

# Utjecaj povišene temperature i izloženosti zraku na endemskog špiljskog školjkaša *Congeria jalzici* (Morton & Bilandžija, 2013)

---

Novina, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:038336>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Novina

Utjecaj povišene temperature i izloženosti zraku na endemskog  
špiljskog školjkaša *Congeria jalzici* (Morton & Bilandžija, 2013)

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Zoologijskom i Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom docentice dr.sc. Sandre Hudina i izvanredne profesorice dr.sc. Sandre Radić Brkanac, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

## ZAHVALA

*Posebno zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Sandri Hudini i izvanrednoj profesorici dr. sc. Sandri Radić Brkanac na stručnom vodstvu i svim savjetima te pomoći i strpljivosti prilikom rada u laboratoriju i pisanja diplomskog rada.*

*Veliko hvala svim prijateljima, obitelji, kolegama ZOOK-ovcima, Marku, ERASMUS-ovcima i BIUS-ovcima bez kojih studiranje nebi bilo isto.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Utjecaj povišene temperature i izloženosti zraku na endemskog špiljskog školjkaša *Congeria jalzici* (Morton & Bilandžija, 2013)**

PETRA NOVINA

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Endemska vrsta *Congeria jalzici* (Morton & Bilandžija, 2013) jedna je od 3 reliktnih vrsta koje nastanjuju područje dinarskog krša i koje su jedini podzemni školjkaši na svijetu. Zabilježena je na ukupno 4 lokaliteta od kojih se 3 nalaze u Hrvatskoj. S obzirom da je ova vrsta opisana nedavno, njezina biologija i fiziologija slabo su istražene. Na lokaciji istraživanja (Markov ponor) planirani su hidrotehnički zahvati koji bi potencijalno mogli utjecati na hidrološki i temperaturni režim voda, a time i na jedinke vrste *C. jalzici*. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj povećanja temperature i izloženosti zraku jedinki vrste *C. jalzici* u laboratorijskim uvjetima putem mjerenja parametara oksidacijskog stresa. Tijekom istraživanja, dio je jedinki tijekom tri tjedna bio izložen zraku pri vlaži karakterističnoj za špiljske ekosustave, dok je dio jedinki postepeno izlagan povećanju temperature (povećanje za 2 do 3 °C stupnja, jednom tjedno). Rezultati su pokazali da jedinke koje su tijekom tri tjedna bile izložene zraku pokazuju značajan porast parametara oksidacijskog stresa, kao i one koje su bile izložene temperaturi vode od 25 °C. Potencijalne promjene u hidrološkom režimu, koje bi izazvale dugotrajnije izbijanje jedinki iz vode, mogle bi dovesti do slabijeg obnavljanja te nestanka populacije s takvog staništa.

(39 stranica, 15 slika, 1 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Dreissenidae, Markov ponor, dinarski krš, razina vode, oksidacijski stres, lipidna peroksidacija, mortalitet

Voditelj rada 1: Dr.sc. Sandra Hudina, doc.

Voditelj rada 2: Dr.sc. Sandra Radić Brkanac, izv.prof.

Ocjenitelji: Dr.sc. Sandra Hudina, doc.  
Dr.sc. Sandra Radić Brkanac, izv.prof.  
Dr.sc. Mladen Maradin, doc.  
Dr.sc. Blanka Cvetko Tešović, izv. prof.  
zamjena: Dr.sc. Alan Moro, izv. prof.

Rad je prihvaćen: 3.5.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Effect of increased temperature and air exposure on endemic cave-dwelling bivalve *Congeria jalzici* (Morton & Bilandžija, 2013)**

PETRA NOVINA

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

The endemic species *Congeria jalzici* (Morton & Bilandžija, 2013) is one of the three relict species in the Dinaric karst area, and it is also the only subterranean bivalve species in the world. It has been recorded in 4 localities, 3 of which are in Croatia. Near one of the sites (Markov ponor; research site in this thesis) hydrotechnical project is being developed, which could potentially affect the hydrological and water temperature regime, and thus the *C. jalzici* species. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of temperature increase and air exposure on *C. jalzici* in laboratory conditions by measuring oxidative stress parameters. In the aerial exposure, individuals were exposed to high humidity typical for caves, while in the temperature exposure trials individuals were gradually exposed to increasing temperature (2 to 3 °C increase, once a week). Aerial exposure induced stress which increased with time. Stress induced by aerial exposure was similar to that induced by temperature increase at 25 °C. Potential changes in the hydrological regime could cause longer absence from the water, which could lead to lower ability of recovery and disappearance of population from such habitat.

(39 pages, 15 figures, 1 table, 58 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: Dreissenidae, Markov ponor, Dinaric karst, water level, oxidative stress, lipid peroxidation, mortality

Supervisor 1: Dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.

Supervisor 2: Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.

Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Dr. Mladen Maradin, Asst. Prof.

Dr. Blanka Cvetko Tešović, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Alan Moro, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 3.5.2018.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1 Dinarsko krško podzemlje .....	1
1.2 Rasprostranjenost roda <i>Congerina</i> .....	2
1.3 Ekologija i godišnji ciklus vrsta roda <i>Congerina</i> .....	4
1.4 <i>Congerina jalzici</i> Morton i Bilandžija, 2013 .....	5
1.5 Povijest istraživanja vrste <i>C. jalzici</i> u Markovom ponoru te opis planiranih zahtjeva u blizini .....	6
1.6 Oksidacijski stres .....	8
1.6.1 Markeri oksidacijskog stresa .....	9
2. Cilj istraživanja .....	11
3. Materijali i metode .....	11
3.1 Geografski položaj .....	11
3.2 Hidrogeološke karakteristike .....	12
3.3 Klimatske karakteristike šireg područja .....	12
3.4 Mikroklimatske karakteristike Markovog ponora .....	13
3.5 Terensko istraživanje .....	13
3.6 Laboratorijska istraživanja .....	14
3.6.1 Izlaganje zraku .....	15
3.6.2 Izlaganje povišenoj temperaturi .....	15
3.7 Biokemijski parametri stresa .....	16
3.7.1 Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina .....	16
3.7.2 Određivanje aktivnosti katalaze .....	16
3.7.3 Određivanje sadržaja malondialdehida (MDA) .....	17
3.7.4 Određivanje sadržaja karbonilnih grupa .....	17
3.8. Statistička obrada podataka .....	18
4. Rezultati .....	18
4.1 Morfometrijska analiza .....	18
4.2 Izlaganje zraku .....	19
4.2.1 Parametri oksidacijskog stresa .....	19
4.3 Izlaganje povišenoj temperaturi .....	22
4.3.1 Istraživanje tolerancije na povišenu temperaturu .....	22

4.3.2	Parametri oksidacijskog stresa.....	23
5.	Rasprava.....	28
5.1	Izlaganje zraku .....	28
5.2	Izlaganje povišenoj temperaturi .....	30
6.	Zaključak.....	33
7.	Literatura.....	34
8.	Životopis.....	40



## Popis kratica:

ANOVA	analiza varijance (engl. Analysis of Variance)
CR	kritično ugrožena (engl. Critically Endangered)
DNP	2,4-dinitrofenol
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
GPx	glutation peroksidaza
GSH	glutation
HE	hidroelektrana
IUCN	Međunarodni savez za očuvanje prirode (engl. The International Union for Conservation of Nature)
KAT	katalaza
MDA	malondialdehid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
ROS	reaktivni kisikovi oblici (engl. Reactive Oxygen Species)
SOD	superoksid dismutaza
TBA	tiobarbituratna kiselina
TCA	trikloroetena kiselina
VU	osjetljiva (engl. Vulnerable)

# 1. Uvod

## 1.1 Dinarsko krško podzemlje

Dinaridi (Dinarsko gorje) su mladi južnoeuropski planinski lanac koji se prostire kroz Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Crnu Goru i sjevernu Albaniju (Slika 1.). Gorje je građeno uglavnom od sedimentnih stijena, vapnenaca i dolomita, koje zbog svoje topivosti u vodi obogaćenog ugljikovim dioksidom formiraju endokrške oblike poput špilja, jama, ponora i kaverni (Ford i Williams, 2013). U Hrvatskoj je 46% teritorija prekriveno krškim područjem koje je dio dinarskog krša (Gottstein, 2010). S obzirom na veliku pokrivenost kršom, područje Hrvatske je bogato speleološkim objektima koji još nisu u potpunosti istraženi. Osim izuzetno vrijedne georaznolikosti, koja uključuje geološku i geomorfološku raznolikost, dinarsko krško podzemlje poznato je i kao područje visoke biološke raznolikosti (engl. hot spot) (Culver i Sket, 2000). Visoka raznolikost u podzemlju širom Dinarske regije je posljedica intenzivnih geoloških događaja u prošlosti koji su utjecali na migracije i specijacije vrsta (Sket, 1999). Kolijevka biospeleologije – znanstvene discipline koja proučava podzemna staništa i žive organizme koji ih nastanjuju, nalazi se upravo na području slovenske regije Kras po kojoj je geomorfološki fenomen krš dobio ime (Belles, 1992; Sket, 1996). Prvi poznati znanstveni opisi špiljskih vrsta datiraju još iz 18. i 19. stoljeća kad su opisane čovječja ribica *Proteus anguinus* Laurenti, 1768 i kornjaš *Leptodirus hochenwartii* Schmidt, 1832, obje vrste otkrivene u Sloveniji (Morton i sur., 1998). U Hrvatskoj je do sad pronađeno više od 500 špiljskih svojti i svakim novim istraživanjem taj broj raste te se opisuju nove vrste. Skupine koje broje najviše svojti su kukci, kornjaši, paučnjaci, rakovi, puževi i stonoge (Ozimec i sur., 2009). Podzemna staništa su izuzetno osjetljiva i mnoga od njih su visoko ugrožena. Prema Zakonu o zaštiti prirode (NN 80/13) speleološki objekti su od posebnog interesa za Republiku Hrvatsku i uživaju njenu osobitu zaštitu te je zabranjeno provoditi zahvate i aktivnosti kojima se mijenjaju stanišni uvjeti u objektu. Jedan od glavnih uzroka ugroženosti speleoloških objekata i špiljskih vrsta su organska i anorganska zagađenja podzemnih voda koja nastaju kao posljedica antropogenih aktivnosti, npr. intenzivna poljoprivreda ili neadekvatno odlaganje otpada. Osim direktnog zagađenja, najveću prijetnju predstavljaju hidrotehnički zahvati uslijed kojih dolazi do promjene hidrologije i vodnog režima tekućica. Osim toga,

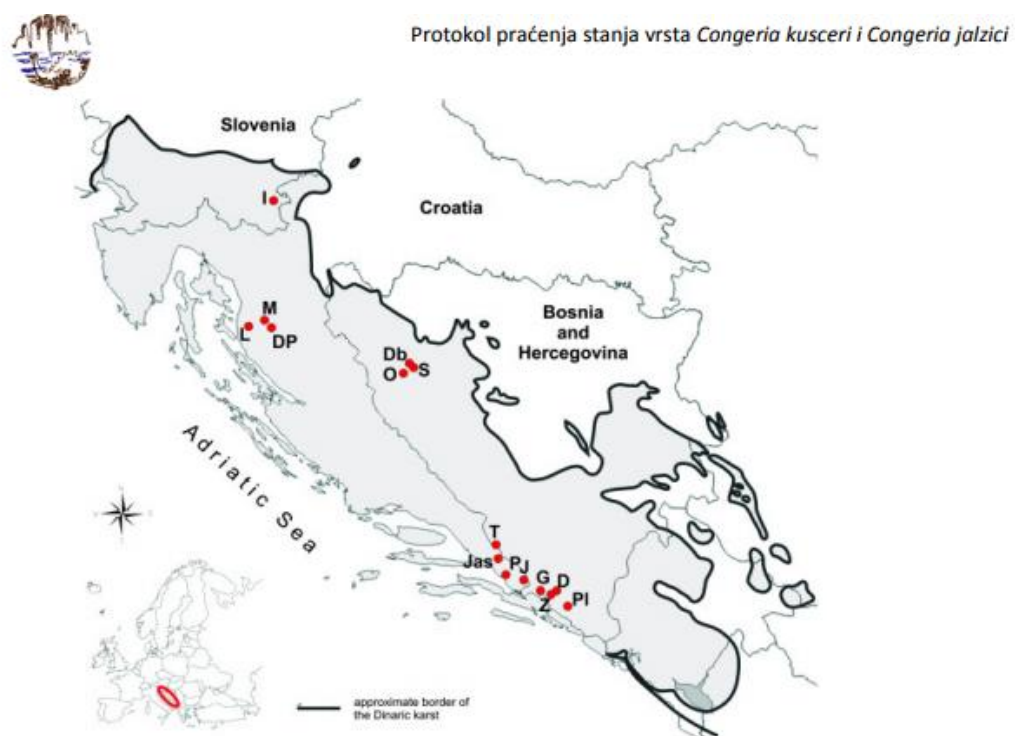
značajan utjecaj imaju izgradnja prometnica, tunela i kamenoloma. Neadekvatno turističko uređenje speleoloških objekata može dovesti do rasta organskih obraštaja "lampenflore" (gljive, alge, mahovine, papratnjače, više biljke). Također mogu utjecati na promjenu mikroklimatskih uvjeta staništa, npr. povišenje temperature zbog umjetne rasvjete i posjetitelja. Česti su slučajevi ilegalnog sakupljanja špiljske faune uz pomoć zamki s mamcima na koje se može uloviti i tisuće primjeraka neke vrste (Ozimec i sur., 2009).

## 1.2 Rasprostranjenost roda *Congeria*

Dinarsko krško podzemlje bogato je brojnim endemskim vrstama među kojima je osobito zanimljiv rod *Congeria* iz porodice Dreissenidae Gray, 1840 (Bilandžija i sur., 2013). Tijekom tercijara, pet rodova unutar porodice je evoluiralo u Paratetisu, dok su tri roda preživjela do danas: *Mytilopsis* Conrad, 1857, *Dreissena* van Beneden, 1835 i *Congeria* Partsch, 1835. Istraživanjem i analizom miocenskih naslaga, Kochansky-Devide i Sliskovic (1978) su identificirali oko 30 vrsta unutar roda *Congeria* na području Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Prema filogenetskim i molekularnim analizama Bilandžija i sur. (2013), unutar roda *Congeria* su se razdvojile tri reliktnne vrste koje nastanjuju područje dinarskog krša i jedini su podzemni školjkaši na svijetu: 1) *Congeria kusceri* Bole, 1962, 2) *Congeria mulaomerovici* Morton & Bilandžija, 2013, te 3) *Congeria jalzici* Morton & Bilandžija, 2013. Vrste su se razdvojile tijekom miocena i pliocena te ih je vrlo teško razlikovati na temelju morfologije (Bilandžija i sur., 2013).

