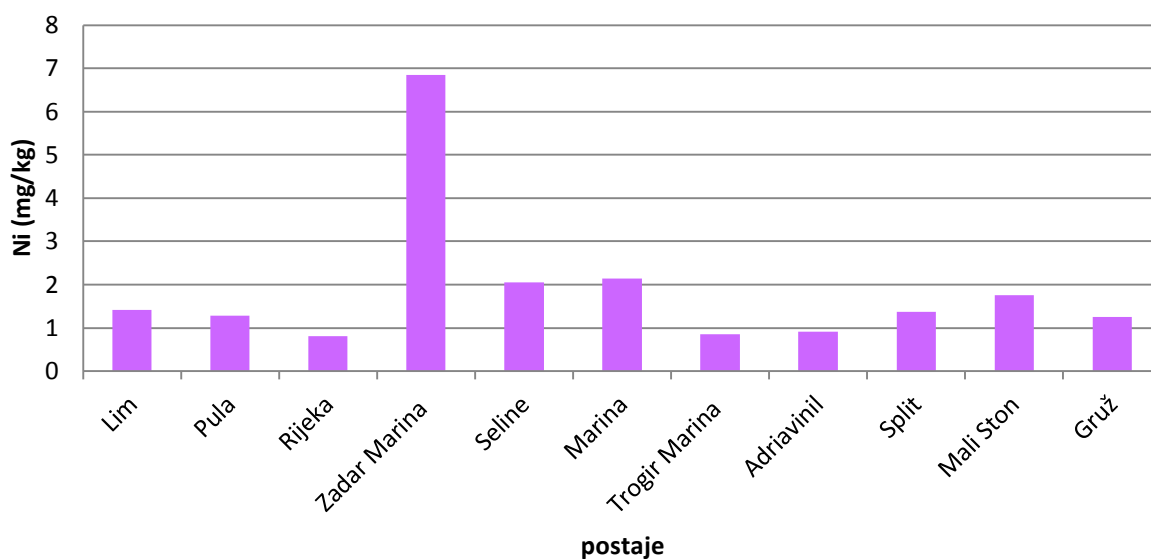
Koncentracije cinka su na svim postajama bile znatno niže od propisanog NDK u tkivama dagnji koji iznosi 1,1 g/kg (N.N. 177/2004). Blago više koncentracije od referentnih postaja zabilježene su na postajama Split, Gruž te Zadar Marina 1 i 2 (Slika 21.).

Na postaji Zadar Marina zabilježena je najveća koncentracija nikla koja prelazi NDK od 2,5 mg/kg za tri puta. Postaje Seline i Marina, iako ispod najveće dopuštene količine, imale su nešto povećane vrijednosti (iznad 2 mg/kg) u odnosu na ostale postaje (Slika 22.).

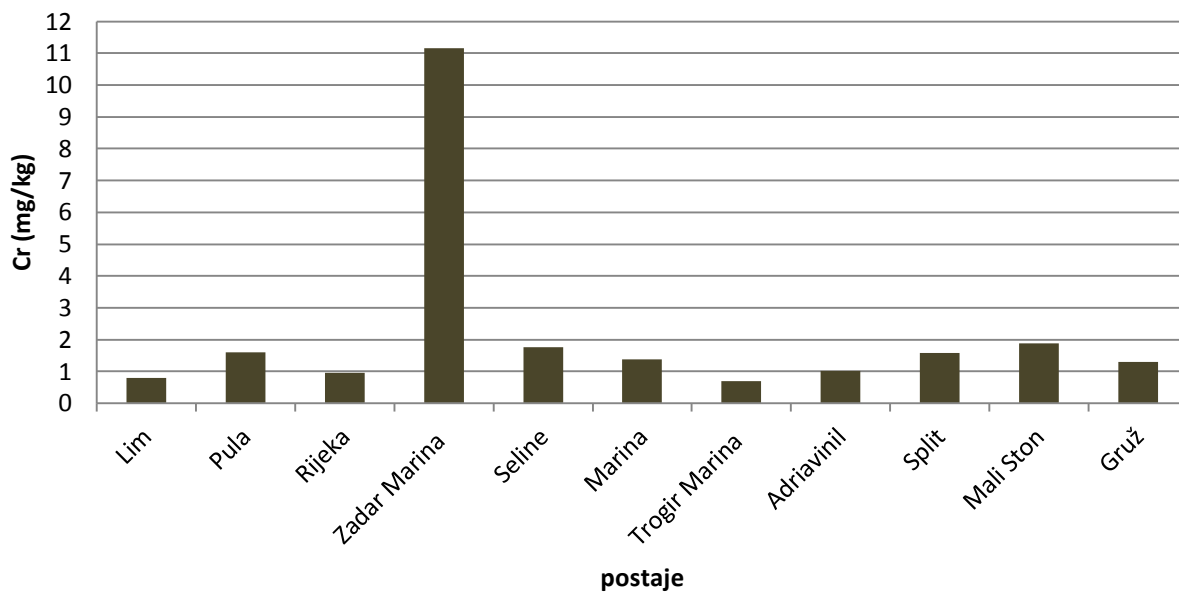
U dagnjama s postaje Zadar Marina izmjerena je i najveća koncentracija Cr (Slika 23.). Nešto veće vrijednosti od propisane NDK izmjerene su u dagnjama sa Selina, Marine, Splita, Pule, Malog Stona, Gruža te Zadar Marine 1 (1 mg/kg; N.N. 117/2004).



Slika 21. Koncentracija Zn određena masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama



Slika 22. Koncentracija Ni određena masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama



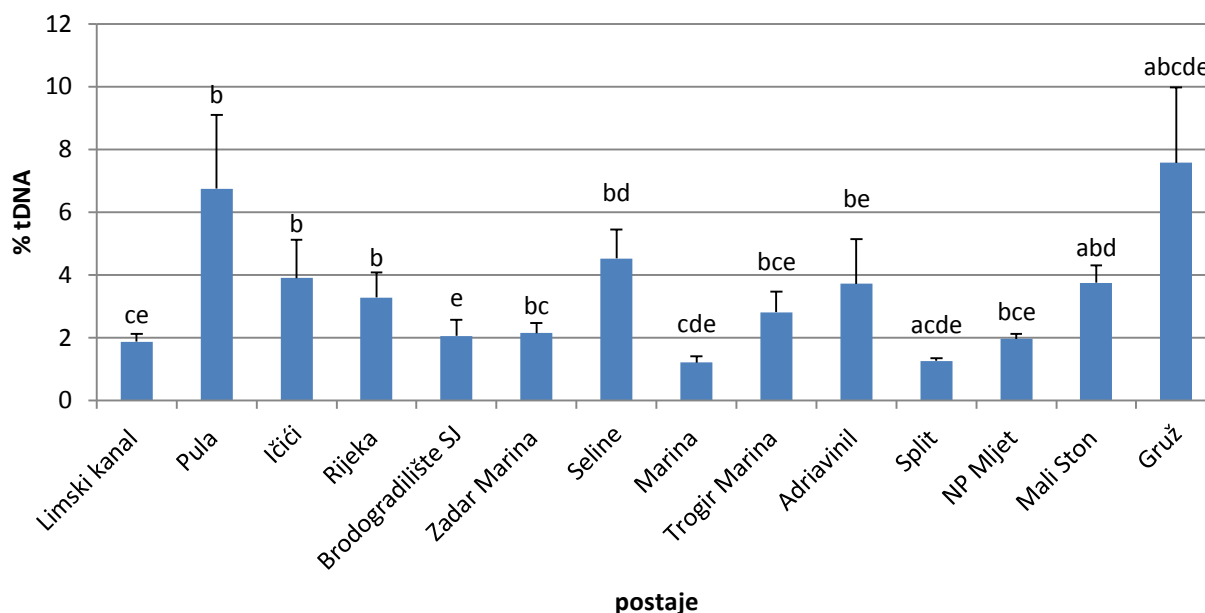
Slika 23. Koncentracija Cr određena masenom spektrometrijom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom u uzorcima tkiva dagnji *M. galloprovincialis* sakupljenih na istraživanim postajama

3.2. Biološke analize

Mjerenje oštećenja DNA 2013. i 2014.g.

