



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



**Kontinuirani monitoring stanja životne
sredine: Optimizacija sistema zasnovanog na
fiziološkim odgovorima dagnje (*Mytilus
galloprovincialis* Lamarck, 1819)**

Doktorska disertacija

Mentor: prof. dr Ivana Teodorović

Kandidat: Marko Nikolić

Novi Sad, 2020. godine

Zahvalnica

Izuzetnu zahvalnost iskazujem mentorki, prof. dr Ivani Teodorović na povjerenju, razumijevanju, savjetima i pomoći prilikom izrade i pisanja disertacije. Vizija, savjeti i velika podrška moje mentorke umnogome su mi olakšali i uljepšali rad na disertaciji.

Srdačno se zahvaljujem članovima komisije, prof. dr Silvani Andrić, prof. dr. Sonji Kaišarević i prof. dr Aleksandru Ostojiću na sugestijama, uloženom trudu i velikoj ekspeditivnosti prilikom ocjene ove disertacije.

Najljepša hvala dr Tanji Tomić na pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem se gđi Tamari Zorić na predusretljivosti, razumijevanju i pomoći tokom cjelokupnog perioda trajanja doktorskih studija.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Igoru Radusinoviću, na ukazanom povjerenju da budem član projektnog tima prvog Centra izvrsnosti u bioinformatički (BIO-ICT), u okviru kojeg su sprovedena istraživanja i dobijeni podaci za izradu ove disertacije. Hvala menadžmentu timu BIO-ICT projekta Tanji Knežević, Feridi Mandić, Ani Tabaš i Milici Milonjić na pomoći tokom projektnih aktivnosti. Zahvaljujem se kolegama sa Elektrotehničkog fakulteta, Univerziteta Crne Gore, a posebno prof. dr Nedeljku Lekiću na pomoći u aktivnostima vezanim za unapređenje postojećeg automatizovanog sistema.

Iskreno se zahvaljujem gg. Iliji i Goranu Guskiću, vlasnicima uzgajališta ribe i školjki u Orahovcu, koji su mi svojim gostoprimstvom pružili sve uslove za nesmetan eksperimentalni rad na uzgajalištu. Zahvalnost za безусловnu pomoć dugujem Zoranu, Pepiju, Jocu, Iliji, Tomu i čika Kostu sa uzgajališta ribe i školjki u Orahovcu.

Iskrenu zahvalnost izražavam g. Zoranu Nikoliću koji mi je pružao nesebičnu pomoć u održavanju sistema za monitoring.

Srdačno se zahvaljujem kolegama iz Instituta za biologiju mora koji su svojom pomoći doprinijeli izradi ove disertacije, a posebno dr Milici Mandić, Branislavu Lazareviću, Vladanu Vukoviću i Stefanu Raleviću.

Ne mogu a da ne izrazim zahvalnost bivšem direktoru Instituta za biologiju mora dr Mirku Đuroviću koji je od početka opstruirao izradu ove disertacije, kao i dr Danijeli Joksimović i dr Aleksandru Joksimoviću koji su svojim riječima i djelima nerijetko bili kamen spoticanja u procesu izrade ove disertacije, čime su zapravo doprinijeli da moj istraživački rad, elan i volja za naučnim radom budu još veći i snažniji. Sa istinskim uvjerenjem da će ova disertacija naći svoju primjenu u naučnim institucijama, uprkos želji

bivšeg direktora da samo krasí zid porodične kuće, prisjećam se stihova Petra II Petrovića Njegoša: „Kome zakon leži u topuzu, tragovi mu smrde nečovještvom“.