Živuća kolonija jedinki iz roda *Congeria* prvi put je pronađena 1956. godine u jami Žira u Popovom polju u Bosni i Hercegovini (Bole, 1962; Jalžić, 1998). Istraživanja su ponovljena 1960. te je vrsta imenovana *Congeria kusceri*. Daljnjim biospeleološkim istraživanjima od 1995. do 1997. pronađeno je sedam novih nalazišta školjkaša *C. kusceri* na području doline rijeke Neretve. Šest nalazišta, od kojih su tri sa živućim kolonijama, se nalaze u Hrvatskoj, dok je jedno u BiH (Jalžić, 1998). Ljušture jedinki su pronađene i na izvoru rijeke Omble pokraj Dubrovnika (Schütt, 2000; Jalžić 2001). Holotip vrste *C. jalzici* je opisan iz Markovog ponora u Lici, dok je ekofenotip pronađen u Lukinoj jami koja je najdublja jama u Hrvatskoj (-1421 m) te je hidrološki povezana s Markovim ponorom. Zahvaljujući modernim genetskim

analizama koje su proveli Bilandžija i sur. (2013), znamo da se današnja rasprostranjenost roda *Conger* u Hrvatskoj odnosi na dvije vrste - *C. jalzici* i *C. kusceri*, dok je *C. mulaomerovici* do sad nađena samo u slivu rijeke Sane u zapadnoj Bosni. Nakon najnovijih istraživanja, poznato je ukupno 15 lokaliteta na području Dinarida koje nastanjuju vrste iz roda *Conger* čija je rasprostranjenost prikazana na slici 1. (Jalžić i Bilandžija, neobjavljeno; Bilandžija i sur., 2013). Obje vrste naseljavaju podzemna slatkovodna špiljska staništa koja prema Nacionalnoj klasifikaciji staništa svrstavamo u Vodena (slatkovodna) krška špiljska staništa H.1.3. (Gottstein, 2010).



**Slika 1.** Karta rasprostranjenosti roda *Conger* (preuzeto iz Bilandžija i sur., 2013). Označeni su samo lokaliteti sa živim populacijama. I - Izvir Jamske Školjke; M - Markov Ponor; L - Lukina jama – Trojama sustav; DP - Dankov Ponor; O - Oko; S - Suvaja; Db - Dabarska Pećina; T - Tihaljina; Jas - Jasena Ponor; P - Pukotina u Tunelu Polje Jezero–Peračko Blato; J - Jama u Predolcu; G - Gradnica; Z - Žira; D - Doljašnica; Pl - Plitica.

### 1.3 Ekologija i godišnji ciklus vrsta roda *Congeria*

Sve tri živuće vrste roda *Congeria* su u potpunosti prilagođene na život u podzemlju te ih svrstavamo u stigobionte jer cijeli životni vijek provode u podzemnim vodama. Uvjeti života u podzemlju su specifični te su se životinje koje nastanjuju špiljska staništa tijekom dugog niza godina, morfološki i fiziološki prilagodile na takve uvjete. Prema Culveru (1982) špiljski organizmi posjeduju neke zajedničke karakteristike: nizak fekunditet, kasnija spolna zrelost, velika jaja i dugi životni vijek što ih svrstava u vrste koje karakterizira K - selekcija (Pianka, 1970; Puljas i sur., 2014). Zbog potpunog nedostatka svjetla, u podzemlju se ne može odvijati proces fotosinteze zbog čega organizmi ne mogu računati na primarne proizvođače poput biljaka ili algi, već ovise o hranjivim tvarima koje se procjeđuju s površine ili dolaze od površinskih vodenih tokova koji protječu podzemljem (Culver i Pipan, 2010). Budući da ultraljubičasto zračenje ne prodire u podzemlje, pigment gubi svoju funkciju i životinje koje tu žive ga više ne trebaju (Aden, 2005) pa su tako vrste roda *Congeria* depigmentirane i reducirani su im organi za vid (Morton i sur., 1998). Veličina ljuštura *C. kusceri* doseže do 20 mm, dok je *C. jalzici* velika oko 13 mm. Morfološki ih je teško razlikovati jer izgled ljuštura može varirati. Septum ljuštura je kod *C. jalzici* manji, te ima zaobljen rub za razliku od *C. kusceri* kod koje je ravan). Morfološki se mogu razlikovati i jedinke iste vrste iz različitih populacija. Ljuštura ekofenotipa *C. jalzici* iz Lukine jame se morfološki razlikuje od holotipa iz Markovog ponora zbog prilagodbe na specifične uvjete okoliša u kojem nema jakih strujanja tijekom promjene razine vode (Bilandžija i sur., 2013). Jedinke žive pojedinačno ili u skupinama pričvršćene bisusnim nitima na podlogu, ali je primijećeno da se mogu kretati. Kao i ostali školjkaši, hrane se filtriranjem hranjivih čestica iz vode (Brusca i Brusca, 2003).

Porast temperature vode tijekom proljeća (Lucy, 2006; OIKON i Elektroprojekt, 2016) i promjena razine vode bitno utječu na period razmnožavanja kod porodice Dreissenidae u koju ubrajamo rod *Congeria*. Oplodnja se događa u ktenidijama ženki (Puljas i sur., 2014), a iz oplođenih jajašaca se razvija planktonska ličinka veliger koja se pričvrsti na podlogu i razvije u mladog školjkaša (Morton i sur., 1998). Gametogeneza se odvija u hladnim jesenskim mjesecima na završetku mrijesta. Neoplođene jajne stanice i zaostale spermalne stanice mogu razgraditi pomoću makrofaga iz hemolimfe te ih koristiti kao izvor hranjivih tvari u periodima gladovanja kad su izvan vode. Analiza gonada mužjaka i ženki *C. kusceri* je pokazala da se mrijest odvija od svibnja do studenog, a maksimum doseže u ranu jesen

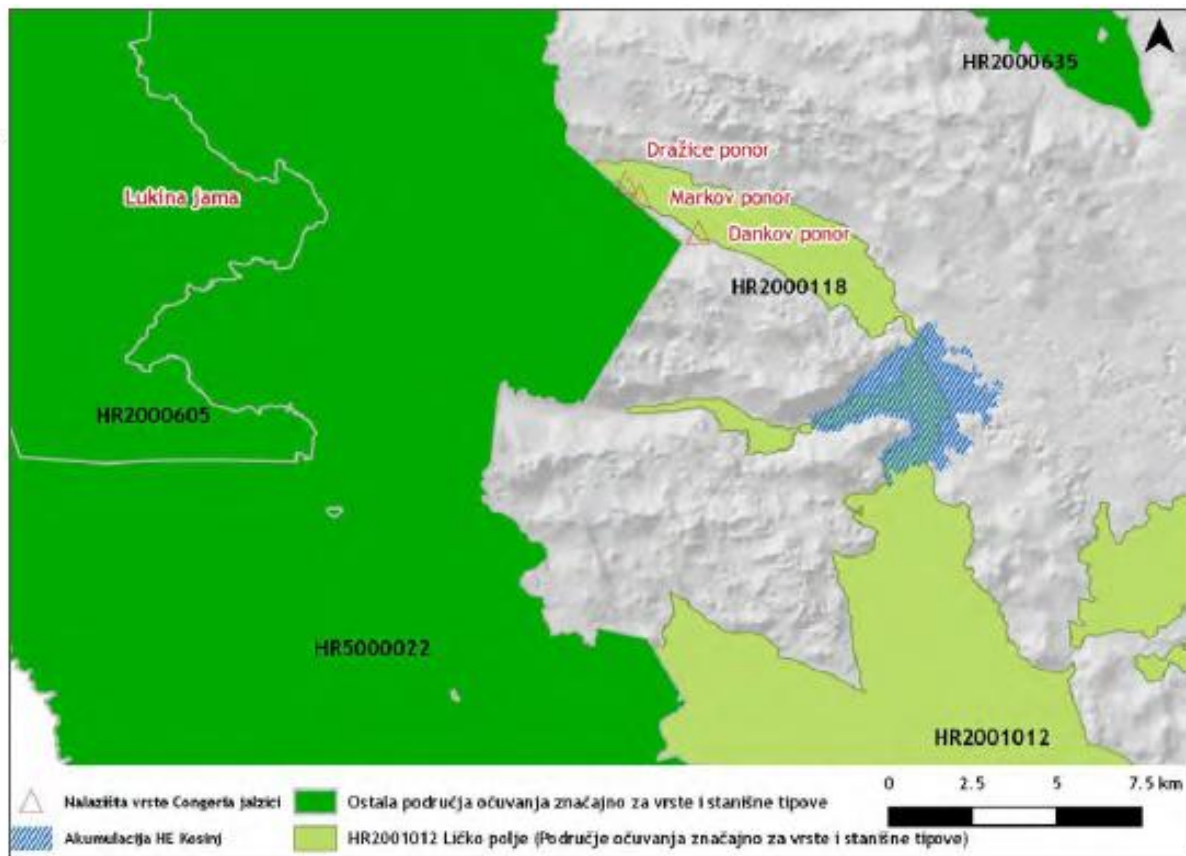
(Puljas i sur., 2014). Rezultati istraživanja jedinki *C. jalzici* iz Markovog ponora upućuju na važnost dotoka ponornih voda rijeke Like na početku i kraju mrijesta jer je moguće da topla voda u svibnju i lipnju utječe na početak, a hladna voda u studenom i prosincu na završetak ciklusa mrijesta (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

#### **1.4 *Congeria jalzici* Morton i Bilandžija, 2013**

Vrsta *Congeria jalzici* Morton i Bilandžija, 2013, sjeverni dinarski špiljski školjkaš, zabilježena je samo u speleološkim objektima alpinsko - biogeografske regije. Pronađena je u slivu rijeke Like na tri lokaliteta, među kojima je i Markov ponor, u slivu rijeke Kupe u Sloveniji gdje je poznat jedan lokalitet Izvir Jamske Školjke (Bilandžija i sur., 2014), te tri u slivu rijeke Sane u sjeverozapadnoj Bosni i Hercegovini. Uz Markov ponor, *C. jalzici* je zabilježena u drugim ponorima Lipovog polja: Dankov ponor i ponor Dražice (Slika 2.) te na području Hajdučkih kukova i na dnu Lukine jame. Svi lokaliteti *C. jalzici* u Hrvatskoj se nalaze u ekološkoj mreži Natura 2000, a Markov ponor i Dankov ponor su i ciljevi očuvanja stanišnog tipa 8310 Špilje i jame zatvorene za javnost područja ekološke mreže HR2001012 Ličko polje (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Obitava u trajno potopljenim podzemnim prostorima, dok u periodu niskih razina voda dio školjkaša preživljava izvan vode u visoko vlažnom staništu (Bilandžija i Komerički, 2013; Bilandžija i sur., 2014). U sklopu izrade Studije o utjecaju na okoliš, analizirana je starost 40 jedinki iz Markovog ponora te je utvrđeno da se dob jedinki kreće od 5 do 22 godine, s tim da je 40% jedinki bilo staro između 15 i 16 godina (OIKON i Elektroprojekt, 2016). S obzirom da je ova vrsta opisana tek nedavno, njezina ekologija i fiziologija nisu dovoljno istražene te ovaj rad nastoji pridonijeti boljem poznavanju vrste, te donijeti nova saznanja o tome kako potencijalno povišenje temperature vode i dugotrajna izloženost zraku (boravak izvan vode) utječu na jedinke ove vrste.

U Hrvatskoj se *C. jalzici* i *C. kusceri* zbog značajnog negativnog antropogenog utjecaja i malog broja utvrđenih lokaliteta, svrstavaju pod kritično ugrožene vrste (CR), a *C. kusceri* se nalazi u Crvenoj knjizi špiljske faune Hrvatske iz 2009. godine. Prema kriterijima za procjenu ugroženosti vrsta na globalnoj razini, Međunarodna unija za očuvanje prirode (IUCN) je dinarskog špiljskog školjkaša svrstala u kategoriju osjetljive vrste (VU). Prema Zakonu o zaštiti prirode (NN 80/13, 15/18) RH obje vrste su strogo zaštićene divlje vrste. Na europskoj razini

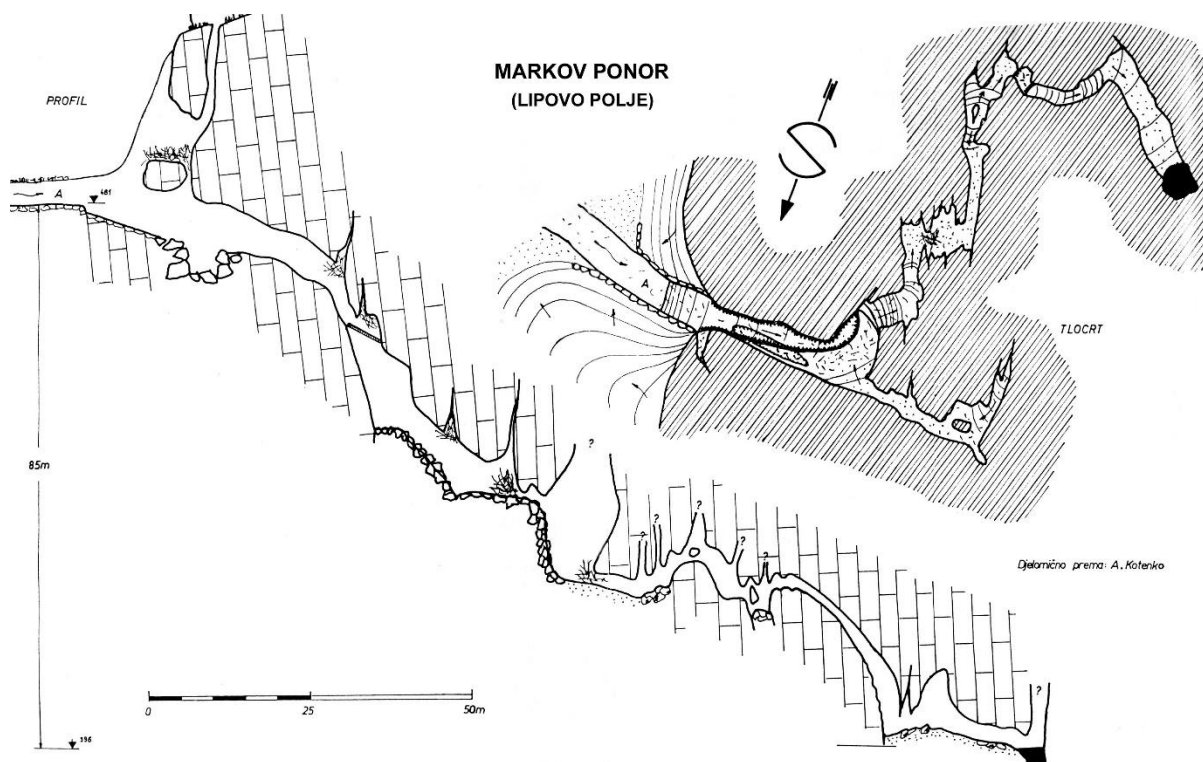
nalaze se na dodatcima Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore Europske unije (Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, <http://www.haop.hr/>).



