Nematopsis sp. u probavnim žlijezdama dagnji Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819.

Šebešćen, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:261430

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

DORA ŠEBEŠĆEN

NEMATOPSIS SP. U PROBAVNIM ŽLIJEZDAMA DAGNJI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819.

Završni rad

Pula, 2018.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

DORA ŠEBEŠĆEN

NEMATOPSIS SP. U PROBAVNIM ŽLIJEZDAMA DAGNJI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819.

Završni rad

JMBAG: 0303053769, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Mikrobiologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Interdisciplinarno
Znanstvena grana: Znanost o moru
Mentor: doc. dr. sc. Emina Pustijanac
Komentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Pula, 2018.

ZAHVALA

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Emini Pustijanac i komentorici doc. dr. sc. Ines Kovačić na mentorstvu, strpljenju i pomoći pri izradi ovog završnog rada te kontinuiranoj podršci tijekom školovanja.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

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

U Puli, 18. lipnja 2018. Studentica

_____

IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Dora Šebešćen dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "*Nematopsis* sp. u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819." koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

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

U Puli, 18. lipnja 2018. Potpis

_____

SADRŽAJ

1 Uvod 1

1.1 Dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819.) 1

1.2 Paraziti dagnje 3

1.3 Rod Nematopsis 4

2 Cilj istraživanja 7

3 Materijali i metode 8

3.1 Područje istraživanja i uzorkovanje školjkaša 8

3.2 Izolacija i priprema tkiva 9

3.3 Identifikacija i određivanje intenziteta infekcije parazita 9

3.4 Prikaz rezultata i statistička obrada 9

4 Rezultati 10

4.1 Prisutnost parazita 10

4.2 Prevalenca i intenzitet infekcije 12

5 Rasprava 14

6 Zaključak 16

7 Literatura 17

8 Popis slika 26

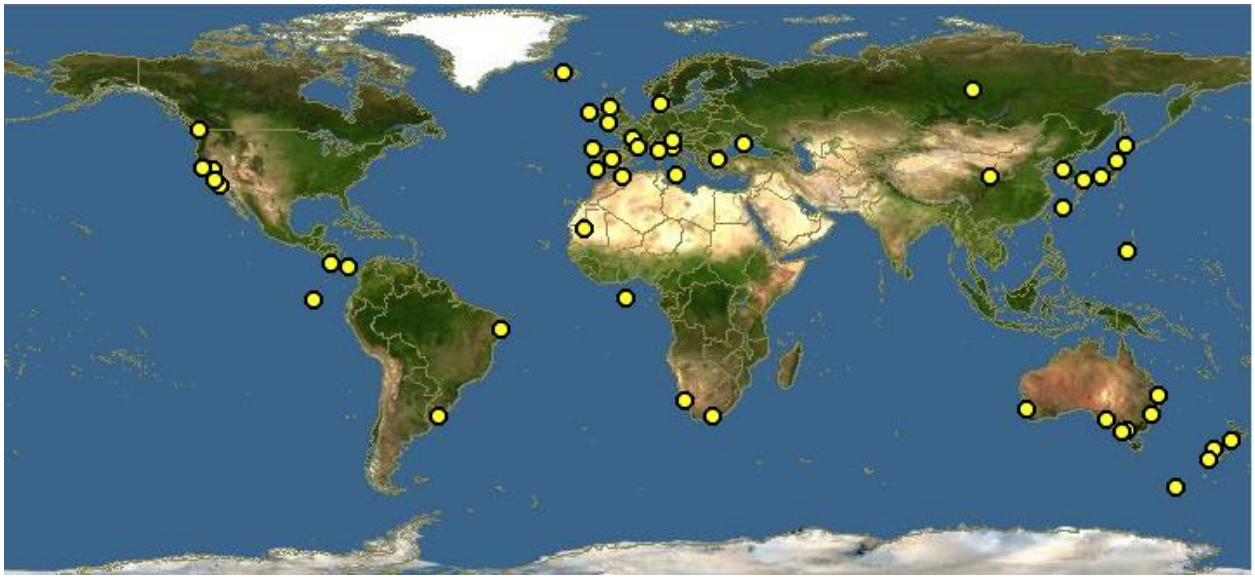
9 Sažetak 27

10 Abstract 28

1 UVOD

1.1 Dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819.)

Mediteranska dagnja je vrsta školjkaša koja spada u porodicu Mytilidae, red Mytilioida, koljeno Mollusca. Široko je rasprostranjeni organizam koji se nativno nalazi na obalama Hrvatske, Italije, Grčke, Portugala, Španjolske, Turske, Algerije, Maroka, Rumunjske, Bugarske i Rusije. Kao invazivna vrsta pojavljuje se na obalama Japana, Sjeverne i Južne Koreje kao i u Africi te u Sjevernoj, Srednjoj i Južnoj Americi (Slika 1.) *(http://www.iucngisd.org)*.



Slika 1. Mapa rasprostranjenosti *Mytilus galloprovincialis* (*https://www.gbif.org*)

Najčešće se nalaze u zonama plime i oseke (0 - 3 m) kamenitih ili šljunčanih dna gdje postoji veći protok vode, a može obitavati i na pješčano-muljevitim dnima područja s povećanom količinom slatke vode kao što su izvori i ušća rijeka (Carlton, 1992). Za podlogu se pričvršćuje bisusnim nitima te se može pronaći i na plutačama, sidrenim konopima i usidrenim brodovima, kao i na podmorskim temeljima raznih građevina, na konstrukcijama naftnih platformi te kavezima za uzgoj riba, na dubinama preko 20 metara (Kovačić, 2015).

Dagnja se sastoji od dviju gotovo jednakih ljuštura glatke površine na kojima su vidljive linije rasta. Anteriorni rub ljušture završava šiljastim i malo savijenim umbom na kojem se nalaze bisusne niti, dok je s posteriorne strane zaobljena. Uobičajena duljina dagnje iznosi od 5 do 8 cm no mogu narasti i do 15 cm. Boja ljušture varira od tamno plave ili smeđe do crne *(http://www.iucngisd.org)*. S unutarnje strane ljuštura nalazi se tkivo plašta unutar kojeg trepetljike usmjerevaju hranjive čestice prema škrgama, a otpadne tvari prema crijevnom otvoru (Seed i Suchanek, 1992). U plaštu se također pohranjuju i rezervne hranjive tvari (Gabbott, 1983). Mišić aduktor omogućuje zatvaranje i otvaranje ljuštura zbog čega je dagnja prilagođena životu u uvjetima povremenog izranjanja, izlaganja visokim temperaturama i promjenama saliniteta (Seed, 1976). Dagnja kontinuirano filtrira morsku vode pomoću škrga. One, osim što omogućavaju proces disanja, imaju ključnu ulogu u hranjenju. Dagnja se hrani suspendiranim česticama detritusa, bakterija, fitoplanktona i mikrozooplanktona, razgrađenom organskom tvari i anorganskim česticama (Jørgensen, 1990). Izvanstanična probava odvija se u lumenu probavila zahvaljujući brojnim probavnim enzimima, dok se unutarstanična probava odvija u probavnoj žlijezdi (Owen, 1972). Probavna žlijezda građena je od probavnih tubula koje sadrže probavne i bazofilne stanice. Probava se odvija u lizosomima probavnih stanica nakon čega se krajnji produkti probave apsorbiraju u hemolimfu, a neprobavljeni produkti se nakupljaju u rezidualna tjelešca (Bayne, 1976).

Zbog sjedilačkog načina života i kontinuiranog filtriranja, u tkivima dagnje se nakupljaju onečišćivala iz morske vode. Dagnja je otporna je na široki raspon okolišnih uvjeta što uključuje povećane koncentracije raznih tipova onečišćenja. Mjerenjem koncentracija onečišćivala u tkivima dagnji omogućuje se procjena biološke dostupnosti onečišćivala (Da Ros i sur., 2000; Zorita i sur., 2007).

