Histološka i morfometrijska analiza probavila dagnje Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) u Malostonskom zaljevu

Ivošević, Diana

Master's thesis / Diplomski rad

2013

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:748907

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diana Ivošević

Histološka i morfometrijska analiza probavila dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) u Malostonskom zaljevu

Diplomski rad

Zagreb, 2013.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Gavrilović i prof.dr.sc.Gordane Lacković-Venturin, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj voditeljici, doc.dr.sc. Ani Gavrilović sa Odjela za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku na stručnim savjetima, velikom trudu i nesebičnoj pomoći koju mi je pružala u svim etapama izrade diplomskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj suvoditeljici, prof.dr.sc. Gordani Lacković-Venturin jer mi je prenijela ljubav prema histologiji i pružila priliku da ovaj rad izradim na Zoologijskom zavodu PMF-a u Zagrebu. Isto tako, zahvaljujem na pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem dr.sc. Romani Gračan i tehničarki Zrinki Benčina sa Zoologijskog zavoda PMF-a, na pomoći prilikom izrade histoloških preparata.

Najljepše zahvaljujem prof.dr.sc. Borisu Hrašovcu i dr.sc. Milivoju Franjeviću na prilici da morfometrijsku analizu izradim u entomološkom laboratoriju Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje Šumarskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Na pomoći prilikom statističke obrade podataka, zahvaljujem dr.sc.Alexis Conidesu iz Centra za istraživanje mora iz Atene, Grčka.

Na kraju, želim zahvaliti svojoj obitelji na strpljenju i velikoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Histološka i morfometrijska analiza probavila dagnje *Mytilus galloprovincialis*

(Lamarck, 1819) u Malostonskom zaljevu

Diplomski rad

Diana Ivošević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Sažetak:Subtidalne jedinke dagnji za ovo istraživanje uzorkovane su na sedam postaja u Malostonskom zaljevu. Histološkim pregledom probavnog sustava, kristalni štapić nije utvrđen u svih jedinki, što ukazuje na postojanje cikličkih promjena u procesu hranjenja i izvanstanične probave. Kod jedinki uzorkovanih na dubini četiri metra, indeks kondicije probavnih tubula varirao je ovisno o postaji, pri čemu je varijabla koja je najviše utjecala na ove promjene bila količina partikularne tvari, tj. dostupne hrane. Na postaji Bistrina, značajno viši indeks kondicije dagnji s dubine od jednog metra iz studenog, može se povezati s razlikom u salinitetu u usporedbi s veljačom, kao i manjom dostupnošću hrane u usporedbi s dubinom četiri metra. Ovaj rad pokazao je da na indeks kondicije probavnih tubula dagnje utječu brojni biotski i abiotski čimbenici, od kojih je najvažniji količina partikularne tvari, kako organske tako i anorganske. Uz navedeno, važna je i dubina na kojoj se jedinke uzgajaju.(53stranice, 15slika, 2 tablice, 151 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski). Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: dagnja, intertidalna, subtidalna, probavni tubuli, indeks kondicije

Voditelj: Dr.sc. Ana Gavrilović, doc.

Suvoditelj: Dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, izv.prof.

Pomoćni voditelj: Dr.sc. Romana Gračan

Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Gavrilović, doc., Dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, izv.prof., Dr. sc. Zdravko Dolenec, izv.prof.

Rad prihvaćen: 26.6.2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Histological and morphometric analysis of the digestive system of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), in the Bay of Mali Ston

Diana Ivošević

Rooseveltovtrg 6, 10000 Zagreb

Summary: In this study subtidal specimens of mussel were sampled at seven different locations in the Bay of Mali Ston. Histological examination of the digestive system was performed, and crystalline style was not found in all specimens, indicating the existence of a cyclical change in the process of feeding and extracellular digestion. For specimens sampled at a depth of four meters, condition index of digestive tubules varied depending on the location, where the variable that affected by these changes the most was the quantity of the particulate matter, i.e. available food. By the statistical comparison of the mean values of the condition index of the digestive tubules on seven sampling stations in the Bay of Mali Ston, four groups of similar locations were identified: Banja and Sutvid, Kuta and Duba, Brijesta and Bistrina,and Soca. At Bistrina station significantly higher condition index of mussels from the depth of one meter in November, can be related to differences in salinity recorded in February, as well as to less availability of food as compared with those at a depth of four meters. This study has shown that the condition index of digestive tubules of mussels is affected by many biotic and abiotic factors, most important being the amount of particulate matter, both organic and inorganic. In addition, the depth at which specimens are cultivated is also important.(53pages, 15 figures, 2 tables, 151 references, original in: Croatian). Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: mussel, intertidal, subtidal, digestive tubules, condition index

Supervisor: Dr. Ana Gavrilović, Asst. Prof.

Cosupervisor: Dr. Gordana Lacković-Venturin, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Romana Gračan

Reviewers: Dr. Ana Gavrilović, Asst. Prof., Dr. Gordana Lacković-Venturin, Assoc. Prof., Dr. Zdravko Dolenec, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 26.6.2013.

SADRŽAJ:

1.UVOD.....1

1.1. Uzgoj školjkaša kroz povijest.....1

1.2. Malostonski zaljev.....2

1.3. Rod Mytilus.....3

1.4. Rasprostranjenost i stanište.....4

1.5. Osnovne morfološke i fiziološke značajke dagnje.....7

1.6. Probavni sustav i hranidba.....10

1.6.1. Izvanstanična probava.....13

1.6.2. Unutarstanična probava.....14

2.CILJ RADA.....19

3.MATERIJALI I METODE.....20

3.1. Obrada uzoraka.....21

3.2. Mikroskopska morfometrijska analiza probavne žlijezde.....24

3.3. Statistička obrada podataka.....25

4.REZULTATI.....26

4.1. Mikroskopski pregled probavne žlijezde.....26

4.2. Indeks kondicije probavnih tubula.....30

5.RASPRAVA.....37

6.ZAKLJUČAK.....42

7.LITERATURA.....43

1. UVOD

1.1. Uzgoj školjkaša kroz povijest

Čovjek je od davnina koristio meso školjkaša za prehranu. Tradicija uzgoja školjkaša u Hrvatskoj, duža je od tisuću godina. Na ovim se prostorima stoljećima uzgaja europska plosnata kamenica *Ostrea edulis*, (Linnaeus, 1758), a uzgoj dagnje *Mytilus galloprovincialis*, (Lamarck, 1819) započeo je prije otprilike dva stoljeća. Iako se uzgoj obavljao na velikom broju lokaliteta, koji su povremeno dobivali ili gubili na važnosti, dva mjesta zasigurno zauzimaju glavne pozicije u povijesti uzgoja školjkaša, a to su Malostonski zaljev i Limski kanal (Dujmušić, 2000).

Malostonski zaljev je poznat po uzgoju školjkaša još iz rimskog doba. Prvobitno se na ovom prostoru uzgajala samo europska plosnata kamenica *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), a početkom 20. stoljeća započeo je i uzgoj mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) (Basioli, 1981; Benović, 1997). Važnost zaljeva za uzgoj školjkaša uvidjela je i Dubrovačka republika, unajmivši 1333. godine od Bana Stjepana Kotromanića uvalu Bistrina, koju je poslije njegove smrti kupila, prenoseći pravo na ribolov i uzgoj u Malostonskom zaljevu na stonskog kneza (D´Erco, 1862). Prvi pristupačan zapis o izlovljavanju kamenica iz prirodnih staništa i njihov daljnji uzgoj u Malostonskom zaljevu, datira iz 1573. godine (Vekarić, 1960).

Nakon pada Dubrovačke republike te dolaska Francuske, a potom i Austro-Ugarske, sva uzgajališta u Malostonskom zaljevu prešla su u privatno vlasništvo. U Drugom svjetskom ratu propala su gotovo sva uzgajališta. Nakon rata, u Bistrini je osnovano državno uzgajalište morskih beskralješnjaka “Kamenica” za proizvodnju kamenica i dagnji. U međuvremenu je osnovana Ribarstvena stanica na Otoku života, čija je zadaća bila rad na unaprijeđenju tehnologije uzgoja školjkaša (Basioli, 1968; 1981). Osamdesetih godina prošlog stoljeća, količina uzgojenih dagnji i kamenica u Malostonskom zaljevu iznosila je oko 90% jugoslavenske proizvodnje (Benović, 1980a). U to vrijeme (1984.g.), društveno uzgajalište u zaljevu Bistrina preuzima Saponija–Osijek, OUR Dalmacijabilje iz Dubrovnika (Bolotin, 1988). Tvrtka je nakon

domovinskog rata propala, te ju je kupilo Sveučilište u Dubrovniku, koje s ciljem pružanja tehnološke potpore hrvatskoj akvakulturnoj industriji, 2008. osniva Tehnološki i poslovno–inovacijski centar za marikulturu MARIBIC d.o.o. (Gavrilović, 2002; www.maribic.com).

Najveća proizvodnja dagnji u Malostonskom zaljevu zabilježena je krajem 80-ih i početkom 90-ih godina 20. stoljeća, kada je količina školjkaša na tržištu dosezala više od 3000 tona. Neposredno nakon domovinskog rata, količina proizvedenih dagnji se višestruko smanjila (Peharda i sur., 2000), no posljednjih godina je ponovno zabilježen značajan porast. Prema Jug-Dujaković (2008) ukupna hrvatska proizvodnja dagnji procjenjuje se na 6000 tona, a kamenice na preko tri milijuna komada.

1.2 Malostonski zaljev

Zbog povoljne primarne produkcije i hidrografskih osobina, u Zaljevu se od antičkih vremena uzgajaju školjkaši. Danas je to najznačajnije mjesto za uzgoj školjkaša u Hrvatskoj. Uslijed veoma slabe naseljenosti u okolnom području, Zaljev nije bio izložen snažnijoj antropogenoj eutrofikaciji. Radi svoje relativno velike produktivnosti i gospodarskog značaja uzgoja školjkaša za ovo područje, Malostonski zaljev je 1983. godine proglašen posebnim rezervatom prirode u moru (NN 31/2009); (NN br.53/05).

Malostonski zaljev se nalazi na završetku Neretvanskog kanala u koji utječe rijeka Neretva, dugačak je 28 km, a na najširem dijelu 6.1 km. Zbog velike razvedenosti vanjskog i unutrašnjeg dijela zaljeva ukupna dužina obalne linije iznosi oko 100 km. Najveća dubina zaljeva je 29 m, međutim na više od 80% zaljeva dubina je između 20 i 29 m. (NN 31/2009).

Zbog svojih geomorfoloških karakteristika i položaja u Jadranskom moru, Zaljev je jedinstven s obzirom na hidrografske prilike. S jedne strane, utjecaj otvorenog mora evidentan je i na unutrašnjim postajama, a s druge strane tu je i utjecaj rijeke Neretve, brojnih podvodnih izvora (vrulja) i oborina koje ispiru strme obale, donoseći sa sobom mineralne tvari i organski detritus i na taj način utječu na relativno uzak i plitak zaljev (Kršinić i Mušin, 1981).

Najniža izmjerena temperatura mora je 5.8^{o}C, a najviša 26.8^{o}C. Proljetni porast temperature uzrokuje termalnu stratifikaciju vodenog stupca. Termoklina nastupa tijekom ljeta, a u jesen slabi. Vertikalni gradijent i izotermija traju tijekom zime i početkom proljeća (IOR, 2003).

Kao prirodno eutrofizirani ekosustav s visokom koncentracijom hranjivih soli, izvrsno je stanište za organizme filtratore (Viličić, 1981).

1.3. Rod *Mytilus*

Školjkaši su vrlo velika i drevna skupina životinja, nastala u ordoviciju, prije oko 500 milijuna godina. Sve glavne skupine školjkaša postojale su i prije kraja paleozoika, prije 230 milijuna godina. Rod *Mytilus* je relativno novijeg postanka, s nalazima ne starijim od dva milijuna godina (Seed, 1976).

Najznačajnija porodica roda *Mytilus* je porodica *Mytilidae,* koja uključuje pet vrsta: *Mytilus zonarius* Lamarck, 1819*, Mytilus chilensis* (Hupe, 1854), *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758*, Mytilus galloprovincialis,* Lamarck, 1819 i *Mytilus trossulus* Gould, 1850 (Župan, 2012). U Europi se kao ekonomski važne vrste izdvajaju dvije: plava dagnja *Mytilus edulis* (L.) i mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Obje vrste imaju jednak broj kromosoma, a zajedničkim mrijestom nastaju hibridi koji također daju vitalne ličinke (Dardignac- Corbel, 1990). Pojava hibrida zabilježena je u svim područjima susretanja ili preklapanja populacija ovih vrsta i može zauzimati vrlo široka područja veća od stotine kilometara (Gosling i McGrath, 1990; McDonald i sur., 1991; Wonham, 2004; Beaumont i sur., 2006).

Kako praktički nema podataka o evoluciji roda, općeprihvaćena je činjenica da je vrsta *M. edulis* predak iz kojeg su se razvile ostale vrste. Vjeruje se da se vrsta *M. galloprovincialis* pojavila na području Mediterana tijekom jednog od ledenih doba u pleistocenu, dok je područje bilo odsječeno od Atlantskog oceana (Barsotti i Meluzzi, 1968). Razvoj uvjeta u kojima je došlo do povišenja temperature na Mediteranu, te ograničen doticaj Atlantika i Mediterana, vjerojatno su bili povoljni za proces diferencijacije (Gosling, 1992).

Dagnja (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) se sistematski svrstava u koljeno *Mollusca* (mekušci), razred *Bivalvia* (školjkaši), red *Filibranchia* (končastoškrgaši), porodicu *Mytilidae* (dagnje), rod *Mytilus* (Župan, 2006).

U Jadranskom moru postoji dvanaest podvrsta mediteranske dagnje među kojima je i hrvatska dagnja (*Mytilus galloprovincialis subsp. Croaticus Brusina*) (Dujmušić, 1992).

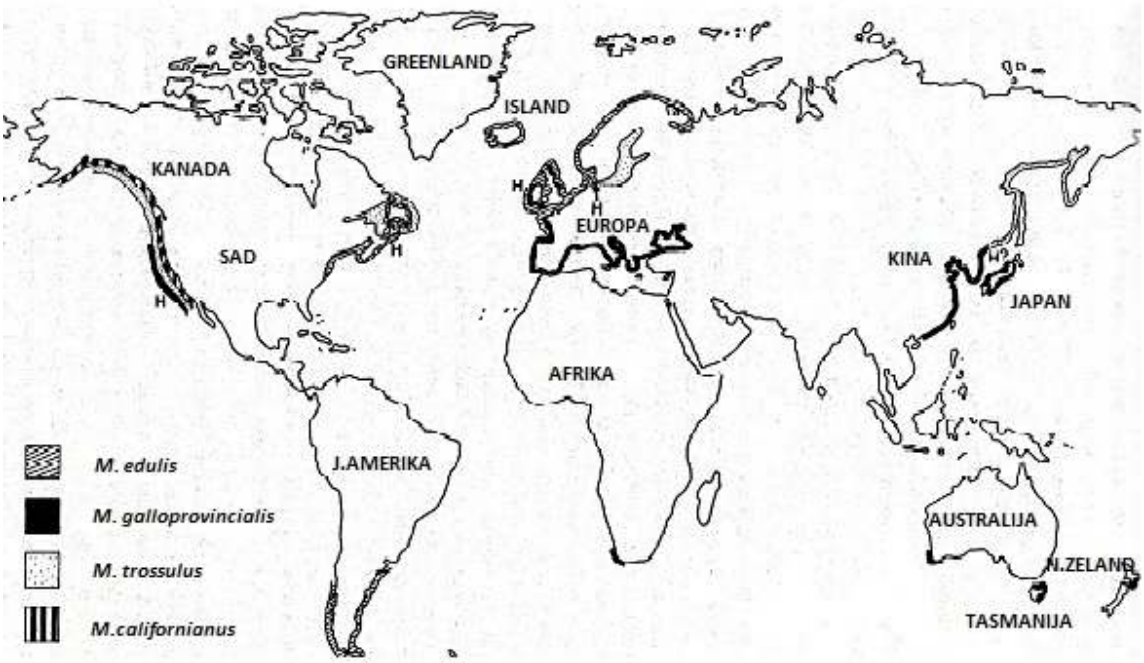
1.4. Rasprostranjenost i stanište

Rod *Mytilus* je široko rasprostranjen u u sjevernim i umjerenim morima sjeverne i južne polutke (Soot–Ryen, 1955). Distribucija populacija roda *Mytilus* je povezana s rasprostranjivanjem tijekom planktonskog ličinačkog stadija. Rana životna strategija ovih školjkaša koju odlikuje produžena planktonska faza, objašnjava visoku sposobnost rasprostranjivanja većine vrsta unutar roda *Mytilus* (Gosling, 1992).

Vrsta *Mytilus galloprovincialis*, za koju se vjeruje da je nastala u Mediteranu, može se pronaći i u Crnom moru, na obalama Španjolske, Potugala, atlantskim obalama Francuske i Britanskog otočja. Korištenjem elektroforetskih markera i/ili na temelju morfoloških karakteristika školjke, *M.galloprovincialis* je identificirana u južnoj Kaliforniji (McDonald i Koehn, 1988), Japanu (Wilkins i sur., 1983), Hong Kongu (Lee i Morton, 1985) i sjeverno duž obala istočne Kine do Koreje (McDonald i sur., 1990). Na južnoj polutki, populacije školjkaša na zapadnoj obali Australije, Tasmanije i Novog Zelanda identificirane su kao *M.galloprovincialis* zbog njihove uske genetičke povezanosti s ovim oblicima na sjevernoj polutki (McDonald, 1991). Nekoliko uzoraka školjkaša iz južne Afrike, također je identificirano kao *M.galloprovincialis* (Grant i Cherry, 1985; Beaumont i sur., 1989).