**Slika 2.** Speleološki objekti u kojima je pronađena vrsta *Congeria jalzici* u odnosu na zahvat i Ekološku mrežu RH (preuzeto iz OIKON i Elektroprojekt, 2016).

### 1.5 Povijest istraživanja vrste *C. jalzici* u Markovom ponoru te opis planiranih zahtjeva u blizini

Markov ponor jedan je od šest speleoloških objekata unutar ekološke mreže HR2001012 Ličko polje. Prva istraživanja su provedena tijekom 60-ih godina 20. stoljeća pod vodstvom Srećka Božičevića i Speleološkog saveza Hrvatske, kad je nastao prvotni topografski nacrt objekta (Slika 3.).



**Slika 3.** Prvi nacrt Markovog ponora (pripremio A. Kotenko, preuzeto iz Bakšić, 2008).

Branko Jalžić navodi da je u svibnju 1999. došao do prvog sifonskog jezera, ali da *Congerina* nije primijećena na stijenama, niti unutar vode. Unatoč tome, istraživački instinkt je nalagao da, zbog hidrološke povezanosti Lukine jame i Ličkog polja, postoji velika šansa da je to stanište *Congerine*. Prve ljušture je pronašao geolog Damir Lacković u sifonu "mrtvih *Congerina*" što je istraživače potaknulo na daljnja istraživanja. U lipnju 1999. prve žive jedinke *Congerina* su pronađene u Sifonu "ronjenje na dah". Tijekom visokih voda zimi i u proljeće, rijeka Lika utječe u ponor zbog čega se vodostaj mijenja te neki dijelovi postaju neprohodni. Zamijećeno je da se jedinke pričvršćuju na mjesta koja nisu izložena jakim povremenim strujanjima vode. Daljnjim istraživanjima ponora pronađene su brojne nove jedinke. Pronađene su i naslage ljuštura debele oko 50 centimetara, što ukazuje na dugotrajno obitavanje *Congerina* na ovom nalazištu (Jalžić, 2001).

Vodni režim u Markovom ponoru ovisi o poniranju voda rijeke Like te dotoku voda s planinskih područja južno i jugozapadno od Lipovog polja. Na rijeci Lici je 1971. izgrađeno akumulacijsko jezero Kruščica kojim je potopljen oko 20 km dug dio toka rijeke za potrebe HE Senj i HE Sklope. Plan projekta koji predviđa izgradnju hidroelektrane Kosinj na području ekološke mreže HR2001012 Ličko Polje i pripadajućeg akumulacijskog jezera na rijeci Lici (uz već postojeću HE Sklope i akumulaciju Kruščica) postoji unazad 50 godina. U sklopu



hidroelektrane planirana je izgradnja tri brane (Kosinj, Sedlo, Bakovac), tunela i kanala kojima bi se vode potoka Bakovca skrenule prema rijeci Lici te bi se potopio cijeli kanjon rijeke Like u duljini 2,6 km, dio rijeke Like u duljini 4,5 km, dio potoka Bakovac u duljini 4,7 km te krško polje Gornjeg Bakovca. Iako se Markov ponor nalazi nizvodno od akumulacije i zahvat ga ne zahvaća direktno, studijom je procijenjen negativan utjecaj na speleološke objekte smještene unutar i u neposrednoj blizini predviđenih granica akumulacije. Osamnaest speleoloških objekata bit će u potpunosti potopljeno, dok njih deset djelomično (OIKON i Elektroprojekt, 2016). S obzirom na složenost i povezanost krških podzemnih prostora, gospodarske aktivnosti koje bi narušavale hidrološke veze između nadzemnih i podzemnih staništa mogu potencijalno imati značajan utjecaj na takva staništa i pripadajuće životne zajednice na širem području planirane akumulacije.

Predviđa se da će tijekom rada HE Kosinj, Lipovo polje rjeđe poplavljavati što bi potencijalno moglo značiti i manju količinu ponornih voda koje utječu u Markov ponor. Studijom je definiran niz mjera ublažavanja utjecaja koje su potrebne za očuvanje vrste *C. jalzici*, s naglaskom na primjenu procijenjenog ekološki prihvatljivog protoka na brani Selište. Procijenjeni stabilni stanišni uvjeti za *C. jalzici* uključuju: zadržavanje vode u sifonima ponora tijekom većeg dijela godine te važnost sušnog razdoblja tijekom ljeta i povremenih promjena temperature vode za razmnožavanje. Opisani utjecaj na *C. jalzici* je u studiji ocijenjen kao prihvatljiv te mali do umjereno negativan zbog mjera predostrožnosti (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

Ovo istraživanje je nastalo kako bi se u laboratorijskim uvjetima ispitao utjecaj izloženosti zraku i povišenim temperaturama vode na vrstu *C. jalzici* zbog potencijalnih promjena dinamike poplavljanja njezinog prirodnog staništa.

## 1.6 Oksidacijski stres

S obzirom da je cilj ovog istraživanja ispitati potencijalni utjecaj okolišnih stresnih čimbenika - povišene temperature i dugotrajne izloženosti zraku na jedinke vrste *C. jalzici*, u istraživanju smo koristili parametre oksidacijskog stresa. Sva živa bića tijekom normalnog staničnog metabolizma u malim količinama proizvode reaktivne oblike kisika (ROS, engl. reactive oxygen species), a njihova se koncentracija održava optimalnom mehanizmima antioksidacijskog sustava. No, promjenom uvjeta okoline te posebice u stresnim uvjetima

poput ionskog zračenja, hiperoksije, teških metala i povišene temperature dolazi do povećane produkcije ROS odnosno do oksidacijskog stresa, nekontroliranih redoks - reakcija i posljedičnog oštećenja strukture molekula DNA, RNA, ugljikohidrata, lipida i proteina čime se mijenja njihova prvobitna funkcija. U reaktivne oblike kisika ubrajamo slobodne radikale koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (superoksidni, hidroksilni i peroksilni radikal) i neradikalne oblike kisika (singletni kisik i vodikov peroksid) (Valko i sur., 2007).

Zbog izloženosti slobodnim radikalima, organizam je razvio kompleksan obrambeni sustav: preventivne mehanizme, mehanizme popravka, fizičku obranu i antioksidacijsku obranu. Antioksidansi su tvari koje mogu značajno usporiti ili u potpunosti spriječiti oksidaciju drugih molekula. Ravnoteža između oksidansa i antioksidansa je ključna za normalno funkcioniranje stanica i organa. Antioksidacijski sustav uključuje antioksidacijske enzime kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (KAT), te neenzimske molekule kao što su askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi, flavonoidi i drugi antioksidansi (Valko i sur., 2007). Vodikov peroksid, superoksidni radikal, malondialdehid (MDA), karbonili, nitrotirozini i ostali biomarkeri oksidacije se mogu mjeriti standardiziranim postupcima iz krvi i plazme (Birben i sur., 2012). Molekule ROS-a mogu potaknuti citotoksično djelovanje, te tako uzrokovati staničnu smrt, mutacije i kromosomske aberacije, a naposljetku i kancerogenezu (Štefan i sur., 2007). Putem različitih parametara možemo odrediti razinu oksidacijskog stresa kod nekog organizma.

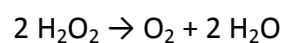
### **1.6.1 Markeri oksidacijskog stresa**

Izlaganjem proteina reaktivnim oblicima kisika na staničnoj razini dolazi do modifikacije aminokiselinskih lanaca što dovodi do funkcionalnih promjena u proteinu i posljedično promjena staničnog metabolizma. Aminokiseline u peptidnom lancu razlikuju se u svojoj osjetljivosti na stres, a i različiti oblici aktiviranog kisika se razlikuju u svojoj potencijalnoj reaktivnosti. Mnoge aminokiseline se ireverzibilno mijenjaju kada se protein oksidira. Aminokiseline histidin, lizin, prolin, arginin i serin stvaraju karbonilne grupe na bočnim lancima (Shacter, 2000). Karbonilacija proteina inhibira ili mijenja aktivnost proteina te povećava osjetljivost na proteolizu. Oksidacijska razgradnja proteina povećana je u

prisutnosti metalnih kofaktora kao na primjer željeza. Metal se veže na dvovalentni kation u aktivnom mjestu te reagira s vodikovim peroksidom dajući hidroksilni radikal koji brzo oksidira aminokiselinski ogranak inaktivirajući enzim. Sadržaj karbonilnih skupina često se koristi kao marker oksidacije proteina jer se te skupine rano formiraju i ostaju stabilne kao karbonilni proteini. Testovi za detekciju karbonilnih proteina temelje se na reakciji karbonilnih skupina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) pri čemu nastaje stabilni 2,4-dinitrofenol (DNP). DNP se može detektirati i mjeriti različitim metodama; spektrofotometrijski, ELISA testom, jednodimenzijском ili dvodimenzijском elektroforezom (Dalle-Donne i sur., 2003).

Lipidna peroksidacija je proces u kojem slobodni radikali napadaju lipide koji sadrže dvostruke ugljikove veze, osobito polinezasićene masne kiseline što dovodi do izdvajanja atoma vodika iz metilenske skupine (Ayala i sur., 2014). Lipidni radikal reagira s kisikom i stvara peroksilni radikal. Peroksilni radikal potiče lančanu reakciju i transformira polinezasićene masne kiseline u lipidne hidroperokside koji se potom razgrađuju u sekundarne produkte poput izoprostana, aldehida i malondialdehida (MDA) (Birben i sur., 2012). Intenzivna lipidna peroksidacija uzrokuje gubitak fluidnosti u staničnim membranama, opadanje vrijednosti membranskoga potencijala, povećanje permeabilnosti prema vodikovim i drugim ionima, te može dovesti do smrti stanice i otpuštanja njenog sadržaja (Štefan i sur., 2007). Oštećenje lipida se može odrediti mjerenjem produkata lipidne peroksidacije. Jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije je MDA čiji je sadržaj mjeren u ovom radu.

Katalaza (KAT) je antioksidacijski enzim izgrađen od četiri monomera koji čine tetramer, pri čemu svaki monomer sadrži jednu molekulu hema. Osnovna uloga katalaze je razgradnja vodikovog peroksida u kisik i vodu prema reakciji:



uz pretvorbu između dvije konformacije katalaze-ferikatalaze (željezo s vodom) i spoja I (željezo s kisikovim atomom). Katalaza veže NADPH kao redukcijski ekvivalent za sprečavanje oksidativne inaktivacije enzima reduciranjem vodikovog peroksida do vode. U životinjskim stanicama vodikov peroksid uklanjaju peroksisomalne i citosolne katalaze (Birben i sur., 2012).

## 2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako dugotrajna izloženost zraku i povećanje temperature vode utječe na pokazatelje stresa kod endemske reliktno vrste sjevernog dinarskog špiljskog školjkaša *C. jalzici*. Izloženost zraku odabrana je s obzirom da je razina vode ekološki parametar koji značajno fluktuiru u krškom podzemlju, a u samom Markovom ponoru može varirati i do 60 m, dok je izloženost povišenoj temperaturi odabrana kako bi se utvrdio temperaturni maksimum vrste. Oba okolišna čimbenika su ujedno i dobri pokazatelji adaptacije vrste na život u podzemlju.

Na lokaciji istraživanja (Markov ponor) planirani su hidrotehnički zahvati koji bi potencijalno mogli utjecati na hidrološki i temperaturni režim voda, a time i na jedinke vrste *C. jalzici*. Stoga su ovakva saznanja neophodna kako bi se procijenila potencijalna mogućnost prilagodbe ove endemske reliktno vrste na izloženost antropogenim utjecajima.

## 3. Materijali i metode

### 3.1 Geografski položaj

Markov ponor (narodnim imenom Begovac) je smješten u sjeverozapadnom dijelu Lipovog polja (44°46'11"N, 15°10'22"E) koje administrativno pripada Općini Perušić u jugoistočnom dijelu Ličko-senjske županije, Republika Hrvatska. Nadmorska visina se nalazi na koti od 481 m (Božičević, 1960).

Lipovo polje se nalazi u kontinentalnom djelu Sjevernog Velebita i Senjskog bila te se prostire dužinom od 9 km, a široko je od 1,2 do 2,5 km (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

### **3.2 Hidrogeološke karakteristike**

Šire promatrano područje je građeno pretežito od karbonata, vapnenaca i vapnenačkih breča u kojima su razvijene ponikve karakteristične za krška područja. Prevladava podzemno otjecanje voda, osim u dnu zavala polja u kršu te u dolini potoka Bakovca. Kosinjsko i Lipovo polje se svrstavaju u krške egzogeomorfološke oblike – zavala polja u kršu, za koje je karakteristično podzemno otjecanje (Božičević, 1960).