1.2 Paraziti dagnje

Postoji puno vrsta parazita koji mogu utjecati na morske školjkaše i izazvati opadanje bilo prirodnih populacija ili populacija iz uzgoja (Özer, 2014). Prema istraživanju Francisco-a i sur. (2010) dagnja *Mytilus galloprovincialis* može biti inficirana nekolicinom parazita.

Protist *Marteilia refringens* pripada koljenu Paramyxea. Ovaj parazit odgovoran je za marteliozu kod školjkaša *Ostrea edulis, Mytilus edulis* i *M. galloprovincialis* (Longshaw i sur., 2001) Martelioza je direktno povezana s visokom temeraturom mora i niskim salinitetom. Protist *M. refringens* može preživjeti izvan domaćina od nekoliko dana do nekoliko tjedana ovisno o uvjetima u okolišu (Comps, 2012).

Haplosporid roda *Minchinia* je česti parazit kamenica ali je pronađen i u dagnjama *M. galloprovincialis* na obalama Francuske (Francisco i sur., 2010). Infekcija ovim parazitom uzrokuje premještanje i razaranje stanica domaćina (Ball, 1981).

Protist *Steinhausia mytilovum* globalno je rasprostranjeni mikrosporidijski parazit koji inficira oocite dagnji *M. edulis* i *M. galloprovincialis* (Comtet i sur., 2004). Može uzrokovati štetu na ženskim gametama, ali nije smrtonosan za domaćina (Bhaby, 2014).

Parazit *Prosorhynchus crucibulum* napada reproduktivna tkiva školjke što dovodi do parazitske kastracije[1] (Francisco i sur., 2010).

Prema radu Topić Popović i Teskeredžić (1999) kopepod *Mytilicola intestinalis* uzrokuje metaplastičke promjene u epitelu crijeva školjke, a može inficirati i probavnu žlijezdu, koja tada mijenja boju u crvenu (Moore i sur., 1978). Infekcije su ponekad i do 100%, a moguće je izdvojiti čak do 30 kopepoda iz jedne dagnje (Kinne, 1983). Bolest je najizraženija u proljeće i jesen (Figueras i Figueras, 1981). Unosom kamenice *Crassostrea gigas* u Francusku unesen je i kopepod *Mytilicola orientalis*, koji uzrokuje metaplastične promjene u crijevu domaćina slične onima koje uzrokuje *M. intestinalis*, često uz fibrozu vezivnoga tkiva. Oba nametnika mogu uzrokovati začepljenje lumena crijeva ili oštećenje crijevne stijenke (Kinne, 1983).

Protist *Urastoma cyprinae* pronađena je u školjkašima *Crassostrea virginica*, *M. edulis, M. galloprovincialis,* i *O. edulis* širom svijeta. U kronično zaraženim

[1] Stanje definirano kao totalna ili parcijalna redukcija produkcije gameta (Sullivan i sur., 1985).

jedinkama, protist *U. cyprinae* reducira ishranu i uzrokuje dezorganizaciju strukture škrga (Francisco i sur., 2010).

Parazit *Nematopsis* je uobičajen među morskim školjkašima. Većom infekcijom ovim protistom može doći do kompletne destrukcije škrga, degeneracije stanica domaćina, a na kraju I do smrti domaćina (Azevedo i Cachola, 1992). U malom broju parazit *Nematopsis* može uzrokovati lokalnu hemocitnu reakciju i promjenu u morfologiji škrga (Bower i McGladdery, 1994). Sprague (1970) je zaključio da parazit *Nematopsis* nema učinka na odraslom domaćinu čak i kada je prisutan u velikom broju, odnosno može oslabiti samo juvenilne jedinke teškom infekcijom škrga ili plašta (Sprague i Orr, 1995).

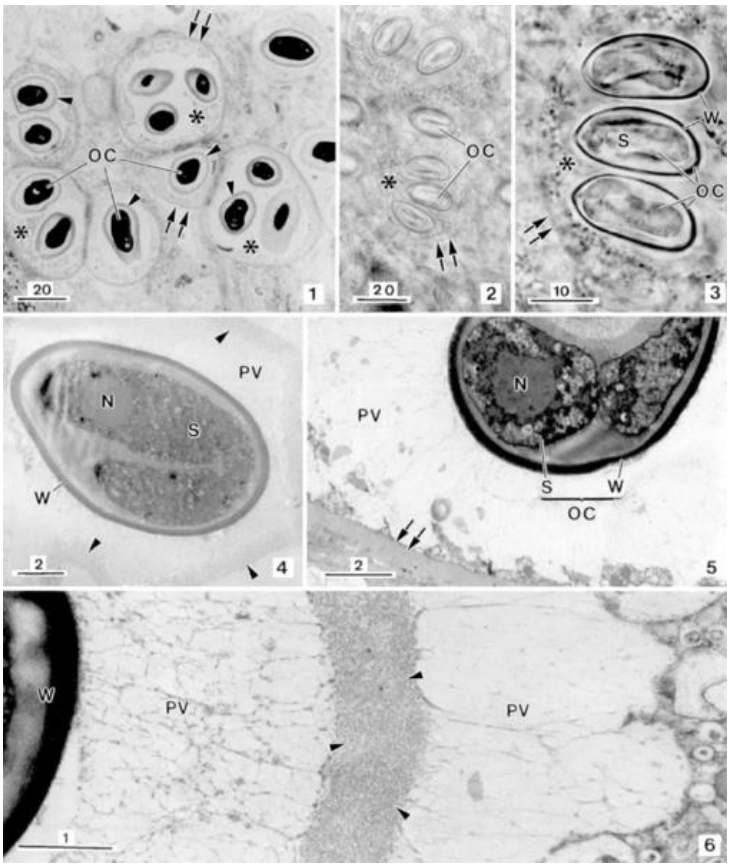
1.3 Rod Nematopsis

Nematopsis je rod eukariotskih, protozoičkih, gregarinskih parazita koji uzrokuju bolesti kod divljih i uzgojnih školjkaša i rakova (Azevedo i sur., 2004; Bower,1996; Brito i sur., 2010; Soto i sur., 1996; Tuntiwaranuruk i sur., 2004). Gregarine se razlikuju od Coccidia i Adeledis po genskim sekvencama RNA (Carreno i sur., 1999), a *Nematopsis* se razlikuje od bliskog roda *Porospora* po morfologiji oocista (Prasadan i Janardanan, 2001). Parazit *Nematopsis* utječe na široki raspon komercijalno važnih morskih organizama mjenjajući domaćina tijekom svog životnog ciklusa (Azevedo i sur., 2004; Bower, 1996; Brito i sur., 2010; Lauckner, 1983; Tuntiwaranuruk i sur., 2004). To je parazit kojemu su školjke intermedijarni domaćini, a rakovi konačni domaćini (Lauckner, 1983). Dobio je sve veću pozornost otkad je njime pogođena industrija akvakulture. Istraživanjem oocista, faza učahurivanja zigota u životnom ciklusu sprorozoita, parazita *Nematopsis* u morskim organizmima pronađene su razvojne faze njihovog životnog ciklusa no manje je saznanja o njihovim genetskim i metaboličkim podacima kao i o jačini utjecaja na morske ekosustave.

Umjesto genomskih podataka, nekoliko faktora se koristi kako bi se razlikovale vrste unutar roda *Nematopsis*. To su veličina oociste (Azevedo i sur., 2004), prisutnost mikrofibrilne strukture u oocisti (Azevedo i sur., 2004; Padovan i sur., 2003), specifičnost domaćina i raspodjela unutar domaćina (Sprague i sur., 1955).