Komet-test

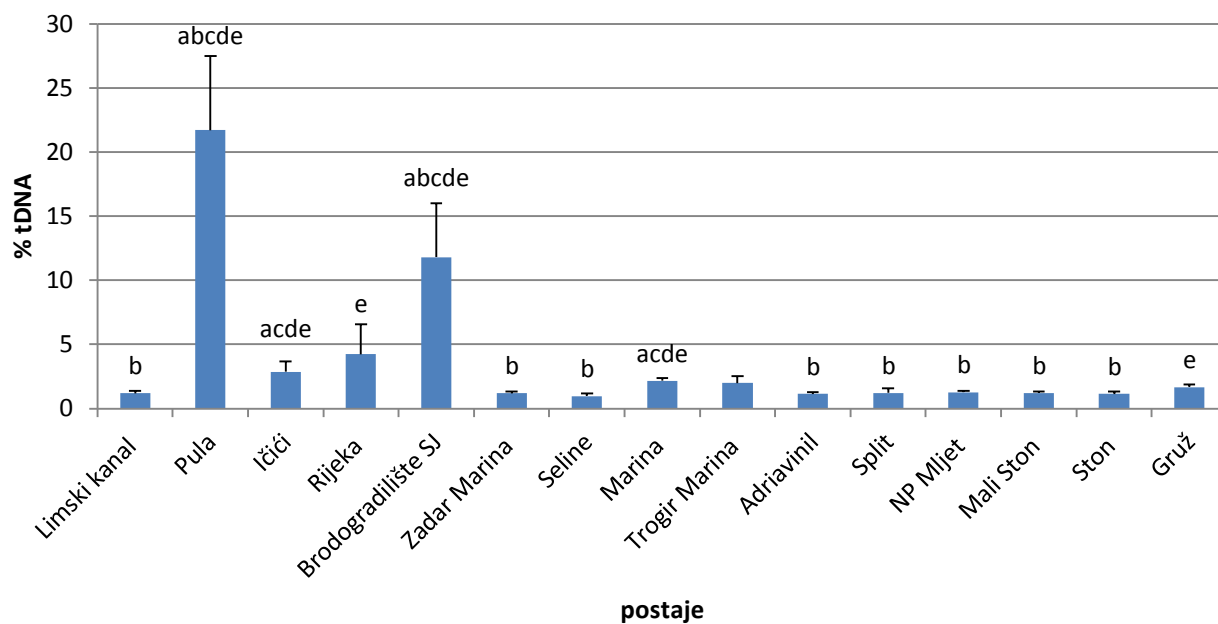
Genotoksični učinak onečišćenja istraživao je komet-testom tijekom jeseni 2013. te proljeća 2014. godine, u nativnim populacijama dagnji na 15 postaja duž istočne obale Jadranskog mora, te kaveznim izlaganjem u proljeće na 6 od tih postaja.



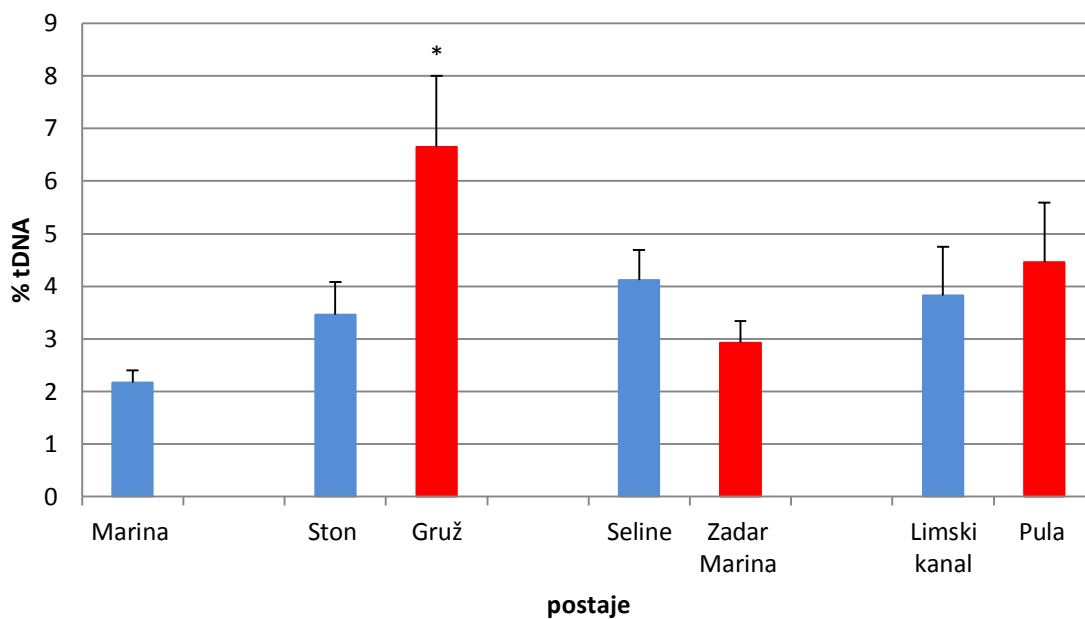
Slika 24. Oštećenje DNA (% tDNA, sr.vr. ± st. greška) mjereno komet-testom u hemocitima dagnji *M. galloprovincialis* na istraživanim postajama u jesen 2013. g. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne postaje Lim (a), Marina (b), Mali Ston (c), Mljet (d), Seline (e) ($p < 0,05$).

Oštećenje DNA u nativnim populacijama dagnji sa referentnih postaja u jesen kretalo se između 1,2% na postaji Marina do 4,5% DNA u repu na postaji Seline. Dagnje s onečišćenih postaja većinom su pokazale povećane vrijednosti oštećenja DNA od dagnji sa referentnih postaja. Najviše vrijednosti genotoksičnog učinka izmjerene su na postajama Gruž (7,57% tDNA) i Pula (6,75% tDNA) (Slika 24.).

Kod nativnih populacija u proljeće 2014. godine izmjerene su vrijednosti od 1,21% tDNA na postaji Zadar Marina do 21,7% tDNA na postaji Pula. Na postaji Pula oštećenje DNA bilo je povećano za čak 10 puta u odnosu na referentne postaje u jesen te oko 3 puta u odnosu na istu postaju u jesen. Povećana vrijednost od 11,7% tDNA izmjerena je na postaji Brodogradilište SJ te 4,2% tDNA na postaji Rijeka. Na svim ostalim postajama oštećenje DNA bilo je relativno nisko te nije prelazilo 3% tDNA, pokazujući sličnost sa rezultatima dobivenim u jesen 2013. godine (Slika 25.).

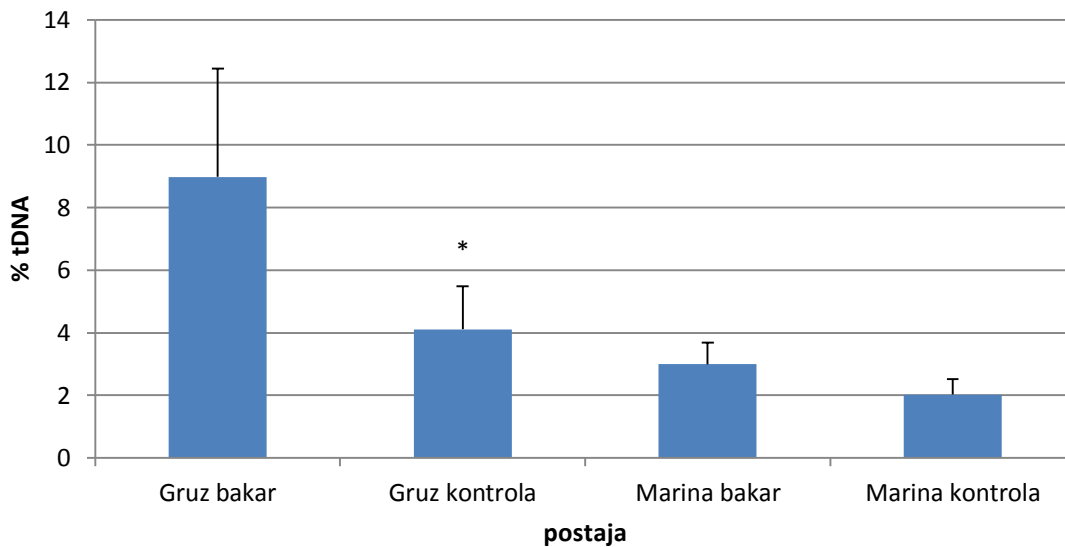


Slika 25. Oštećenje DNA (% tDNA, sr.vr. \pm st. greška) mjereno komet-testom u hemocitima dagnji *M. galloprovincialis* na istraživanim postajama u proljeće 2014. g. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne postaje Lim (a), Marina (b), Mali Ston (c), Mljet (d), Seline (e) ($p < 0,05$).