Postanak Lipovog polja je uvjetovan rasjedima na sjevernom i južnom rubu. Rubovi polja su izgrađeni od vapnenaca i dolomita jurske starosti te tercijarnih breča i vapnenaca, dok je samo polje izgrađeno od kvartarnih naslaga (pijesci, šljunci, kršje, ilovine, terra rossa, riječni nanosi i naplavine) (Božičević, 1960). Lipovo polje se navodnjava vodom na južnom kraju iz rijeke Like te potoka Bakovca, a na sjevernom kraju vode otječu u Markov i Dankov ponor (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Ponor je formiran u pukotini koja se proširuje u smjeru istok - zapad. Ulazni dio je obzidan kamenjem nakon I. Svjetskog rata (Božičević, 1960) kako bi se spriječilo erozijsko djelovanje voda rijeke Like. Plavljenje ponora je najučestalije tijekom siječnja, travnja, studenog i prosinca, dok je tijekom svibnja, lipnja, rujna i listopada broj dana plavljenja u prosjeku jedan dan mjesečno. Za vrijeme srpnja i kolovoza nije zabilježeno plavljenje ponora (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

### **3.3 Klimatske karakteristike šireg područja**

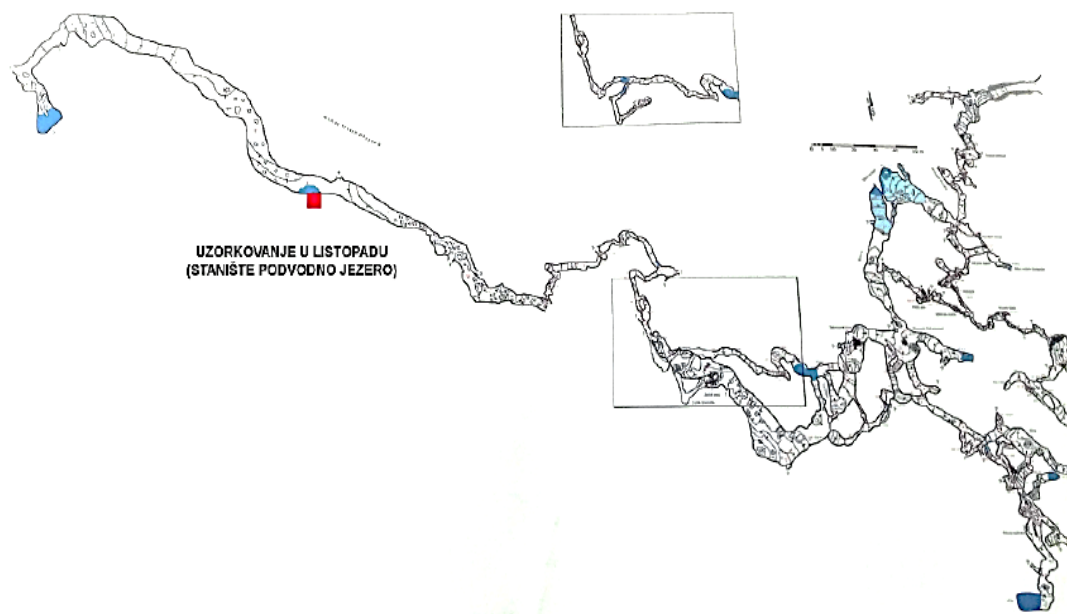
Prema Köppenovoj klasifikaciji klime u Hrvatskoj, područje Like pripada tipu Cfsbx – umjereno topla kišna klima s toplim ljetom sa srednjom mjesečnom temperaturom najhladnijeg mjeseca višom od -3 °C i nižom od 18 °C (oznaka C). Tijekom godine nema suhih razdoblja (oznaka f), ali je najmanje oborina u toplom dijelu godine (oznaka s). U oborinskom režimu postoje dva maksimuma oborine: prvi u kasnu jesen i sekundarni početkom toplog dijela godine (oznaka x). Srednja temperatura najtoplijeg mjeseca viša je od 10 °C i najmanje četiri uzastopna mjeseca imaju srednju temperaturu višu od 10 °C (oznaka b) (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Na temperaturu zraka i padaline znatno utječu reljef i nadmorska visina područja. Velebit ograničava toplinski utjecaj Jadranskog mora, ali ne može spriječiti prodor vlage s mora duboko u unutrašnjost (Pejnović, 1990).

### 3.4 Mikroklimatske karakteristike Markovog ponora

Mjerenja abiotičkih čimbenika iz 2016. pokazuju da na temperaturu ulaznih dijelova značajan utjecaj ima okolina jer su na ulaznim dijelovima zabilježene najviše temperature zraka između 8,8 °C i 10,8 °C te najmanja relativna vlažnost 79,7%. Najniža izmjerena temperatura zraka u dubljim dijelovima je iznosila 6,7 °C, a najviša 10,1 °C. Temperatura vode se kretala u rasponu od 7,8 °C do 9,1 °C, a tla od 5,9 °C do 8,4 °C. Relativna vlažnost zraka u drugim dijelovima ponora doseže 100%. Podaci iz logera postavljenih 2010./2012. pokazuju da je prosječna temperatura vode u sifonu iznosila 5,5 °C (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

### 3.5 Terensko istraživanje

Terenska istraživanja su proveli stručnjaci iz OIKON-a i Elektroprojekta, u listopadu 2016. godine, u sklopu projekta vezanog uz nadopunu podataka procjene utjecaja na okoliš, novoplaniranog zahvata HE Kosinjski na rijeci Lici na podzemne ekosustave Ličkog polja. Sto jedinki *C. jalzici* prikupljeno je iz sifonskog jezera (Slika 4.) u Markovom ponoru na 51,7 metara dubine. Zajedno s jedinkama, iz sifona je doneseno 18 litara vode koja je korištena tijekom provedenih laboratorijskih istraživanja.



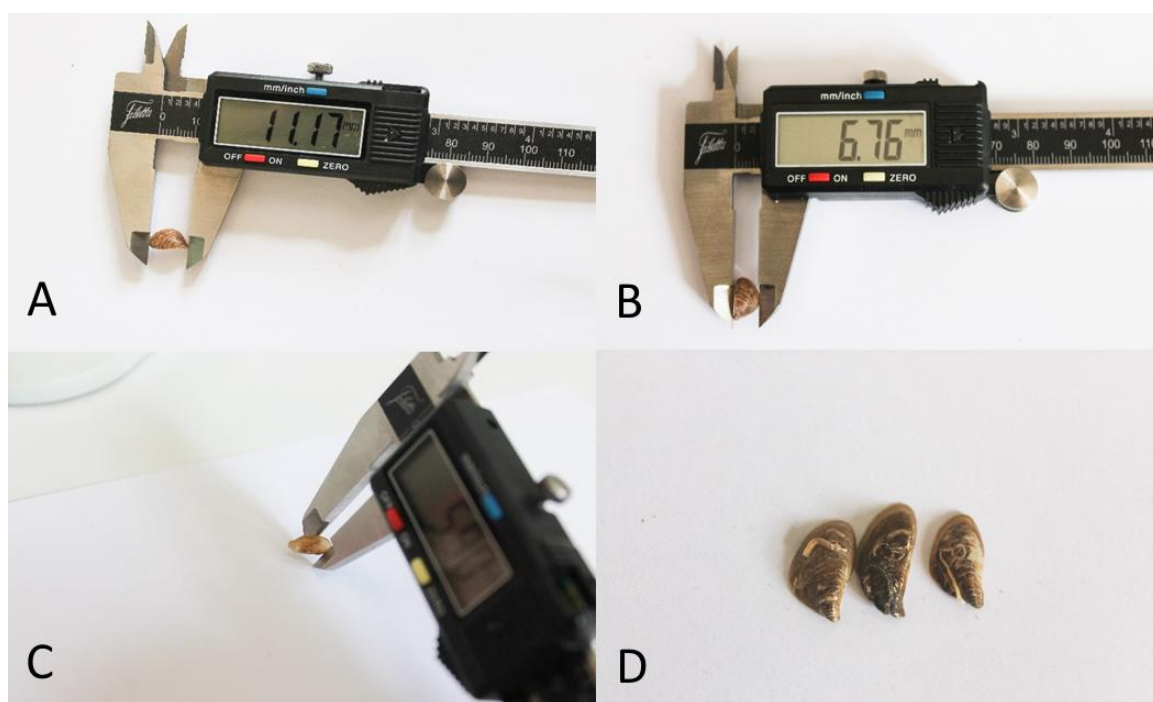
**Slika 4.** Speleološki nacrt Markovog ponora s označenim lokalitetom sifonskog (podvodnog) jezera iz kojeg su uzorkovane jedinke *Congerija jalzici* (preuzeto iz OIKON i Elektroprojekt, 2016).

### 3.6 Laboratorijska istraživanja

Nakon uzorkovanja, jedinke su odmah prenesene u zamračeni termokabinet (Lovibond, raspon temperatura 0 - 40 °C) te su tijekom tri tjedna aklimatizirane na laboratorijske uvjete koji su odgovarali stanju u Markovom ponoru (odsustvo svjetla i temperatura 8 °C). Školjkaši su tijekom aklimatizacije hranjeni jednom tjedno mješavinom algi i protista iz uzgojnih kultura. Jednom tjedno izmijenjena je voda u akvarijima u kojima su jedinke držane, a zbog ograničene količine dostupne vode iz sifona, voda iz akvarija sa školjkašima profiltrirana je kroz filter papir kako bi se uklonile organske čestice te zatim aerirana tjedan dana prije ponovnog korištenja. Nakon perioda aklimatizacije, provedene su dvije grupe pokusa:

1) izlaganje jedinki zraku i 2) izlaganje jedinki porastu temperature.

Prije svakog dijela eksperimenta, svim jedinkama izmjereni su sljedeći morfometrijski parametri: visina (po leđno-trbušnoj osi), dužina (od umba do prednjeg ruba školjkaša) i širina školjke (bočno kroz ljušturu) (Slika 5.). Poslije izlaganja jedinki povišenim temperaturama, morfometrijski parametri su izmjereni na uginulim jedinkama.



**Slika 5.** Mjerenje A) dužine, B) visine i C) širine jedinke *Congeria jalzici* pomoću pomične mjerke; D) *Congeria jalzici* prekrivena s dinarskim špiljskim cjevašem *Marifugia cavatica* Absolon & Hrabe, 1930; autor: P. Novina

### 3.6.1 Izlaganje zraku

Prilikom izlaganja školjkaša zraku, korišteno je 60 jedinki pri čemu je 30 jedinki držano u vodi (odsutstvo svjetla, temperatura 8 °C, kontrola), a 30 jedinki je bilo izloženo zraku (odsutstvo svjetla, boravak na zraku pri vlazi 85 – 90%, temperatura 8 °C; što odgovara uvjetima u Markovom ponoru (OIKON i Elektroprojekt, 2016)) tijekom tri tjedna. Jedinke koje su bile izložene zraku postavljene su na sterilne gaze (Slika 6.), na koje je nakapana mala količina vode kada bi vlaga počela padati. Za održavanje konstantne razine vlage u eksperimentalnim grupama korišteni su vlagomjeri koji su bili postavljeni u sam akvarij. Sve jedinke su hranjene jednom tjedno, te je svaki tjedan uzorkovano po 10 jedinki iz eksperimentalnih i kontrolnih akvarija, te su mjereni parametri oksidacijskog stresa i morfometrijski parametri.



**Slika 6.** Jedinke *Congeria jalzici* izložene zraku i postavljene na sterilne gaze; autor: P. Novina

### 3.6.2 Izlaganje povišenoj temperaturi

U pokusu izlaganja školjkaša povišenoj temperaturi (40 jedinki), školjkašima je postepeno povećavana temperatura vode – svaki tjedan za 2-3 °C, počevši od temperature aklimatizacije 8 °C. Svaki je tjedan bilježen mortalitet jedinki i njihovo ponašanje (prihvatanje bisusnim nitima za podlogu). Tijekom ovog pokusa, uzorkovano je po osam jedinki koje su bile izložene temperaturama od 19 °C i 25 °C (temperature prije kojih je uslijedio mortalitet



jedinki tijekom eksperimenta) te su zatim provedena mjerenja kao i u prvom dijelu pokusa. Ostatak jedinki korišten je kako bi se utvrdio temperaturni maksimum vrste – odnosno temperatura pri kojoj je nastupio mortalitet svih jedinki.

### **3.7 Biokemijski parametri stresa**

#### **3.7.1 Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina**

S obzirom na veličinu jedinki *C. jalzici*, u ovom eksperimentu su korištene cijele jedinke kako bismo imali dovoljno tkiva za analize. Za biokemijske analize, tkivo školjkaša stavljano je u Eppendorf epruvete, izvagano te zamrznuto u tekućem dušiku prije homogenizacije. Uzorci su homogenizirani (Tissuelyser, Qiagen) 1 minutu na 30000 Hz, te nakon dodatka 500  $\mu\text{L}$  kalij fosfatnog pufera (50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4 + 3 mM EDTA) homogenizirani još 1 minutu (Abel i Gelderblom, 1998). Nakon dodatka narednih 500  $\mu\text{L}$  kalij fosfatnog pufera, homogenat je centrifugiran u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 °C, 15 minuta na 20000 g. Dobiveni supernatant korišten je kao sirovi ekstrakt za određivanje koncentracije proteina, aktivnosti katalaze, sadržaja malondialdehida i karbonila. Koncentracija proteina određena je Bradfordovom metodom (1976). Bradfordova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa Coomasie Brilliant Blue G-250 pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracija proteina u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 mg mL<sup>-1</sup>).

#### **3.7.2 Određivanje aktivnosti katalaze**

Za mjerenje aktivnosti katalaze (KAT) korištena je reakcijska otopina koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7) i 10 mM vodikovog peroksida (Aebi, 1984). Prije mjerenja, u reakcijsku smjesu dodavan je alikvot supernatanta (20  $\mu\text{L}$ ) te je mjeren pad apsorbancije (zbog nestajanja supstrata tj. vodikovog peroksida) svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost KAT izražena je kao količina potrošenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\mu\text{molu}$  po minuti (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina (U mg<sup>-1</sup> proteina), a pri izračunavanju je korišten odogovarajući ekstincijski koeficijent (40 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

### 3.7.3 Određivanje sadržaja malondialdehida (MDA)

Alikvoti uzorka (300  $\mu\text{L}$ ) pomiješani su s 700  $\mu\text{L}$  10%-tne trikloroetene kiseline uz dodatak 0,01 %-tnog butiliranog hidroksitoluena (Abel i Gelderblom, 1998). Smjesa je centrifugirana 3 min/3000 g, nakon čega je supernatantima dodano 600  $\mu\text{L}$  0,67%-tne tiobarbituratne kiseline (TBA) te zagrijavano 20 minuta na 90 °C u sušioniku. Nakon grijanja svi su uzorci brzo ohlađeni u ledenoj kupelji. Apsorbancija supernatanta očitavana je na 532 nm. Kao slijepa proba korištena je otopina 0,67 %-tne TBA. Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa, pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, pri čemu se stvara crvenkasti kromogen kojem je izmjerena apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u nmol po g svježe tvari ( $\text{nmol g}^{-1}$  svježe tvari) uz ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{532} = 156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Buege i Aust, 1978).