Vjeruje se da je vrsta *M.galloprovincialis* slučajno unesena u Japan (Wilkins i sur., 1983), Hong Kong (Lee i Morton, 1985), južnu Kaliforniju (McDonald i Koehn, 1988) i južnu Afriku (Grant i Cherry, 1985), jer u svim ovim slučajevima populacije školjkaša pokazuju veliku morfološku i elektroforetsku sličnost sa *M.galloprovincialis* iz Mediteranskog mora (Gosling, 1992).

Nedavni dokazi šire rasprostranjenosti *M.galloprovincialis* na području južne polutke - u Australiji, Tasmaniji i na Novom Zelandu (McDonald i sur., 1991), ukazuju na činjenicu da bi ova vrsta mogla biti autohtona na južnoj polutki (Gosling, 1992) (Slika 1).



Slika 1: Karta rasprostranjenosti vrsta *M.edulis*, *M.galloprovincialis*, *M.trossulus* i *M.californianus* u svijetu. Prilagođeno prema Gosling, 1992.

Iako se vrste roda *Mytilus* ponekad mogu naći u izobilju ispod zone plime i oseke (Newcombe, 1935; Paine, 1976b; Tursi i sur., 1985), tipično se javljaju na staništima u pojasu plime i oseke; ova ograničena distribucija uglavnom je posljedica bioloških faktora predacije i kompeticije, više nego nemogućnošću preživljavanja u uvjetima koji vladaju na staništima ispod pojasa plime i oseke (Gosling, 1992).

Gornje granice rasprostranjenosti za vrste roda *Mytilus* su obično prilično konstantne tijekom dugog vremenskog razdoblja. Fiziološka intolerancija na temperaturne ekstreme i isušivanje, najvažniji su čimbenici koji određuju gornje granice rasprostranjenosti populacija roda *Mytilus* stjenovitih zona plime i oseke (Gosling 1992). Vrsta *Mytilus edulis* podnosi vrlo niske temperature, čak i smrzavanje (Williams, 1970; Aarset, 1982). Jedinke ove vrste preživljavaju čak i kad im se temperatura tkiva spusti do -10^{o}C (Williams, 1970). Za razliku od *M. edulis*, više stenotermna vrsta *Mytilus californianus*, ne podnosi smrzavanje. Kao posljedicu pojave temperatura ispod točke smrzavanja, Suchanek (1985) navodi povećan mortalitet i značajno sniženu gornju granicu rasprostranjenja vrste *M.californianus* na Tatoosh otočju u sjeveroistočnom Pacifiku. Ponovna pojava sličnih temperaturnih vrijednosti snizila je gornju granicu rasprostranjenja za 0.27 metara, a u gornjih 1.65 metara ove zone, populacija ove vrste reducirana je za oko 65%. Vrsta *M. californianus* obično naseljava intertidalne zone, procjepe, te subtidalna područja (Gosling 1992). Povremene pojave masovnog mortaliteta na gornjim granicama rasprostranjenja intertidalnih školjkaša, često su povezane s produženim periodima neuobičajeno visokih temperatura i isušivanjem (Suchanek, 1978, 1985; Tsuchiya, 1983). U sjevernom Japanu, dug period visokih temperatura od oko 34^{o}C (koji je doveo do povišenja temperature tkiva školjkaša na 40^{o}C), uzrokovao je mortalitet 50% intertidalnih jedinki *M. edulis* unutar jednog sata u zoni gornjih 75% rasprostranjenosti (Tsuchiya, 1983). Gornja temperaturna granica koju podnose *M.edulis* u Engleskoj iznosi oko 29^{o}C (Read i Cumming, 1967; Almada-Villela i sur., 1982), ali vjerojatno kraći period mogu podnijeti i nešto više temperature (Cawthorne, 1979).

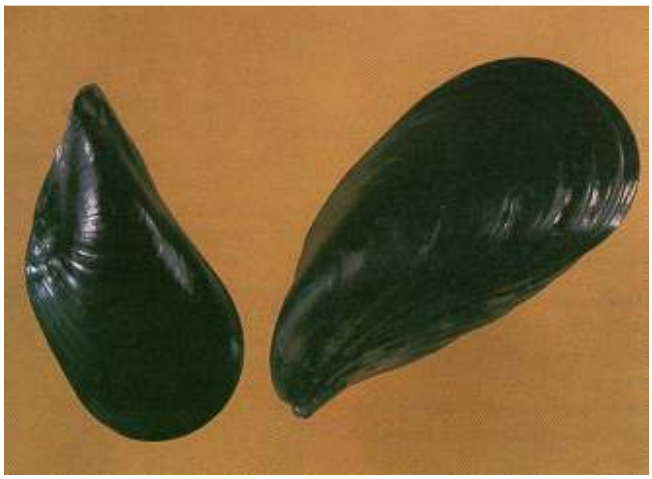
Donje granice rasprostranjenosti za mnoge sesilne vrste, uključujući školjkaše, su pod jakim utjecajem bioloških faktora, osobito predatorstva (Connell, 1972; Paine, 1974).

Dagnje se mogu naći i na dubinama preko 20 metara. Ova naselja se pojavljuju najčešće na podmorskim temeljima raznih građevina, na konstrukcijama naftnih platformi, kaveza za uzgoj riba i slično. Kod ovih populacija dolazi do konstantnog rasta te smanjenog utjecaja predatora što omogućuje jedinkama postizanje velikih dužina u relativno kratkom vremenu (Gosling, 1992).

Dagnja *M. galloprovincialis,* najrasprostranjeniji je školjkaš Jadrana. Najčešće se nalazi u uzobalnoj kamenoj zoni uzduž cijele obale i otoka Jadranskog mora, kao i na ušćima rijeka u more (Milišić, 1991). Iako se u prirodnim uvjetima nalazi do dubine od 4 metra, najčešće se uzgaja na dubinama 1-5 metara (MARIBIC, 2010). Dagnja živi na kamenim podlogama i drugim predmetima (plutače, usidreni brodovi i sl.) u kolonijama, gusto prekrivajući čitavu podlogu, za koju se pričvršćuje snopom bisusnih vlakanaca, pomoću kojih se može kretati (Milišić, 1991). Rast dagnje je brži u područjima gdje je stalni dotok slatke vode. Uzrok bržem prirastu je povećana količina hranjivih tvari u ovim vodama, a ne direktan utjecaj sniženog saliniteta. Nizak salinitet zapravo ima negativan utjecaj na rast, a u ekstremnim slučajevima može biti i letalan (Gosling, 1992).

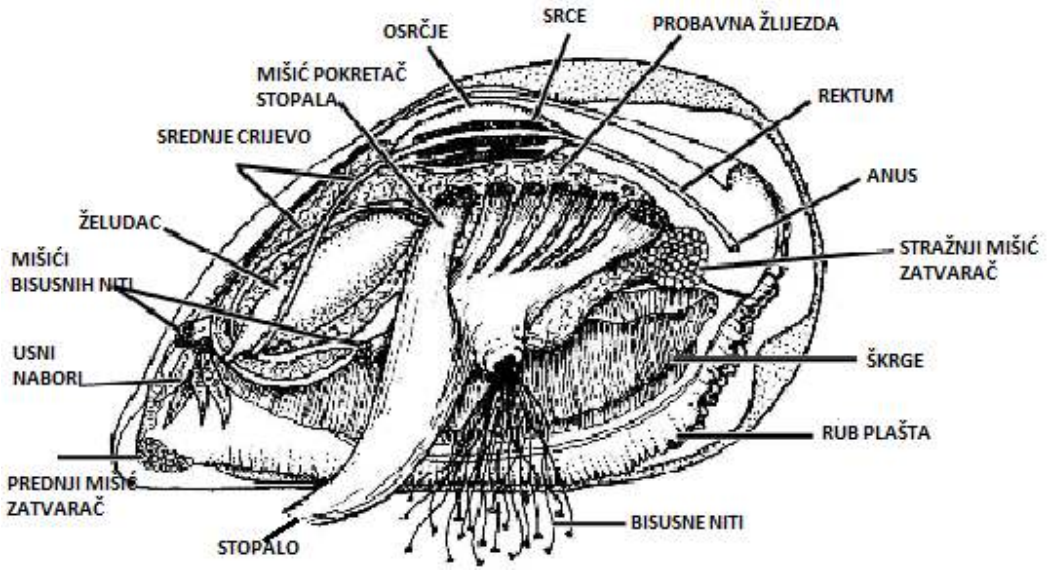
1.5. Osnovne morfološke i fiziološke značajke dagnje

Školjkaš je trokutastog ili izduženo-jajolikog oblika. Ljušture su jednake, tankih i oštrih stijenki, sprijeda šiljaste, a straga proširene i zaobljene. S vanjske strane ljuštura, jasno su vidljive naraštajne crte. Najduža osovina školjkaša iznosi do 150mm, a težina do 0.20 kg i srednja lovna težina do 0.04 kg. Boje je crnomodrikaste, a iznutra blijedosedefaste s plavim rubom (Milišić, 1991) (Slika 2).



Slika 2: Vanjski izgled mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Iz: Milišić, 1991.

Unutar ljušture je smješteno tijelo, koje je bilateralno simetrično, produljeno i sa strane stisnuto. S leđne strane, odmah ispod ljušture, spušta se s obje strane tijela plašt prema trbušnoj strani. Ispod plašta su smješteni visceralna masa i škrge. Ljušture, lijeva i desna, proizvod su plašta, a međusobno su spojene elastičnim ligamentom. Otvaranje i zatvaranje ljuštura omogućuje mišić zatvarač. Njegovim otpuštanjem ljušture se otvaraju, dok se pri kontrakciji ljušture zatvaraju. Stopalo je prstasto i sadrži mnogobrojne žlijezde koje izlučuju sluz (Slika 3). Nakon izlaska iz žlijezda, sluz se u vodi skrutne u dugačka i žilava vlakna, tzv. bisus, pomoću kojih se školjkaš učvrsti na mjestu (Matoničkin, Habdija, Primc- Habdija, 1998).



Slika 3: Anatomska građa dagnje. (Prilagođeno prema: BIODIDAC, 2013)

Dagnje su odvojenih spolova, s nešto većim udjelom mužjaka naspram ženki i s vrlo malenim udjelom hermafrodita (Gosling 1992). Parne gonade smještene su u prednjem dijelu tijela. Gonodukti su kratki i otvaraju se pokraj mokraćnog otvora u suprabranhijalni prostor. Ovi školjkaši izbacuju svoja jaja u okolnu vodu, gdje dolazi do oplodnje, za što je kao podražaj

najčešće potrebno izlučivanje sjemena mužjaka. Nakon tipičnog spiralnog brazdanja, kasnije se razvija veliger ličinka s potpuno razvijenim velumom, organom koji služi za plivanje i hranjenje (Matoničkin, Habdija, Primc-Habdija, 1998).

Trajanje ličinačkog stadija školjkaša obično traje od jednog do četiri tjedna, a ovisi o temperaturi, salinitetu, dostupnosti hrane i drugim faktorima (Bayne, 1976; Sprung, 1984a,b,c,d). Tijekom ličinačkog stadija, jedinke se aktivno hrane u stupcu vode, koristeći cilije na velumu za prehranu i pokretanje (Gosling, 1992). Pravilan rast i razvoj ličinki ovisi uglavnom o omjeru stanica fitoplanktona (Bayne, 1983), iako rast ličinki može biti potaknut unosom otopljenih organskih tvari, osobito otopljenih aminokiselina, kao i konzumacijom bakterija i detritusa (Courtwright i sur., 1971; Bayne, 1983; Manahan i sur., 1983). Prema Hrs-Brenko (1974) optimalna temperatura za embrionski razvoj vrste *Mytilus galloprovincialis* iznosi 15-20^{o} C, a salinitet oko 40‰.

Približavanjem metamorfoze, razvija se stopalo koje ubrzo postaje funkcionalan organ za puzanje. Jedinke koje se nalaze u kasnijem ličinačkom stadiju, mogu aktivno ispružati stopalo. "Pedveliger" ličinkama se nazivaju one ličinke, koje su sposobne metamorfozirati (Carriker, 1961). Kriteriji koji se koriste za procjenu sposobnosti metamorfoziranja, uglavnom se odnose na utvrđivanje prisutnosti određenih morfoloških značajki odnosno stopala i očnih mrlja, te na procjenjivanje veličine ličinke (Bayne, 1965; Pechenik, 1980; Sprung 1984 a,b).

Prihvaćanje bisusne niti za supstrat označava kraj pelagičkog života i početak metamorfoze praćen morfološkim promjenama organizma, koje jedinku pripremaju za prijelaz iz pelagičkog na sesilni način života (Gosling, 1992). Tijekom metamorfoze, kod vrsta roda *Mytilus* mogu se uočiti četiri značajne promjene: sekrecija bisusne niti, propadanje i razgradnja veluma fagocitozom, formiranje usnih nabora s apikalnom pločom unutar usnih nabora postlarvalnog školjkaša, te reorijentacija organa plaštane šupljine. Postličinke nakon metamorfoze imaju sve morfološke karakteristike adultnog školjkaša (Bayne 1971).

Kako su gonade adultne dagnje smještene u rastresitom vezivnom tkivu plašta i probavne žlijezde, to fiziološki nakon mriještenja volumen tkiva školjkaša značajno opada. Stoga se izračunavanje indeksa kondicije (popunjenosti međuljušturnog prostora mesom), najčešće

koristi kao pokazatelj fiziološkog, odnosno zdravstvenog stanja i kvalitete mesa školjkaša (Gavrilović, A., 2008; Gavrilović, A. i sur., 2011b).

1.6. Probavni sustav i hranidba

Probavni sustav školjkaša sastoji se od usta, jednjaka, želuca, probavne žlijezde, crijeva i analnog otvora (Gosling, 1992). Budući da školjkaši nemaju glavu, usni otvor nije na vrhu prednjeg dijela tijela, nego nešto iza prednjeg mišića zatvarača, na spoju lijevog i desnog para usnih nabora. Usta vode u kratki jednjak. Na jednjak se nastavlja želudac, u koji se otvaraju izvodni kanali probavne žlijezde. Na želudac se nastavlja izuvijano crijevo, čiji zavoji dopiru sve do stopala. Stražnji dio crijeva završava anusom u stražnjem dijelu plaštane šupljine (Matoničkin, Habdija, Primc-Habdija, 1998).

Organe za hranjenje kod školjkaša predstavljaju škrge i usni nabori. Školjkaši koriste mukocilijarne mehanizme na škrgama i parnom organu - usnim naborima za filtraciju i ingestiju brojnih u vodi suspendiranih tvari koje uključuju fitoplankton, bakterije, detritus, mikrozooplankton i anorganske tvari (Bayne i Newell, 1983; Griffiths i Griffiths, 1987; Jørgensen, 1991; Jones i sur., 1990; Gavrilović, 2011). Od fitoplanktona, najvažnije skupine su alge kremenjašice - dijatomeje (*Bacillriophyta*), jednostanični bičaši - dinoflagelati (*Dinophyta*) i morski bičaši - silikoflagelati (*Chrysophyceae*) koje sudjeluju u ishrani dagnji sa velikim brojem vrsta, a ujedno su i najzastupljenije skupine u ukupnoj gustoći populacija jadranskog fitoplanktona (Jasprica, 2003).

Kao i ostali pripadnici reda *Filibranchia,* dagnja se hrani filtriranjem čestica iz morske vode. Nivo filtracije je definiran kao volumen vode koji proteče kroz škrge u jedinici vremena. Ovisi o koncentraciji čestica tvari u mediju. Školjkaši ne filtriraju u vrlo razrijeđenim otopinama, što nedvojbeno pomaže očuvanju energije tijekom zimskih mjeseci, kada je koncentracija čestica hrane manja (Gosling, 1992). Pri niskim koncentracijama čestica hrane, sve čestice filtrirane iz otopine mogu biti progutane, dok iznad određene koncentracije koja odgovara zasićenju probavnog kapaciteta životinje, količina progutanog hranidbenog materijala ostaje približno

konstantna, a višak filtriranog materijala se izbacuje kao pseudofeces. Ta koncentracija ovisi o vrsti, veličini tijela jedinke i tipu progutanih čestica. Općenito, koncentracija čestica hrane u otopini koja označava prag iznad kojeg količina progutanog materijala ne raste, iznosi između 1-6 mg sestona (partikularne tvari, suhe mase) po litri (Bayne i Newell, 1983).

Dagnja pri hranjenju iskorištava 100% hranjivih čestica veličine 3-5 µm, oko 50% čestica veličine 1-2 µm, te 20-30% čestica manjih od 1 µm, kao i manji dio čestica veličine 6 µm, pa sve do 200µm (Gosling, 1992; Dardignac-Corbel, 1990). Osim toga, školjkaši su u određenoj mjeri sposobni selektirati stanice algi slične veličine, iako točan mehanizam selekcije nije poznat (Shumway i sur., 1985). Kod različitih vrsta školjkaša intenzitet selekcije organa za hranjenje se razlikuje. Tako npr. *O.edulis* škrge predstavljaju glavni organ za selekciju, dok kod dagnje *M. trossulus* glavnu ulogu u sortiranju čestica imaju usni nabori (Ward i sur., 1998). Sposobnost školjkaša da odabiru različitu vrstu hrane u suspenziji, moglo bi predstavljati mehanizam pomoću kojeg potencijalno kompetitivne vrste koje borave na istom staništu, dijele dostupne izvore hrane (Shumway i sur., 1990).