Slika 26. Oštećenje DNA (% tDNA, sr.vr. \pm st. greška) mjereno komet-testom u hemocitima kavezno izlaganih dagnji *M. galloprovincialis* na istraživanim postajama u proljeće 2014. g. * označuje statistički značajnu razliku u odnosu na postaju Marina ($p < 0,05$).

Kavezno izlagane jedinke pokazale su tek malo povećanje oštećenja DNA s obzirom na nativnu populaciju s postaje Marina (2,16% tDNA), no jedino je oštećenje na postaji Gruž statistički značajno ($p < 0,05$) te je iznosila 6,64% tDNA. Na postajama Ston, Seline, Pula te Limski kanal izmjerene vrijednosti kretale su se od 3,45-4,45% tDNA, dok je na postaji Zadar Marina vrijednost bila niža te iznosila 2,92% tDNA (Slika 26.).



Slika 27. Oštećenje DNA (% tDNA, sr.vr. ± st. greška) mjereno komet-testom u hemocitima dagnji *M. galloprovincialis* u mezokozmos eksperimentu. * označava statistički značajnu razliku u odnosu na postaju Marina kontrola ($p < 0,05$).

Jedinke u mezokozmos eksperimentu pokazale su najveće oštećenje DNA u akvariju Gruž bakar (8,97% tDNA), dok je najmanju vrijednost imala Marina kontrola (2,02% tDNA). Gruž kontrola imala je oštećenje DNA 4,10% tDNA, te je ujedno bila jedina koja je pokazala statistički značajnu razliku s obzirom na akvarij Marina kontrola, dok je Marina bakar imala 2,99% tDNA (Slika 27.)

4. Rasprava

4.1. Kemijske analize i onečišćenost postaja

Kada se razmatraju koncentracije teških metala dozvoljene za ljudsku konzumaciju, najvažniji aspekt je njihova toksičnost za ljudsku populaciju. Slično ostalim europskim zemljama, zakon Republike Hrvatske definira granice dozvoljenih koncentracija (NDK) za samo nekoliko metala i metaloida u svježoj morskoj hrani, i to onih najtoksičnijih za ljude (N.N. 117/2004).

As	8 mg/kg
Cd	1 mg/kg
Cr	1 mg/kg
Pb	1,5 mg/kg
Hg	1 mg/kg
Ni	2,5 mg/kg
Zn	1,1 g/kg

Postaja Zadar Marina pokazala se kao najonečišćenija postaja sa povišenom koncentracijom Sn, Ni, Cr, Pb, Cu te Bi. Na mnogim postajama izmjerene su povišene koncentracije određenih metala iznad njihovog NDK: Seline (Cr, Cd), Marina (Cr), Split (Cr, Pb), Adriavinil (Pb), Pula (Cd, Pb), Trogir Marina (Pb), Rijeka (Pb), Mali Ston (Cr, Pb, Cd), Gruž (Cu, Cr, Pb).

Koncentracije bakra su bile povećane na postajama Gruž te Zadar Marina. Objekti postaje predstavljaju onečišćene luke i marine, te vjerojatno bakar u vodi potječe od kemijskih sredstava na bazi bakra za premazivanje brodova protiv obraštaja algi. Povišene vrijednosti pojedinih metala na postajama Split, Pula, Trogir te Rijeka također se mogu objasniti onečišćenjem vezanim za pomorski promet s obzirom da su sve od navedenih luke. Povećane koncentracije mogu se pripisati onečišćenju od brodskih premaza i nafte kao i drugim aktivnostima (brodogradnja, nautički turizam) te blizini gradova i industrijskih postrojenja. Povišene vrijednosti kroma i kadmija pronađene su i na svim referentnim postajama (Mali Ston, Seline) osim Linskog kanala što može značiti da je došlo do onečišćenja i na postajama koje su prethodno smatrane čistima. Uzrok tim povišenim koncentracijama teško je utvrditi, no on potencijalno može biti objašnjen povećanom količinom nautičkog turizma u tim područjima (uzorci za analizu metala uzeti su u proljeće kada počinje turistička sezona u

Hrvatskoj). Postaja Seline pokazala je najveće vrijednosti svih neantropogenih metala. Te visoke vrijednosti metala vjerojatno su rezultat stalnog priljeva vode s Velebita koja je bogata mineralima. Za ukupnu procjenu onečišćenja potrebne su također mjere drugih onečišćivača poput PAH, PCB i sl.

Postaja Linski kanal jedina je postaja koja nije pokazala povišene vrijednosti niti jednog od analiziranih metala u tkivu školjkaša što dokazuje neopterećenost onečišćenjem teškim metalima te se smatra referentnom postajom, kao i u prošlim istraživanjima rađenim na istom području (Projekt Jadran 2008, Štambuk i sur. 2013).

U istraživanju Projekta Jadran 2008. na osnovu rezultata analiza toksikanata iz dagnji, uočeno je da su industrijska područja ona koja su najviše zagađena različitim teškim metalima te PCB spojevima kao posljedica dugotrajnog ispuštanja industrijskih i urbanih otpadnih voda u područja priobalnog mora. Ta područja odnose se na Split, Dubrovnik, Rijeku, Pulu te Bakarski zaljev, dok su najniže vrijednosti izmjerene u školjkašima Linskog zaljeva. Rezultati te studije podudaraju se sa rezultatima ovog istraživanja. Iako su analize sedimenata Projekta Jadran (2008) potvrdile prisutnost većeg utjecaja industrijskih i urbanih otpadnih voda na istraživanim postajama, koja je rezultirala većim masenim udjelom metala u površinskom sedimentu, autor je zaključio da hrvatsko priobalno područje nije značajno zagađeno analiziranim metalima.

Slične koncentracije teških metala dobivene su i u drugim studijama na Mediteranu i Europi (Borchardt i sur. 1989, Fattorini i sur. 2008, Fowler i Oregioni 1976, Kljaković -Gašpić i sur. 2002, Martinčić i sur. 1987, Rainbow i sur. 2000, Wright i Mason 1999) te pokazuju da su i rezultati dobiveni ovim istraživanjem u rasponu vrijednosti nađenim u malo do umjereno onečišćenim priobalnim područjima Mediterana.

4.2. Oštećenje DNA

Genotoksični učinak onečišćenja analiziran je u hemocitima nativnih populacija dagnji na 15 istraživanih postaja duž hrvatske obale Jadranskog mora tijekom jeseni 2013. godine te u proljeće 2014. godine. Također, da bi se procjenila sposobnost prilagodbe dagnji na promjenu okoliša, postavljen je eksperiment u kojem je nativna populacija s postaje Marina translocirana na 6 postaja s različitim stupnjem onečišćenja.

Rezultati komet-testa tijekom jeseni 2013. g. ukazali su na najveći genotoksični učinak na postajama Gruž i Pula. Komet-test je također u proljeće pokazao najjači genotoksični učinak na postaji Pula, dok je postaja Gruž pokazala mnogo niže oštećenje DNA od onog dobivenog pola godine ranije.