### 3.7.4 Određivanje sadržaja karbonilnih grupa

Za određivanje sadržaja karbonilnih grupa, 100  $\mu\text{L}$  uzorka (supernatanta) koji sadrži najmanje 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  proteina, pomiješano je s 100  $\mu\text{L}$  10%-tne (w/v) trikloroetene kiseline (radi precipitacije proteina). Kao slijepa proba korišten je alikvot istog uzorka (100  $\mu\text{L}$ ) pomiješan s 10%-tnom (w/v) trikloroetenom kiselinom (100  $\mu\text{L}$ ). Pripremljeni uzorci zatim su centrifugirani 3 minute na 1000 g i dekantirani. Talozni su pomiješani s 300  $\mu\text{L}$  dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina te inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 30 minuta. Slijepa proba pomiješana je samo s 2 M HCl (Levine i sur., 1990).

Nakon inkubacije svi uzorci su pomiješani s 500  $\mu\text{L}$  10%-tne trikloroetene kiseline te centrifugirani 10 minuta na 2000 g. Dobiveni talozni isprani su u etanol/etilacetatu u omjeru 1:1 (1 x 500  $\mu\text{L}$ ) kako bi se uklonio nevezani reagens, a zatim otopljeni u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji oko 30 minuta. Sadržaj karbonila koji se temelji na reakciji karbonilnih skupina s DNPH određen je spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur., 1990). Količina

nastalih karbonila izražena je u nmol po miligramu proteina, koristeći ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.8. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz provedeni su korištenjem računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD) i Excel programa Microsoft Office paketa. Morfometrijski parametri su opisani standardnim deskriptivnim statističkim parametrima. Od mjera centralne tendencije izračunata je aritmetička sredina, a od mjera varijabilnosti izračunata standardna devijacija. Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom aritmetička je sredina deset replika. Za sve parametre je provjerena normalnost distribucije podataka korištenjem Shapiro – Wilk testa. Ukoliko su podaci bili normalno distribuirani, korištene su parametrijske statističke metode. Pri tome su razlike između eksperimentalnih grupa testirane jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i post hoc testom višestrukih uporedbi. Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini  $P < 0,05$ .

## 4. Rezultati

### 4.1 Morfometrijska analiza

U tablici 1. prikazani su podaci morfometrijskih mjerenja ljuštore *C. jalzici* neposredno prije provedbe eksperimenata. Mjerene su dužina, širina i visina školjke, a dobivene vrijednosti su prikazane u obliku: aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija te minimum i maksimum. Shapiro - Wilkovim testom za utvrđivanje normaliteta ustanovljena je normalna distribucija izmjerenih vrijednosti unutar svih testnih skupina ( $P < 0,05$ ).

**Tablica 1.** Morfometrijski podaci jedinki *Congerina jalzici* uzetih iz Markovog ponora 2016. godine.

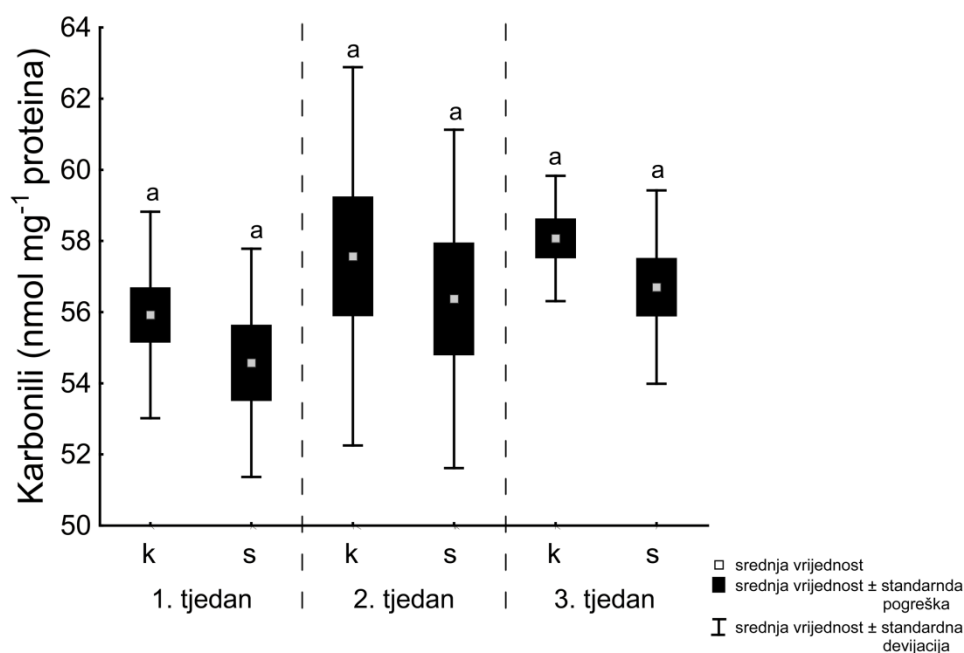
	Dužina	Širina	Visina
<b>N (broj jedinki)</b>	83	82	83
<b>aritmetička sredina <math>\pm</math> standardna devijacija (mm)</b>	12,02 $\pm$ 1,37	7,64 $\pm$ 0,94	6,87 $\pm$ 0,76
<b>min-max (mm)</b>	8,8-15,38	5,4-9,93	4,91-8,98

## 4.2 Izlaganje zraku

Uočene su statistički značajne razlike između jedinki izloženih zraku i kontrolnih jedinki (u vodi) za sljedeće parametre oksidacijskog stresa: ukupno topivi proteini, katalaza i sadržaj MDA. Jedino se količina karbonila nije statistički značajno razlikovala. Rezultati provedenih analiza pojedinih parametara oksidacijskog stresa prikazani su u nastavku.

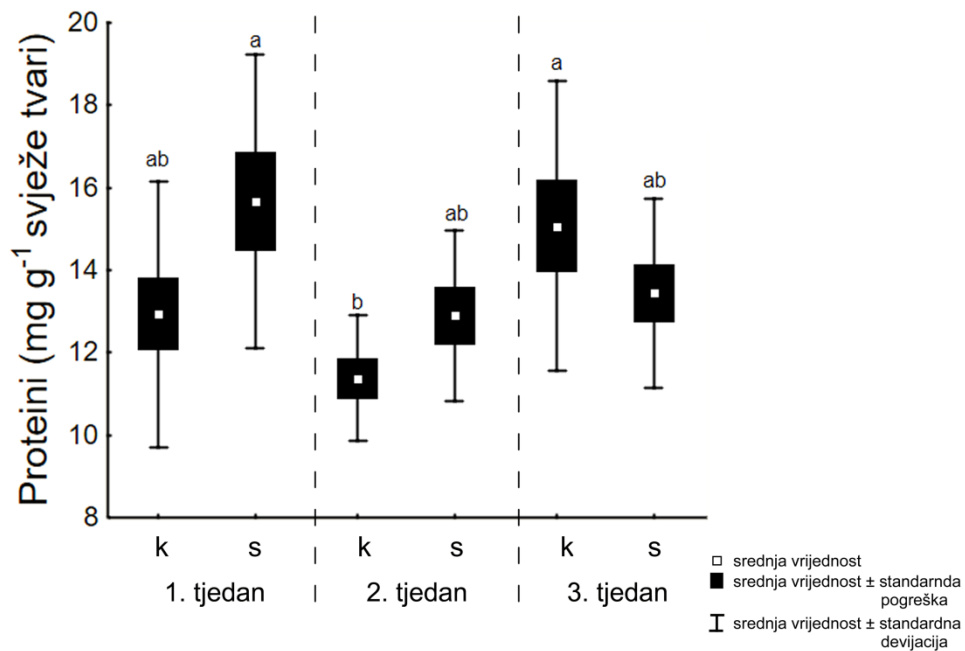
### 4.2.1 Parametri oksidacijskog stresa

Na slici 7. je prikazano kako se količina karbonila u tkivu školjkaša pri kontrolnim uvjetima (voda 8 °C) tijekom tri tjedna, statistički značajno nije razlikovala (Duncan test,  $P < 0,05$ ) od količine karbonila testne skupine koja je bila držana na suhom (8 °C, 80-95% relativna vlažnost zraka). Kontrole se međusobno nisu razlikovale.



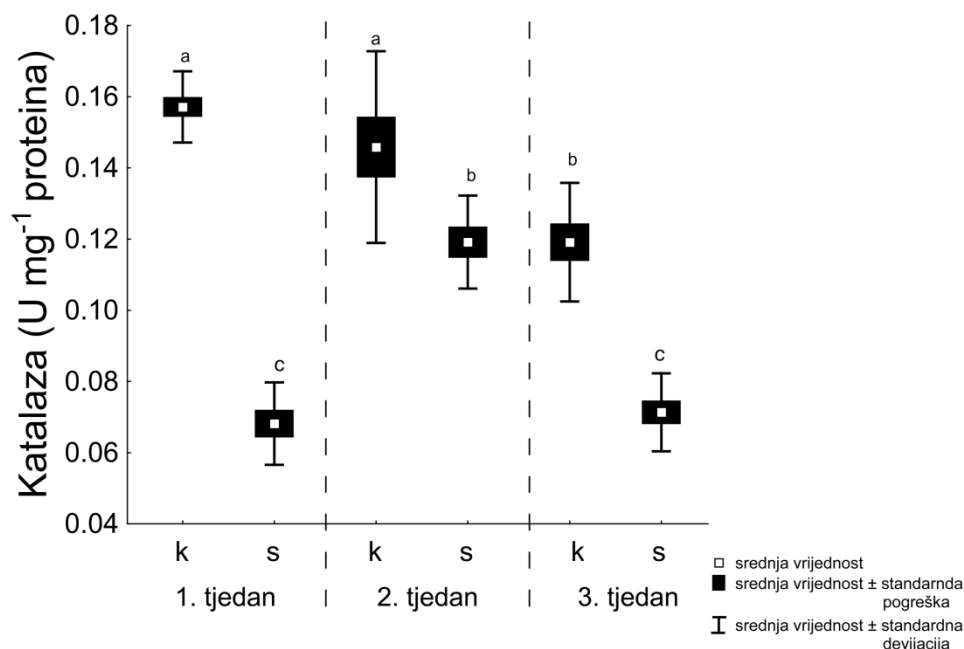
**Slika 7.** Sadržaj karbonila u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* u normalnim uvjetima (držane u vodi – kontrola: k) i izloženim zraku (držane na suhom – stres: s) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika ± standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

Sadržaj ukupnih topivih proteina u jedinkama koje su bile izlagane zraku tijekom tri tjedna se nije statistički značajno mijenjao, niti je bio značajno različit u odnosu na kontrole. Kontrolne jedinke tijekom trećeg tjedna su imale statistički značajno viši sadržaj ukupno topivih proteina od kontrolnih jedinki u drugom tjednu (Slika 8.).



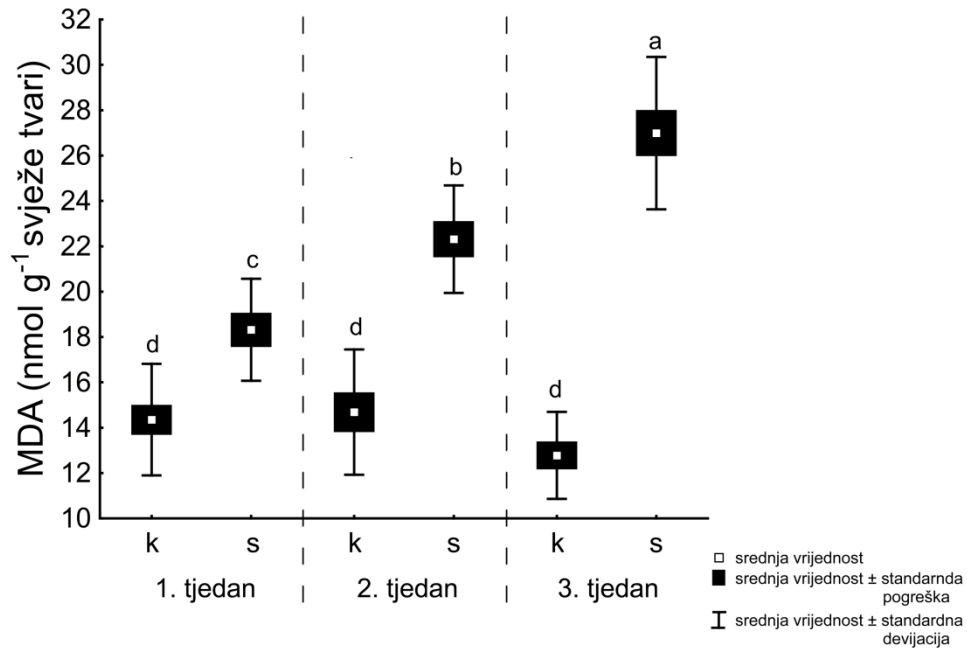
**Slika 8.** Sadržaj ukupnih topivih proteina u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* u normalnim uvjetima (držane u vodi – kontrola: k) i izloženim zraku (držane na suhom – stres: s) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3). Na slici je prikazana srednja vrijednost 10 replika  $\pm$  standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

Aktivnost katalaze bila je statistički značajno niža kod jedinki koje su držane na suhom, nego kod jedinki iz kontrolne skupine tijekom sva tri tjedna ( $P < 0,05$ ) (Slika 9.). Aktivnost kontrolnih jedinki iz trećeg tjedna bila je značajno niža u odnosu na kontrolne jedinke iz prvog i drugog tjedna.