Jedna fagocita inficiranog tkiva domaćina može sadržavati brojne oociste, koje imaju zid i dodatno su zaštićene unutar parazitske vakuole u citoplazmi (Azevedo i sur.,

2004). Neke vrste imaju mrežu mikrofibrila koja se projektira s vanjske strane zida oociste do parazitske vakuole (Azevedo i sur., 2004; Padovan i sur., 2003). Oocista je apikalna, a organeli su koncentrirani na šiljastom kraju koji sadrži otvor koji se zove mikrofilni sporozit. On razlikuje rod *Nematopsis* od roda *Porospora* koji imaju više sporozita unutar svake oociste (Padovan i sur., 2003) (Slika 2.). *Nematopsis* ima životni ciklus koji je tipičan potkoljenu Apicomplexian koji uključuje formaciju gameta (spolnih stanica), razvoj zaštitnih spora i razmnožavanje kroz aseksualnu reprodukciju. Točna morfologija svake faze varira po vrstama (Prasadan i Janardanan, 2001).



Slika 2. Parazit *Nematopsis gigas* n. sp. smješten u tkivu plašta gastropoda *Nerita ascensionis.* Sekcije prikazuju fagocite domaćina (*) u kojima se nalaze oociste (OC). Vrhovima strelica označena je gusta struktura smještena između oociste i periferne parazitske vakuole (PV) dok je dvostrukim strelicama označen zid fagocite. N označuje jezgru, S sporozoit, W zidove oociste (Azevedo i Padovan 2004).

Zbog parazitske prirode, kultura *in vivo* tkiva domaćina nedovoljno je korištena u korist *in situ* studija. Iako je manjak istraživanja o probavnom metabolizmu unutar cijelog Apicomplexa razreda, istraživanje Luz i sur. (2015) pokazalo je da prisutnost

parazita roda *Nematopsis* mijenja metabolizam masti u kamenici *C. virginia*. Ovo sugerira da su gregarine, i vjerovatno eugregarine, sposobne za potpuni oksidacijski metabolizam i pokazuju visoku metaboličku raznolikost unutar domaćina. Paraziti Apicomplexa zahtijevaju visoke stope fosfolipidne biosinteze za održavanje infektivnih stanica (Coppens i sur., 2005). Parazit *Nematopsis* je, zbog toga, razvio jedinstvene sekretne organele nazvane roptri za skladištenje fosfolipida i kolesterola. Smatra se da roptri izdvajaju fosfolipide i kolesterol za brze mitotičke događaje i raspršivanje novih zaraženih stanica (Bradley i sur., 2004).

Stupanj oštećenja domaćina parazitom roda *Nematopsis* je još uvijek u fazi istraživanja. U istraživanju Sota i sur. (1892) otkrilo se da su školjkaši *G. depressa*, *M. galloprovinciallis*, *S. vagina*, i *T. rhomboideus* bili aktivno zaraženi parazitom *Nematopsis* sp. Pojedine školjke mogu biti vrlo jako inficirane parazitima gregarina nakon čega se razvijaju lokalne lezije u unutarnjim organima, osobito u škrgama (Lauckner, 1983). Kako to lokalno oštećenje može utjecati na integritet populacije nije poznato, kao niti stupanj do kojeg parazit *Nematopsis* utječe na domaćine. Studije su pokazale da parazit *Nematopsis* prevladava u jesen (Özer i Güneydag, 2015) za vrijeme jutra i poslijepodneva (Gutiérrez-Salazar, 2011). Ta otkrića dovela su do pitanja da li temperature mora utječu na njegovu prevalencu.

Iako vrste roda *Nematopsis* nisu humani patogeni, pronađeni su u raznim školjkama koje su od komercijalne važnosti (Azevedo i sur., 2004; Bower, 1996; Brito i sur., 2010; Lauckner, 1983; Tuntiwaranuruk i sur., 2004). Još nije istraženo može li parazit *Nematopsis* uzrokovati ili sudjelovati u velikom pomoru domaćina (Nascimento i sur., 1986). Imunološki odgovor domaćina je neuspješan jer parazit živi unutar fagocita domaćina (Padovan i sur., 2003). Paraziti su najzastupljeniji u hepatopankreasu, aduktoru, škrgama, plaštu i gonadama (Meissner i sur., 2002; Ménard, 2001) no lokacija infekcije ovisi o staništu (Brito, 2010).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

1) Utvrditi prisutnost parazita *Nematopsis* sp. u krioprerezu probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis*

2) Odrediti intenzitet infekcije parazitom *Nematopsis* sp.

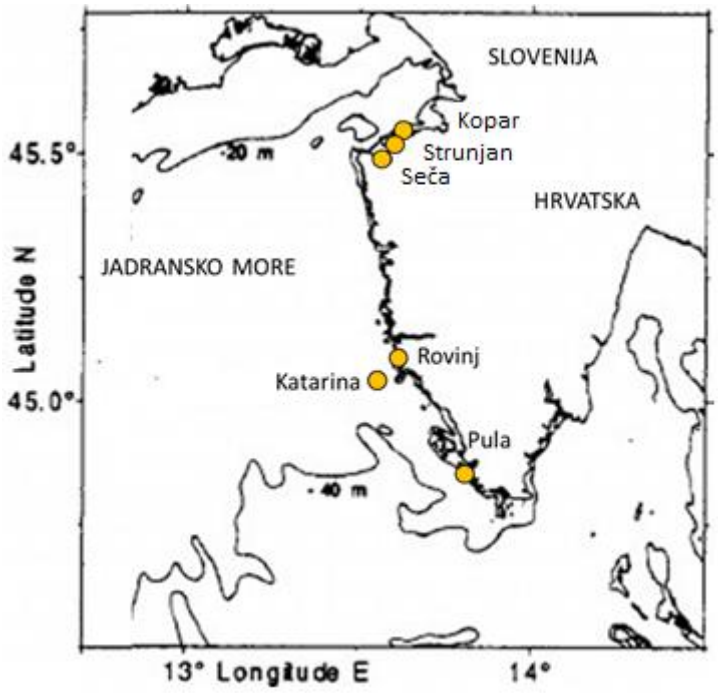
3) Usporediti infekciju parazita *Nematopsis* sp. na različitim mjestima uzorkovanja

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Područje istraživanja i uzorkovanje školjkaša

Uzorci dagnje *M. galloprovincialis* Lamarck 1819 (N=10), sakupljani su u veljači i travnju 2014. godine na šest postaja u sjevernom Jadranu: ACI Marina Pula, otok Katarina, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča i Kopar (Slika 3.). Postaja Katarina nalazi se na zapadnoj obali istarskog poluotoka, te je udaljena 2 km zračne linije od Rovinja. U blizini postaje Sv. Katarina nema izvora onečišćenja, stoga se smatra kontrolnom postajom u istraživanju. Unutar urbaniziranog područja Rovinja nalazi se postaja Rovinj, mjesto koje je pod utjecajem vode porijeklom iz tvornice prerade ribe Mirna i pristaništa brodova. Postaja ACI marina Pula je pod utjecajem luke i brodogradilišta u Puli (Bihari i sur., 2004).

Postaja Strunjan je kontrolna postaja u Sloveniji koja se nalazi na uzgajalištu dagnji (Ramšak i sur., 2012). Postaja Seča nalazi se u Piranskom zaljevu, također na području uzgajališta. Postaja Kopar okružena je turističkim naseljima, te je pod utjecajem industrijskih otpadnih voda i luke.



Slika 3. Mjesta uzorkovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu.

Po deset jedinki dagnji prosječne duljine od 5 ± 1 cm, uzorkovane su iz prirodnih staništa. Jedinke su nakon uzorkovanja, u spremnicima s morskom vodom, prenesene u laboratorij gdje se unutar jednog sata od uzorkovanja izoliralo tkivo.

3.2 Izolacija i priprema tkiva

Tkivo probavne žlijezde i škrga isječeno je škaricama. Polovice probavne žlijezde naglo su smrznute u N-heksanu, prethodno ohlađenom u tekućem dušiku. Tako obrađeni uzorci pohranjeni su na -80 ºC do pripreme histoloških preparata.