Histološka karakteristika svih dijelova tijela koji su unutar plaštane šupljine (osim stopala) je da su pokriveni trepetljikavim epitelom, što je vrlo važno za hranjenje i disanje. Istosmjerno ritmičko udaranje treplji na velikoj površini, npr. na škrgama, omogućuje trajnu i pravilnu cirkulaciju vode, a s tim i dovođenje sitnih čestica suspendiranih u njoj. Škrge su strukturalno jako izmijenjene jer istovremeno služe za filtraciju hrane i za disanje (Matoničkin, Habdija, Primc-Habdija, 1998). Dijele plaštanu šupljinu na inhalantnu i ekshalantnu komoru. Voda koja ulazi kroz ulazni (inhalantni) otvor se usmjerava u inhalantnu, a zatim u ekshalantnu komoru pomoću cilija na škrgama i na površini plašta, te izlazi kroz izlazni (ekshalantni) otvor. Protok vode kroz plaštanu šupljinu reguliran je otvaranjem i zatvaranjem ljuštura pomoću mišića (Gosling, 1992). Škrge su vrlo su velike i izgrađene od škržnih vlakanaca (Matoničkin, Habdija, Primc-Habdija, 1998). Na svakom škržnom vlakancu, nalaze se tri vrste cilija (lateralne, laterofrontalne i frontalne), od kojih svaka ima određenu dužinu, raspored, smjer udaranja i ulogu. Kod dagnje su susjedna škržna vlakanca zbog ojačanja međusobno spojena ispreplitanjem njihovih cilija i čine tip filibranhijalnih škrga (Jørgensen, 1990; Gosling, 2003).

Osim cilija, u prikupljanju i transportu hrane znatnu ulogu ima i sluz (mukus), koju luče mukozne stanice svakog škržnog vlakanca (Beninger i Dufour, 1996; Beninger i sur. 1997; Dufour i Beninger, 2001). Krajnji rezultat združenog djelovanja cilija je transport za sluz vezanih čestica hrane prema bazi škrga, ili prema njihovim slobodnim rubovima, odakle će se transportnim cilijarnim žljebovima prebaciti do usnih nabora (Jørgensen, 1990; Gosling, 2003).

Veće čestice hrane koje se zbog svoje veličine ne mogu dalje transportirati, padaju na unutarnju površinu plašta, odakle će kao pseudofeces biti izbačene iz inhalantne šupljine (Jørgensen, 1990; Hawkins i sur., 1996, 1998a).

Čestice iz transportnih žlijebova škrga prihvaćaju dva para usnih nabora. Unutarnja površina usnih nabora sadrži brojne nabore i žlijebove s kompliciranim serijama cilijarnih traktova, čija je uloga separiranje čestica hrane, dok je njihova vanjska površina glatka (Jørgensen, 1990; Gosling, 2003). Putem usnog žlijeba koji se nalazi pri dnu usnih nabora, hranidbene čestice ulaze u usta (Gosling, 1992). Epitel usta i jednjaka sadrži cilije i brojne mukozne stanice koje izlučuju kiseline i neutralne mukopolisaharide, čak i dok se životinja ne hrani (Beninger i sur., 1991, Gavrilović, 2011a). Jednjak nema probavnu ulogu, već služi samo za provođenje materijala duž cilijarnih traktova prema želucu (Gosling, 1992).

Kao i na škrgama, odbačeni materijal predstavlja pseudofeces, a cilijarni ga traktovi unutarnje površine plašta sprovode do samog ruba, odakle će se periodičnim snažnim kontrakcijama mišića aduktora izbaciti izvan inhalantne komore (Younge, 1966; Quayle, 1969; Walne, 1974).

Hranidbene tvari koje iz usta kroz kratki jednjak dođu u želudac, podvrgnute su daljnjim promjenama. Općenito, probava školjkaša može se podijeliti u dvije faze, a to su izvanstanična probava u želucu i crijevima, te unutarstanična probava u probavnoj žlijezdi i amebocitima (hemocitima) (Younge, 1926a; Mathers, 1973a; Bavčević, 1990; Langdon i Newell 1996; Gosling, 2003; Boucaud-Camou i Henry, 2003).

1.6.1. Izvanstanična probava

Želudac se sastoji od prostrane želučane vrećice i cjevastog želučanog nastavka koji se prema crijevu može zatvoriti sfinkterom. Šupljina želučanog cjevastog nastavka podijeljena je naborima stijenki u dva kata. Donji kat izgrađuje prolaz prema crijevu, a epitel gornjeg je bogat žlijezdama koje povremeno luče kristalni štapić. Trepetljike vreće kristalnog štapića rotiraju ga oko glavne osi. Ova rotacija štapića dovodi do njegovog otapanja i ujedno pomaže u miješanju sadržaja želuca s enzimima. Pored toga, dio hrane se potiskuje prema želučanom štitu, hitinskoj tvorbi, pri čemu dolazi do njezinog usitnjavanja, što povećava efikasnost probave. Ostatak sadržaja potiskuje se prema području za razvrstavanje hrane na desnoj strani želuca (Matoničkin, Habdija, Primc-Habdija, 1998).

Brojna istraživanja pokazala su da kristalni štapić školjkaša sadrži velik broj enzima, kao što su: amilaza, celulaza, hitinaza, laminaraza, kisela i alkalna fosfataza, hitobiaza, galaktozidaza i lipaza (Younge, 1926a; George, 1952; Mathers, 1973a; Mathers, 1973b; Langton i Gabbott, 1974; Smucker i Wright, 1984; Newell i Langdon, 1986; Smucker i Wright, 1986; Mayasich i Smucker, 1986; Brock i Kennedy, 1992). Pored enzima kristalnog štapića, u ovoj fazi probave sudjeluju i enzimi koje luče žljezdane stanice epitela želuca, te dio enzima koji je u sferulama dospio iz probavne žlijezde.

Kristalni štapić se tijekom procesa probave otapa i troši, da bi se u fazi kada se ne hrane ponovno resintetizirao. Tako njegova veličina varira ovisno o ciklusu hranjenja. Najveći je kad se većina hrane nalazi u želucu, što odgovara periodu kad je životinja potopljena i u fazi uzimanja hrane (Gosling, 1992).

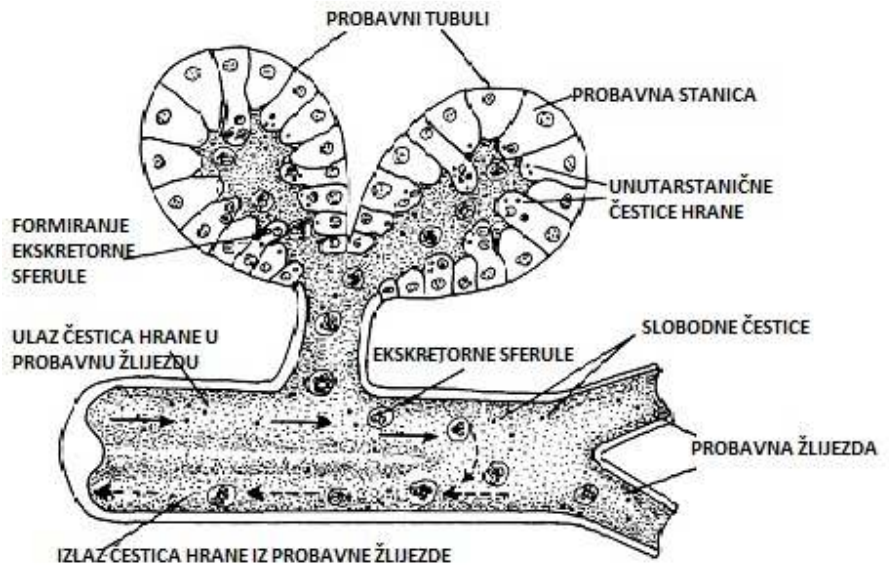
Tijekom miješanja i izvanstanične probave, sadržaj želuca je podvrgnut utjecaju cilijarnih puteva koji prekrivaju sva područja želuca osim onih u području želučanog štita (Yonge i Thompson, 1976). Za vrijeme izvanstanične probave u želucu, dolazi do redukcije veličine čestica i oslobađanja topivih tvari. Topive tvari pretežno se resorbiraju u želucu, a ostatak materijala se ovisno o stadiju probavljenosti usmjerava u probavnu žlijezdu (na unutarstaničnu probavu) ili dalje u crijevo (Langdon i Newell, 1996).

Na želudac se nastavlja srednje crijevo. U njega dospijevaju hranidbene čestice odbačene iz želuca. Ove čestice u crijevu mogu biti podvrgnute daljnjoj probavi, te transportirane tijelom nakon što ih fagocitiraju amebociti (Gosling, 1992). Ranije se smatralo da je glavna funkcija dugačkih zavijenih crijeva konsolidacija fekalnih materija, pri čemu se čestice miješaju sa sluzi i pritom se stvara čvrst sadržaj, kako feces ne bi mogao onečistiti ekshalantnu komoru u koju dospijeva kroz anus (Younge, 1966, Morton, 1973), a osim navedenog, Younge (1926a) je pripisao ovom organu i ulogu u apsorpciji vode. Novija su istraživanja pokazala da srednje crijevo ima značajnu ulogu u probavi i apsorpciji (Reid, 1966; Payne i sur., 1972; Mathers, 1973a; Mathers, 1973b).

Srednje crijevo prelazi u rektum, koji završava anusom. Neprobavljeni ostaci hrane odstranjuju se kroz ekshalantni otvor izvan tijela životinje (Gosling, 1992).

1.6.2. Unutarstanična probava

Probavna žlijezda je glavno mjesto unutarstanične probave (Gavrilović, 2011a, Gosling, 2003., Boucaud-Camou i Henry, 2003). Osim toga, važna je i kao mjesto skladištenja metaboličkih rezervi koje se koriste kao izvor energije za vrijeme gametogeneze i u razdobljima kada su jedinke izložene fiziološkom stresu (Bayne i sur., 1976). Ovaj se organ sastoji od brojnih slijepih tubula, koji sa želucem komuniciraju sustavom kanala (Slika 4). Pritom je svaka skupina tubula povezana s kratkim sekundarnim kanalima, čijim spajanjem nastaju širi primarni kanali. Primarni kanali se spajaju u lijevi i desni izvodni kanal, koji se otvaraju u želudac (Younge, 1926a; Owen, 1955; Gosling, 2003; Boucaud-Camou i Henry, 2003).

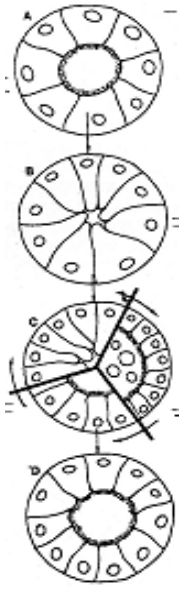


Slika 4: Probavna žlijezda. Prilagođeno prema: 0wen, 1955.

U kanalima se odvija kontinuirano dvosmjerno kretanje materijala: čestice hrane iz želuca ulaze u probavnu žlijezdu na unutarstanično probavljanje i apsorpciju, dok otpadni materijal u obliku ekskretornih sferula napušta ovaj organ i ulazi u želudac (Gavrilović, 2011a., Mathers, 1972., Morton, 1983).

Probavni su tubuli sastavljeni od dvije vrste stanica: probavnih i bazofilnih (Weinstein, 1995). Probavne su stanice najzastupljenije u tubularnom epitelu i odgovorne su za unutarstaničnu probavu. Te su stanice prizmatičnog oblika, a na apikalnom su kraju prekrivene mikrovilima. Citoplazmu ovih stanica karakterizira prisustvo brojnih tipova citoplazmatskih vezikula. Čestice hrane dospjele u lumen tubula, unose se preko mikrovila u probavne stanice pinocitozom i skladište u velikim vezikulama koje se nazivaju fagosomi. Probava se odvija u vezikulama lizosomalnog sustava koje sadrže hidrolitičke enzime. Otpadni materijal se nagomilava u rezidualnim tjelešcima (sferulama) probavnih stanica, a probavljeni sastojci prelaze u hemolimfu ili amebocite. Nakupljanjem rezidualnih tjelešaca, povećava se visina ovih stanica i one tada u potpunosti ispunjavaju lumen probavnih tubula. U ovoj fazi stanice pucaju, otpadni materijal u obliku ekskretornih sferula napušta tubule i kanale, te dospijeva u želudac.

Proces propadanja probavnih stanica i nadomiještanja novima, odvija se u najmanje četiri faze, a to su faza zadržavanja, apsorpcije, propadanja i nadomiještanja (Langdon i Newell, 1996) (Slika 5).



Slika 5: Proces propadanja i nadomještanja probavnih stanica tubula. A- faza zadržavanja, B- faza apsorpcije, C- faza propadanja, D- faza nadomještanja. Prilagođeno prema Owen, 1972.

Kada je lumen tubula prazan (bez hrane), probavne su stanice pločaste, a lumen tubula širok. Apsorpcija i unutarstanična probava započinju s dolaskom hrane u tubule, pri čemu probavne stanice postaju veće. U krajnjem stadiju unutarstanične probave apikalni dijelovi probavnih stanica pucaju i oslobađaju brojne sferule. To je faza propadanja, a nju slijedi faza

nadomještanja tubularnog epitela, pri čemu se razvijaju nove probavne stanice (Morton, 1983; Boucaud-Camou i Henry, 2003).

Ritam unutarstanične probave opisan je kod brojnih vrsta školjkaša, a očituje se prvenstveno u morfološkim promjenama epitela probavnih tubula, koje u prvom redu ovise o stadiju probave (Morton, 1956; McQuiston, 1969; Morton, 1969, 1970a,b, 1971, 1977; Owen, 1972; Langton, 1975; Mathers, 1976; Mathers i sur., 1979).

Istraživanja intertidalnih školjkaša kao što su *Cardium edule* (Owen, 1970), *Macoma balthica* (Morton, 1970), *Ostrea edulis* (Langton i Gabbott, 1974), te *Mytilus edulis* (Langton, 1975), potvrđuju činjenicu da probavni tubuli prolaze kroz niz morfoloških promjena, u kojima se njihov epitel mijenja iz visokoprizmatičnog tijekom plime, u kubični ili pločasti tijekom oseke, te se vraća u prizmatični za slijedeće plime (Morton, 1970, Robinson i Langton, 1980).

Kod subtidalnih školjkaša, čini se da postoje varijacije probavnih procesa. Ranije studije ukazivale su da je probava u subtidalnih školjkaša diskontinuiran, ciklički proces (Purchon 1971, Morton 1983), a kasnije studije koje su se bazirale na utjecaju dostupnosti hrane na morfologiju probavne žlijezde *O.edulis* (Wilson i La Touche 1978), *Mercenaria mercenaria* (Robinson i Langton 1980), i *Crassostrea virginica* (Winstead, 1995), upućivale su na činjenicu da je probava kontinuirani proces gdje epitel probavnih tubula prolazi sva četiri morfološka stadija.

Winstead (1998) je u svom istraživanju pokazao da probavni tubuli intertidalne *C. virginica* prolaze kroz sinkronizirani uzorak morfoloških promjena povezan s plimom i osekom. Za vrijeme plime, dok su organizmi bili potopljeni i hranili se, epitel probavnih tubula je bio visokoprizmatičan. Za oseke, uzimanje hrane je prestalo, a epitel tubula postao je nizak i kubični, što se moglo uočiti unutar 13 sati nakon izranjanja. Epitel tubula vratio se u visokoprizmatični unutar 6-9 sati nakon ponovnog uranjanja. U suprotnosti s intertidalnim jedinkama, kod subtidalne *C. virginica*, glavnina je probavnih tubula bila u fazi apsorpcije i fazi probavljanja, sa visokoprizmatičnim epitelom i uskim lumenom, neovisno o plimi i oseki.

Istraživanja subtidalnih školjkaša kao što su *Pectin maxinius* (Mathers, 1976), *O. edulis* (Wilson i La Touche, 1978), *M.mercenaria* (Robinson i Langton, 1980), te *C.virginica* (Winstead, 1995),

upućuju na zaključak da su prve dvije faze probave prisutne glavninu vremena, jer je hranjenje vjerojatno kontinuirani proces koji se temelji na dostupnosti hrane (Robinson i Langton, 1980; Winstead, 1995).

Značajnu ulogu u unutarstaničnoj probavi hranjivih tvari u kompletnom probavnom sustavu školjkaša imaju amebociti (Langdon i Newell, 1996; Gosling, 2003). Poznata je njihova važnost u probavljanju masti i bjelančevina. Unutarstanično sadrže amilaze, proteaze i lipaze. Mogu uzimati hranjive tvari neposredno iz probavne šupljine i probavljati ih, a osim toga, imaju i ulogu prijenosa hranjivih tvari po cijelom organizmu (Matoničkin, Habdija, Primc-Habdija, 1998.)