**Slika 9.** Aktivnost katalaze u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* u normalnim uvjetima (držane u vodi – kontrola: k) i izloženim zraku (držane na suhom – stres: s) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika  $\pm$  standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

Kod jedinki koje su bile izložene zraku zabilježeno je statistički značajno povećanje ( $P < 0,05$ ) sadržaja MDA u odnosu na kontrolne jedinke iz vode. Sadržaj MDA u tkivu školjkaša je tijekom tri tjedna izlaganja zraku kontinuirano rastao, dok se sadržaj MDA u kontrolnim jedinkama nije statistički značajno razlikovao (Slika 10.). Najmanji sadržaj MDA je izmjeren kod jedinki tijekom trećeg tjedna kontrole ( $N=10$ ,  $12,77 \pm 1,92$  nmol  $g^{-1}$  svježe tvari), a najveći tijekom trećeg tjedna na suhom ( $N=11$ ,  $26,99 \pm 3,36$  nmol  $g^{-1}$  svježe tvari).

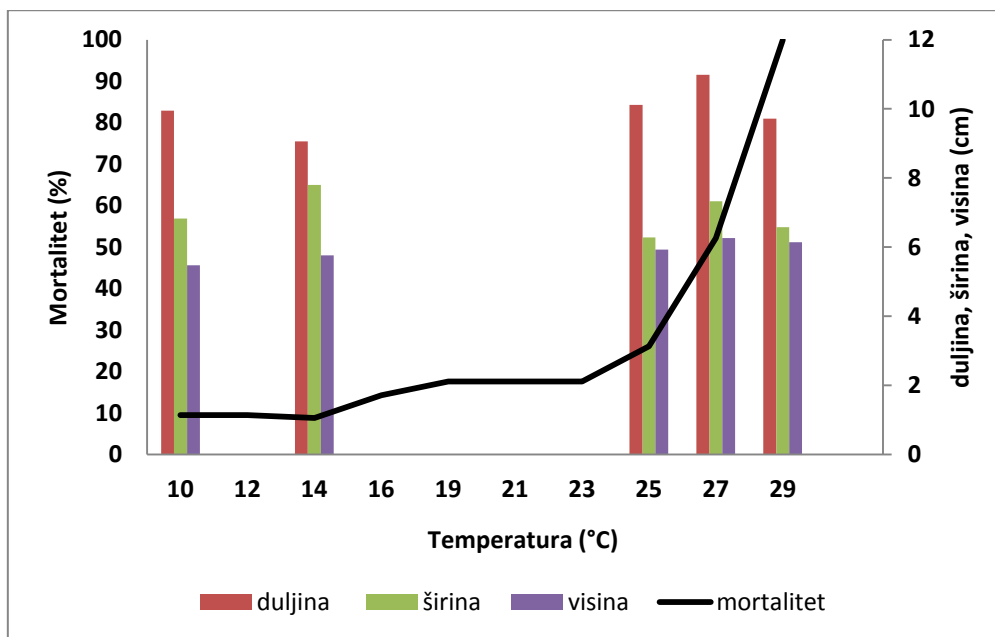


**Slika 10.** Sadržaj malondialdehida (MDA) u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* u normalnim uvjetima (držane u vodi – kontrola: k) i izloženim zraku (držane na suhom – stres: s) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika  $\pm$  standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

### 4.3 Izlaganje povišenoj temperaturi

#### 4.3.1 Istraživanje tolerancije na povišenu temperaturu

Na slici 11. je prikazana ovisnost mortaliteta o temperaturi vode. Jedinke *C. jalzici* (N=42) su bile aklimatizirane na 8 °C, a prve jedinke su uginule na 10 °C. Na 25 °C je uginulo 26% jedinki te je mortalitet tada počeo značajno rasti do temperaturnog maksimuma na 29 °C pri kojem su uginule sve preostale jedinke. Uginulim jedinkama su izmjereni morfološki parametri – duljina, širina i visina ljuštore (Slika 11.). One-way ANOVA testom je dokazano da nije bilo statističke razlike ( $P > 0,05$ ) u veličini jedinki uginulih pri različitim temperaturama (10 °C, 14 °C, 25 °C, 27 °C, 29 °C).



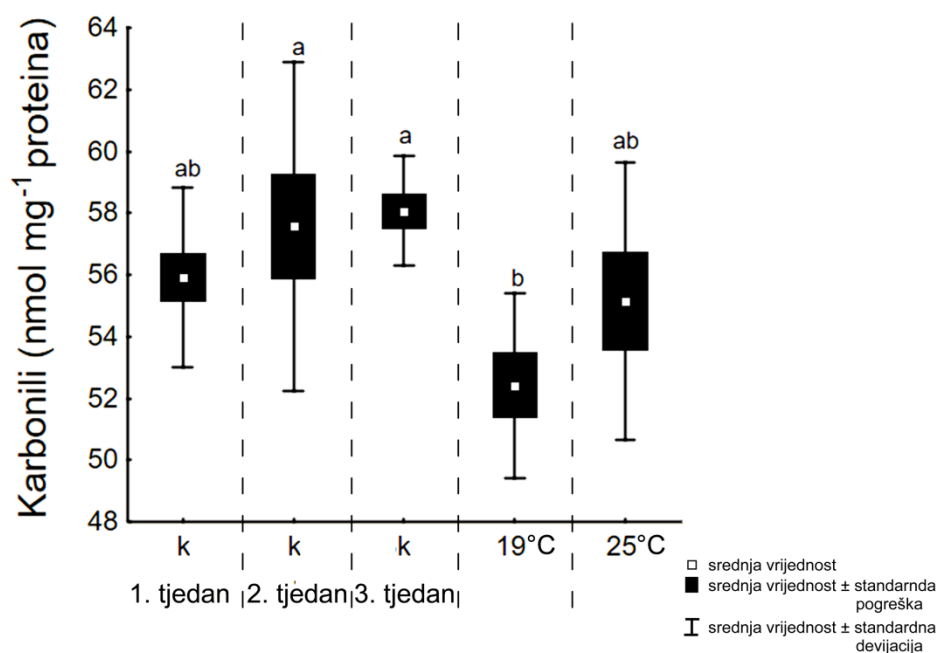
**Slika 11.** Ovisnost mortaliteta (%) te duljine (cm), širine (cm) i visine (cm) uginulih jedinki *Congeria jalzici* o temperaturi vode (°C).

#### 4.3.2 Parametri oksidacijskog stresa

Izmjerene vrijednosti parametara oksidacijskog stresa pokazale su statistički značajne razlike između jedinki izloženih povišenoj temperaturi 25 °C stupnjeva i kontrolnih jedinki (u vodi) za sljedeće parametre oksidacijskog stresa: ukupno topivi proteini, aktivnost katalaze i sadržaj MDA. Jedinke izložene temperaturi od 19 °C stupnjeva imale su statistički značajno manji sadržaj karbonila od jedinki iz drugog i trećeg tjedna kontrole. Također, statistički značajno manji im je bio sadržaj ukupnih topivih proteina, aktivnost katalaze te sadržaj MDA u usporedbi s jedinkama koje su bile izložene temperaturi od 25 °C stupnjeva. Rezultati provedenih analiza pojedinih parametara oksidacijskog stresa prikazani su u nastavku teksta.

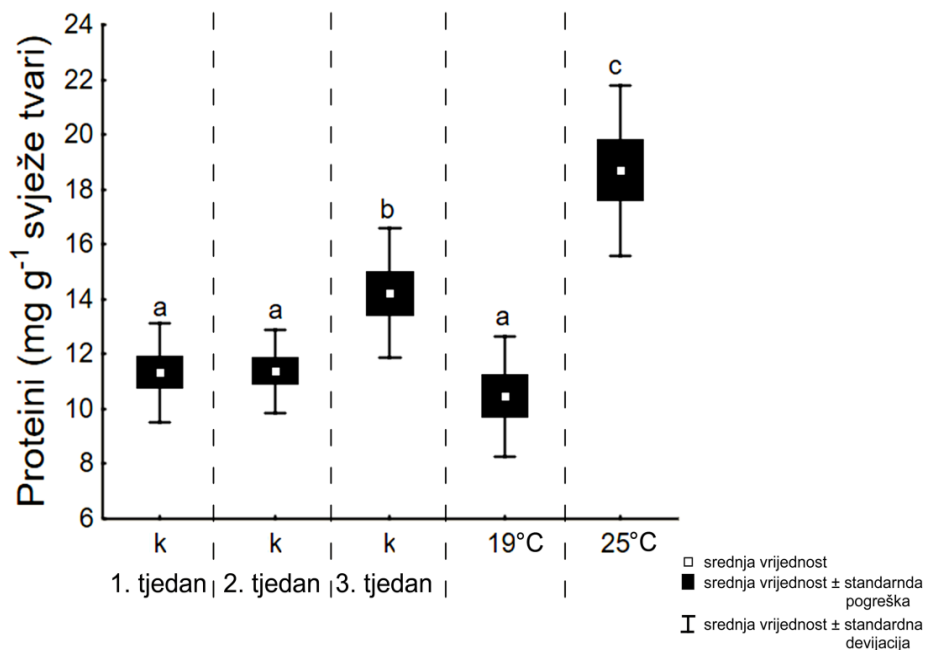
U kontrolnim jedinkama tijekom drugog ( $P < 0,05$ ) i trećeg ( $P < 0,05$ ) tjedna u vodi utvrđen je statistički značajno veći sadržaj karbonila, u odnosu na jedinke koje su bile izložene temperaturi od 19 °C stupnjeva, dok na 25 °C stupnjeva statistički značajne razlike u sadržaju karbonila nije bilo. Najveća količina karbonila izmjerena je tijekom trećeg tjedna u kontrolnim uvjetima ( $N=10$ ,  $58,07 \pm 1,76$  nmol  $\text{mg}^{-1}$  proteina), dok je najmanja izmjerena količina utvrđena kod jedinki na 19 °C ( $N=8$ ,  $52,42 \pm 2,99$  nmol  $\text{mg}^{-1}$  proteina) (Slika 12.).





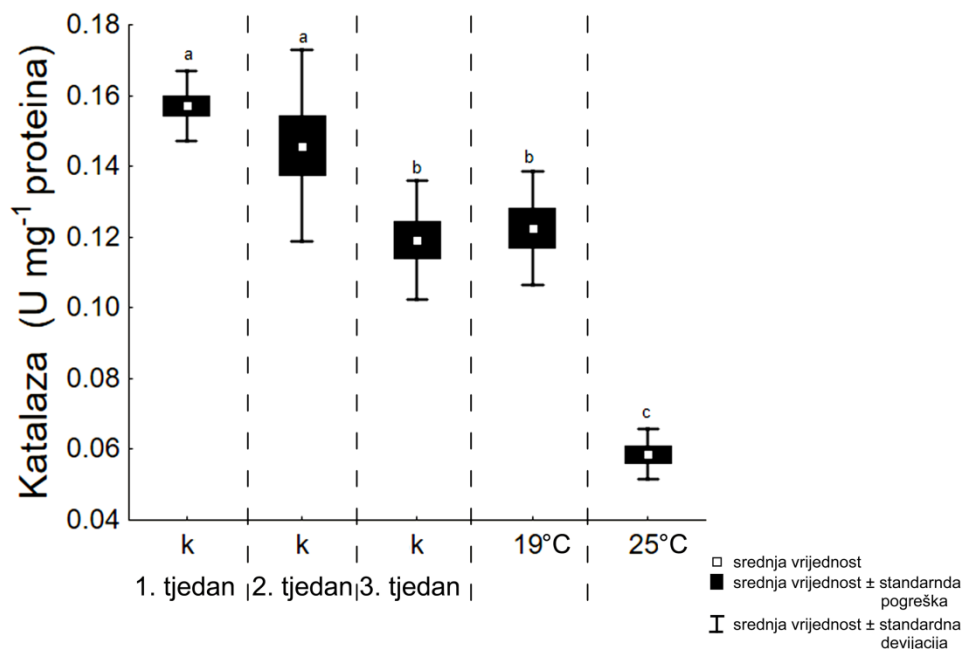
**Slika 12.** Sadržaj karbonila u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* držanim u vodi (kontrola : k) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3) i izloženim temperaturi (19 °C i 25 °C). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika ± standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

Sadržaj proteina u tkivu jedinki izloženih temperaturi od 25 °C je bio statistički značajno veći od sadržaja kod kontrolnih skupina tijekom prvog, drugog i trećeg tjedna u vodi te školjkaša koji su bili izloženi temperaturi od 19 °C ( $P < 0,05$ ). Koncentracija proteina je bila najveća kod jedinki izloženih temperaturi 25°C ( $N=8$ ,  $18,68 \pm 3,13$  mg g<sup>-1</sup> svježe tvari), a najmanja kod jedinki na 19°C ( $N=8$ ,  $10,46 \pm 2,18$  mg g<sup>-1</sup> svježe tvari) (Slika 13.).