Prije kriosekcije[2], uzorci su pričvršćeni za nosač mikrotoma i uklopljeni u medij O.C.T. ^{TM} (Optimum Cutting Temperature) (Microm Inc. GmbH, Germany) (Kovačić, 2015). Uzorci žlijezdi smješteni su na nosač kriotoma (Zeiss Hyrax C 50, Microm GmbH, Germany) prethodno ohlađenim na -30 ºC. Za pojedini uzorak od pet žlijezda pripremljeni su preparati prereza debljine 10 µm. Smrznuti poprečni prerezi probavnih žlijezdi nanešeni su na predmetno stakalce zagrijano na sobnu temperaturu. Preparati su bojani otopinom hematoksilina i eozina (Sigma-Aldrich, USA) pri sobnoj temperaturi. Nakon bojanja, preparati su uklopljeni u glicerol želatinu (Sigma - Aldrich, USA).

3.3 Identifikacija i određivanje intenziteta infekcije parazita

Termin "infekcija" organizma koristi se prema Saffo i sur. (1992) za sve organizme bilo paraziti i/ili endobionti. Identifikacija parazita procijenjena je na svjetlosnom mikroskopu Nikon-SA povezanom s CCD kamerom Ikegami ICD-803P (Nikon, UK). Prevalenca i intenzitet infekcije računa se prema radu Bush i sur. (1997): prevalenca (%) kao broj zaraženih školjkaša u odnosu na ukupan broj promatranih školjkaša; a intenzitet infekcije kao broj parazita pronađenih u inficiranim školjkama.

3.4 Prikaz rezultata i statistička obrada

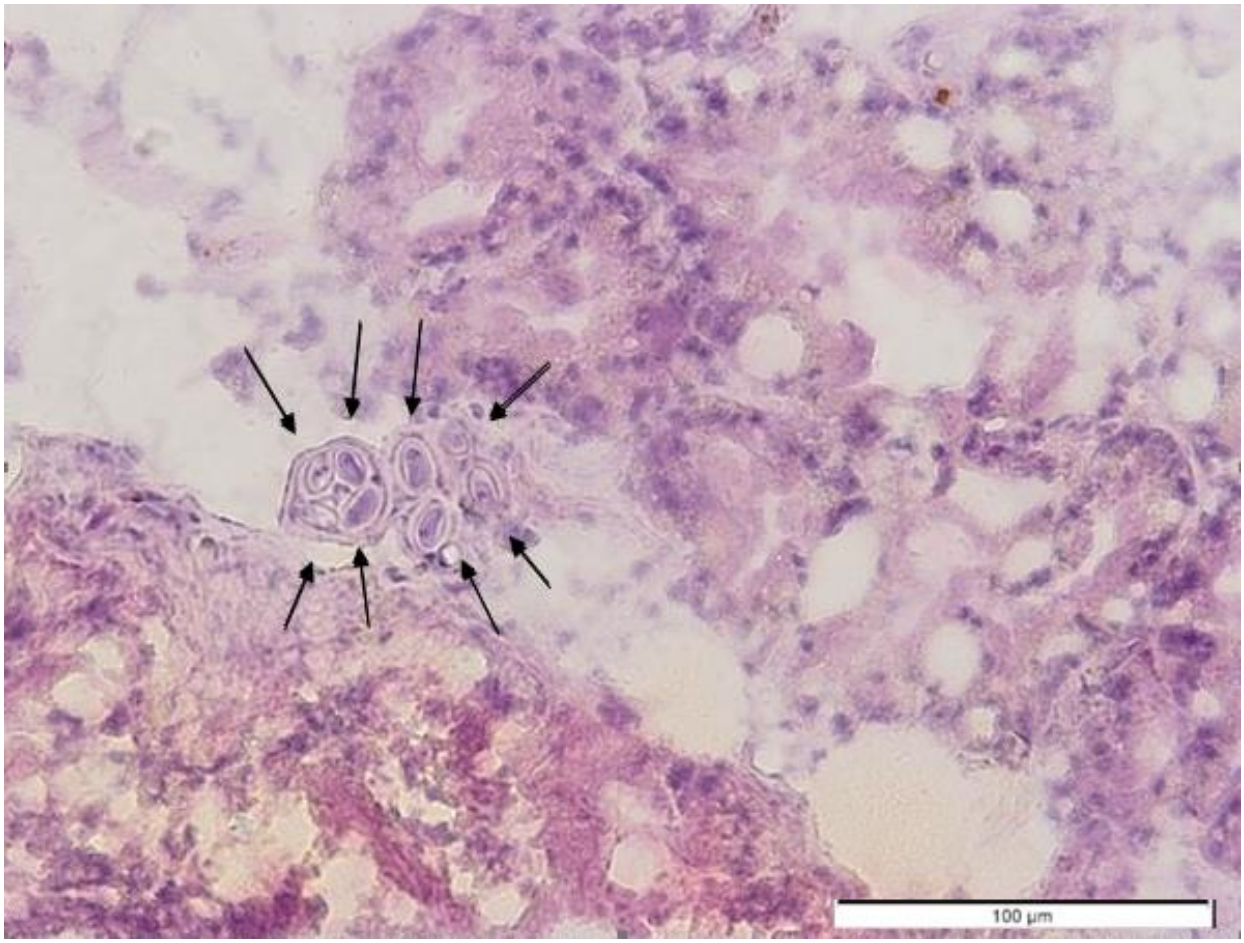
Ukupan broj, intenzitet infekcije i prevalenca gregarina *Nematopsis* sp. izračunata je u Microsoft Excel 2016. Statistička obrada rezultata izvršena je u program Statistica 9.0. Statistička razlika između prevalence na postajama u veljači i travnju računata je pomoću Hi-kvadrat testa, a statistička razlika između ukupnog broja i intenziteta infekcije računata je pomoću Kruskal-Wallis testa.

[2] Proces sekcije uzorka pomoću kriotoma (Dimitriatis i sur. 2004).