Ova varijabilnost u rezultatima može se potencijalno objasniti sezonskim razlikama u razini ljudskih aktivnosti ali i sezonskim promjenama drugih čimbenika koji nisu izravno vezani za antropogeno onečišćenje. Ti čimbenici mogu biti biotički, poput rasta i razmnožavanja ili abiotski kao što su temperatura i salinitet. Upravo informacija o lokalnim čimbenicima jako je važan uvjet za točnu interpretaciju dobivenih rezultata. Kada je uzorkovanje nativnih ili kavezno izlaganih populacija izvedeno na područjima sa relativno sličnim fizikalnim uvjetima, može se očekivati da su rezultati povezani specifično sa efektima antropogenog onečišćenja. Prijašnja istraživanja pokazala su da se kod prebacivanja *Mytilus edulis* iz saliniteta 15 na 30 PSU (practical salinity unit), osmolarnost hemolimfe naglo promijenila (u roku od 5 sati) dok nije dostigla ravnotežu sa vanjskim medijem (Livingstone i sur. 1979). Također, brzina rada srca kod *M. edulis* pokazala je veliku sposobnost aklimatizacije na promjene saliniteta. Bakhmet i sur. (2005) napravili su eksperiment u kojem su pokazali da se niski broj otkucaja srca na 15 PSU naglo poveća ako se školjkaš prebaci u medij sa 25 PSU. Kako u ovom istraživanju nije došlo do drastične promjene u salinitetu tijekom transplantacije dagnji, nije bila očekivana drastična promjena u samoj fiziologiji proučavanih dagnji.

Sezonska varijabilnost u rezultatima primijećena je i u drugim istraživanjima. U istraživanjima Shaw i sur. (2002) populacija dagnji je na onečišćenoj postaji imala manje oštećenje DNA u listopadu nego u lipnju. Značajna razlika, međutim, nije bila vidljiva kod populacija na referentnoj postaji. Frenzilli i sur. (2001) su u škrgama vrste *M. galloprovincialis* uočili najveće oštećenje u kasno ljeto, dok su Shaw i sur. (2004) uočili najmanje oštećenje u stanicama probavne žlijezde *M. edulis* u prosincu. Pisanelli i sur. (2009) su ustanovili u 2004. g. najveća oštećenja DNA zimi, dok su ona bila najveća u rano proljeće u 2005. i 2006. g. Te varijacije mogu biti uzrokovane i razlikama u dostupnosti određenih metala te oksidativnim stresom uzrokovanim intenzivnijom hranidbom i razmnožavanjem u proljeće. Poznato je da je povećanje u temperaturi vode u proljeće blisko vezano sa početkom razvijanja gameta te početkom mrijesta kod dagnji sjevernog Jadrana (Brenko 1971). Termalni stres i konzumacija energetske resurasa za reproduktivnu aktivnost utječu na fiziologiju dagnji smanjujući njihovu sposobnost borbe protiv utjecaja toksikanata, te na taj način doprinose višoj razini destabilizacije lizosomalne membrane (Domouhtsidou i Dimitriadis 2001) kao i povišenom oštećenju DNA. Buschini i sur. (2003) pokazali su da je temperatura utjecala na oštećenje DNA u hemocitima školjkaša *Dreissena polymorpha* izloženog hipokloritu, sa većim oštećenjem na niskoj (4°C) te visokoj (28°C) temperaturi, te najmanjih oštećenjem na temperaturi od 18°C. Temperatura vode dokazano ima utjecaj na

mitotičku stopu koja može povećati broj mikronukleusa u dagnji (Brunetti i sur. 1992), no, mjerenje oštećenja DNA koristeći komet-test ne zahtijeva mitotičku aktivnost kao što je to slučaj kod mikronukleus-testa. Izravni utjecaj temperature na DNA lomove igra važnu ulogu ukoliko podiže metabolizam, pri čemu se povećava oksidativni stres te izloženost samom onečišćenju. Malev i sur. (2010) pokazali su da dolazi do statistički značajnog povećanja oštećenja DNA kod vrste *Astacus leptodactylus* već treći dan izlaganja na temperaturi od 30°C te sedmi dan pri izlaganju na temperaturi od 25°C.

Postaje Pula, Brodogradilište SJ i Rijeka u proljeće pokazale su najveće oštećenje DNA sa maksimumom od 21,71% tDNA (Pula). Perić i sur. (2012) u svojem su istraživanju također zaključili da su Pula i Rijeka najonečišćenije postaje. Analiza je pokazala nisku vrijednost stabilnosti lizosomalne membrane zbog stresa uzrokovanog dugoročnom akumulacijom kemijskih tvari poput kloriranih ugljikovodika te teških metala već prethodno detektiranih studijama rađenim na tom području (Projekt Jadran 2008, Lipanović Landeka 2010). Rezultati ovog istraživanja poklapaju se i sa istraživanjem Štambuk i sur. (2013) u kojem se oštećenje DNA u proljeće 2008. na postaji Pula kretalo oko 5%, dok je na postaji Rijeka ono bilo nešto niže. Petrović i sur. (2004) pokazali su da se preživljavanje dagnji nakon izlaganja zraku značajno smanjilo kod dagnji sakupljenih na postajama Pula i Rijeka u odnosu na kontrolne postaje. Zanimljivo, Jakšić i sur. (2005) su koristeći Fast Micromethod® metodu za analizu oštećenja DNA u škrgama dagnji, ustanovili da su postaje Rijeka i Gruž bile među postajama gdje je u manjem broju uzoraka zabilježen utjecaj onečišćenja na DNA, a dagnje s postaja Pula i Lim su najmanje pokazivale smanjen integritet DNA. U istom istraživanju Splitsko područje pokazalo se kao najonečišćenije, dok je u ovom istraživanju postaja Split jedna od onih gdje je genotoksični učinak bio manje vidljiv i u jesen i u proljeće. Rezultati istraživanja Klobučar i sur. (2008) u listopadu 2004. godine pokazali su slične rezultate na postajama Adriavinil i Split kao i ovo istraživanje u jesen 2013., sa oštećenjem DNA oko 5%, dok su vrijednosti u listopadu 2003. u istom istraživanju bile niže, između 2% i 4%.

Gruž je u jesen pokazao najveće oštećenje, što se slaže sa rezultatima Projekta Jadran u kojem se ta postaja pokazala kao onečišćena na osnovu kemijskih analiza tkiva dagnji, sedimenta, ali i opterećena mutagenim tvarima po rezultatima Ames testa. Istraživanje Štambuk i sur. (2013) također je pokazalo da je postaja Gruž bila najonečišćenija 2008. i 2009. godine. Osim Gruža koji je pokazao smanjeno oštećenje DNA u proljeće u odnosu na jesen, većina istraživanih postaja pratila je isti trend: Adriavinil, Ičići, Trogir Marina, Zadar Marina, varirajući tako između vrijednosti u kojima su se nalazile i kontrolne postaje. Ovi

rezultati u slijedu su sa istraživanjem Štambuk i sur. (2013) gdje je oštećenje DNA u proljeće 2008. na postajama Lim, Mljet, Ston, Trogir, Split, Pula i Rijeka imalo slične vrijednosti kao i u ovom istraživanju, ispod 5%. Također je u istraživanju Jakšić i sur. (2005), u određenim mjesecima, bilo malo postaja koje su pokazivale razliku u odnosu na kontrolne postaje (Lim). Neka istraživanja nisu pokazala nikakvu indukciju oštećenja DNA u nativnim populacijama na onečišćenim postajama koju autori objašnjavaju kao adaptivne mehanizme koji se razvijaju u populacijama koje nastanjuju onečišćena područja (Akcha i sur. 2004, Shaw i sur. 2004).