U bazofilnim stanicama probavne žlijezde školjkaša odvija se sinteza proteina, ali njihova uloga još nije u potpunosti razjašnjena. Probavne stanice tubula imaju ograničen životni vijek, a propale se stanice nadomještaju novima (Gavrilović, 2011a., Morton, 1983., Boucaud-Camou i Henry, 2003., Owen, 1974).

2. CILJ RADA

S obzirom da se morfometrijske karakteristike probavnih tubula dagnje mijenjaju u ovisnosti o stadiju probave, ali ovise i o količini dostupne hrane, kvaliteti vode i zdravstvenom stanju školjkaša, cilj ovog rada bio je:

1. Utvrditi morfometrijske karakteristike probavnih tubula dagnji uzorkovanih na sedam različitih postaja u Malostonskom zaljevu

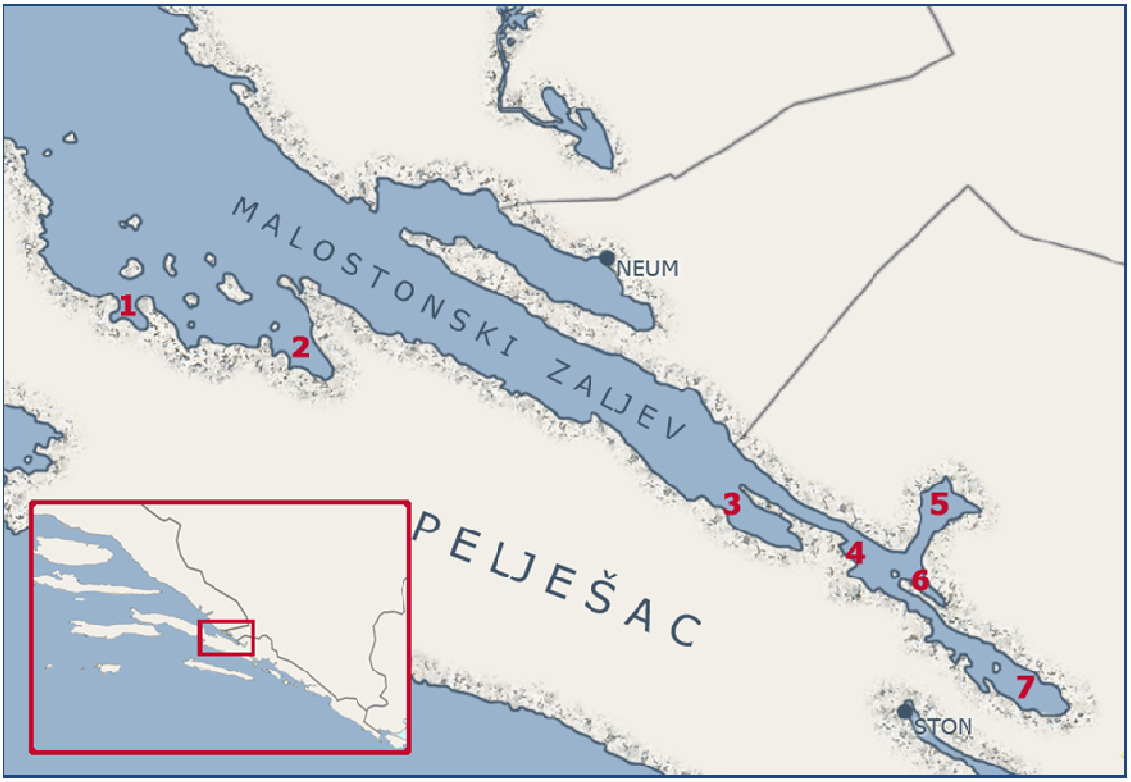
2. Utvrditi postoje li razlike između morfometrijskih značajki, posebno indeksa kondicije tubula, kod dagnji uzorkovanih na različitim postajama na istoj dubini

3. Utvrditi postoje li razlike u indeksu kondicije tubula dagnji uzorkovanih na istoj postaji, ali na različitim dubinama

4. Utvrditi utjecaj biotskih i abiotskih čimbenika na visinu indeksa kondicije na istraživanim postajama.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu provedeno je histološko i morfometrijsko istraživanje probavila dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sklopu projekta "Značajke uzgojnih lokaliteta na osnovu praćenja rasta, indeksa kondicije, zdravstvenog statusa i spolnog sazrijevanja uzgojnih populacija kamenice i mušule u području Malostonskog zaljeva". Dagnje su prikupljane na sedam postaja u Malostonskom zaljevu (Slika 6).



Slika 6: Lokacije postaja u Malostonskom zaljevu na kojima su se prikupljali uzorci. (1. Sutvid, 2. Brijesta, 3. Duba, 4. Banja, 5. Bistrina, 6. Soca, 7. Kuta)

Na svakoj od postaja: Sutvid, Brijesta, Duba, Banja, Kuta i Soca, uzimao se uzorak od sedam jedinki dagnji na dubini od četiri metra, u dva navrata - 25.11.2008. i 11.2.2009., te na postaji Bistrina, uzorak od sedam jedinki dagnji, istih datuma, na dubinama od jednog i četiri metra. Uzorci dagnji uzimani su uvijek u isto doba dana (od 12 do 14 sati), kako bi se izbjegle

eventualne morfološke promjene uzrokovane varijacijama u dnevnom ritmu probave i hranjenja.

3.1. Obrada uzoraka

Zbog očuvanja prirodne strukture tkiva, tkivo je fiksirano neposredno nakon uzorkovanja. Dagnje odvojene od ljuštura, fiksirane su u Davidson fiksativu. Nakon fiksacije, materijal je transportiran u Histološki laboratorij Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu. Fiksirani uzorci isprani su u tekućoj vodi, a zatim dehidrirani, kroz niz otopina etanola rastućih koncentracija. Dehidracija se provodi na slijedeći način:

70% etanol, 1-48h

80% etanol, 1h

96% etanol, 1h

100% etanol, 2 puta po 1h

Zatim se uzorci tkiva iz 100%- tnog etanola prebacuju u kloroform i ostavljaju preko noći do idućeg dana, kada se uklapaju u paraplast, materijal koji tkivo učini tvrdim i homogenim kako bi ga bilo moguće rezati na vrlo tanke rezove.

Iz kloroforma u kojem je tkivo stajalo preko noći, materijal je idući dan prebačen u mješavinu kloroforma i paraplasta u volumnom omjeru 1:1 na 1/2-1h (ovisno o veličini tkiva) u termostat, na temperaturu od 60^{o}C. Nakon toga, premješten je u paraplast I (1/2-1h), zatim u paraplast II (1/2-1h), te na kraju u čisti paraplast koji je stavljen u prethodno izrađene papirnate “lađice”. Čitav postupak uklapanja odvija se u termostatu, na temperaturi do 60^{o}C. Tako dobiveni blokovi, hladili su se do drugog dana, a onda su izvađeni iz papirnatih “lađica”, obrađivani nožem i označeni.

Blokovi su zatim rezani pomoću rotacijskog mikrotoma Shandon Finesse 325, na rezove debljine 8 mikrometara i stavljani na predmetna stakalca.

Predmetna stakalca oprana su u 75%-tnom alkoholu. Nakon sušenja, na njih je nanesena kapljica glicerin bjelanjka i razmazana po površini stakalca. Stakalca su ostavljena 5-10 minuta da se osuše.

Priprema glicerin-bjelanjka: jedan bjelanjak se odvoji od žumanjka i isjecka škarama. Zatim se bjelanjak razlupa u snijeg i ostavi u lijevku sa filter papirom koji se stavi u menzuru preko noći. Očita se količina bjelanjka u menzuri i dodaje se ista količina kemijski čistog glicerina (1:1). Dobro se izmiješa, te se doda zrnce timola (konzervans).

Dobiveni prerezi prebačeni su pomoću kistića u vodenu kupelj, gdje je temperatura vode bila 50-60^{o}C. Prerezi su prebačeni na predmetna stakalca uranjanjem stakalca u vodenu kupelj ispod reza. Tako pripremljena stakalca s rezovima sušena su u termostatu na temperaturi 60-65^{o}C, te su nakon toga ostavljena na temperaturi 35^{o}C do idućeg dana.

Deparafiniranje i bojanje hemalaun – eozinom

Postupak deparafiniranja proveden je kako bi uklonili paraplast iz tkiva. Sastoji se od provođenja rezova na predmetnom stakalcu kroz niz za deparafiniranje. Ovaj niz čini niz otapala u kojima se postepeno, prenošenjem iz jednog u drugi, zamijenjuje paraplast iz tkiva. Otapala su raspoređena slijedećim redom:

Ksilol I (15 minuta)

Ksilol II (15 minuta)

100% etanol (5 minuta)

96% etanol (5 minuta)

80% etanol (5 minuta)

70% etanol (5 minuta)

Nakon deparafiniranja, slijedi ispiranje u destiliranoj vodi, dva puta po pet minuta.

Stakalca s rezovima tkiva prebačena su u kadicu s hemalaunom, na četiri minute. Nakon toga su isprana dva puta i to prvi put u kadici s tekućom vodom (10 min), a onda u destiliranoj vodi (10 min). Zatim su prebačena u eozin (12 min) i ponovno isprana u destiliranoj vodi (5 min).

Hemalaun boju (poznatu i kao Mayerova otopina) rabili smo gotovu, već priređenu. Eozin (0.1%-tnu otopinu) smo priredili sami, po slijedećoj recepturi:

0.1 gram boje u prahu otopili smo u 100 ml 75%-tnog alkohola, dobro promućkali i dodali 2-3 kapi ledene octene kiseline. Ponovno smo promiješali i nastojali da pH otopine bude oko 4.5. Talog smo profiltrirali.

Hemalaun se ponaša kao bazična boja, tj. boji bazofilne sastojke tkiva odnosno sastojke koji sadržavaju kiseline (npr. nukleoproteine). Kiselim bojama (u našem slučaju to je eozin), boje se najčešće osnovni sastojci bjelančevina u citoplazmi, tj.sastojci koji imaju afinitet prema kiselinama. Dok hemalaun boji plavo staničnu jezgru i druge kisele sastojke u stanicama (npr. organele koji sadrže puno RNA, poput hrapavog endoplazmatskog retikuluma), eozin boji citoplazmu i citoplazmatske proteine crveno.

Dehidriranje i uklop u kanadski balzam

Dehidriranje smo primijenili da bi uklonili vodu iz tkiva nakon bojanja. Postupak se sastoji od provođenja preparata kroz niz otopina alkohola rastućih koncentracija, kako je navedeno:

70% etanol (5 minuta)

80% etanol (5 minuta)

96% etanol (dva puta po 5 minuta)

100% etanol (dva puta po 5 minuta)

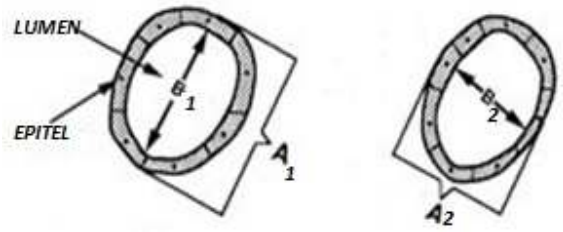
Stakalca s rezovima zatim su uronjena u ksilol (dva puta po 5 minuta) i takva uklopljena u kanadski balzam u svrhu dobivanja trajnih mikroskopskih preparata.

3.2. Mikroskopska morfometrijska analiza probavne žlijezde

Probavna žlijezda analizirana je mikroskopom Olympus Leica Wild m28 opremljenim objektnim mikrometrom, pri povećanju od 50x. Predmet analize bili su probavni tubuli.

Indeks kondicije

Vidno polje podijeljeno je u četiri kvadranta. Iz svakog kvadranta, za mjerenje je nasumično odabrano deset probavnih tubula, u svrhu izračunavanja indeksa kondicije. Indeks kondicije probavnih tubula dagnje, izračunavao se prema Winsteadu (1995), gdje su svakom od 10 nasumično odabranih tubula u svakom kvadrantu izmjereni vanjski promjeri, te promjeri lumena, na način kako je prikazano na slici 7.



Slika 7: Shematski prikaz probavnog tubula s naznačenim načinom mjerenja u svrhu izračunavanja indeksa kondicije. Prilagođeno prema: Winstead, 1995.

Dobivene su vrijednosti A1, A2, B1 i B2, te je za svaki tubul izračunat indeks kondicije na slijedeći način:

$$\text{Indeks kondicije} = B1 + B2 / A1 + A2$$

Nakon izračunavanja srednje vrijednosti indeksa kondicije probavnih tubula za svaki kvadrant, dobivena je srednja vrijednost za svaki od sedam preparata označenih istim početnim brojem. Konačno je dobivena srednja vrijednost indeksa kondicije probavnih tubula za svaku skupinu uzoraka, označenu brojevima 1-16.

Budući da je po sedam preparata označeno istim početnim brojem uzorka (npr. 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 i 1.7), srednje vrijednosti za svaki uzorak računale su se zbrajanjem vrijednosti svih preparata pod istim brojem uzorka, a zbroj se dijelio sa sedam. Zbog nemogućnosti morfometrijske analize uslijed oštećenja tkiva prilikom izrade preparata, kod uzoraka pod brojem 4 i 7, srednja vrijednost izračunata je na temelju analize šest preparata.

3.3. Statistička obrada podataka

PCA (engl. Principal Components Analysis) i klaster analiza rabljene su za utvrđivanje statističke sličnosti između srednjih vrijednosti indeksa kondicije probavnih tubula (debljine, odnosno visine epitela probavnih stanica) na različitim postajama.

Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između indeksa kondicije probavnih tubula dagnji prikupljenih na postaji Bistrina u istom razdoblju uzorkovanja na različitim dubinama (1 i 4m), korišten je T-test, dok je za usporedbu srednjih vrijednosti indeksa kondicije tubula na različitim dubinama i u različitim razdobljima uzorkovanja korišten Turkey-Kramer test za višestruku usporedbu.

Analiza linearne višestruke regresije korištena je da bi se utvrdio odnos između indeksa kondicije probavnih tubula i biotskih i abiotskih čimbenika izmjerenih tijekom monitoringa istraživanih postaja (MARIBIC, 2010) koji je obavljan istovremeno kada i uzorkovanje za ovo istraživanje.

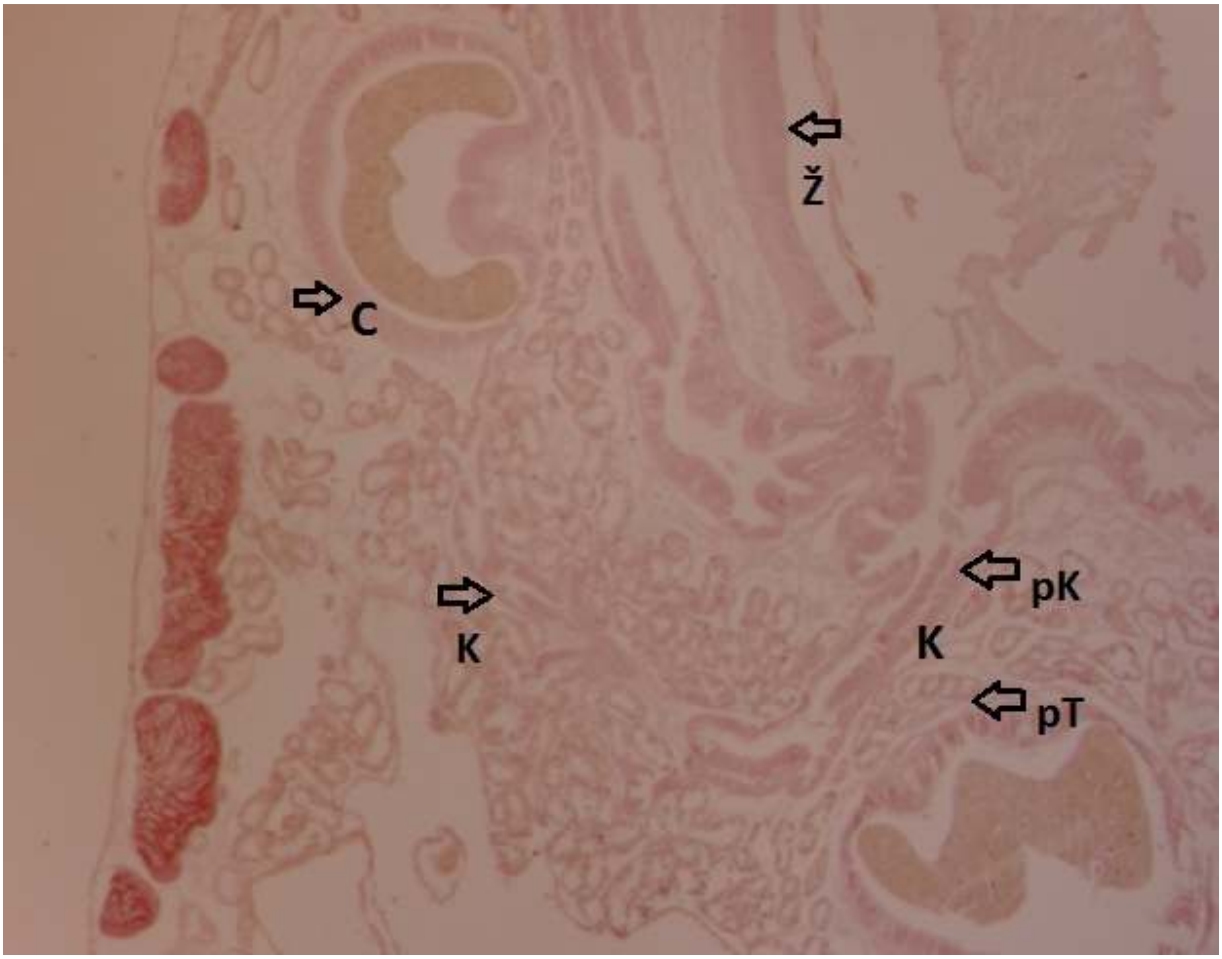
Srednje mjesečne vrijednosti indeksa kondicije probavnih tubula dagnji izračunate su u programu MS Excel 2000. Za grafički prikaz podataka korišteni su MS Excel i Sigma Plot 8.0. Obrada podataka objavljena je prema Zarr-u (1999) u programu Statistica 6.0.