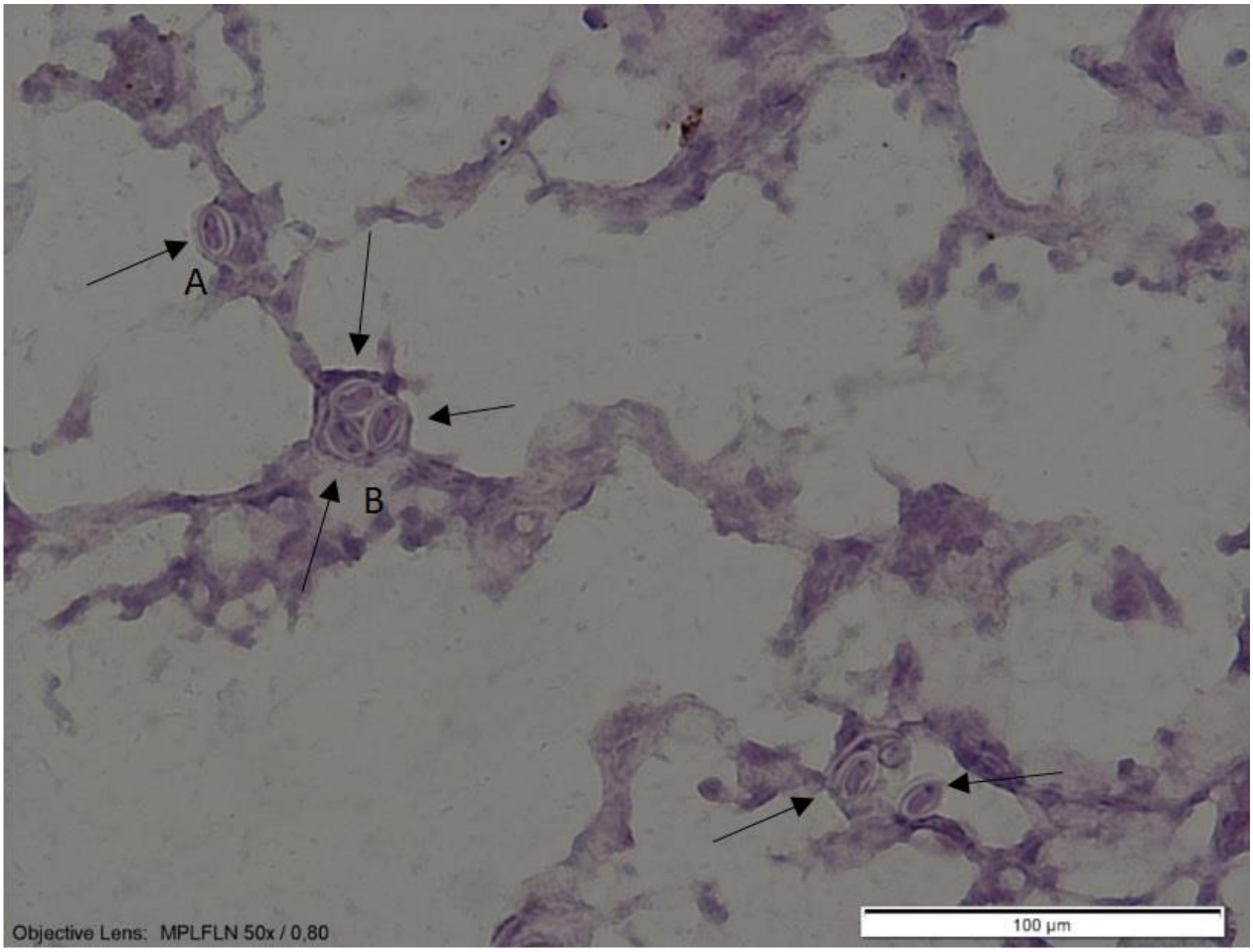
4 REZULTATI

4.1 Prisutnost parazita

Ukupno je uzorkovano 120 dagnji *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Histološkim pregledom uzoraka tkiva probavne žlijezde dagnje pronađene su elipsoidne monozoične oociste s debelim hijalinskim zidom karakteristične za rod *Nematopsis* (Slika 4.). Oociste se nalaze unutar fagocita izolirane (Slika 4, Slika 5.A) ili agregirane grupe od 1 - 4 oociste po hemociti (Slika 4, Slika 5.B). Svaka oocista sadrži po jedan crvoliki sporozoit.



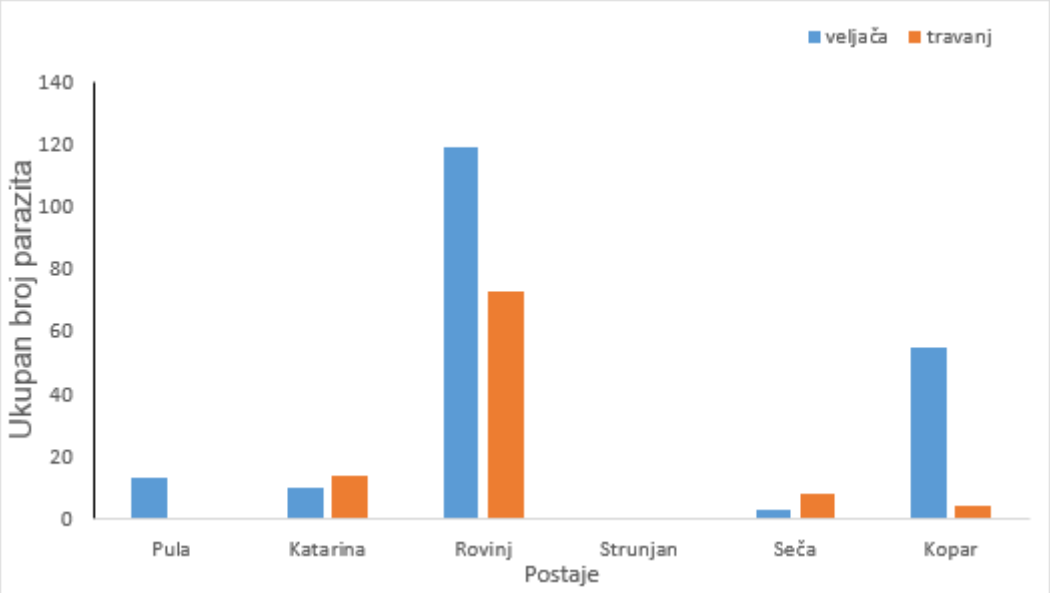
Slika 4. *Nematopsis* sp. (označen strelicama) u probavnoj žlijezdi *Mytilus galloprovincialis.*



Slika 5. Parazit *Nematopsis* sp. (označeni strelicama) u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis*. **A** prikazuje izoliranu oocistu parazita *Nematopsis* sp. **B** prikazuje nakupinu od 3 oociste *Nematopsis* sp.

Postaja s najviše pronađenih parazita je Rovinj koja broji 192 pronađena parazita *Nematopsis* sp., od čega 119 u veljači i 73 u travnju (Slika 6.). Zatim slijedi postaja Kopar s pronađenih 59, odnosno 55 parazita u veljači i 4 u travnju. Sljedeća je Katarina koja broji 24 odnosno 10 parazita u veljači i 14 u travnju, Pula kod koje je *Nematopsis* sp. pronađen samo u veljači i broji 13 jedinki te Seča s 11 pronađenih nametnika: 3 u veljači i 8 u travnju. Na kontrolnoj postaji Strunjan parazit *Nematopsis* sp. nije pronađen u ispitivanim organizmima.

Između postaja ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju ispitivanih nametnika *Nematopsis* sp. (Kruskal-Wallis test, $H = 2,10$, $p = 0,14$), niti između veljače i travnja u ispitivanim uzorcima (Kruskal-Wallis test, $H = 0,41$, $p = 0,51$).



Slika 6. Ukupan broj parazita *Nematopsis* sp. u dagnjama uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja

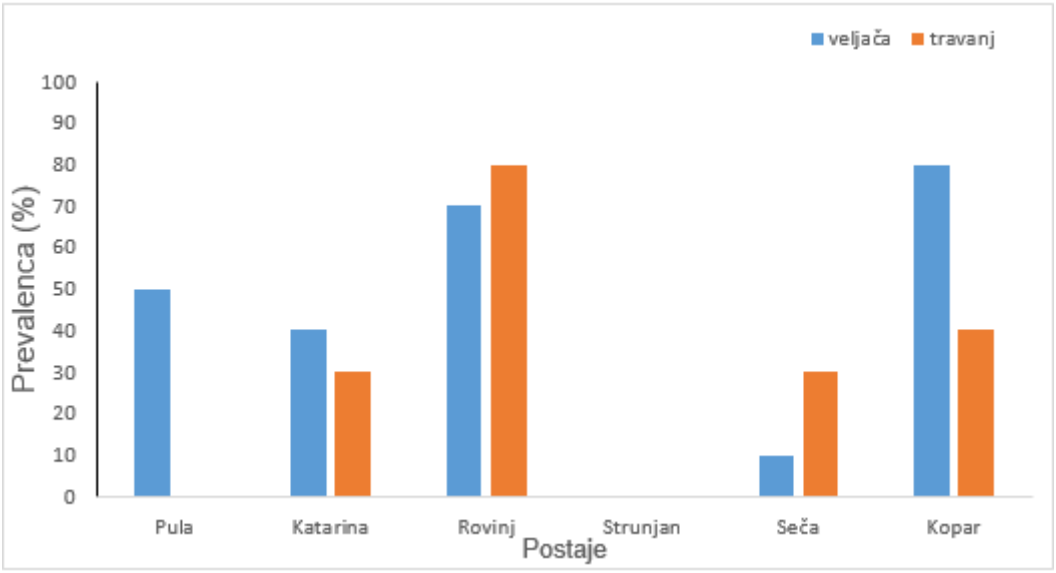
4.2 Prevalenca i intenzitet infekcije

Izračunata je prevalenca i intenzitet infekcije povezan s područjem i vremenom uzorkovanja. Na Slici 7. prikazana je prevalenca parazita *Nematopsis* sp. na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja. Postaja s najvećom prevalencom *Nematopsis* sp. u veljači je Kopar s 80%, zatim slijedi Rovinj sa 70%, Pula s 50%, Katarina s 40% te na kraju Seča s 10%. Postaja s najvećom prevalencom *Nematopsis* sp. u travnju je Rovinj s 80%, zatim slijedi Kopar s 40% te Katarina i Seča s 30%.