Postaja Split nije pokazala značajno smanjenje integriteta DNA niti u jesen, niti u proljeće. Limski kanal, Marina, NP Mljet i Ston pokazale su oštećenje DNA manje od 2% i time potvrdile status referentnih postaja. Bihari i sur. (2005) također su potvrdili visoki integritet DNA u dagnjama s otoka Mljeta i zaključili da se radi o postaji sa vrlo niskim antropogenim utjecajem. Iako su i postaje Seline te Mali Ston uzete kao kontrolne, kod njih je u jesen bio smanjen integritet DNA, što je moglo biti posljedica većih aktivnosti na moru u periodu uzorkovanja ili nekih drugih abiotskih ili biotskih čimbenika. Kako su to postaje relativno niskog stupnja antropogenog utjecaja, Bolognesi i sur. (2004) predlažu da se varijacije bioloških varijabli, poput veličine životinje, osobitosti tkiva te biokemijskih i enzimatskih procesa vezanih uz rast i razmnožavanje, trebaju uzeti u obzir u biomonitoringu područja niskog stupnja onečišćenja.

Kada se dagnje koriste u monitoringu utjecaja onečišćenja ili studijama biomarkera, predloženo je obratiti pažnju na koncentraciju *chl a* (klorofil a) koji mora biti viši od $0,5\mu\text{gL}^{-1}$ da bi dagnje pokazale filtracijsku aktivnost (Dolmer 2000, Riisgård i Larsen 2000). Posljedica niske razine filtracije biti će niski unos kemikalija, te zaključno niski stupanj štetnog učinka. Niže vrijednosti u proljeće mogu biti posljedica niske filtracijske aktivnosti zbog niske razine *chl a* u vodi. Za potvrdu ove teorije trebalo bi se, dakako, izmjeriti koncentracije *chl a* u vodi u na istraživanim postajama. Također, mogu biti posljedica manjeg onečišćenja mora zbog prethodne zime, dok je tijekom ljeta prisutno povećano onečišćenje zbog turizma.

Populacija s postaje Marina translocirana je na 6 lokacija podijeljenih u 3 grupe (sjeverni, srednji i južni Jadran) od kojih je jedna postaja bila onečišćena, a druga čista. Rezultati dobiveni ovim eksperimentom nisu pokazali značajne razlike između transplantanata koji su postavljeni na čistim i na onečišćenim postajama te je teško zaključiti da li postoji razlika ukoliko se dagnje iz čistog okoliša prenesu u čisti okoliš ili okoliš sa određenim stupnjem onečišćenja.

Rezultati dobiveni kaveznim izlaganjem u proljeće 2014.g. pokazali su lagano povišene vrijednosti oštećenja DNA u odnosu na nativnu populaciju s postaje Marina. No,

samo je postaja Gruž imala statistički značajno povećanje ($p < 0,05$). Iako su vrijednosti kod transplantiranih dagnji bile nešto više nego kod nativnih populacija, vrijednosti nisu statistički značajne te je teško reći da li se radi o aklimatizacijskim mehanizmima koji se razvijaju u populacijama koje obitavaju u onečišćenim područjima. Aklimatizacija populacija na povišene razine onečišćenja pokazana je u mnogim istraživanjima (Da Ros i Nesto 2005, Shaw i sur. 2002). Shaw i sur. (2002) pokazali su da je nakon 13 tjedana kaveznog izlaganja oštećenje DNA bilo 1,8 puta veće kod kavezno izlaganih jedinka u odnosu na native jedinke tog područja, što pokazuje da se proučavane dagnje nisu u potpunosti aklimatizirale u tom periodu.

Razlog zašto rezultati nisu pokazali više oštećenje DNA može biti i u dužini samog eksperimenta izlaganja. Regoli i sur. (2004) opisali su optimalnu dužinu izlaganja 30 dana, dok su Rank i sur. (2007) uočili da je najveće oštećenje 64 dana nakon izlaganja, dok nakon 29 dana nije bilo značajnog porasta. Mogući razlog također može biti u većoj dubini na kojoj su kavezi postavljeni što je moglo utjecati na dobivene rezultate (Klobučar i sur. 2008).

Eksperiment izlaganja dagnji bakru dovodi do nekoliko zaključaka. Kao prvo, populacija s postaje Gruž nije uspjela popraviti oštećenje DNA nastalo onečišćenjem na postaji čak ni nakon više od mjesec dana aklimatizacije. U jesen 2013. godine na postaji Gruž izmjereno je oštećenje DNA od 7,57%, dok je ono u proljeće 2014. iznosilo 1,66%. Nadalje, u jesen postaja Marina pokazala je 1,20% tDNA, dok je u proljeće vrijednost bila 2,16% tDNA. Na jedinke s postaje Gruž bakar je jače djelovao nego na jedinke s postaje Marina. Iako prisutstvo bakra otkriva da je na istraživanom području došlo do neke vrste onečišćenja te ima utjecaj na određene genotipove same vrste (genotipovi sa alozimima za fosfoglukomutazu te malat dehidrogenazu osjetljiviji su na utjecaj bakra) (Gillespie i Guttman 1989), istraživanja ukazuju da on nema nužno i genotoksični učinak na organizme (Nacci i sur. 1992). Može se pretpostaviti da bakar ima određeno toksično djelovanje u stanici koje kasnije indirektno rezultira genotoksičnim stresom i oštećenjem DNA kojoj je već smanjen integritet. Genotoksičnost Cu u hemocitima dagnji može biti povezana sa njegovom ulogom u stvaranju ROS-a te naknadnom oksidativnom stresu u obliku oštećenja DNA, oksidaciji baza i apoptotičkoj DNA fragmentaciji, koja je već dokazana u drugim istraživanjima na morskim organizmima (Al-Subiai i sur. 2011, Bolognesi i sur. 1999, Steinert 1995). Carić i sur. (2014), bazirajući se na emisiji bakra s velikih brodova (kruzera), izračunali su da je emisija Cu u luci Gruž 154 kg u godini 2009., što upućuje na srednji do visoki utjecaj na morski okoliš. Ako se uzme u obzir i vrlo slaba dinamika mora u tom području, vjerojatnost onečišćenja bakrom vrlo je visoka. Također, zabilježene su visoke vrijednosti bakra u sedimentu na tom području,

što potencijalno može biti vrlo opasno s obzirom da, osim ACI marine koja se tamo nalazi, lokalni brodovi iz luke Gruž upotrebljavaju slične protuobraštajne premaze na bazi bakra kao i veliki brodovi na kojima je rađeno ovo istraživanje.

Rezultati ovog istraživanja slični su rezultatima Nacci i sur. (1992) koji su u svom istraživanju dagnje izlagali bakru 7 dana (kronično izlaganje). Izlaganje subletalnim dozama nije povećalo oštećenje DNA u škrgama, tek kada su dagnje izložene letalnoj dozi (100 μ g/L), došlo je do indukcije mortaliteta i malo ali statistički značajno povećanje oštećenja DNA. Kod akutnog izlaganja bakru od 48h, dagnje opet nisu pokazale značajno povećanje oštećenja DNA. Zaključno, rezultati komet testa u mezokozmos eksperimentu ne upućuju na aklimatizaciju populacije dagnji s postaje Gruž na prisustvo bakru u okolišu, već na njihovu višu osjetljivost.

Svi metali pronađeni u razmjerno višim koncentracijama u tkivima dagnji s onečišćenih područja mogu imati genotoksično djelovanje. Bolognesi i sur. (1999) pokazali su da kadmij, uz živu, uzrokuje oštećenja DNA. Kadmij je značajan kao inhibitor mehanizma popravka DNA (Pruski i Dixon 2002) te se smatra prooksidansom (McDonagh i sur. 2005). Bakar je također poznat kao jedan od čestih ksenobiotika koji uzrokuje oksidativni stres kod dagnji (Sjølin i Livingstone 1997). Komunalne vode u Hrvatskoj se na nekim od istraživanih postaja izijevaju u more bez pročišćavanja ili nakon samo djelomičnog pročišćavanja (Gruž, Rijeka, Split, Pula), te s obzirom na svoj volumen imaju značajan utjecaj na okolni ekosustav. One također mogu imati veliki genotoksični utjecaj što potvrđuje i studija White i Rasmussen (1998) u kojoj je utvrđena povezanost genotoksičnosti tekućica i broja stanovnika na nekom području.