4. REZULTATI

Na sedam postaja u Malostonskom zaljevu, prikupljeno je 112 jedinki dagnji. Predmet istraživanja bio je probavni sustav, s naglaskom na probavnu žlijezdu. Mikroskopskim pregledom utvrđeno je da je dva preparata nemoguće histološki i morfometrijski analizirati uslijed oštećenja prilikom izrade.

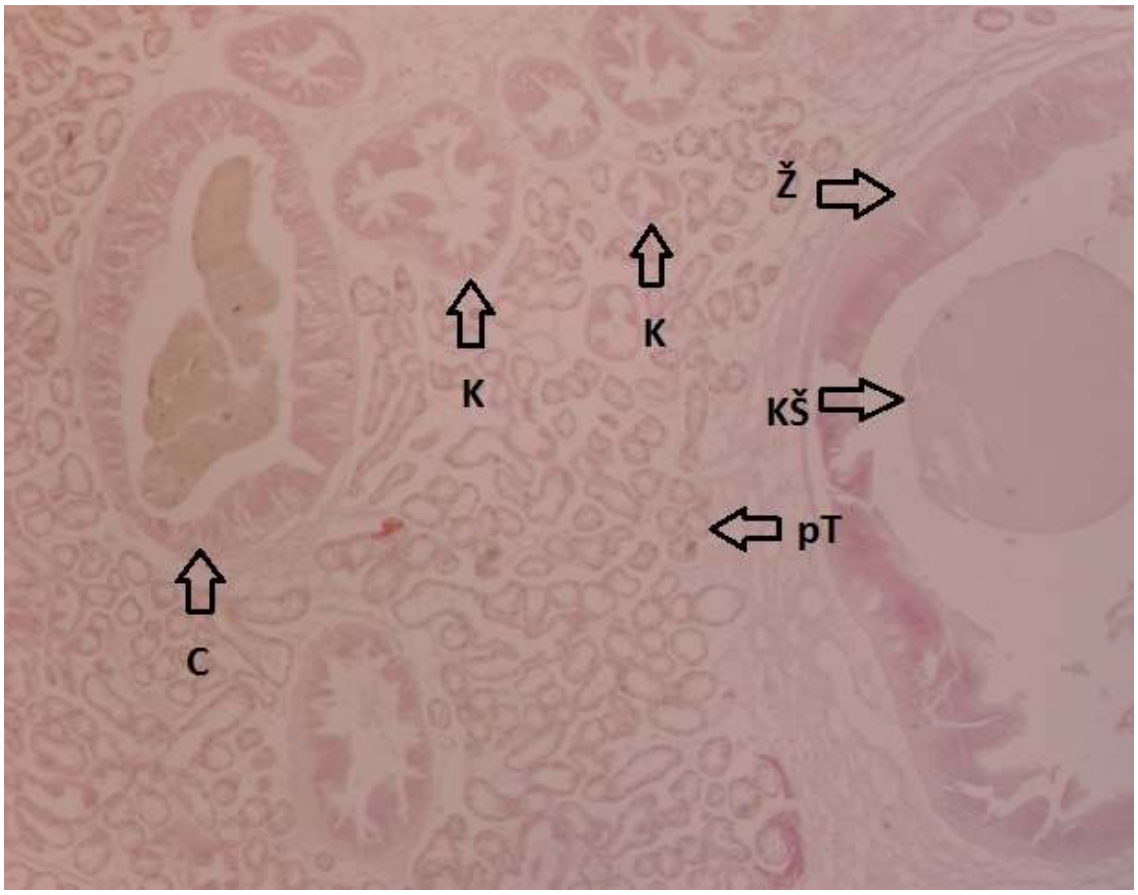
4.1. Mikroskopski pregled probavne žlijezde

Probavna žlijezda dagnje leži u rastresitom vezivnom tkivu, koje u potpunosti okružuje želudac (Ž) i crijeva (C). Sastoji se od niza primarnih kanalića koji se otvaraju u želudac, granaju se na manje i potom slijepo završavaju probavnim tubulima (Slika 8).



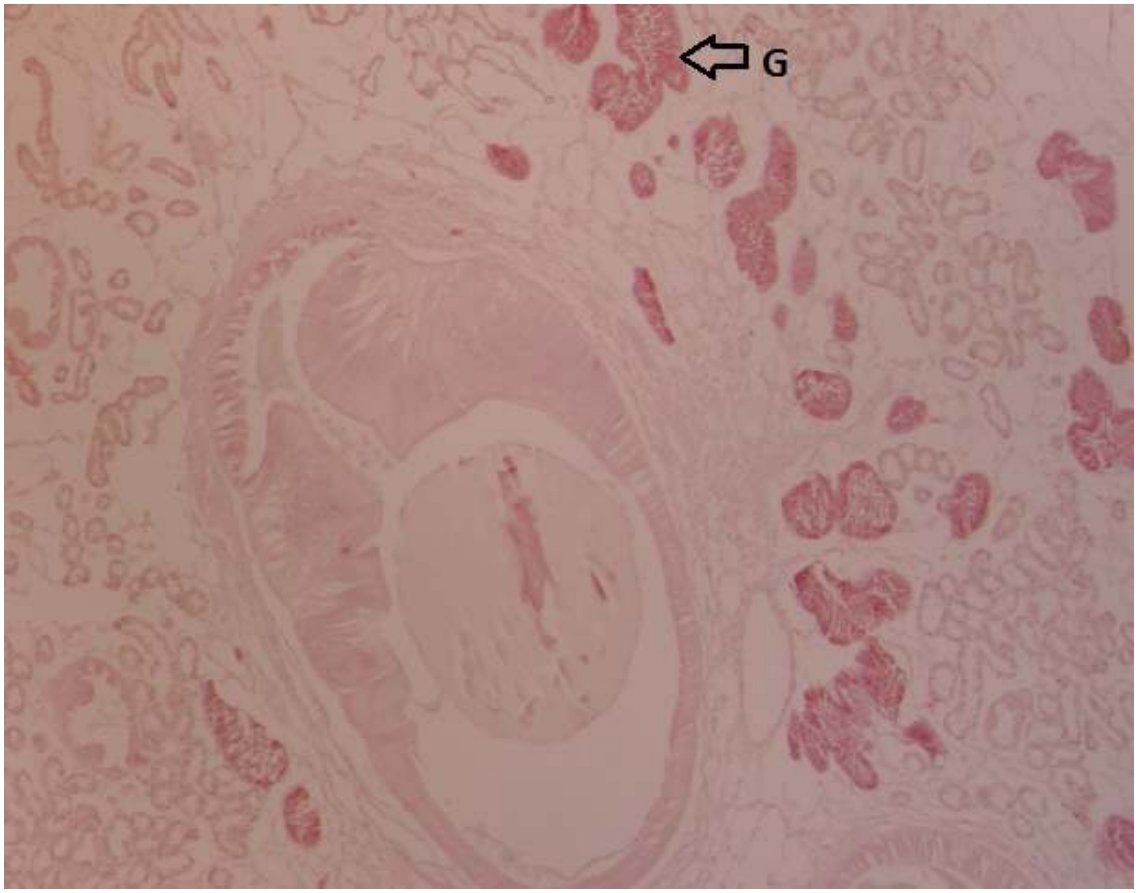
Slika 8: Probavna žlijezda dagnje uložena u rastresito vezivno tkivo zajedno s dijelom crijeva (C) i želuca: primarni kanalići (pK) koji se otvaraju u želudac (Ž); manji kanalići (K) koji nastaju grananjem primarnih; probavni tubuli (pT). HE x 50

Na slici 9, pored probavne žlijezde vidi se želudac (Ž), s kristalnim štapićem (KŠ) te crijevo (C) ispunjeno sadržajem dospjelim iz želuca.



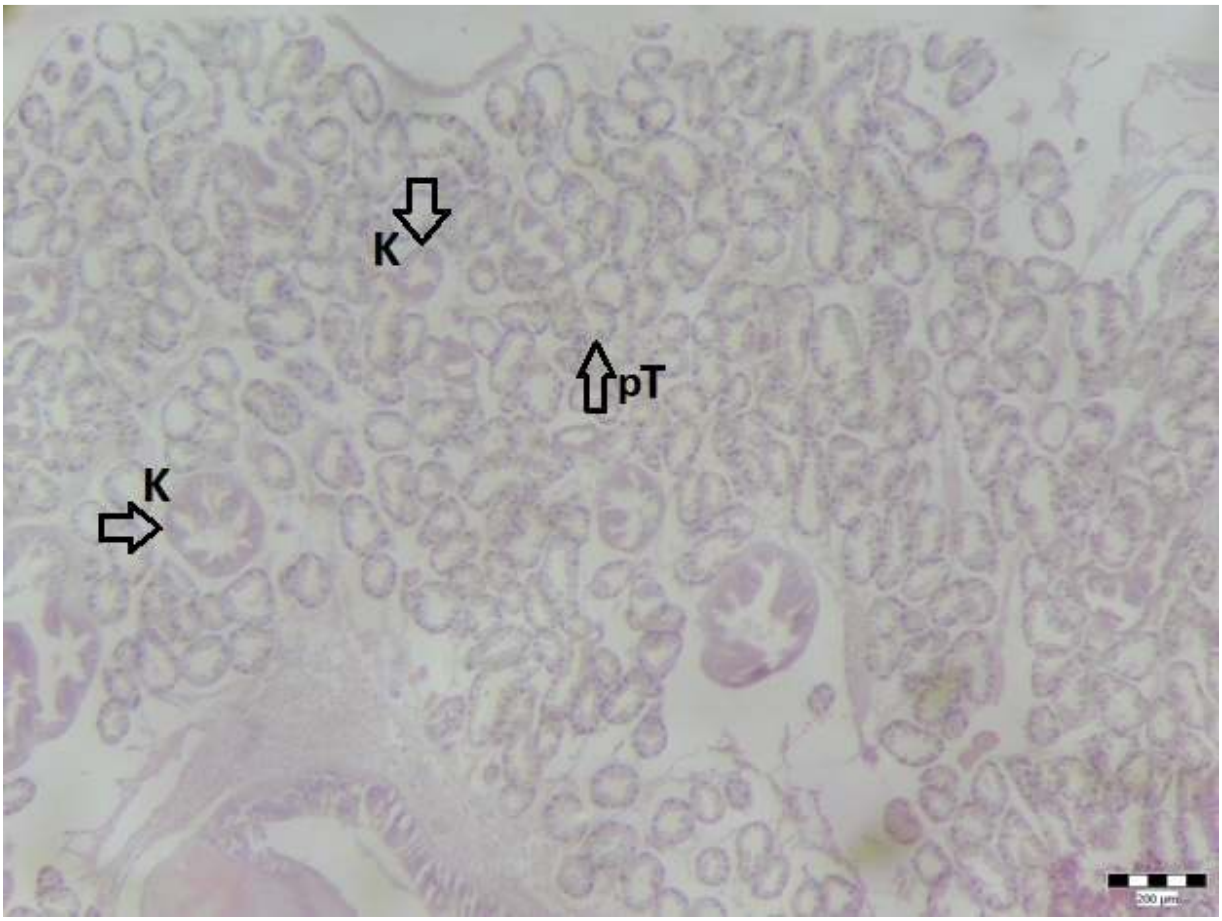
Slika 9: Želudac (Ž) u čijem se lumenu nalazi kristalni štapić (KŠ), crijevo (C) sa sadržajem dospjelim iz želuca, probavni kanalići različitog promjera (K), koji slijepo završavaju probavnim tubulima (pT). HE x 50

U rastresitom vezivnom tkivu nakupljaju se hranjive tvari (posebno glikogen) neposredno pred gametogenezu, te potom dolazi do razvitka spolnih stanica u spolnim kanalićima. Na slici 10 se, pored probavne žlijezde i želuca, vidi i početak razvitka spolnih kanalića.



Slika 10: Pored probavne žlijezde i želuca s kristalnim štapićem, na slici je vidljiv i početak gametogeneze (G). HE x 50

Probavni tubuli se sastoje od probavnih i bazofilnih stanica. Njihov je epitel heterogen u usporedbi s epitelom probavnih kanalića. Tubuli svih analiziranih uzoraka imali su uglavnom nizak, kubični epitel i širok lumen. Tubuli na rubnim dijelovima tkiva imali su širi lumen i niži epitel od tubula u središnjim dijelovima (Slika 11).



Slika11: Probavna žlijezda dagnje. K- kanalići probavne žlijezde, pT- probavni tubuli. HE x 50

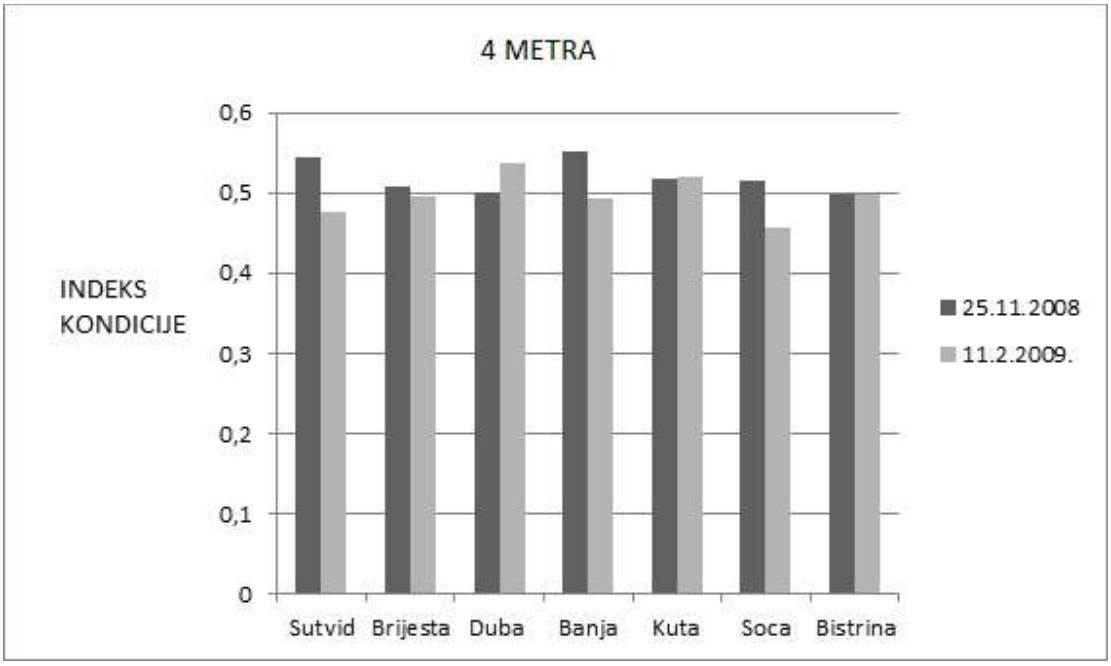
4.2. Indeks kondicije probavnih tubula

U tablici 1 prikazane su srednje vrijednosti indeksa kondicije dagnji uzorkovanih na sedam različitih postaja, na dubini od četiri metra, u dva navrata- 25.11.2008. i 11.2.2009. Najviša srednja vrijednost indeksa kondicije zabilježena je na postaji Banja, 25.11.2008. (0.552788), dok je najniža zabilježena na postaji Soca 11.2.2009. (0.456539).

Tablica 1. Indeks kondicije dagnji uzorkovanih na 4m, po postajama.