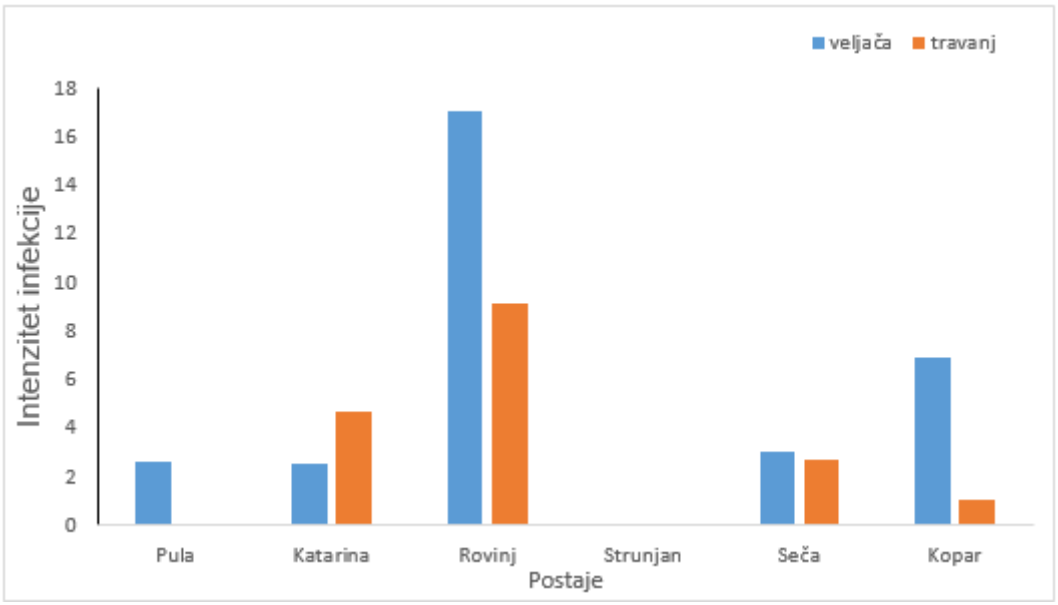
Između postaja postoji statistički značajna razlika u prevalenci nametnika *Nematopsis* sp. (Hi - kvadrat test, X2 = 5,33, p = 0,02).

Na Slici 8. prikazan je intenzitet infekcije *Nematopsis* sp. u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja. Postaja s najvećim intenzitetom infekcije u veljači je Rovinj (17.00), zatim Kopar (6.88), Seča (3.00), Pula (2.60) te Katarina (2.50). Postaja s najvećim intenzitetom infekcije u travnju je Rovinj (9.13), zatim Katarina (4.67), Seča (2.67) te Kopar (1.00).

Između postaja ne postoji statistički značajna razlika u intenzitetu infekcije parazitom *Nematopsis* sp. (Kruskal-Wallis test, H = 0,93, p = 0,33).



Slika 7. Prevalenca *Nematopsis* sp. u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja



Slika 8. Intenzitet infekcije parazitom *Nematopsis* sp. u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja

5 RASPRAVA

Bolesti i infekcije parazitima u populacijama divljih i uzgojenih školjki obično se procjenjuju pomoću parafinskih sekcija, što je standardna metoda za histološku procjenu infekcija parazitima. U ovom ispitivanju identificirali smo parazite roda Nematopsis u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis*, koristeći kriosekcije. Postupak kriosekcije ne uključuje dehidraciju, koja je tipična za druge postupke sekcioniranja, pa se tako smanjuje vrijeme promatranja uzoraka. Brzo zamrzavanje reducira stvaranje kristala leda i smanjuje morfološku štetu. Isto tako, postupkom kriosekcije, tkivo je bliže prirodnom stanju. Zamrznuti dijelovi mogu se koristiti za različite dijagnoze kao što su imunohistokemija, enzimska detekcija i *in situ* hibridizacija. To može biti korisno u marikulturi gdje je otkrivanje parazita potrebno za identifikaciju vrsta u skladu sa zakonodavstvom (Kovačić i Pustijanac, 2017).

Parazit *Nematopsis* sp. vidljiv je u sekciji kao brojne oociste smještene u fagocitama domaćina (Azevedo i Padovan, 2004). Odstupanja u prevalenci *Nematopsis* sp. moguće je pripisati razlici u geografskom položaju, domaćinima, sezonskim fluktuacijama u temperaturi i salinitetu te u tipu staništa (Kovačić i Pustijanac, 2017). Prema mnogim istraživanjima (Aarab i sur., 2008; Bignell i sur., 2008; Bignell i sur., 2011; Morley, 2010), zabilježena je povezanost parazitske brojnosti s mjestima zagađenja jer su dagnje pod fiziološkim stresom i kao takve podložne infekcijama. Dagnje uzorkovane s mjesta zagađenja kao što su marine ili lučice, imale su veće prevalence parazita *Nematopsis* sp. od dagnji uzorkovanih na mjestima bez takvih utjecaja i na mjestima akvakulture.

Postaja Kopar je blizu luke Kopar i karakterizira ju povišena koncentracija zagađivala u organizmima i sedimentu u usporedbi s uzgajalištima školjaka (Ramšak i sur., 2012, Tsangaris i sur., 2016). Usporedbom tih podataka s rezultatima ovog istraživanja vidljivo je da dagnje s postaje Kopar imaju prevalence *Nematopsis* sp. od 80% u veljači (int. inf. 6.88) i 40% u travnju (int. inf. 1.00) za razliku od postaje Seča koja se nalazi na području uzgajališta te broji manju prevalencu parazita od 10% u veljači (int. inf. 3.00) i 30% u travnju (int.inf. 2.67) i postaje Strunjan, koja je područje uzgajališta dagnji, gdje nisu pronađeni paraziti i / ili patogeni (Slika 7., Slika 8.). ACI Pula i ACI Rovinj zabilježili su povišenje onečišćivala u bioti i sedimentu

(Kanduč i sur., 2018) pa stoga usporedbom tih podatka s rezultatima ovog istraživanja, vidljivo je da postaje Rovinj i Pula imaju veću prevalencu parazita od postaje Sv. Katarina koja se zbog manjka onečišćivala smatra kontrolnom postajom. Točnije, prevalenca nametnika *Nematopsis* sp. kod postaje Rovinj u veljači iznosi 70% (int. inf. 17.00) dok ista u travnju iznosi 80% (int. inf. 9.13), kod postaje Pula 50% u travnju (int. inf. 2.60), te kod Svete Katarine 40% u veljači (int. inf. 2.50) i 30% u travnju (int. inf. 4.67) (Slika 7., Slika 8.).

Prirodne karakteristike sjevernog Jadrana uz aktivnosti akvakulture, kao što je prikupljanje dagnji iz prirodnih područja, mogla bi imati rizik za širenje parazita u tako malim, zaštićenim obalnim područjima kao što su Strunjanski i Piranski zaljev. Morske struje teku s juga, uz istarsku obalu, te skreću zapadno uzduž slovenske obale, I na taj način mogu prenesti parazite prema uzgajalištima sjevernoga Jadrana. Osim morskih struja, na širenje parazita mogu utjecati i morske mijene tako što prenesu parazite s domaćina koji živi na dnu mora do školjaka. Različiti stresori u takvim obalnim zajednicama zajedno s različitim vrstama translokacije vrsta kao što su balastne vode, disperzija vjetrom i klimatske promjene mogu dodatno utjecati na dinamiku parazita, te je stoga od velike važnosti konstantno provoditi mjerenja kako bi se uklonila mogućnost zaraze parazitima (Kovačić i sur., 2018).