Iako kod nativnih populacija u ovom istraživanju postoji generalni trend povišenog oštećenja DNA na onečišćenim postajama u odnosu na one kontrolne, istraživanja bi trebalo provoditi redovitije kroz duži period kako bi se dobili još jasniji rezultati komet-testa. Iako je komet-test vrlo efikasna i relativno lagana metoda za detekciju genotoksičnog stresa u populacijama dagnji, za bolju procjenu trebalo bi se koristiti i metodu mikronukleus-testa te neku metodu detektiranja generalnog stresa organizma poput stabilnosti lizosomalne membrane. Također, pozornost se treba obratiti na enzime oksidativnog stresa, karbonile i MDA kao pokazatelje oštećenja makromolekula. Koristeći sve navedene metode kao alat za budući monitoring ovih područja, možemo biti sigurniji da će se detektirati svi negativni učinci različitih toksikanata.

5. Zaključak

Povišene vrijednosti koncentracija većine teških metala zabilježene su u područjima velikih lučkih aktivnosti kao i u blizini ispusta industrijskih i urbanih otpadnih voda. Međutim, dobiveni podaci ne pružaju dokaz o značajnom onečišćenja istočne obale Jadranskog mora. Usporedba sa prethodnim studijama rađenim na ovom području potvrđuje da naše vrijednosti ulaze u grupu blago do umjereno zagađenih područja.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su blage sezonske razlike u oštećenju DNA s povišenim vrijednostima u jesen 2013. za sve postaje osim Pule i Brodogradilišta SJ koji su više vrijednosti pokazali u proljeće 2014. Razloge ovakvih rezultata teško je odrediti, no moguće je da se povišena vrijednost oštećenja DNA pojavila u jesen zbog veće količine onečišćivača prisutnih nakon turističke sezone kao i povišene temperature mora. Da bi se dobio dublji uvid da li postoje razlike među sezonama te da li postoje odnosi među njima, istraživanja bi se trebala provoditi učestalije kroz nekoliko godina.

Iako kavezno izlagane jedinke u ovom istraživanju nisu imale statistički značajne povećane vrijednosti oštećenja DNA u odnosu na kontrolnu postaju, ne može se utvrditi je li riječ o aklimatizaciji ili je posrijedi neki drugi razlog. Sukladno tome, buduća istraživanja kaveznog izlaganja trebala bi se provoditi u više kraćih perioda (od nekoliko dana do mjesec dana ili više) da bi se lakše utvrdilo kako se mijenja integritet DNA kroz vrijeme. Također, biomonitoring programi bi se uvijek trebali provoditi u istom dijelu godine (npr. proljeće i/ili jesen) kako bi se izbjegao utjecaj različitih sezona na istraživane populacije.

Analize koje ukazuju na integritet DNA kod morskih beskralježnjaka u područjima pod visokim antropogenim pritiskom imaju široko značenje u globalnom kontekstu. Zbog konstantno rastuće industrije, turizma te pomorskog prometa, antropogeni stres na okoliš može samo rasti te je biomonitoring takvih sustava od veoma važnog značaja, ne samo za zdravlje morskih ekosustava, nego i za cjelokupnu ljudsku populaciju.

6. Literatura

1. Akcha F, Tanguy A, Leday G, Pelluhet L, Budzinski H, Chiffolleau JF (2004) Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar Environ Res* 58:753-756
2. Al-Subiai SN, Moody AJ, Mustafa SA, Jha AN (2011) A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:1913-1920.
3. AZO (2007) Izvješće o stanju okoliša u Republici Hrvatskoj. Agencija za zaštitu okoliša, republika Hrvatska. 1-309
4. Bakhmet IN, Berger VJ, Khalaman VV (2005) The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones. *J Exp Mar Biol Ecol* 318: 121–126
5. Banni M, Negri A, Dagnino A, Jebali J, Ameer S, Boussetta H (2010) Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotox Environ Safe* 73:842-848
6. Bayne BL (1965). Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* 2:1-47
7. Beaumont A, Gjedrem T, Moran P (2007). Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. Blue Mussel – *M. edulis* and Mediterranean mussel – *M. galloprovincialis*. 62-69, U:Svasand T, Crosetti D, Garcia-Vazquez E, Verspoor E (ur). Genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802). <http://genimpact.imr.no/>
8. Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L, Athwal R (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat Res-Rev Mutat* 463:33-51
9. Bihari N, Fafandel M, Jakšić Z, Pleše B, Batel R (2005) Spatial distribution of DNA integrity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Adriatic Sea, Croatia. *B Environ Contam Tox* 75:845-850

10. Bolognesi C, Degan P (2001) Genotoxicity biomarkers in aquatic organisms as indicators of carcinogenic marine pollutants. U:Garrigues P, Barth H, Walker CH, Narbonne JF(ur.) Biomarkers in Marine Organisms:A Practical Approach. Elsevier Science B.V.:45-64
11. Bolognesi C, Frenzilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggieri P (2004) Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*:wild versus caged mussels. Mutat Res 552:153-162
12. Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels:Experimental studies. Environ Mol Mutagen 33:287-292
13. Borchardt T, Burchert S, Karbe L, Zeitner R (1989) Enhanced heavy metal concentrations in *Mytilus edulis* from the central North Sea. Sci. Mar. 53:725–728
14. Brunetti R, Gabriele M, Valerio P, Fumagalli O (1992) The Micronucleus Test - Temporal Pattern of Base-Line Frequency in *Mytilus galloprovincialis*. Mar Ecol-Prog Ser 83:75-78
15. Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C (2003) Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. Mutat Res-Gen Tox En 537:81-92
16. Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula:a practical approach. Sci Total Environ 247:295-311
17. Carić H, Klobučar G, Štambuk A, Ecotoxicological risk assessment of antifouling emissions in a cruise ship port, Journal of Cleaner Production (2014), doi: 10.1016/j.jclepro.2014.08.072.
18. Collins AR (2002) The Comet Assay:Principles, Applications and Limitations U:Didenko VV (ur.) In Situ Detection of DNA damage Methods and Protocols. Humana Press Totowa, Ney Jersey:163-179
19. Collins AR, Dobson VR, Dušinská M, Kennedy G, and Štětina (1997) The comet assay:what can it really tell us?. Mutat Res 375:183-193
20. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R (2008) The comet assay:topical issues. Mutagenesis 23:143-151

21. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López- Fernández C, Gosálbez A, Gosálvez J (2011) New application of the comet assay: chromosome Comet assay. *J Histochem Cytochem* 59:655–660
22. Da Ros L, Nesto N (2005) Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adas and Reeve 1850) as biomarkers of environmental stress: field studies in the Lagoon of Venice (Italy). *Environ Int* 31:1078–1088
23. De Blok JW, Maas MT (1977) Function of byssus threads in young post-larval *Mytilus*. *Nature* 267:558
24. DiBattista JD (2008) Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. *Conserv Genet* 9:141-156
25. Dolmer P (2000) Feeding activity of mussels *Mytilus edulis* related to near-bed currents and phytoplankton biomass. *J Sea Res* 44: 221–231
26. Domouhtisou GP, Dailianis M, Kaloyanni & DIMITRIADIS VK (2004) Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.), as biomarkers. Combination with trace metal concentrations. *Mar Pollut Bull* 48:572-586
27. Fattorini D, Notti A, Di Mento R, Cicero AM, Gabellini M, Russo A, Regoli F (2008) Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic Sea: a regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities. *Chemosphere* 72:1524–1533
28. Fowler SW, Oregioni B (1976) Trace metals in mussels from the NW Mediterranean. *Mar Pollut Bull* 7:27–32
29. Frenzili G, Nigro M, Lyons BP (2001) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681:80–92
30. Gačić M, Lascaratos A, Manca BB, Mantziafou A (2001) Adriatic deep water and interaction with the Eastern Mediterranean Sea. U: Cushman-Roisin B, Gacic M, Poulain PM, Artegiani A (eds) *Physical oceanography of the Adriatic Sea: past, present and future*, 111-142. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
31. Gedik CM, Ewen SWB, Collins AR (1992) Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Rad Biol* 62:313-320