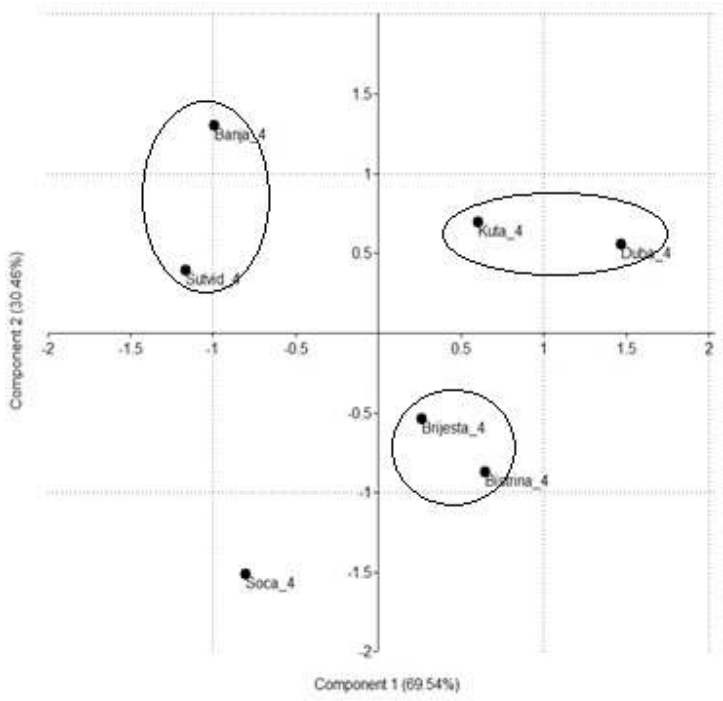
POSTAJA	**DATUM**	**INDEKS KONDICIJE**
Sutvid	25.11.2008. 11.2.2009.	0.545164 0.476546
Brijesta	25.11.2008. 11.2.2009.	0.508729 0.494571
Duba	25.11.2008. 11.2.2009.	0.500182 0.537675
Banja	25.11.2008. 11.2.2009.	0.552788 0.493761
Kuta	25.11.2008. 11.2.2009.	0.517232 0.520421
Soca	25.11.2008. 11.2.2009.	0.516164 0.456539
Bistrina	25.11.2008. 11.2.2009.	0.497939 0.498243

Iz slike 12 je vidljivo da su srednje vrijednosti indeksa kondicije probavnih tubula dagnji uzorkovanih u studenome na postajama Sutvid, Banja, Brijesta i Soca bile veće od vrijednosti izmjerenih u veljači na istoj postaji i istoj dubini uzorkovanja (4m). Na postajama Bistrina i Kuta ove su vrijednosti bile približno jednake u oba razdoblja uzorkovanja, dok su u Dubi veće vrijednosti izmjerene u veljači.



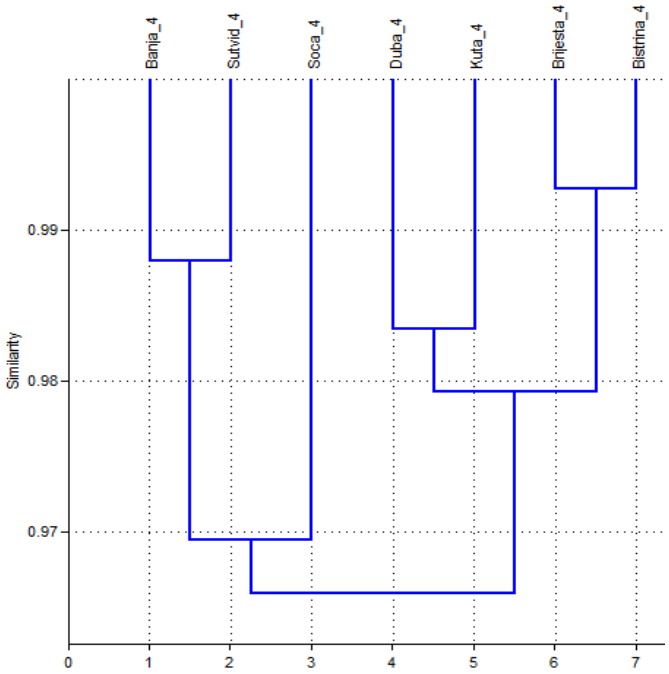
Slika 12: Indeks kondicije dagnji uzorkovanih na sedam postaja u Malostonskom zaljevu 25.11.2008. i 11.2.2009. na dubini od 4m.

Rezultati PCA statističke analize kojom su uspoređeni uzorci prikupljenih na istoj dubini (4 m) na svim postajama, neovisno o datumu prikupljanja, pokazuju četiri skupine sličnih postaja: Banja i Sutvid, Kuta i Duba, Brijesta i Bistrina te postaja Soca (Slika 13).



Slika 13. Usporedba indeksa kondicije probavnih tubula dagnji prikupljenih na dubini od 4 m na postajama Banja, Bistrina, Brijesta, Duba, Kuta, Soca i Sutvid, na temelju PCA statističke analize.

Klaster analizom su potvrđeni rezultati PCA analize, s tim da su postaje Banja i Sutvid po vremenskim promjenama srednjih vrijednosti indeksa kondicije probavnih tubula sličnije postaji Soca, dok su Kuta i Duba sličnije skupini postaja Brijesta i Bistrina (Slika14).



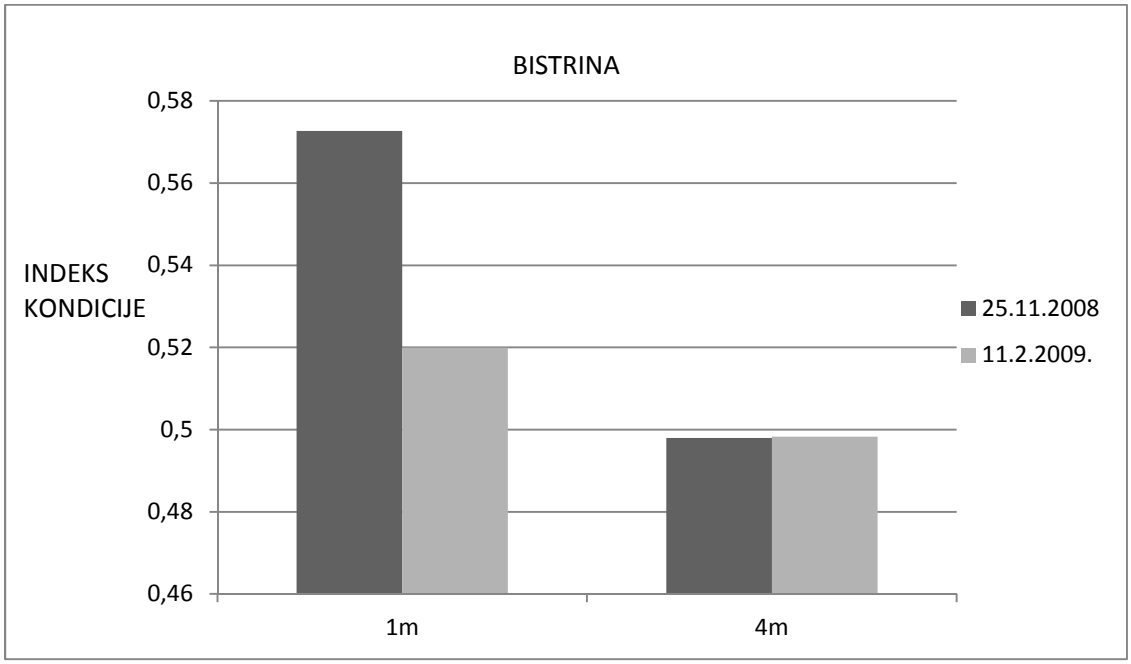
Slika 14. Rezultati klaster analize za utvrđivanje sličnosti indeksa kondicije probavnih tubula između postaja Banja, Bistrina, Brijesta, Duba, Kuta, Soca i Sutvid.

Tablica 2 prikazuje srednje vrijednosti indeksa kondicije dagnji uzorkovanih na postaji Bistrina, u dva navrata - 25.11.2008. i 11.2.2009. na dubinama od 1 i 4 m. Najvišu prosječnu vrijednost indeksa kondicije u Bistrini imale su dagnje uzorkovane 25.11.2008. na dubini od 1m (0.572675), a najnižu dagnje sakupljene 25.11.2008. na dubini od 4m (0.497939).

U studenom je srednja vrijednost indeksa kondicije probavnih tubula bila veća na dubini od jedan metar u odnosu na vrijednosti izmjerene u veljači na istoj dubini. Za razliku od navedenog, vrijednosti izmjerene na dubini od četiri metra bile su slične u oba razdoblja uzorkovanja (Tablica 2, Slika 15).

Tablica 2: Indeks kondicije jedinki uzorkovanih na postaji Bistrina na dvije dubine uzorkovanja (1 i 4 m)

DUBINA / m	**DATUM**	**INDEKS KONDICIJE**
1	25.11.2008. 11.2.2009.	0.572675 0.519943
4	25.11.2008. 11.2.2009.	0.497939 0.498243



Slika 15: Indeks kondicije dagnji uzorkovanih na dubini 1m i 4m na postaji Bistrina, 25.11.2008. i 11.2.2009.

T-Test je pokazao da se indeks kondicije probavnih tubula dagnji uzorkovanih u studenome značajno razlikuje između jedinki prikupljenih s dubine od jednog i četiri metra. To znači da su jedinke prikupljene na dubini od jednog metra imale značajno tanji epitel probavnih tubula u usporedbi s jedinkama sakupljenim na dubini od četiri metra. Indeks kondicije dagnji uzorkovanih u veljači, na obje dubine nije se statistički značajno razlikovao.

Turkey-Kramer test višestruke usporedbe pokazao je da se indeks kondicije jedinki prikupljenih na postaji Bistrina u studenome na dubini od jednog metra statistički značajno razlikuje od indeksa kondicije svih ostalih uzoraka prikupljenih s postaje Bistrina.

Analiza linearne višestruke regresije pokazala je da na visinu indeksa kondicije probavnih tubula dagnje od svih biotskih i abiotskih čimbenika (temperatura - T; salinitet - S; pH; otopljeni kisik; koncentracija ukupne, organske i anorganske partikularne tvari; koncentracija klorofila a - CHL a i feopigmenta – PHAEO; indeks kondicije školjkaša - CI) izmjerenih tijekom monitoringa

istraživanih postaja (MARIBIC, 2010) najveći utjecaj ima količina partikularne tvari, kako ukupne (TPM), tako i njezine pojedinačne komponente (organska - POM i anorganska - PIM). Ova međusobna ovisnost može se prikazati slijedećim formulama:

Indeks kondicije tubula= -0.001*CI + 0.007*T+ 0.014*S + 0.702*TPM + 0.026*chlα + 0.059*PHAEO - 0.018*datum uzorkovanja

R^2=0.996

Indeks kondicije tubula = -0.002*CI+ 0.01*T+ 0.013*S+ 1.876*PIM-10.937*POM+ 0.08* chlα -0.0009*PHAEO-0.007* datum uzorkovanja

R^2=0.996

5. RASPRAVA

Istraživanja Morton-a (1970b, 1975) i Owen-a (1970) pokazala su da je hranjenje u intertidalnih školjkaša diskontinuiran proces povezan s plimom i osekom. Epitel tubula mijenja se iz visokoprizmatičnog (za plime) u nizak, kubični epitel (za oseke), te se za slijedeće plime ponovno vraća u visokoprizmatični oblik (Morton, 1970; Robinson i Langton, 1980). Prema Mortonu (1970, 1971) koji je svoje istraživanje temeljio na mjerenju veličine kristalnog štapića i pH vrijednosti štapića i želučanog sadržaja, kod *O.edulis* i *C.edule* se uzimanje hrane odvija tijekom plime, izvanstanična probava tijekom oseke, a unutarstanična probava u probavnoj žlijezdi za slijedeće plime. Općenito, prisutnost kristalnog štapića, i kod intertidalnih i kod subtidalnih jedinki, pokazatelj je da se životinja aktivno hrani (Galtsoff, 1964). Štapić nije permanentna struktura, te jednako kao i epitel probavnih tubula, varira u veličini ovisno o plimi i oseki, te dostupnosti hrane (Langton i Newell, 1996). U našem istraživanju subtidalne populacije dagnje prisutnost kristalnog štapića nije utvrđena u želucu svih jedinki, iako su bile u dobroj kondiciji tj. imale indeks kondicije i indeks mesa (MARIBIC, 2010) tipičan za zdrave jedinke koje se aktivno hrane. To ukazuje na postojanje cikličnih promjena u procesu hranjenja i izvanstanične probave i kod subtidalnih jedniki. Slično našim nalazima, Purchon (1971) i Morton (1983) smatraju da su hranjenje i probava kod subtidalnih školjkaša diskontinuiran i ciklički proces.

Postojanje ritma unutarstanične probave kod više vrsta školjkaša dokazali su brojni autori na temelju morfoloških promjena tubula probavne žlijezde, ovisno o stadiju probave (Morton, 1956; McQuiston, 1969; Morton, 1969; 1970a,b, 1971, 1977; Owen, 1972; Langton, 1975; Mathers, 1976; Mathers i sur., 1979). Međutim, na promjenu visine epitela probavnih stanica, koju je moguće analitički utvrditi izračunavanjem indeksa kondicije tubula (Winstead, 1995), pored stadija probave mogu utjecati i različiti biotski i abiotski čimbenici (Winstead, 1995; Winstead, 1998; Hawkins i Bayne, 1992). Kako bi se izbjegle eventualne morfološke promjene uzrokovane varijacijama u dnevnom ritmu probave i hranjenja, a ujedno bolje mogao procijeniti utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika mora i fiziološkog stanja školjkaša, u ovom je istraživanju uzorkovanje oba puta obavljeno u isto doba dana (od 12 do 14 sati). Tubuli svih analiziranih uzoraka iz našeg istraživanja imali su uglavnom nizak, kubični epitel i širok lumen.

Tubuli na rubnim dijelovima tkiva imali su širi lumen i niži epitel probavnih stanica od tubula u središnjim dijelovima. Iz navedenog bi se, sukladno podjeli faza probavnog ciklusa u probavnoj žlijezdi prema Langdon-u i Newell-u (1996) dalo zaključiti da su tubuli na rubnim dijelovima probavne žlijezde bili u fazi zadržavanja, dok je većina tubula u središnjim dijelovima tkiva već postupno prelazila u početnu fazu apsorpcije.

Cikličke promjene tijekom unutarstanične probave subtidalnih jedinki *O.edulis* dokazali su i Wilson i La Touche (1978). Ovi su autori uzorkovanje obavljali svakih sat vremena tijekom 12 sati. Za razliku od do sada navedenih autora, Robinson i Langton (1980) i Winstead (1995) probavni proces kod subtidalnih školjkaša promatraju kao kontinuirani proces, u kojem epitel tubula normalno ostaje u visokoprizmatičnom obliku. Winstead (1998) je uzorkovao intertidalne i subtidalne *Crassostrea virginica* i ustvrdio da kod intertidalnih jedinki postoji sinkronizirani uzorak morfoloških promjena povezan s ritmom plime i oseke. U prvom redu to se odnosilo na nastanak kristalnog štapića i pojavu epitela tubula u visokoprizmatičnom obliku kad su životinje bile potopljene i hranile se, te otapanje kristalnog štapića i prijelaz epitela u nizak kubični tijekom oseke. Za razliku od intertidalnih, kod subtidalnih *C. virginica* uzorkovanih u isto vrijeme (za plime i oseke) kristalni je štapić uvijek bio prisutan, a većina probavnih tubula bila je u fazi apsorpcije i fazi probavljanja sa visokoprizmatičnim epitelom i uskim lumenom tubula. Očigledno je, da je i u ovom istraživanju, kao i u našem, zbog izbora vremena uzorkovanja izostalo utvrđivanje dnevnih cikličkih promjena. Također bi se moglo pretpostaviti da probavni tubuli subtidalnih školjkaša dnevno prolaze nekoliko cikličkih faza. Ovoj pretpostavci bi mogli ići u prilog i nalazi Devenport-a i sur. (2000). Ovi su autori istražujući ishranu dagnje *M. edulis* utvrdili da je ova vrsta sposobna ingestirati i probaviti mikrozooplankton veličine 1 – 1000 µm, pri čemu je unutarstanična probava u želucu bila izuzetno brza (manje od 40 minuta na temperaturi od 15 – 20 °C).

Mnogi autori pokazali su da su najvažniji čimbenici okoliša za školjkaše - količina i sastav dostupne hrane, te osnovni hidrografski parametri (temperatura, salinitet, koncentracija otopljenog kisika i pH) (Winstead, 1995; Hawkins i Bayne, 1992; Ibarrola i sur., 1998a; Ibarrola i sur, 1998b; Labarta i sur., 2002; Fernandez-Reiriz i sur., 2001). Pritom ovi hidrografski parametri

imaju značajan utjecaj na intenzitet filtracije, kao i na apsorpcijsku učinkovitost (Jørgensen, 1990; Gosling, 2003). Kao odgovor na oscilacije ovih čimbenika, javljaju se različiti fiziološki odgovori školjkaša (Hawkins i Bayne, 1992). Kozarić i Peternel (1987) navode da morfološka građa probavnog sustava ovisi o načinu ishrane i vrsti dostupne hrane. U našem je istraživanju indeks kondicije probavnih tubula dagnje varirao u ovisnosti o postaji. Rezultati PCA i klaster analize pokazali su da s obzirom na promjene indeksa kondicije tubula postoje četiri skupine sličnih postaja. S obzirom da su uzorci za ovo istraživanje prikupljani tijekom monitoringa pri kojem su, između ostalog, mjereni hidrografski parametri i količina dostupne hrane (MARIBIC, 2010), postaje je bilo moguće usporediti i metodom višestruke linearne regresije. Parcijalni koeficijenti korelacije pokazali su da najvažniju, iako ne jedinu, varijablu koja utječe na visinu indeksa kondicije tubula predstavlja količina dostupne hrane (količina ukupne, organske te anorganske partikularne tvari). Slično našim nalazima, Robinson i Langton (1980) te Winstead (1995) smatraju da je probava kod subtidalnih jedinki proces koji se temelji na dostupnosti hrane.