6 ZAKLJUČAK

Dobivenim rezultatima i njihovom obradom može se zaključiti slijedeće:

1) Histološkim pregledom uzoraka tkiva probavne žlijezde dagnje pronađene su elipsoidne oociste s crvolikim sporozoitom u lumenu karakteristične za rod *Nematopsis*

2) Intenzitet infekcije je varijabilan, s <9 oocista po sekciji u većini slučajeva, a maksimumom od 17 oocista

3) Dagnje uzorkovane s onečišćenih postaja imaju veće prevalence parazita *Nematopsis* sp. od dagnji uzrokovanih na mjestima bez takvih utjecaja i na uzgajalištima

7 LITERATURA

Aarab N., Pampanin D.M., Nævdal A., Øysæd K.B., Gastaldi L., Bechmann R.K. (2008.) Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). Marine Pollution Bulletin, 57(6–12), 569-574.

Azevedo C. i Padovan I. (2004.) "*Nematopsis gigas* n. sp.(Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil." Journal of Eukaryotic Microbiology 51(2): 214-219.

Azevedo C. i Cachola R. (1992.) Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. Diseases of Aquatic Organisms 14: 69–73.

Ball S.J. (1981.) Spore Structure of *Minchinia chitonis.* Marine Fisheries Review 43(10) Department of Biology. North East London Polytechnic. Romford Road, London E15 4LZ, Engleska.

Bayne B.L. (1976.) Marine Mussels, Their Ecology and Physiology. Cambridge University
Press.

Bignell J.P., Dodge M.J., Feist S.W., Lyons B., Martin P.D., Taylor N.G.H., Stone D., Travalent L., Stentiford G.D. (2008.) Mussel histopathology: effects of season, disease and species. Aquatic Biology, 2(1): 1-15.

Bignell J.P., Stentiford G.D., Taylor N.G.H. i Lyons B.P. (2011.) Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. Marine Environmental Research, 72(1–2): 25-32.

Bihari N., Mičić M., Fafanđel M., Hamer B., Jakšić Ž. i Batel R. (2004.) Seawater quality of Adriatic coast, Croatia, based on toxicity, genotoxicity and DNA integrity assay. Acta Adriatica, 45(1): 75-81.

Bhaby S. (2014.) *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus galloprovincialis* (The Case of Atlantic Northwest Africa-Morocco). British Microbiology Research Journal 5(3): 237-244.

Bush A.O., Aho J.M., Kennedy C.R. (1990.) Ecological versus phylogenetic determinants of helminth parasite community richness. Evolutionary Ecology 4: 1–20.

Bower, S.M. (1996): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Gregarine Disease of Penaeid Shrimp. Canadian Department of Fisheries and Oceans (September 1996).

Bower S.M. i Mcgladdery S.E. (1994.) Synopsis of infection diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annual Review of Fish Diseases *4:* 1–199.

Bradley J.P., Ward C., Cheng S.J., Alexander D.L., Coller S., Coombs G.H., Dunn J.D., Ferguson D.J., Sanderson S.J., Wastling J.M., Boothroyd J.C. (2004.) Proteomic Analysis of Rhoptry Organelles Reveals Many Novel Constituents for Host-Parasite Interactions in *Toxoplasma gondii.* The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Brito L.O., Nascimento J.C., Barros A.O.G. (2010.) Presence of *Nematopsis* sp. (Protozoa, Apicomplexa) in the oyster, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), cultivated in the state of Pernambuco, Brazil. World aquaculture.

Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R. (1999.). Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 85: 899–904.

Carlton J.T. (1992.) Introduced Marine and Esturine Mollusks of North America: An End-of-the-20th-century Perspective. *Journal of Shellfish Research 11*(2): 489-505.

Comps M. (2012.) Marteiliosis of oysters caused by *Marteilia refringens*. ICES. 2012. Revised and updated by Tristan Renault and Susan E. Ford. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish.

Comtet T., Garcia C., Coguic Y.L., Joly J.P. (2004.) First record of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus* sp. (Bivalvia: Mytilidae) from France. Diseases of Aquatic Organisms. 58: 261–264

Coppens I. i Vielemeyer O. (2005.) "Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities." International journal for parasitology 35: 597-615.

Da Ros L., Moschino V., Guerzoni S., Halldórsson H.P. (2007.) Lysosomal responses and metallothionein induction in the blue mussel *Mytilus edulis* from the south-west coast of Iceland. Environment International 33: 362-369.

Da Ros L., Nasci C., Marigomez I., Soto M. (2000.) Biomarkers and trace metals in the

digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. Marine Environmental Research 50: 417-423.

Figueras A. i Figueras A.J. (1981.): *Mytilicola intestinalis* Steuer, in cultivated mussels in the Ria of Vigo. Invest. Pesq. Barc., 45(2): 263-278.

Francisco J.C., Almeida A., Castro A.M., Pina S., Russell-Pinto F., Rodrigues P. i Santos M.J. (2010.) Morphological and molecular analysis of metacercariae of *Diphtherostomum brusinae* (Stossich, 1888) Stossich, 1903 from a new bivalve host *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Helminthology, page 1 of 6 Cambridge University Press.

Francisco J.C., Hermida M.A., Santos M.J. (2010.) Parasites and Symbionts from *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) (Bivalves: Mytilidae) of the Aveiro Estuary Portugal. Journal of Parasitology, 96(1):200-205.

Gabbott P.A. (1983.) Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. The mollusca: Their Ecology and Physiology 2: 165-217.

Gutiérrez-Salazar G.J., Molina-Garza Z.J., Hernández-Acosta M., García-Salas J.A., Mercado-Hernández R., Galaviz-Silva L. (2011.). Pathogens in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) and their relationship with physicochemical parameters in three different culture systems in Tamaulipas, Mexico. Aquaculture, 321(1–2): 34–40.

Jørgensen C.B. (1990.) Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen.

Kanduč T., Šlejkovec Z., Falnoga I., Mori N., Budič B., Kovačić I., Pavičić-Hamer D., Hamer B. (2018.) Environmental status of the NE Adriatic Sea, Istria, Croatia: Insights from mussel *Mytilus galloprovincialis* condition indices, stable isotopes and metal(loid)s. Marine Pollution Bulletin, 126: 525-534.

Kinne, O., editor (1983.): Diseases of marine animals. Volume II. Biologishe Anstalt Helgoland, Hamburg. 1038 pp.

Kovačić I. (2015.) Aktivnost kisele deoksiribonukleaze i histokemijske promjene u lizosomima kao odgovor dagnje *Mytilus galloprovincialis* na čimbenike u okolišu. Doktorska disertacija, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Kovačić I. i Pustijanac E. (2017.) Parasites and endobiotic fungi in digestive gland cryosections of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Northern Adriatic, Croatia. Oceanological and Hydrobiological Studies. 46:414.

Kovačić Ines, Pustijanac Emina, Ramšak Andreja, Šebešćen Dora, Lipić Sanja (2018.) Variation of parasite and fungi infection between farmed and wild mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) from the Adriatic Sea. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. JMBA-03-18-SIEMBS17-0073 (u postupku objavljivanja).

Lauckner G. (1983.) Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Diseases of Marine Animals. Volume 11. Bivalvia to Scaphopoda (0. Kinne edit.), Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg: 542548.

Lauckner, G. (1983.) Diseases of Mollusca: Bivalvia, in: Kinne, O. (Ed.) Diseases of marine animals: 2. Introduction, Bivalvia to Scaphopoda 477-961.

Longshaw M., Feist S.W., Matthews A.R., Figueras A. (2001.) Ultrastructural characterisation of *Marteilia species* (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. Diseases of Aquatic Organisms 44: 137–142.

Luz M.S.A. i Boehs G. (2015.) Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. Journal of Parasitology and Vector Biology 7(6): 120-128.

Meissner M., Schlüter D., Soldati D. (2002.) Role of *Toxoplasma gondii* Myosin A in Powering Parasite Gliding and Host Cell Invasion. Science: 837-840.