32. Gillespie RB, Guttman SI (1989) Effects of contaminants on the frequencies of allozymes in populations of the central stoneroller. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 309–317
33. Gosling EM (1992) Genetics of *Mytilus*. U:Gosling, E.M. (Ur.), The mussel *Mytilus*:Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, No. 25. Elsevier, Amsterdam, pp. 309–382.
34. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendation for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:45-51
35. Brenko M. (1971) The reproductive cycle of the *Mytilus galloprovincialis* Lamk. in the Northern Adriatic Sea. *Thalassia Jugoslav* 7:533-542
36. Jakšić Ž, Batel R, Bihari N, Mičić M, Zahn RK (2005) Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination—A long-term field study. *Marine Pollution Bulletin* 50:1314–1327
37. Jha AN (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms:an overview. *Mutat Res* 553:1-17
38. Kanduč T, Medaković D, Hamer B (2011) *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of environmental conditions: the case of the Eastern coast of the Adriatic Sea. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 47:42-61
39. Kasum J, Baljak K, Vidan P (2008) Luka Split:Prometna učinkovitost i prijedlozi poboljšanja // *International Conference on Protection and Safety of the Adriatic Sea 2008:Book of Proceedings* / Britvić R (ur.). Split:RCADR, 2008.
40. Kijewski T, Wijsman, JWM, Hummel H, Wenne R (2009) Genetic composition of cultured and wild mussels *mytilus* from the Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture* 287:292-296
41. Kleinjans JCS, van Schooten F-J (2002) Ecogenotoxicology:the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11 :173-179
42. Klobučar GIV, Pavlica M, Erben R, Papeš D (2003) Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat Toxicol* 64:15-23

43. Klobučar GIV, Štambuk A, Hylland K, Pavlica M (2008) Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kastela and Trogir bays, Croatia. *Sci Total Environ* 405:330-337
44. Kljaković-Gašpić Z, Ujević I, Barić A (2002) The Mediterranean blue mussel as an environmental indicator of metal pollution in the coastal area of Eastern Adriatic. *Fresen Environ Bull* 11:620–625
45. Kolarević S, Knežević-Vukčević J, Paunović M, Kračun M, Vasiljević B, Tomović J, Vuković-Gačić B, Gačić Z (2013) Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere* 93:243-251
46. Lipanović Landeka H (2010) Opterećenost Pulskog zaljeva metalima i njihov učinak na dagnju *Mytilus galloprovincialis* L. (The overload of Pula Bay with metals and their effect on the mussel *Mytilus galloprovincialis* L.). M. S. Thesis, University of Zagreb 79 pp.
47. Livingstone DR, Widdows J, Fieth P (1979) Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis* adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. *Mar Biol* 53: 41–55
48. Malev O, Šrut M, Maguire I, Štambuk A, Ferrero EA, Lorenzon S, Klobučar GIV (2010) Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152:433-443
49. Martinčić D, Kwokal Ž, Branica M, Stoepler M (1987) Trace metals in selected organisms from the Adriatic Sea. *Mar Chem* 22:207–220
50. McCarthy JF, Shugart LR (1990) Biological markers of environmental contamination. U: McCarthy JF, Shugart LR (ur.) Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton:3-14
51. McDonagh B, Tyther R, Sheehan D (2005) Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat Toxicol* 73:315-326
52. Michel C, Bourgeault A, Gourlay-France C, Palais F, Geffard A, Vincent-Hubert F (2012) Seasonal and PAH impact on DNA strand-break levels in gills of transplanted zebra mussels. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92:18-26

53. Nacci D, Nelson S (1992) Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Marine Environmental Research* 33:83-100
54. Narodne novine (2005) „Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o kriterijima za utvrđivanje naknade šteta počinjenih ribama i drugim morskim organizmima“ (N.N. 96/2005)
55. Narodne Novine (2004) „Pravilnik o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet žvrih školjkaša“ (N.N. 117, 2004)
56. Nigro M, Falleni A, Del Barga I, Scarcelli V, Lucchesi P, Regoli F, Frenzilli G (2006) Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquat Toxicol* 77:339-347
57. Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res-Rev Mutat* 567:109-149
58. Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29:294-307
59. Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291–298
60. Perić L, Smoldaka Tanković M, Ravlić S (2012) Evaluation of marine water quality along North-Eastern Adriatic coast based on lysosomal membrane stability in mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. - A long term study. *Acta Adriat* 53(3):457-466
61. Petrović S, Semenčić L, Ozretić B, Ozretić M (2004) Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar Pollut Bull* 49:713-720
62. Pisanelli B, Benedetti M, Fattorini D, Regoli F (2009) Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere* 77:1551-1557
63. Pisanelli B, Benedetti M, Fattorini D, Regoli F (2009) Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere* 77:1551-1557

64. Projekt Jadran (2008) Završno izvješće. Program za procjenu i kontrolu zagađenja u području Mediteran. Nacionalni monitoring program, Republika Hrvatska, Izvješće za 2007. godinu. Zagreb. Ministarstvo zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva
65. Pruski AM, Dixon DR (2002) Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* 57:127-137
66. Quesada H, Wenne R, Skibinski DOF (1995)a Differential Introgression of Mitochondrial-DNA across Species Boundaries within the Marine Mussel Genus *Mytilus*. *P Roy Soc Lond B Bio* 262:51-56
67. Quesada H, Zapata C, Alvarez G (1995)b A Multilocus Allozyme Discontinuity in the Mussel *Mytilus-Galloprovincialis* - the Interaction of Ecological and Life-History Factors. *Mar Ecol-Prog Ser* 116:99-115
68. Rainbow PS, Wolowicz M, Fialkowski W, Smith BD, Sokolowski A (2000) Biomonitoring of trace metals in the Gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (*Balanus improvisus*). *Water Res* 34:1823–1829
69. Rank J, Jensen K (2003) Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotox Environ Saf* 23:323-329
70. Rank J, Lehtonen KK, Strand J, Laursen M (2007) DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* 84:50-61
71. Regoli F, Frenzilli G, Bocchetti R, Annarumma F, Scarcelli V, Fattorini D, Nigro M (2004) Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicol* 68:167-178
72. Riđanović, J., Rendulić, I., Šimunović, V. (1999): Hrvatski Jadran u sklopu novog teritorijalnog ustroja. Zbornik radova 2. Hrvatske Konferencije o vodama, Dubrovnik, str. 269-276
73. Riisgård HU, Larsen PS (2000) Comparative ecophysiology of active zoobenthic filter feeding, essence of current knowledge. *J Sea Res* 44: 169–193
74. Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B* 722:225-254

75. Saavedra C, Bachère E (2006) Bivalve genomics. *Aquaculture* 256:1-14
76. Shaw JP, Large AT, Donkin P, Evans SV, Staff FJ, Livingstone DR, Chipman JK, Peters LD (2004) Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* *Aquat Toxicol* 67:325-336
77. Shaw JP, Large AT, Donkin P, Evans SV, Staff FJ, Livingstone DR, Chipman JK, Peters LD (2004) Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* *Aquat Toxicol* 67:325-336
78. Shaw JP, Large AT, Livingstone DR, Doyotte A, Renger J, Chipman JK, Peters LD (2002) Elevation of cythochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. *Mar Environ Res* 54:505-509
79. Shaw JP, Large AT, Livingstone DR, Doyotte A, Renger J, Chipman JK, Peters LD (2002) Elevation of cythochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. *Mar Environ Res* 54:505-509
80. Singh NP (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exper Cell Res* 256:328-337
81. Singh NP, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191
82. Sjölin AM, Livingstone DR (1997). Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquat Toxicol* 38:83–99
83. Skibinski DOF, Gallagher C, Quesada H (1999) On the roles of selection, mutation and drift in the evolution of mitochondrial DNA diversity in British *Mytilus edulis* (Mytilidae; Mollusca) populations. *Biol J Linn Soc* 68:195-213
84. Steinert SA (1995) Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar. Environ. Res.* 42: 253-259.
85. Supić, N., Orlić, M. (1992): Annual cycle of sea surface temperature along the east Adriatic coast. *Geofizika*, 9: 79-97.