Procjena veličine fitoplanktonske biomase, kao dijela hrane školjkaša, može se određivati mjerenjem koncentracije klorofila a, jer je taj pigment zajednički za sve skupine fitoplanktona (Viličić, 2002), te se koristi kao pokazatelj abundancije fitoplanktona. Sezonske promjene biomase fitoplanktona izražene koncentracijom klorofila a, ukazuju na zimski i ljetni razvoj fitoplanktona. Na temelju podataka o koncentraciji klorofila a iz monitoringa istraživanih postaja (MARIBIC, 2010) provedenog u razdoblju od studenog 2008. do procinca 2009., najveća koncentracija klorofila a, zabilježena je na postaji Soca (>0.70 mg m-3) , na dubini od 4 m, u veljači 2009. Ovaj podatak može se također povezati s rezultatima statističkih analiza sličnosti postaja obavljenih na osnovu srednjih vrijednosti indeksa kondicije tubula, koje su pokazale da se postaja Soca razlikuje od ostalih istraživanih postaja.

U ovom radu, na postaji Bistrina uzorkovane su jedinke dagnji s dvije dubine. Statistička analiza pokazala je da dagnje prikupljene s dubine od jednog metra u studenom 2008. imaju značajno višu srednju vrijednost indeksa kondicije probavnih tubula, odnosno niži epitel tubula od ostalih uzoraka. Značajno viši indeks kondicije u odnosu na dagnje prikupljene na istoj dubini u veljači,

vjerojatno se jednim dijelom može povezati s razlikom u salinitetu. Prema podacima monitoringa istraživanih postaja (MARIBIC, 2010), na postaji Bistrina u studenom je zabilježena vrijednost saliniteta od 37 psu, a u veljači 28.5 psu. Sniženi salinitet (ali ne ekstremni niži od optimalnog za ovu vrstu) vjerojatno je posljedica pojačanog dotoka slatkih voda u Zaljev, a s njima i hranjivih soli koje utječu na ishranu dagnji. Naime, poznato je da zimi u Malostonskom zaljevu vlada estuarni tip cirkulacije (u površinskom sloju voda izlazi iz zaljeva, a u pridnenom ulazi u njega zbog znatnijih izvora slatke vode u Zaljevu) (Vučak i sur., 1981). Prostorna i vremenska raspodjela hranjivih soli u vodenom stupcu ima ulogu regulatora rasta fitoplanktona, osnovne hrane školjkaša. Promjene njihovih molarnih omjera utječu na rast i razvoj pojedinih vrsta fitoplanktona. Stoga su poželjne u optimalnim koncentracijama, no njihovo prekomjerno unošenje u morsku vodu može dovesti i do promjena u stupnju zasićenja kisikom u morskoj vodi, te do porasta abundancije i biomase fitoplanktona, pa tako i do cvata otrovnih vrsta fitoplanktona. S druge strane, njihova smanjena koncentracija dovodi do smanjene abundancije fitoplanktona, što se također može negativno odraziti na kakvoću i mrijest školjkaša (MARIBIC, 2010).

Razlika između indeksa kondicije dagnji prikupljenih na dubini od jedan metar u studenom na postaji Bistrina i dagnji uzorkovanih sa četiri metra, ne može se povezati sa razlikom u salinitetu, jer ona nije bila izražena. No, može se povezati s dostupnošću hrane, odnosno različitom koncentracijom ukupne partikularne tvari u studenom, koja je prema rezultatima monitoringa (MARIBIC, 2010), u Bistrini na dubini od 1m iznosila oko 0.005 g/L, dok je u isto vrijeme, na dubini od 4m iznosila više od 0.015 g/L. Niža koncentracija ukupne partikularne tvari u studenom vjerojatno je dovela do smanjene dostupnosti hrane, odnosno pojave niskog epitela probavnih tubula jedinki s dubine 1m. Naime, školjkaši se hrane različitim česticama koje su suspendirane u morskoj vodi, kao što su: fitoplankton, zooplankton, bakterije i detritus (Gosling, 2003; Web i Chu, 1982; Kršinić, 1987; McHenry i Berkbeck, 1985; Tamburri i Zimmer-Faust, 1996; Langdon i Newell, 1990). Brojni autori, kao što su Theede (1963), Winter (1969) i Thompson i Bayne (1972), su pokazali da partikularna tvar u suspenziji povećava intenzitet hranjenja u brojnih vrsta školjkaša. No, bitan je i međusobni omjer anorganske i organske partikularne tvari. Prema pokusima, koncentracija anorganske partikularne tvari koja je 25-50

puta veća od organske, značajno pospješuje filtraciju i probavu školjkaša (Kiørboe i sur., 1981). Navedeno su pokazali i naši rezultati višestruke linearne regresije, s obzirom na visinu parcijalnog koeficijenta korelacije za partikularnu anorgansku tvar.

Na postaji Bistrina, uzorci s dubine od četiri metra, manje su se razlikovali s obzirom na indeks kondicije tubula između studenog i veljače, nego uzorci s dubine od jednog metra. Mogući uzrok su konstantniji i povoljniji uvjeti okoliša (kombinacija svih biotskih i abiotskih faktora) koji vladaju na ovoj dubini. Prema rezultatima monitoringa istraživanih postaja (MARIBIC, 2010), za razliku od dubine od 1m, ni salinitet zabilježen na postaji Bistrina na dubini od 4m nije značajno varirao između studenog i veljače (36.5 psu i 35 psu). Da dubina ima značajan utjecaj na rast, kvalitetu mesa i preživljavanje školjkaša, a time svakako i na ishranu, na ovoj postaji utvrdili su i Gavrilović i sur. (2011c) te Šimunović i sur. (1981). Gavrilović i sur. (2011c) su uspoređivali kvalitetu mesa i stopu mortaliteta subtidalnih populacija europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) u uvali Bistrina, korištenjem dviju uzgojnih tehnologija (tradicionalnog cementiranja na "pergolare" i uzgoja u "kašetama" na dubini od 4m). Pritom su ustvrdili da kondicija i rast školjkaša ovise o uzgojnoj tehnologiji, kao i dubini uzorkovanja, te zaključili da bolje uvjete za razvoj ostvaruju kamenice s dubine od četiri metra. Slično tome, Šimunović (1981) je u uvali Bistrina, tijekom istraživanja koje je proveo na kamenicama uzgajanim u sanducima 1971.g., najmanji mortalitet utvrdio na dubini 4 i 5m (43.1%), a najveći na dubini od 1m (63.5%).

6. ZAKLJUČAK

Predmet istraživanja u ovom radu, bile su dagnje prikupljene na sedam postaja u Malostonskom zaljevu, u sklopu projekta "Značajke uzgojnih lokaliteta na osnovu praćenja rasta, indeksa kondicije, zdravstvenog statusa i spolnog sazrijevanja uzgojnih populacija kamenice i mušule u području Malostonskog zaljeva". Na svakoj postaji, uzimao se uzorak od sedam jedinki dagnje, u dva navrata: 25.11.2008. i 11.2.2009. Na postaji Bistrina, dagnje su prikupljene navedenih datuma s dubina od jednog i četiri metra, dok su na ostalim postajama prikupljene na dubini od jednog metra. Trajni mikroskopski preparati izrađeni za svaku od 16 skupina uzoraka, te su mikroskopski analizirani s ciljem utvrđivanja morfometrijskih karakteristika probavnih tubula.

Većina probavnih tubula dagnji iz Malostonskog zaljeva, neovisno o godišnjem razdoblju i dubini uzorkovanja, imala je nizak kubični epitel karakterističnog heterogenog izgleda, u odnosu na epitel probavnih kanalića i ostalih dijelova probavnog sustava.

S obzirom na usporedbu srednjih vrijednosti indeksa kondicije probavnih tubula na sedam istraživanih postaja u Malostonskom zaljevu, utvrđene su četiri skupine sličnih postaja: Banja i Sutvid, Kuta i Duba, Brijesta i Bistrina te postaja Soca.

Od svih uzoraka prikupljenih na sedam različitih postaja na dubini od 4m, prema indeksu kondicije probavnih tubula, najniža srednja vrijednost, odnosno najviši epitel probavnih stanica tubula, utvrđen je na postaji Soca. Na ovoj je postaji u isto vrijeme utvrđena i najveća koncentracija klorofila a, te bi se visina epitela probavnih stanica mogla povezati s povećanom dostupnošću hrane.

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da od svih ambijentalnih čimbenika na istraživanom području na indeks kondicije tubula najviše utječe količina partikularne tvari, odnosno količina dostupne hrane. Pored same količine hrane, važan je i odnos partikularne organske i anorganske tvari, s obzirom da ingestirana anorganska tvar povećava iskoristivost ingestirane organske.

Na postaji Bistrina, na kojoj je uzorkovanje obavljano na dvije dubine, indeks kondicije probavnih tubula dagnje uzorkovane na dubini od jednog metra u studenom 2008., značajno se

razlikuje od vrijednosti utvrđenih na dubini od četiri metra, kao i od vrijednosti utvrđenih na obje dubine u veljači. Navedeno ukazuje na činjenicu da na dubini od četiri metra vladaju konstantniji i povoljniji uvjeti okoliša na ishranu dagnje.

7. LITERATURA

Aarset, A.V**.,** 1982. Freezing tolerance in intertidal invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol*., 73A: 571-580.

Almada-Villela, P.C., Davenport, J., i Gruffydd, L.L.D., 1982. The effects of temperature on the shell growth of young *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 59: 275-288.

Barsotti, G. i Meluzzi, C., 1968. Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck. Conchiglie (Milan), 4: 50-58.

Basioli, J., 1968. Uzgoj školjaka na istočnim obalama Jadrana. Pomorski zbornik, 6: 179-218.

Basioli, J., 1981. Uzgoj školjkaša na istočnoj obali Jadranskog mora, s posebnim osvrtom na Malostonski zaljev. Zbornik radova Savjetovanja "Malostonski zaljev prirodna podloga i društveno valoriziranje", Dubrovnik, 268-281.

Bavčević, L. 1990. Fagocitozna aktivnost hemocita kamenice *Ostrea edulis.* Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Bayne, B.L., 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). Ophelia, 2: 1-47.

Bayne, B.L., 1971. Some morphological changes that occur at the metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis*. U: D.J. Crisp (Ur.), *Proc. 4th Eur. Mar. Biol. Symp. Bangor,* U.K., 1969. Cambridge University Press, London, 259-280.

Bayne, B.L., 1976. The biology of mussel larvae. U: B.L. Bayne (Ur.), Marine Mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 81-120.

Bayne, B.L., 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. U: N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar, i A. Tompa (Ur.), The Mollusca, Vol.III, Development. Academic Press, New York, 299-343.

Bayne, B.L. i Newell, R.C., 1983. Physiological energetics of marine molluscs. U: The molluska. Physiology: I. (Saleudin, A.S.M. i Wilbur, K.M. (Ur.). Academic Press, New York, 407-515.

Bayne, B.L., Thompson, R.J., Widdows, J., 1976. Physiology. U: Marine mussels: Their Ecology and Physiology. (Bayne, B.J., Ur.), Cambridge University Press, Cambridge, 121-206.

Bayne, B.L., Moore, N.M., i Koehn, R.K., 1981. Lysosomes and the response by *Mytilus edulis* L. to an increase in salinity. *Mar. Biol*. 2: 193-204.

Beaumont, A.R., T.Gjedrem i P. Moran, 2006. Blue mussel- *Mytilus edulis* and Mediterranean mussel - *M. galloprovincialis*. U: "Genetics effects of domestification, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations". D.Crosseti, S.Lapegue, I.Olesen, T.Svaasand (Ur.). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network WP1 workshop, "Genetics of domestification, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish, Viterbo, Italy, June 12-17th, 2006, 6pp.

Beaumont, A.R., Seed, R., i Garcia-Martinez, P., 1989. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. U: J. Ryland i P.A. Tyler (Ur.), *Proc. 23rd Eur*. *Mar. Biol. Symp*., Swansea, U.K., 1988. Olsen and Olsen, Fredensborg, Dennmark, 251-258.

Beninger, P.G., Le Pennec, M., Donval, A. 1991. Mode of particle ingestion in five species of suspension - feeding bivalve mollusks. *Mar. Biol.* 108: 255-261.

Beninger, P.G. i Dufour, S.C., 1996. Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudollamelibranch gill of *Crassostrea virginica* (*Bivalvia: Ostreidae*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137: 133-138.

Beninger, P.G., Dufour, S.C., Bourque, J. 1997. Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 150: 157-169.

Benović, A., 1980a. Razvoj marikulture u Kanalu Malog Stona. Morsko ribarstvo, 32(1): 26-28.

Benović, A., 1997. The History, Present condition and future of the Molluscan Fisheries of Croatia, NOAA Tech. Rep. NMFS, 199: 217-226.

BIODIDAC,2013. A bank of digital resources for teaching biology, http.//www. biodidac.bio.uottawa.ca; pristupljeno 15.5.2013.

Bishop, S.H., 1976. Nitrogen metabolism and excretion: regulation of intracellular amino acid concentration. 414-429. U: (Wiley, M., Ur.) Estuarine Processes. Academic Press, New York.

Bolotin, J., 1988. Prilog uzgoju dagnji (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck) u dubrovačkom području. Magistarski rad, Sveučilište Zagreb, 1-59.

Boucaud-Camou, E. i Henry, M., 2003. The digestive system. U: Atlas d´histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins = An atlas of histology and citology of marine bivalve moluscs. (Grizel, H., Ur.), Ifremer, France, 65-116.

Brock, V. i Kennedy, V.S., 1992. Quantitative analysis of crystalline style carbohydrases in five suspension-and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 159: 51-58.

Carriker, M.R., 1961. Interrelation of functional morphology, behaviour and autecology in early stages of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J.Elisha Mitchell Sci. Soc.,* 77: 168-241.

Cawthorne, D.F., 1979. Some effects of fluctuating temperatures and salinity upon cirripedes. Ph.D. Thesis, University of Wales, U.K.

Connell, J.H., 1972. Community interactions on marine rocky intertidal shores. *Ann. Rev. Ecol. Syst.,* 3: 169-192.

Courtright, R.C., Breese, W.P., i Krueger, H., 1971. Formulation of a synthetic seawater for bioassays with *Mytilus edulis* embryos. Water Res., 5: 877-888.

Dardignac- Corbel, 1990. Traditional mussel culture, Aquaculture, Vol.1, *J.Moll.Stud*. (1987), 3: 293-297.

D´Erco, R., 1862. Sulla coltura delle ostriche e sulle asterie o stelle di mare. Coi tipi di Colombo Coen, Trieste, 44.

Devenport, J., Smith, R.J.J.W. I Packer, M., 2000. Mussels *Mytilus edulis*: significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 198: 131-137.

Dufour, S.C. i Beninger, P.G. 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Mar. Biol*. 138: 295-309.

Dujmušić, A., 2000. Hrvatsko ribarstvo ispod površine, Rabus media d.o.o.

Dujmušić, A., 1992. Uzgoj školjaka u Limskom kanalu. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Navarro, J.M. i Velasco, A., 2001. Enzymatic digestive activity in *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) in response to food regimes and past feeding history. *J. Comp. Physiol*. B. 171: 449-456.

Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. U.S. Fish. Bull. 64: 1-480.

Gavrilović, A., 2002. Koncentracije kadmija, olova i cinka u kamenica (*Ostrea edulis*, L.) Malostonskog zaljeva. Magistarski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Marinović-Bonačić, A., Conides, A., Bonačić, K., Ljubičić, A. i Van Gorder, S., 2011b. The influence of environmental parameters on the growth and meat quality of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia). AACL BIOFLUX (Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation). *Int. J. Bio. Soc.* Vol.4.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Gjurčević, E., Ljubičić, A. 2008. Utjecaj indeksa kondicije i stupnja infestacije ljušture polihetom *Polydora spp.* na kvalitetu europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (Linneaus, 1758) iz Malostonskog zaljeva. Proceedings of the 43

Croatian and 3 International Symposium on Agriculture. Pospišil, M. (Ur.). Zagreb, Faculty of Agriculture, međunarodna recenzija, 742-746.

Gavrilović, A., 2011a. Utjecaj planktona na morfohistokemijske i biokemijske osobine probavnog sustava kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) Malostonskog zaljeva. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubičić, A., Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R., Topić-Popović, N. i Jadan, M., 2011c. Utjecaj uzgojne tehnologije na kvalitetu mesa i preživljavanje kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) u Malostonskom zaljevu. 46th Croatian&6th International Symposium on Agriculture. Section 6. Fisheries, Game Management and Beekeeping, 159-160.

George, W.C., 1952. The digestion and absorption of fat in lamellibranchs. Biol. Bull. 102: 118-127.

Gosling, E., 2003. Bivalve Moluscs - biology, ecology and culture. Fishing News Books, Blackwell Publishing, Oxford 443.

Gosling, E. i D.McGrath, 1990. Genetic variability in exposed-shore mussels, *Mytilus spp.,* along an environmental gradient. *Mar. Biol*., 104: 413-418.

Gosling, E., 1992. The mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol 25., Elsevier, Amsterdam, 589.

Grant, W.S. i Cherry, M.I., 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in southern Africa*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 90: 179-191.

Griffiths, C.L. i Griffiths, R.J., 1987. Bivalvia. U: Animal Energetics, Vol.2, Bivalvia through Reptilia (Pandian, T.J. i Vernberg, F.J., Ur.). New York, Academic Press, 1-88.

Hawkins, A.J.S., Smith, R.F.M., Bayne, B.L., He´ral, M., 1996. Novel observations underlying the fast growth of suspensionfeeding shellfish in turbid environments: *Mytilus edulis. Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131: 179-190.

Hawkins, A.J.S. i Bayne, B.L., 1992. Physiological interrelations and the regulation of production. U: The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture (Gosling, E.M., Ur.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 171-222.