Ménard R. (2001.), Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. Cellular Microbiology, 3: 63–73.

Moore M. N., Lowe D. M., Gee J. M. (1978.) Histopathological effects induced in *Mytilus edulis* by *Mytilicola intestinalis* and the histochemistry of the copepod intestinal cells. J. Cons. CIEM, 38(1): 6-11.

Morley N.J. (2010.) Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. Aquatic Toxicology, 96(1): 27-36.

Nascimento I.A., Smith D.H., Kern F., Pereira S.A. (1986.) Pathological Findings in *Crassostrea Rhizophorae* from Todos Os Santos Bay, Bahia, Brazil. Journal of Invertebrate Pathology 47 (3): 340–49.

Owen G. (1972.) Lysosomes, peroxisomes and bivalves. Science Progress 60, 299-318.

Özer A. and Güneydağ S. (2014.) First report of some parasites from Mediterranean

mussel, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, collected from the Black Sea coast at Sinop. Turkish Journal of Zoology 38: 486-490.

Özer A. i Güneydağ S. (2015.) Seasonality and host-parasite interrelationship of Mytilus galloprovincialis parasites in Turkish Black Sea coasts. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 95(8): 1591–1599.

Padovan I., Corral L., Tavares L.A., Padovan P.A., Azevedo C. (2003.) Fine structure of the oocyst of *Nematopsis mytella* (Apicomplexa, Porosporidae), a parasite of the mussel *Mytella falcata* and of the oyster *Crassostrea rizophorae* (Mollusca, Bivalvia) from the northeastern Atlantic coast of Brazil. Braz J Morphol Sci. 2003; 20: 121–124.

Prasadan P.K., Janardanan K.P. (2001.) Three new species of gregarines (Apicomplexa: Sporozoea: Porosporidae) in the estuarine crabs from Kerala, India. Acta Protozoologica 40(4): 303-309.

Ramšak A., Ščandar J., Horvat M. (2012.) Evaluation of metallothioneins in blue mussel *(Mytilus galloprovincialis)* as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): a long-term field study. *Acta Adriatica*, ISSN 0001-5113, 53(1): 71-86.

Saffo M.B. (1992.) Invertebrates in endosymbiotic association. Amer. Zool.

Seed R. (1976.) Ecology. In: Bayne, B.L. Marine Mussels. Cambridge University Press,
Cambridge.

Seed R. and Suchanek T.H. (1992.) Population and community ecology of *Mytilus*, in: G.E. (Ed.), The Mussel *Mytilus:* Ecology, Physiology, Genetics and Culture, 87–169.

Soto M., Pascual S., Rodriguez H., Gestal C., Abollo E., Arias C., Estevez J. (1996.) *Nematopsis* Spp. Schneider, 1892 (Appicomplexa: Gregarinida) in Bivalve Molluscs Off Ria De Vigo (Galicia, NW Spain). Bulletin- European Association of Fish Pathologists, 16:157-160.

Sprague V. (1970.) Some protozoan parasites and hyperparasites in marine bivalve molluscs. *In* Symposium on diseases of fishes and shellfishes. Special publication, S.F. Snieszko (ed.). American Fisheries Society, Washington, DC, p. 511–526.

Sprague V. i Orr P.E. (1955.) *"Nematopsis Ostrearum* and *N. Prytherchi* (Eugregarinina: Porosporidae) with Special Reference to the Host-Parasite Relations." The Journal of Parasitology 41(1): 89.

Sullivan J., Cheng T.C., Howland K. (1985.) Studies on parasitic castration: castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine trematodes. Trans Am Microsc Soc 104:154–171.

Topić Popović N. and Teskeredžić E. (1999.) Bolesti i toksini školjaka regulirani zakonom. Ribarstvo, 57(2): 65-83

Tsangaris C. i sur. (2016.) Biochemical biomarker responses to pollution in selected sentinel organisms across the Eastern Mediterranean and the Black Sea. Environment Science and Pollution Research International, 23(2): 1789-1804.

Tuntiwaranuruk C., Chalermwat K, Upatham E.S., Kruatrachue M., Azevedo C. (2004.) "Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of bivalves from Chonburi Province, Gulf of Thailand." Diseases of aquatic organisms 58(1): 47-53.

Internetski izvori

Global invasive species database – *Mytilus galloprovincialis*
https://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=102 11.12.2017.

Global Biodiversity Information Facility – *Mytilus galloprovincialis*
https://www.gbif.org/species/2285683 20.2.2018.

8 POPIS SLIKA

Slika 1. Mapa rasprostranjenosti *Mytilus galloprovincialis* (*https://www.gbif.org*) 1

Slika 2. *Nematopsis gigas* n. sp. smješten u tkivu plašta *Nerita ascencionis.* Sekcije prikazuju fagocite domaćina (*) u kojima se nalaze oociste (OC). Vrhovima strelica označena je gusta struktura smještena između oociste i periferije parazitske vakuole (PV) dok je dvostrukim strelicama označen zid fagocite. N označuje jezgru, S sporozoit, W zidove oociste. (Azevedo, Padovan 2004.) 5

Slika 3. Mjesta uzorkovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu. 8

Slika 4. *Nematopsis* sp. (označen strelicama) u probavnoj žlijezdi *Mytilus galloprovincialis*. 10

Slika 5. *Nematopsis* sp. (označeni strelicama) u probavnoj žlijezdi *Mytilus galloprovincialis*. **A** prikazuje izoliranu oocistu *Nematopsis* sp. **B** prikazuje agregiranu grupu od 3 oociste *Nematopsis* sp. 11

Slika 6. Ukupan broj *Nematopsis* sp. u dagnjama uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja 12

Slika 7. Prevalenca *Nematopsis* sp. u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja 13

Slika 8. Intenzitet infekcije *Nematopsis* sp. u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na pojedinim postajama tijekom veljače i travnja 13

9 SAŽETAK

U ovom istraživanju promatrana je parazitska infekcija probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 rodom *Nematopsis* Schneider, 1892 (Apicomplexa, Gregarina) povezana s područjem i vremenom uzorkovanja. Dagnje su sakupljene u veljači i travnju 2014. na šest postaja u sjevernom Jadranu: ACI Marina Pula, otok Katarina, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča i Kopar. Probavne žlijezde dagnji prerezane su kriomikrotomom, te obojane standardnim bojanjem eozina i hematoksilina. Poprečni presjeci su dalje istraživani svjetlosnim mikroskopom. Prevalenca parazitom *Nematopsis* sp. varira od 10 do 80% dok je intenzitet infekcije <9 oocista po sekciji u većini slučajeva a maksimumom od 17 oocista. Dagnje uzorkovane s onečišćenih postaja imaju veću prevalencu *Nematopsis* sp. od dagnji uzrokovanih na mjestima bez takvih utjecaja i na uzgajalištima.

Ključne riječi: dagnja, kriopresjek, *Mytilus galloprovincialis*, *Nematopsis* sp., intenzitet infekcije, probavna žlijezda

10 ABSTRACT

In this study, a parasitic infection with parasite from genus *Nematopsis* Schneider, 1892 (Apicomplexa, Gregarina) was observed in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, related to the area and time of sampling. Mussels were collected in February and April 2014 at six stations from Northern Adriatic: ACI Marina Pula, Catherine, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča and Kopar. The digestive glands were cuted by cryomicrotomy, and further processed with eosin and hematoxylin. Cryosections were examined by a light microscope. Prevalence of parasitism *Nematopsis* sp. ranges from 10 to 80% while the intensity of infection was <9 oocysts per section in most cases and a maximum of 17 oocysts. Mussels sampled from stations with increased concentrations of pollutants had a higher prevalence of *Nematopsis* sp. in comparison to mussels sampled from places without influences and in aquaculture.

Key words: mussel, cryosection, *Mytilus galloprovincialis*, *Nematopsis* sp., density of infection, digestive gland