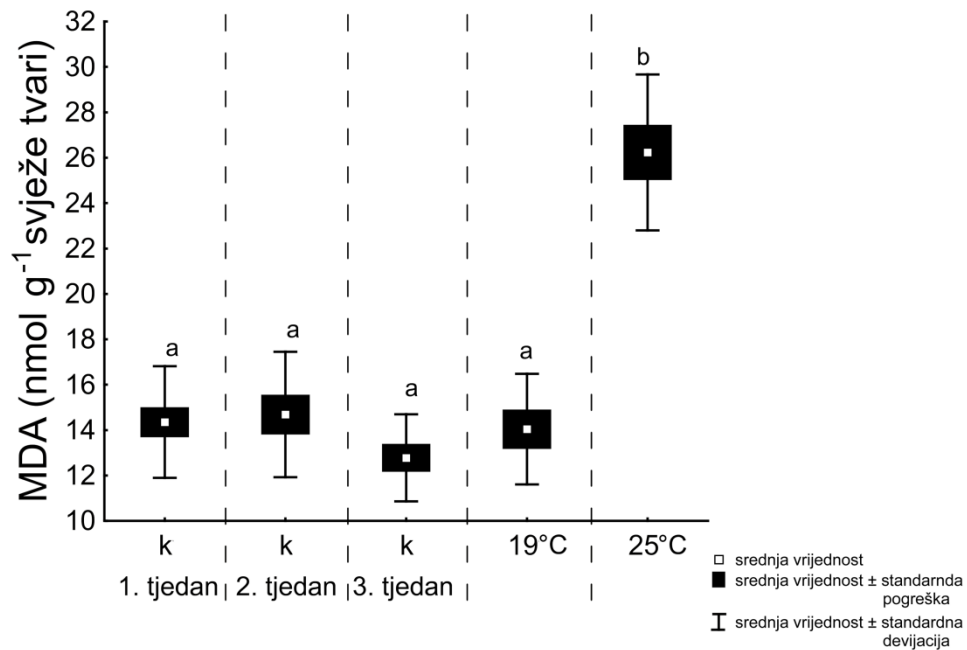
**Slika 13.** Sadržaj proteina u tkivu školjkaša *Congeria janzici* držanim u vodi (kontrola: kv) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3) i izloženih temperaturi (19 °C i 25 °C). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika ± standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ )

Aktivnost katalaze je bila statistički značajno niža kod jedinki izloženih povišenoj temperaturi od 25 °C, u usporedbi s jedinkama iz kontrolne skupine tijekom sva tri tjedna i jedinki na temperaturi od 19 °C. Aktivnost katalaze na 19 °C i tijekom trećeg tjedna je bila statistički značajno niža od aktivnosti kontrolnih jedinki tijekom prvog i drugog tjedna (Slika 14.).



**Slika 14.** Aktivnost katalaze u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* držanim u vodi (kontrola: k) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3) i izloženim temperaturi (19 °C i 25 °C). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika ± standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

Izlaganje školjkaša povišenoj temperaturi od 25 °C uzrokovalo je značajno povećanje sadržaja MDA u odnosu na kontrolne uzorke školjkaša ( $P < 0,05$ ) dok temperatura od 19 °C nije bitno utjecala na razinu lipidne peroksidacije. Sadržaj MDA u kontrolnom tkivu školjkaša nije se tijekom tri tjedna statistički značajno razlikovao ( $P < 0,05$ ) (Slika 15.).



**Slika 15.** Sadržaj malondialdehida (MDA) u tkivu školjkaša *Congeria jalzici* držanim u vodi (kontrola: k) tijekom 3 tjedna (oznake 1,2,3) i izloženim temperaturi (19 °C i 25 °C). Na stupcima je prikazana srednja vrijednost 10 replika  $\pm$  standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

## 5. Rasprava

Temperatura tijela ektotermnih organizama ovisi direktno o temperaturi okoliša u kojem se nalaze te utječe na njihov metabolizam. Školjkaši su kao sesilni ektotermni organizmi osobito osjetljivi na temperaturne promjene u okolišu (Wacker i von Elert, 2004). Promjena temperature vode ili izlaganje školjkaša zraku utječe na cjelokupno fiziološko stanje jedinke što je moguće dokazati ispitivanjem parametara oksidacijskog stresa koje smo koristili u istraživanju. Povišenje temperature povećava konzumaciju kisika što može dovesti do povećanog stvaranja ROS-a i u konačnici do oksidacijskog stresa (Lushchak, 2011). Snižena temperatura okoliša također može utjecati na nastanak oksidacijskog stresa, iako je mehanizam još uvijek nejasan, moguće je da pad temperature oslabljuje antioksidacijski sustav i pojačava stvaranje ROS-a (Lushchak, 2011). Kod školjkaša *Perna perna* Linnaeus, 1758 izloženih zraku, zabilježeno je jasno povećanje peroksidacije lipida i oksidacijskog oštećenja DNA (Almeida i sur., 2005). Antioksidacijski sustav djeluje kao obrana organizma od reaktivnih oblika kisika koji nastaju i tijekom normalnog rada organizma, ali su štetni ako dođe do njihovog prekomjernog stvaranja jer dolazi do oksidacijskog stresa (Chainy i sur., 2016). U sljedećim poglavljima ćemo usporediti dobivene rezultate s nadzemnom srodnom vrstom *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 i podzemnom *Congeria kusceri* za koje su provedena određena istraživanja.

### 5.8. Izlaganje zraku

Tijekom eksperimenta *C. jalzici* aklimatizirana na 8 °C i 80-95% vlage je preživjela tri tjedna izlaganja zraku. Biospeleološkim istraživanjima je zapaženo da jedinke iz sve tri vrste roda *Congeria*, dio godine mogu provesti izložene zraku pričvršćene na špiljske zidove zbog promjena u razini podzemne vode tijekom godine. Relativna vlažnost zraka u podzemlju često dostiže 100% što sprječava isušivanje. *C. jalzici* tijekom razdoblja niske razine vode u Markovom ponoru (kolovoz - rujan - listopad) može ostati na suhom više od dva mjeseca. Tijekom ovog razdoblja izvan vode, istraživanjima su opažene i jedinke sa otvorenim školjkama i aktivnim ulaznim i izlaznim sifonom što upućuje na moguće uzimanje hrane ili kisika iz tankog sloja vode (Jovanović Glavaš i sur., 2017). S obzirom da su jedinke vrste

*C. jalzici* je u svom staništu izložena razdobljima bez vode, te su takvi uvjeti vjerojatno utjecali na razvoj povećane otpornosti i prilagodbe na isušivanje. U usporedbi s nadzemnim srodnikom iz iste porodice *D. polymorpha*, *C. jalzici* bolje podnosi izlaganje zraku. *D. polymorpha* je za razliku od vrsta iz roda *Congerina* mnogo istraženija zbog invazivnog širenja u slatkovodnim ekosustavima diljem svijeta. Istraživanja i zapažanja o njezinoj toleranciji na izloženost zraku, pokazuju da može preživjeti izvan vode četiri dana na temperaturi od 20 do 22 °C (Alyakrinskaya, 1978; Ricciardi i sur., 1995). Prema istraživanju McMahon i Paine (1992), relativna vlažnost i temperatura zraka utječu na preživljavanje *D. polymorpha* izvan vode. Aklimatizirana na 10 °C i pri relativnoj vlažnosti zraka od 95%, *D. polymorpha* može izvan vode preživjeti do 15 dana. Iako cilj ovog istraživanja nije bio ispitati duljinu preživljavanja na suhom, utvrdili smo da *C. jalzici* aklimatizirana na 8 °C tijekom 3 tjedna preživljava izložena zraku i vlazi od 85 do 90%, bez zabilježenog mortaliteta jedinki.

Unatoč sposobnosti *C. jalzici* da preživi određeno razdoblje bez vode, rezultati našeg istraživanja pokazuju statistički značajne razlike u parametrima oksidacijskog stresa između jedinki izloženih zraku i jedinki koje su se nalazile u vodi. Najveća promjena je vidljiva u značajnom porastu količine MDA između prvog i trećeg tjedna boravka jedinki na suhom što ukazuje na stupanj oštećenja lipidne komponente stanične membrane jedinki. Suprotno tome, količina MDA kod jedinki u vodi se nije značajno mijenjala kroz tjedne. Aktivnost katalaze je bila značajno niža tijekom tri tjedna boravka na suhom, nego kod kontrolnih jedinki što može biti posljedica povećane kataboličke aktivnosti, izravne inhibicije katalaze i teškoća s antioksidacijskom obranom (Bielen i sur., 2016). Sadržaj ukupnih topivih proteina se nije značajno mijenjao tijekom tri tjedna boravka na suhom, ali je bio blago povišen u odnosu na kontrolne jedinke tijekom prvog i drugog tjedna. Od svih parametara, jedino se količina karbonila nije značajno mijenjala tijekom tri tjedna. Na temelju dobivenih rezultata, zaključujem da izlaganje jedinki *C. jalzici* zraku uzrokuje oksidacijski stres koji jedinke mogu podnijeti, no pretpostavka je da bi u slučaju dugotrajnijeg boravka jedinki na suhom došlo do naglog povećanja oksidacijskog stresa.

## 5.9. Izlaganje povišenoj temperaturi

U našem eksperimentu, jedinke *C. jalzici* smo aklimatizirali na 8 °C te smo povećavali temperaturu vode za 2 do 3 °C svakog tjedna što je rezultiralo naglim porastom mortaliteta jedinki pri temperaturi od 25 °C, dok su na 29 °C sve preostale jedinke uginule. Mjereni su morfološki parametri jedinki uginulih prilikom povišenja temperature. Morfološki parametri nisu uspoređivani na jedinkama prije i nakon eksperimenta zbog vrlo niske konstante rasta školjke koja je izračunata za srodnu vrstu *C. kusceri* ( $k = 0.04 \text{ godina}^{-1}$ ) (Puljas i sur., 2014). Značajne razlike u veličini jedinki koje su uginule pri različitim temperaturama nije bilo što je očekivano s obzirom na to da smo u eksperimentu koristili jedinke sličnih veličina. Da bismo donijeli dodatne zaključke o vezi između veličine jedinki, a samim time i starosti, te njihove otpornosti na povišenu temperaturu, potrebna su istraživanja koja bi uključivala raspon jedinki različitih veličina. Parametre oksidacijskog stresa smo mjerili na jedinkama uzetim s 19 i 25 °C, koje smo odabrali s obzirom na maksimum temperature vode u Markovom ponoru (14 °C) (OIKON i Elektroprojekt, 2016) i na temelju opažanja ponašanja jedinki.

S obzirom na nedostatak istraživanja izloženosti vrsta roda *Congerina* na povišenu temperaturu, usporedili smo rezultate s podacima o nadzemnim srodnicima. Prema istraživanjima Iwanyzki i McCauley (1993) temperatura vode na kojoj *D. polymorpha* više ne može preživjeti iznosi 30 °C. Druga istraživanja pokazuju da može tolerirati temperaturu od 30 °C, dok je 31 °C letalna temperatura (Spidle i sur., 1995). Rezultati eksperimenta Jost i sur. (2015) u kojem su postepeno povećavali temperaturu kroz dva tjedna od početnih 16 °C, pokazuju da je 90% jedinki *D. polymorpha* preživjelo nakon što su četiri tjedna bile izložene temperaturi od 20 °C, dok ih je 100% uginulo nakon tri tjedna izlaganja temperaturi od 30 °C. Oni zaključuju da povišena temperatura može direktno dovesti do mortaliteta jedinki te da je povezana sa općim fiziološkim stanjem jedinki. Istraživanja koja su proveli Spidle i sur. (1995) na srodnoj vrsti *Dreissena bugensis* Andrusov, 1897, pokazuju da važnu ulogu u preživljavanju ima i temperatura na kojoj su jedinke aklimatizirane uoči naglog povećanja temperature. Jedinke prethodno aklimatizirane na 20 °C su na 30 °C preživjele više dana od jedinki aklimatiziranih na 5 °C i 15 °C, što ukazuje da su tolerantnije na temperaturni stres ako su aklimatizirane na višoj temperaturi (20 °C) (Spidle i sur., 1995). Možemo pretpostaviti

da bi nagli temperaturni šok, bez prethodne aklimatizacije, negativno utjecao na preživljavanje *C. jalzici*.

*C. jalzici* unatoč svojoj prilagodbi i specijalizaciji na život u podzemlju ima sličan temperaturni raspon kao i njezini nadzemni srodnici *D. polymorpha* i *D. bugensis* što je neočekivano s obzirom da je riječ o špiljskoj vrsti koja živi u stabilnim uvjetima gdje su kolebanja u temperaturi vode minimalna. Monitoring temperature vode u Markovom ponoru pokazuje da temperatura može sezonski varirati od 2 °C do 14 °C, a uglavnom se kreće od 7,8 °C do 9,1 °C (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Usporedbom podataka sa postavljenih logera, primijećeno je da *C. jalzici* obitava u hladnijim špiljama gdje dolazi do većih oscilacija u razini vode, nego na lokalitetima *C. kusceri* koja obitava u vodama temperature 7,2 °C do 19,4 °C (Jovanović Glavaš i sur., 2017). Temperatura vode je bitna za rast ljuštare školjkaša i mrijest jedinki. Donji limit za rast ljuštare *C. kusceri* iznosi oko 13 do 14 °C (Puljas i sur., 2014), dok su za *C. jalzici* potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdio minimum neohpoda za rast jedinki.

Organizmi koji stalno nastanjuju podzemlje su ektotermni i žive u uvjetima stabilnog okoliša zbog čega ne toleriraju velike promjene u temperaturi te ih uglavnom svrstavamo u stenotermne organizme koje karakterizira uska ekološka valencija (Issartel i sur., 2005). Unatoč navedenom i vrlo malom broju istraživanja koja uspoređuju podzemne i nadzemne vrste, prvenstveno zbog nepoznavanja nadzemnih bliskih srodnika, neki podzemni organizmi ipak pokazuju karakteristike euritermni organizama koji dobro podnose kolebanja temperature. Zanimljivo istraživanje su proveli Issartel i sur. (2005) u kojem su ispitali utjecaj temperature na dva podzemna rakušca iz sličnih staništa *Niphargus rhenorhodanensis* Schellenberg, 1937 i *Niphargus virei* Chevreux, 1896 te nadzemnog rakušca *Gammarus fossarum* Koch, 1836. Očekivano, rezultati su pokazali da je *G. fossarum* najotporniji na promjene u temperaturi vode budući da je tijekom svog životnog ciklusa izložen velikim temperaturnim promjenama. Iznenadujuće je što podzemni *N. rhenorhodanensis*, za razliku od *N. virei* vrlo dobro podnosi temperaturne promjene iako ne obitava u okolišu u kojem postoje sezonske promjene u temperaturi vode. Jedan od mogućih odgovora se krije u poznavanju geološke prošlosti, odnosno rasprostranjenosti ledenog pokrova u pleistocenu ispod kojeg je preživio *N. rhenorhodanensis* zahvaljujući mogućnosti prilagodbe na nisku temperaturu koju je zadržao sve do danas. Na temelju naših rezultata možemo pretpostaviti da *C. jalzici* također ima karakteristike euritermni organizama što je potrebno dalje ispitati.