Hawkins, A.J.S., Smith, R.F.M., Tan, S.H. i Yasin, Z.B., 1998a. Suspension – feeding behaviour in tropical bivalve molluscs *Perna viridis*, *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, *Saccostrea cucculata* and *Pinctada margarifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 166, 173-85.

Hrs - Brenko, M., 1974. Temperature and salinity requirements for embryonic development of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Thalassia Jugosl., 10: 131-138.

http:// www.maribic.com

Ibarrola, I., Larretxea, X., Iglesias, J i P., Urrutia, M.B. i Navarro, E., 1998a. Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule. Comp. Biochem. and Physiol.* A. 121, 25-34.

Ibarrola, I., Navarro, E. i Iglesias J i P., 1998b. Short-term adaption of digestive processes in the cockle *Cerastoderma edule* exposed to different food quality and quantitiy. *J. Comp. Physiol.* B. 168, 32-40.

IOR, 2003. Studija utjecaja na okoliš zahvata marikulture na području Malostonskog zaljeva i Malog mora (strateška procjena utjecaja na okoliš). Voditelj: Benović, A., Institut za oceanografiju i ribarstvo Split- Dubrovnik, 173.

Jasprica, N., 2003. Prva hrana svijeta, Biseri Jadrana, br.4, 66-72.

Jones, D.S., et al. 1990. Annual shell banding, age and growth rate of hard clams (*Mercenaria spp.*) from Florida. *J. Shell. Res*. 9: 215-225.

Jug- Dujaković, J. 2008. Marine aquaculture production. National fisheries strategy and COM project- PHARE 2005-EUROPEAID/123609/D/SER/HR.

Jørgensen, C.B., 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen Ltd., Fredensborg, Denmark.

Jørgensen, C.B., 1991. Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Olsen and Olsen, Fredensborg, 140.

Kiørboe, T., Møhlenberg, F. i Nøhr, O., 1981. Effect of suspended bottom material on growth and energetics in *Mytilus edulis. Mar. Biol*. 61: 283-288.

Kozarić, Z., Peternel, R., 1987. Neke histokemijske osobitosti mukopolisaharida probavne cijevi štuke (*Esox lucius*, L.). Vet. arhiv 59(3): 147-153.

Kršinić, F., 1987. On the Ecology of Tintinnines in the Bay of Mali Ston (Eastern Adriatic). *Est. Coast. Shelf. Sci*. 24: 401-418.

Kršinić, F., Mušin, D., 1981., Mikrozooplankton Malostonskog zaljeva i Malog mora. Zbornik radova savjetovanja "Malostonski zaljev, prirodna podloga i društveno valoriziranje", 12-14 studenog, Dubrovnik, Hrvatska, 108-119.

Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M. i Velasco, A., 2002. Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. Mar. Biol. 140, 669-676.

Langdon, C.J., Newell, R.I.E., 1996. Digestion and nutrition in Larvae and adults. U: The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. (Kenedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble, Ur.). A Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland, 231-269.

Langdon, C.J. i Newell, R.I.E., 1990. Utilization of detritus and bacteria as food sources by two bivalve suspension feeders, the oyster *Crassostrea virginica* and the mussel *Guekensia demissa. Mar. Ecol. Prog. Ser*. 58: 299-310.

Langton, R.W., 1975. Synchrony in the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc*. U.K. 55, 221-229.

Langton, R.W. i Gabbott, P.A., 1974. The tydal rhythm of extracellular digestion and the response to feeding in *Ostrea edulis*. *Mar. Biol*. 24: 181-187.

Lee, S.Y. i Morton, B.S., 1985. The introduction of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. *Malacol. Rev.,* 18: 107-109.

Manahan, D.T., Wright, S.H., i Stephens, G.C., 1983. Simultaneous determination of net uptake of 16 amino acids by a marine bivalve. *Am. J. Physiol*., 244: 832-838.

MARIBIC, 2010. Značajke uzgojnih lokaliteta na osnovu praćenja rasta, indeksa kondicije, zdravstvenog statusa i spolnog sazrijevanja uzgojnih populacija kamenice i mušule u području Malostonskog zaljeva. Završno izviješće projekta, pp. 90.

Mathers, N.F., 1973a. Carbohydrate digestion in *Ostrea edulis*. *Proc. Malacol. Soc*. London 41, 359-367.

Mathers, N.F., 1973b. A comparative histochemical survey of enzymes associated with the processes of digestion in *Ostrea edulis* and *Crassostrea angulata* (Mollusca: Bivalvia). *J. Tool*., Lond. 169: 169-179.

Mathers, N.F., Shirley, T.C. i Dietz, T.H., 1979. Monophasic and diphasic digestive cycles in *Venerupis decussata* and *Chlamys varia. J. Moll. Stud*. 45: 68-81.

Mathers, N.F., 1976. The effects of tidal currents on the rhythm of feeding and digestion in *Pecten maximus* L., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 24: 271-283.

Mathers, N.F., 1972. The tracing of a natural algal food labelled with carbon 14 isotope through the digestive tract of *Ostrea edulis*. *Proc. Malacol. Soc.* London, 40: 115-24.

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc- Habdija, B., 1998. Beskralješnjaci- biologija nižih avertebrata, III. prerađeno i dopunjeno izdanje. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Školska knjiga, Zagreb.

Mayasich, S.A. i Smucker, R.A., 1986. Glycosidases in the American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin, digestive tract. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 95, 95-98.

McDonald, J.H., R.Seed i R.K.Koehn, 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in Northern and Southern Hemispheres. *Mar. Biol*., 111: 323-333.

McDonald, J.H., Koehn, R.K., Balakirev, E.S., Manchenko, G.P., Pudovkin, A.I., Sergiyevskii, S.O. i Krutowskii, K.V., 1990. Species identity of the "common mussel" inhabiting the Asiatic coasts of the Pacific Ocean. *Biol. Morya*, 1990 (1): 13-22.

McDonald, J.H. i Koehn, R.K., 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America*. Mar. Biol*., 99: 111-118.

McHenry, J.G. i Birkbeck, T.H., 1985. Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 90: 145-163.

McQuiston, R.W., 1969. Cyclic activity in the digestive diverticula of *Lasaea rubra* (Montago). (Bivalvia: Eulamellibranchia). *Proc. Malacol. Soc*. London 38: 483-492.

Milišić, N., 1991. Školjke i puževi Jadrana, Logos, Split.

Moore, M.N., Livingstone, D.R. i Widdows, J., 1989. Hydrocarbons in marine mollusks: biological effects and ecological consequences. pp. 303-310. U: (Varanasi, U., Ur.). Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton, FL.

Morton, B.S., 1973. A new theory of feeding and digestion in the filter feeding Lamellibranchia. Malacologia 14: 63-79.

Morton, B.S., 1983. Feeding and digestion in Bivalvia. U: The Mollusca. Physiology 5 (Wilbur, K.M. i Salleudin, A.S.M., (Ur.). Academic press, 65- 147.

Morton, B., 1969. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall II. Correlation of the rhythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. *Proc. Malacol. Soc*. London 38: 401-414.

Morton, B.S., 1975. The diurnal rhythm and the feeding responses of the Southeast Asian mangrove bivalve *Geloina proxima* Prime 1864 (Bivalve: Corbiculacea). Forma et functio. 8: 405-418.

Morton, B.S., 1971. The diurnal rhythm and tidal rhythm of feeding and digestion in *Ostrea edulis. Biol. J. Linn. Soc*. 3: 329-342.

Morton, B.S., 1970b. The rhythmical behaviour of *Anodonta cygnea* L. and *Unio pictorum* L. Forma et Functio 2: 110-120.

Morton, B., 1956. The tidal rhythm and action of digestive system of the lamellibranch *Lasaea rubra*. *J. Mar. Biol. Assoc.* U.K. 35: 135-151.

Morton, B., 1970. The tidal rhythm and rhythm of feeding and digestion in *Cardium edule*. *J. Mar. Biol. Assoc.* U.K. 50: 499-512.

Morton, B.S., 1970a. The tidal rhythm of feeding and digestion in *Cardium edule*. *J. Mar. Biol. Assoc.* U.K. 50: 499-512.

Morton, B.S., 1977. The tydal rhythm of feeding and digestion in the Pacyfic oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 26: 135-151.

Newcombe, C.L., 1935. A study of the community relationships of the sea mussel, *Mytilus edulis* L., Ecology, 16: 234-243.

Newell, R.I.E. i Langdon, C.J., 1986. Digestion and absorption of refractory carbon from the plant *Spartina alterniflora* by the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 34: 105-115.

Owen, G. 1974. Feeding and digestion in bivalvia. *Adv. Comp. Physiol. Biochem*. 5: 1-35.

Owen, G. 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci. Prog*. Oxford. 60: 299-318.

Owen, G. 1955. Observations on the stomach and digestive diverticula of the Lamellibranchia. I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia. Quart. *J. Microsc. Sci*. 96: 517-537.

Owen, G., 1970. The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Cardium edule*. *Phil. Trans. R. Soc.* London Ser. B 258: 245-260.

Paine, R.T., 1976b. Biological observations on a subtidal *Mytilus californianus* bed. Veliger, 19: 125-130.

Paine, R.T., 1974. Intertidal community structure: experimental studies on the relationship between a dominant competitor and its principal predator. Oecologia (Berl.), 15: 93-120.

Payne, D.W., Thorpe, N.A., Donaldson, E.M., 1972. Cellulolytic activity and a study of the bacterial population in the digestive tract of *Scrobicularia plana* (Da Costa). Proc. Malacol. Soc. London 40: 147-160.

Pechenik, J.A., 1980. Growth and energy balance during the larval lives of three prosobranch gastropods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 44: 1-28.

Peharda, M., Bolotin, J., Onofri, V., i Benović, A., 2000. Školjkarstvo i zaštita Malostonskog zaljeva. Dubrovnik, časopis za književnost i znanost, nova sekcija, 11(1-2): 227-231.

Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša za 2009. godinu. (NN 31/2009), (NN br.53/05)).

Purchon, R.D., 1971. Digestion in filter feeding bivalves – a new concept. *Proc. Malacol. Soc*. London 39: 253-261.

Quayle, D.B., 1969. Pacific oyster culture in British Columbia. Stevenson, J.C., (Ur.). Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Ontario. 1-48.

Read, K.R.H. i Cumming, K.B., 1967. Thermal tolerance of the bivalve molluscs *Modiolus modiolus*, L., *Mytilus edulis*, L., and *Brachidontes demissus* (Dillwyn). *Comp. Biochem. Physiol.*, 22:149-155.

Reid, R.G.B. 1966. Digestive tract enzymes in the bivalves *Lima hians* Gmelin and *Mya arenaria* L. *Comp. Biochem. Physiol*. 17: 417-433.

Robinson, W.E. i Langton, R.W., 1980. Digestion in a subtidal population of *Mercenaria mercenaria* (Bivalvia). *Mar. Biol*. (Berlin) 58: 173-179.

Seed, R., 1976. Ecology. U: B.L. Bayne (Ur.), Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 13-65.

Shumway, S.E., Cucci, R.C., Yentsch, C.M. 1985. Particle selection, ingestion and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 91: 77-92.

Shumway, S.E., Newell, R.C., Crisp, D.J. i Cucci, T.L., 1990. Particle selection in filter – feeding bivalves molluscs: a new technique on an old theme. U: The Bivalvia. Proceedings of a Memorial Symposium in honour of Sir Charles Maurice Yonge, Edinburgh, 1986. Morton, B. (Ur.). 152-165. Hong Kong University Press, Hong Kong.

Smucker, R.A. i Wright, D.A., 1986. Characterystics of *Crassostrea virginica* crystalline style chitin digestion. *Comp. Biochem. Physiol*. 83A: 489-493.

Smucker, R.A. i Wright, D.A., 1984. Chitinase activity in the cristalline style of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol*. 77A: 239-241.

Soot-Ryen, T., 1955. A report on the family *Mytilidae* (*Pelecypoda*). Allan Hancock Pacif. Exped., 20: 1-175.

Sprung, M., 1984a. Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). II. Food uptake. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 17: 295-305.

Sprung, M., 1984b. Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). I. Shell growth and biomass. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 17: 295-305.

Sprung, M., 1984c. Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). III. Respiration. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* 18: 171-178.

Sprung, M., 1984d. Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). IV. Efficiencies. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 18: 179-186.

Suchanek, T.H., 1985. Mussels and their role in structuring rocky shore communities. U: P.G.Moore i R. Seed (Ur.), The Ecology of Rocky Coasts. Hodder and Stoughton, Sevenoaks, U.K., 70-96.

Suchanek, T.H., 1978. The ecology of *Mytilus edulis*, L., in exposed rocky intertidal communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 31:105-120.

Šimunović, A., 1981. Biološko-ekološka istraživanja jestivih školjaka Malostonskog zaljeva. Savjetovanje: Malostonski zaljev, prirodna podloga i društveno valoriziranje, Dubrovnik, 12-14, 11.1981, JAZU, 252-267.

Tamburri, M.N. i Zimmer-Faust, R.K., 1996. Suspension feeding: Basic mechanisms controlling recognition and ingestion of larvae. *Limnol. Oceanogr*. 41(6): 1188-1197.

Theede, H., 1963. Experimentelle Untersuchungen über die Filtrationsleitung der Miesmuschel *Mytilus edulis*. Kieler Meeresforsch. 19: 20-41.

Thompson, R.J. i Bayne, B.L., 1972. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis L., J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 8: 111-124.

Tsuchiya, M., 1983. Mass mortality in a population of the mussel *Mytilus edulis*, L. , caused by high temperature on rocky shores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 66: 101-111.

Tursi, A., Matarrese, A., Liaci, L.S., Cecere, E., Montanaro, C. i Chieppa, M., 1985. Struttura della popolazione di *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck presente nei branchi naturali del Mar Piccolo di Taranto. Quad. Ist. Ric. Pesca Marit., 4: 183-203.

Vekarić, S. 1960. Pelješki jedrenjaci. U: Basioli, J. (Ur.) Uzgoj školjaka na istočnim obalama Jadrana. Pomorski zbornik, 6: 179-218.

Viličić, D., 2002. Fitoplankton Jadranskog mora: biologija i taksonomija. Školska knjiga, Zagreb.

Viličić, D. 1981. Fitoplankton Malostonskog zaljeva i Malog mora. Zbornik radova savjetovanja "Malostonski zaljev, prirodna podloga i društveno valoriziranje", 12.-14. studenog, Dubrovnik, 77-88.

Vučak, Z., Gačić, M. i Dadić, V., 1981. Značajke strujnog polja Malostonskog Zaljeva. U: (Roglić, J. i Meštrov, M. Ur.). Zbornik radova Savjetovanja Malostonski zaljev prirodna podloga i društveno valoriziranje. JAZU. Znanstveni savjet za zaštitu prirode. Dubrovnik, 41-51.

Walne, P.R., 1974. Culture of Bivalve Molluscs: 50 Year´s Expirience in Conwy. Fishing News Books Ltd. Oxford.

Ward, J.E., Sanford, L.P., Newell, R.I.E. i MacDonald, B.A., 1998. A new explanation of particle capture in suspension – feeding bivalve molluscs. Limnol. Oceanogr. 43: 741-52.

Web, K.L. i Chu, F.E., 1982. Fitoplancton as a food source for bivalve larvae. Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. (Pruder, G.D., Langdon, C.J. i Conklin, D.E., Ur.) 15.-18. travnja, Luisiana State University, Baton Rouge.

Weinstein, J.E. 1995. Fine structure of the digestive tubule of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shell.Res*. 14 (1): 97-103.

Wilkins, N.P., Fujino, K. i Gosling, E.M., 1983. The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. *Biol. J. Linn. Soc*., 20: 365-374.

Williams, R.J., 1970. Freezing tolerance in *Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol*., 35: 145-161.

Wilson, J.H., La Touche, R.W., 1978. Intracellular digestion in two sublittoral populations of *Ostrea edulis. Mar. Biol*. 71-77.

Winstead, J.T., 1998. A histological study of digestive tubules in intertidal and subtidal oysters, *Crassostrea virginica*, collected at high and low tides. *J. Shell. Res*. 17 (1): 275-279.

Winstead, J.T., 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. *J. Shell. Res*. 14 (1): 105-111.

Winter, J.E., 1969. Über den Einfluss der Nahrungskonzentration und anderer Faktoren auf Filtrierleistung und Nahrungsausnutzung der Muscheln *Arctica islandica* und *Modiolus modiolus. Mar. Biol.* 4: 87-135.

Wonham, M.J., 2004. Mini review: Distribution of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae), and hybrids in the Northeast Pacific. *J.Shell. Res.,* 23(2): 535-543.

Younge, C.M. i Thompson, T.E., 1976. Living marine molluscs, Collins, London.

Younge, C.M., 1966. Oysters. Collins, St James´s place, London.

Younge, C.M., 1926a. Structure and Physiology of the Organs of Feeding and Digestion in *Ostrea edulis. J. Mar. Biol. Assoc.* U.K. 14: 295- 386.

Zarr, J., 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.

Župan, I**.,** 2006. Utjecaj blizine kaveznog uzgoja riba na prirast i indeks kondicije dagnji (*Mytilus galloprovincialis*). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Župan, I., 2012. Integralni uzgoj dagnje (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) i kunjke (*Arca noae*, Linnaeus 1758) na uzgajalištima riba. Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu i Sveučilište u Dubrovniku.