86. Štambuk A, Pavlica M, Malovic L, Klobucar GIV (2008) Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environ Mol Mutagen* 49:217-225
87. Theodorakis CW (2001) Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* 10:245-256
88. Thomas RE, Lindeberg M, Harris PM, Rice SD (2007) Induction of DNA strand breaks in the mussel (*Mytilus trossulus*) and clam (*Protothaca staminea*) following chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the Exxon Valdez spill. *Mar Pollut Bull* 54:726-732
89. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221
90. Villela IV, Marques de Oliveira I, Coelho Silveira J, Ferraz Dias J, Antonio Pegas Henriques J, da Silva J (2007) Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research* 628:76–86
91. White PA, Rasmussen JB (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat Res-Rev Mutat* 410:223-236
92. WHO (1993) Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. World Health Organisation, Geneva
93. Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR (1998) Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytillus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat Res* 399:87-95
94. Wright P, Mason CF (1999) Spatial and seasonal variation in heavy metals in the sediments and biota of two adjacent estuaries, the Orwell and the Stour, in eastern England. *Sci Total Environ* 226:139–156
95. Zvonarić T (1991). The cycling of mercury through the marine environment of Kaštela Bay. U: Gabrielides GP (ur.) Proceedings of the FAO/UNEP/AEA consultation meeting on the accumulation and transformation of chemical contaminants by biotic and abiotic processes in the marine environment, 24–28 September 1990, La Spezia, Italy. MAP Technical Reports Series Athens. UNEP: 369-38

7. Prilozi

Tablica 2. Statistički značajne razlike među postajama u oštećenjima DNA mjenog komet-testom. Vrijednosti se odnose na istraživanje u jesen 2013. godine

	AD	GZ	IC	LK	MA	MS	PL	RI	MLJ	ST	TM	VL	ZB	ZM
AD														
GZ	X													
IC		X												
LK		X												
MA	X	X	X											
MS		X		X	X									
PL					X									
RI					X									
MLJ		X			X	X								
ST	X	X	X	X		X	X	X	X					
TM		X			X	X				X				
VL		X												
ZB	X	X		X	X				X	X	X	X		
ZM		X			X	X				X			X	

Tablica 3. Statistički značajne razlike među postajama u oštećenjima DNA mjenog komet-testom. Vrijednosti se odnose na istraživanje u proljeće 2014. godine

	AD	GZ	IC	LK	MA	MS	PL	RI	MLJ	ST	SN	TM	VL	ZB	ZM
AD															
GZ	X														
IC	X														
LK			X												
MA	X			X											
MS			X		X										
PL	X	X	X	X	X	X									
RI							X								
MLJ			X		X		X								
ST		X	X		X		X	X							
SN			X		X		X	X							
TM							X								
VL	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X			
ZB		X	X		X		X	X					X		
ZM			X		X		X						X		

Tablica 4. Statistički značajne razlike među postajama u oštećenjima DNA mjenenog komet-testom. Vrijednosti se odnose na istraživanje kaveznog izlaganja u proljeće 2014. Godine

	MA	PL	LM	ZM	ZB	GZ	SN
MA							
PL							
LM							
ZM							
ZB	X						
GZ	X			X			
SN							

Tablica 5. Koncentracije (mg/kg) teških metala izmjerene u tkivu dagnji u proljeće 2014.g.

	Seline	Marina	Split	Adriavinil	Pula	Trogir Marina 1	Trogir Marina 2	Lim	Rijeka	Mali Ston	Gruž	Zadar Marina 1	Zadar Marina 2
Li	1,46	1,40	1,01	0,68	0,62	0,62	0,61	0,92	0,57	1,41	0,91	0,75	0,71
Rb	4,72	6,60	5,89	4,87	3,62	4,67	4,69	4,58	3,17	7,30	6,00	3,92	3,86
Mo	4,32	0,95	0,75	0,45	0,90	0,38	0,39	0,78	0,36	0,81	0,49	0,45	1,82
Ag	0,026	0,010	0,020	0,006	0,028	0,007	0,008	0,029	0,291	0,030	0,042	0,154	0,160
Cd	1,01	0,81	0,49	0,52	0,37	0,35	0,35	0,89	0,48	1,66	0,68	0,38	0,38
Sn	0,12	0,16	0,21	0,29	0,54	0,19	0,20	0,09	0,25	0,24	0,34	1,45	1,37
Sb	0,031	0,022	0,019	0,017	0,026	0,010	0,011	0,012	0,029	0,046	0,030	0,019	0,019
Pb	1,437	1,323	2,095	1,881	5,758	1,229	1,259	0,825	2,870	2,264	3,169	6,675	6,819
Bi	0,026	0,024	0,038	0,018	0,021	0,008	0,010	0,011	0,027	0,013	0,027	0,110	0,115
U	0,162	0,134	0,088	0,083	0,127	0,044	0,047	0,129	0,104	0,147	0,105	0,094	0,092
Al	890	411	271	132	167	118	119	253	148	412	215	166	150
Ti	30,3	15,8	12,5	7,4	7,9	4,3	4,5	9,8	8,2	18,9	9,9	9,4	9,0
V	16,58	2,41	1,15	0,84	0,91	0,58	0,60	3,65	0,65	1,74	1,33	0,68	0,67
Cr	1,76	1,38	1,58	1,02	1,59	0,64	0,69	0,80	0,96	1,89	1,30	1,29	11,17
Mn	20,50	9,02	8,03	6,23	5,07	4,91	4,88	8,62	5,35	23,98	10,13	4,17	4,97
Fe	500	308	226	134	177	111	113	155	150	401	215	152	181
Co	1,12	0,83	0,42	0,52	0,30	0,32	0,34	0,58	0,22	0,91	0,54	0,27	0,29
Ni	2,05	2,15	1,37	0,92	1,28	0,74	0,86	1,41	0,81	1,75	1,25	0,97	6,85
Cu	10,39	4,85	6,46	5,70	8,84	6,65	7,31	4,90	9,63	19,17	60,29	81,08	81,71
Zn	102,3	128,5	162,9	123,6	126,8	104,4	109,1	100,4	87,5	127,5	164,1	164,5	165,6
Sr	45,8	55,4	60,6	34,0	32,8	28,7	29,6	51,1	32,2	63,3	22,6	55,5	55,2
Ba	5,62	1,95	1,95	1,22	1,20	0,86	0,87	1,38	1,43	3,13	0,84	1,59	1,57
As	36,43	28,06	25,38	20,93	14,93	22,20	23,18	23,97	14,15	25,96	28,52	15,59	16,83
Se	3,16	3,33	2,07	2,55	1,41	1,82	2,25	2,07	1,51	3,45	2,62	1,46	1,62

8. Životopis

Marina Linardić

- Datum i mjesto rođenja: 9. svibnja 1991. godine, Rijeka, RH
- Adresa prebivališta: Vela draga 20, 51521 Punat
- Mobitel: +385915512366
- Email: marinal0905@gmail.com

Završeno obrazovanje:

- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek
- Sveučilište u Beču, Prirodoslovni fakultet; ERASMUS razmjena studenata
- Srednja škola "Hrvatski kralj Zvonimir", smjer: opća gimnazija, Krk
- Osnovna škola "Fran Krsto Frankopan", Punat
- Osnovna glazbena škola "Ivan Matetić Ronjgov", Rijeka, smjer: glasovir

Kongresna priopćenja:

- Koletić, N., Hanžek, N., Polović, D., Kovarik, I., Mejdandžić, M., **Linardić, M.**, and Slana, A., (2011): *Contribution to the Knowledge of Macro-algae of the Coastal Area of the Island of Hvar*, BALWOIS 2012 - Ohrid, Republic of Macedonia

Nagrade i priznanja:

- Dobitnica posebne Rektorove Nagrade Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za projekt "Noć biologije 2012/13."

Udruge i organizacije:

- Član Udruge studenata biologije „BIUS” – Sekcija za alge
- Član Kulturno-umjetničkog društva "Punat"