Neki organizmi izloženi jednom tipu stresa, mogu razviti povećanu toleranciju na druge tipove stresa. Takva sposobnost organizma je poznata kao unakrsna tolerancija (engl. cross tolerance) i najviše je istražena kod biljaka (Pastori i Foyer, 2002), ali se zadnjih godina istražuje i kod akvatičkih organizama posebice sedentarnih (Marigómez i sur., 2017). Budući da je *C. jalzici* pokazala visoku toleranciju na stresne uvjete – izloženost zraku i visokoj temperaturi, moguće je da i ona, kao sedentarni organizam koji nema mogućnost "bijega" od nepovoljnih uvjeta, razvila ovaj oblik adaptacije. Sedentarni organizmi su osobito izloženi stresorima iz okoliša (Bielen i sur., 2016) i budući da se školjkaši hrane filtriranjem čestica iz vode, tijekom boravka na suhom hranjenje im je otežano iako je primijećeno da vjerojatno mogu uzimati kisik i hranjive tvari iz tankog filma vode koji se stvara zbog visoke vlage u špiljama (Jovanović Glavaš i sur., 2017). Također, uvjeti života u podzemnim vodama u ovom slučaju mogu biti višestruko stresni jer podrazumijevaju sezonalne promjene u razini vode i temperaturi, preživljavanje dužeg razdoblja na suhom te ograničen dotok hranjivih tvari.

Analizirani standardni pokazatelji oksidacijskog stresa proteini i MDA su statistički značajno povišeni kod jedinki uzetih iz vode na temperaturi od 25 °C, aktivnost katalaze je značajno niža u odnosu na kontrole, dok se karbonili nisu značajno mijenjali. Rezultati Bielen i sur. (2016) pokazuju da se aktivnost katalaze nije značajno mijenjala tijekom 14-dnevnog izlaganja školjkaša *Anodonta anatina* Linnaeus, 1758 i *Sinanodonta woodiana* Lea, 1834 povišenim temperaturama od 10 do 26 °C. Suprotno tome, rezultati Khessiba i sur. (2005) upućuju na povećanu aktivnost katalaze kod školjkaša *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 pri povišenoj temperaturi od 25 °C. Ovakvi oprečni rezultati su vjerojatno pokazatelj da na parametre oksidacijskog stresa, odnosno katalazu utječu mnogi faktori poput fiziološkog stanja jedinke, dobi, štetnih tvari u okolišu, godišnjeg doba, itd. Vrijednosti parametara oksidacijskog stresa u našem istraživanju na 25 °C su slične onima nakon izloženosti jedinki zraku. Primijećeno je da je porast parametara oksidacijskog stresa na 25 °C, povezan s porastom mortaliteta jedinki koji se na toj temperaturi naglo povećao.

## 6. Zaključak

- Na temperaturi od 25 °C parametri oksidacijskog stresa kod *C. jalzici* su povišeni i sličnih su vrijednosti onima prilikom izlaganja zraku.
- Izlaganje povišenoj temperaturi i zraku je potaknulo prekomjerno stvaranje ROS-a što je vidljivo na temelju oštećenja lipidnih membrana (porast MDA) i inhibicije katalaze. Suprotno tome, nije došlo do oksidacijskog oštećenja proteina.
- S obzirom na uvjete u staništu, značajniji izvor stresa za *C. jalzici* je izloženost zraku jer bi se temperatura vode trebala povisiti do 25 °C kako bi došlo do oksidacijskog stresa.
- Kako predviđeni zahvat ne bi negativno utjecao na postojeće populacije *C. jalzici* potrebno je održati postojeće stabilne okolišne uvjete koji uključuju: zadržavanje vode u sifonima ponora tijekom većeg dijela godine te sušno razdoblje tijekom ljeta i povremene promjene temperature vode koje su bitne za razmnožavanje.
- Potrebno je i dalje provoditi monitoring vrste *C. jalzici* i abiotičkih čimbenika.
- Provoditi laboratorijska istraživanja kako bi se saznalo više o samoj ekologiji i fiziologiji vrste.

## 7. Literatura

Abel S., Gelderblom W.C.A. (1998): Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo, *Toxicology* 131, 121–131

Aden E. (2005): Adaptation to Darkness. Culver D.C., White W.B. *Encyclopedia of caves*, Elsevier Academic Press, 1-3

Aebi H. (1984): Catalase in vitro, *Methods in Enzymology* 105, 121-126

Almeida E., Bairy A., Dafe A., Gomes O., Medeiros M., Di Mascio P. (2005): Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318 (1), 21-30

Alyakrinskaya I.O. (1978): Biochemical adaptations to drying conditions in bivalves in the Kruski Zaliv Baltic Sea USSR, *Zooligicheskii Zhurnal* 57, 136-138

Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-31

Bakšić D. (2008): Speleološka istraživanja Markovog ponora 1999. i 2000. godine, *Hrvatski speleološki poslužitelj*, [public.carnet.hr/speleo](http://public.carnet.hr/speleo)

Belles X. (1992): From dragons to allozymes, A brief account of the history of biospeleology, In: *The natural history of biospeleology*, 3–24

Betteridge J. (2000): What is oxidative stress? *Metabolism* 49, 3-8

Bielen A., Bošnjak I., Sepčić K., Jaklič M., Cvitanić M., Lušić J., Lajtner J., Simčić T., Hudina, S. (2016): Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves, *Science of The Total Environment* 543, 449-459

Bilandžija H., Komerički A. (2013): Krške podzemne vode – stanište jedinstvenog školjkaša i rezerve pitke vode, Završno izvješće za Fond za zaštitu okoliša i energetske učinkovitost, Hrvatsko biospeleološko društvo, Zagreb, 49

Bilandžija H., Morton B., Podnar M., Cetković H. (2013): Evolutionary history of relict *Congeria* (Bivalvia: Dreissenidae): unearthing the subterranean biodiversity of the Dinaric Karst, *Frontiers in Zoology* 10, 1-17

Bilandžija H., Puljas S., Čuković T. (2014): Protokol praćenja stanja vrsta *Congeria kusceri* Bole, 1962 i *Congeria jalzici* Morton & Bilandžija, 2013 u Republici Hrvatskoj, Hrvatsko biospeleološko društvo, Zagreb

Birben E., Sahiner U., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19

Bole J. (1962): *Congeria kusceri* sp. n. (Bivalvia, Dreissenidae), *Biološki vestnik* 10, 55-61

Božičević S. (1960): Hidrogeologija glavnih ponora rijeke Like, *Geološki vjesnik* 21, 317 – 328

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Brusca C. R., Brusca G. J. (2003): *Invertebrates*, Sinauer Associates

Buege J. A., Aust S. D. (1978): Microsomal lipid peroxidation, *Methods, Enzymol* 52, 302–310

Chainy G., Paital B., Dandapat, J. (2016): An Overview of Seasonal Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some Invertebrate and Vertebrate Species, *Scientifica*, 1-8

Culver D. C. (1982): *Cave life – evolution and ecology*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 189

Culver D. C., Sket, B. (2000): Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells, *Journal of Caves and Karst Studies* 62 (1), 11–17

Culver D., Pipan T. (2010): *The biology of caves and other subterranean habitats*, Oxford: Oxford University Press

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta* 329 (1-2), 23-38

Ford D., Williams P. (2013): *Karst hydrogeology and geomorphology*, Hoboken

Gottstein S. (2010): *Priručnik za određivanje podzemnih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU*, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 99

Issartel J., Hervant F., Voituron Y., Renault D., Vernon P. (2005): Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigeal and hypogean crustaceans to different temperatures, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 141 (1), 1-7

Iwanyzki S., McCauley R.W. (1993): Upper lethal temperatures of adult zebra mussels (*Dreissena polymorpha*), In *Zebra mussels: biology, impacts, and controls*, Lewis Publishers, Boca Raton, 667-673

Jalžić B. (1998): The stygobiont bivalve *Congeria kusceri* Bole, 1962. (Bivalvia, Dreissenidae) in Croatia, *Natura Croatica* 7 (4), Zagreb, 341-347

Jalžić B. (2001): The first finding of live stygobiont bivalve *Congeria* in Lika region, Croatia. *Natura Croatica* 10 (3), 213-220

Jost J., Soltis E., Moyer M., Keshwani S. (2015): Linking zebra mussel growth and survival with two cellular stress indicators during chronic temperature stress, *Invertebrate Biology* 134 (3), 189-202

Jovanović Glavaš O., Jalžić B., Bilandžija H. (2017): Population density, habitat dynamic and aerial survival of relict cave bivalves from genus *Congeria* in the Dinaric karst, *International Journal of Speleology* 46 (1), 13-22

Khessiba A., Roméo M., Aïssa, P. (2005): Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane, *Environmental Pollution* 133 (2), 275-281

Kochansky-Devide V., Sliskovic T. (1978): Miocenske kongerije Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Zagreb, Jugoslavenska Akademija Znanosti i Umjetnosti

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Meth Enzymol* 186, 464-478

Lucy F. (2006): Early life stages of *Dreissena polymorpha* (zebra mussel): the importance of long-term datasets in invasion ecology, *Aquatic Invasion* 1, 171–182

Lushchak V. (2011): Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30

Marigómez I., Múgica M., Izagirre U., Sokolova I. (2017): Chronic environmental stress enhances tolerance to seasonal gradual warming in marine mussels, *Ploset One* 12 (3)

McMahon R.F., Payne B.S. (1992): Effects of temperature and relative humidity on desiccation resistance in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): is aerial exposure a viable control option? *Dreissena polymorpha* Information Review, Special Conference Issue (June/July 1992), 14

Morton B., Velkovrh, F., Sket, B., (1998): Biology and anatomy of the »living fossil« *Congeria kusceri* (Bivalvia: Dreissenidae) from subterranean rivers and caves in the Dinaric karst of former Yugoslavia, *Journal of Zoology* 245 (2), 147–174

OIKON i Elektroprojekt (2016): Studija o utjecaju na okoliš HES Kosinjski, Zagreb, 835

Ozimec R., Bedek J., Gottstein S., Jalžić B., Rajko Slapnik R., Štamol V., i ostali (2009): Crvena Knjiga špiljske faune Hrvatske, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 363

Pastori G., Foyer C.H. (2002): Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls, *Plant physiology* 129 (2), 460-468

Pejnović D. (1990): Prilog poznavanju obilježja klime i klimatska regionalizacija Like, *Radovi Geografskog odjela* 25, 1-22

Pianka E. R. (1970): On r- and K selection *American Naturalist* 104, 595–597

Puljas S., Peharda M., Morton B., Giljanović N., Jurić, I. (2014): Growth and Longevity of the „Living fossil“ *Congeria kusceri* (Bivalvia: Dreissenidae) from the Subterranean Dinaric Karst of Croatia. *Malacologia* 57 (2), 353-364

Ricciardi A., Serrouya R., Whoriskey F. (1995): Aerial exposure tolerance of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae): implications for overland dispersal, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52 (3), 470-477

Shacter E. (2000): Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metabolism Reviews* 32, 307-326

Schutt H. (2000): Die Höhlenmollusken der Ombla-quelle, *Natura Croatica* 9 (3), 203–215

Sket B. (1996): Biotioc diversity of hypogean habitats in Slovenia and its cultural importance, *Biodiversity - International Biodiversity Seminar, Proceedings*, 59–74

Sket B. (1999): The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered, *Biodiversity and Conservation* 8, 1319-1338

Spidle A., May B., Mills E. (1995): Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52 (10) , 2108-2119

Štefan L., Tepšić T., Zavidčić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice, *Medicina Fluminensis* 43 (2), 84–93

Turner S. (1960): Bojanje rijeke Like na Markovom ponoru u Lipovom polju, Arhiva "Elektroprojekta", Zagreb

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1), 44-84

Wacker A., Von Elert E. (2004): Food quality controls egg quality of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: the role of fatty acids. *Limnology and Oceanography* 49 (5), 1794–1801

Web izvori:

<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/dinarski-spiljski-skoljkasi> (Pristupljeno: 10.3.2018.)

Zakoni: NN 80 (2013): Zakon o zaštiti prirode, Narodne novine 80



## 8. Životopis

### *Edukacija*

15.–18. Master of Science, Magistar struke znanosti o okolišu

Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb

- Student diplomskog studija Znanosti o okolišu

rujna 17.–prosinca 17.

Lancaster University, Lancaster (Ujedinjeno Kraljevstvo)

- Erasmus exchange student (Michaelmas term)
- Postgraduate courses: Wildlife Monitoring Techniques, Environmental Governance and Management, Groundwater Resources and Protection

12.–15. Bachelor of Science, Prvostupnik struke znanosti o okolišu

Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb

- Student preddiplomskog studija Znanosti o okolišu

08.–12.

XV. Gimnazija, Zagreb

- prirodoslovno - matematička gimnazija

00.–08.

Osnovna škola braće Radića, Kloštar Ivanić

---

### *Radno iskustvo*

*siječanj 18. –svibanj 18. Administrativni pomoćnik*

Agencija za mobilnost i programe EU

*ožujka 17.–lipnja 17. Edukator*

Javna ustanova Maksimir, Zagreb

- edukacija djece osnovnoškolskog uzrasta
- vođenje terenskih radionica u parku Maksimir (teme: prepoznavanje flore i faune, voda, godišnja doba, orijentacija u prirodi)

*listopada 14.–veljače 15. Demonstrator*

Prirodoslovno- matematički fakultet, Zagreb

- priprema preparata i rad sa studentima na praktičnoj nastavi iz kolegija Beskralježnjaci

## *Jezici*

Hrvatski (materinji jezik), Engleski (C1)

## *Komunikacijske vještine*

- sposobnost rada u timu
- komunikacijske i prezentacijske vještine stečene kroz rad i vođenje na znanstveno-popularnim događajima (Noć biologije, Noć šišmiša, Znanstveni piknik, Znanstveni kvart)
- Sudjelovanje na Erasmus+ Youth Exchange projektima (Mountains connecting people - Kosovo 2015, Orientate your youth map - Turkey 2016, Nature calls - Belgium 2016, Biodiversity - Italy 2016, PBA Youth for nature volunteering and inclusion - Kosovo 2016, Do sports, not posts - Romania 2017, Be cyclist friendly - Azerbaijan 2017, Living libraries - Poland 2018)

## *Digitalne vještine*

- Microsoft office (Excel, Word, Powerpoint), statistički software Statistica, Adobe Lightroom

## *Ostale vještine*

- speleološki pripravnik (SO Željezničar, 2015) – DRT tehnika
- fotografiranje (tečaj digitalne i analogne fotografije KSET, 2017)