Veliku zahvalnost izražavam dr Tatiani Kuznetsovoj, prof. dr Sergeju Kholodkevichu, Antonu Kurakinu, prof. dr Andreyu Sarovu iz Naučno-istraživačkog centra za ekološku bezbjednost Ruske akademije nauka (Sankt Peterburg, Rusija) na nesebičnoj pomoći, strpljenju, povjerenju, prijateljstvu, korisnim savjetima i instrukcijama u eksperimentalnom radu vezanom za funkcionisanje sistema za kontinuirani monitoring i obradi dobijenih podataka. Takođe se zahvaljujem prof. dr Aleksanderu Antsulevichu, kao i kolegama iz Naučno-istraživačkog centra za ekološku bezbjednost na prijatno provedenom vremenu u Sankt Peterburgu.

Posebno se zahvaljujem mojim prijateljima, kumovima i rođacima na podršci, pomoći, razumijevanju i bodrenju tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala tetki Ljubici, Biljani, Jeleni i Novaku, gazdi Tomi i Bojanu na gostoprimstvu, pomoći i podršci, kao i divno provedenom vremenu u Novom Sadu. Hvala Milovanu Jakšiću i njegovoj porodici, Branki, Didi i Miju, Ani i Igoru, Vladanu, Uglješi, Ani, Milošu, Acu, Nikoli i Deju koji su mi u teškim trenucima pružali nesebičnu podršku.

Mojim roditeljima, bratu Andriji i sestri Mariji koji su uvijek i u svemu moj oslonac, podrška, snaga i sigurnost, u znak zahvalnosti posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj Slađi. Ona je moj genijalni inspirator, moj dobri anđeo čuvar od grešaka životnih i još više naučnih. Bez nje nikada ne bih postavio i završio ovo djelo.

Marko Nikolić

Sadržaj

1. UVOD	6
2. PREGLED LITERATURE	9
2.1. Monitoring	9
2.2. Bioindikatori	12
2.3. Biomarkeri	13
2.4. Mekušci u biomonitoring programima sa osvrtom na školjke	23
2.4.1. Aktivni i pasivni biomonitoring	25
2.5. Fiziološki biomarkeri kod markoinvertebrata	26
2.5.1. Srčani ritam (HR) kao fiziološki biomarker kod makroinvertebrata sa akcentom na školjke	27
2.5.1.1. Uticaj ekoloških faktora na srčani ritam	29
2.5.1.2. Osjetljivost srčanog ritma na specifične klase ksenobiotika	38
2.5.2. Otvorenost ljuštura (VG) kao fiziološki biomarker kod školjki	45
2.5.2.1. Uticaj ekoloških faktora na otvorenost ljušture školjki	46
2.5.2.2. Osjetljivost otvorenosti ljušture na različite grupe ksenobiotika	52
2.6. Opis vrste <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	57
3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA – BOKOKOTORSKI ZALIV	62
4. CILJEVI	64
5. MATERIJAL I METODE	65
5.1. Eksperimentalna postavka	65
5.1.1. Kontinuirani monitoring fizioloških odgovora dagnji	66
5.1.2. Studija slučaja	68
5.2. Fizičko-hemijski i biološki parametri morske vode i tkiva dagnji	70
5.3. Automatizovani sistem za kontinuirani monitoring fizioloških biomarkera	73
5.3.1. Oprema za praćenje srčane aktivnosti (HR oprema)	73
5.3.2. Oprema za praćenje otvaranja i zatvaranja ljuštura školjki (VG oprema)	77
5.4. Obrada podataka	81
5.4.1. Obrada podataka dobijenih pomoću opreme za praćenje srčane aktivnosti	81
5.4.2. Obrada podataka dobijenih pomoću opreme za praćenje otvaranja i zatvaranja ljuštura školjki	81
5.5. Statistička obrada podataka	82
6. REZULTATI I DISKUSIJA	83

6.1. Kontinuirani monitoring fizioloških biomarkera dagnji	83
6.1.1. Kontinuirani monitoring srčanog ritma dagnji	83
6.1.1.1. Dnevna dinamika srčanog ritma	83
6.1.1.2. Dinamika srčanog ritma tokom jednogodišnjeg monitoringa	92
6.1.2. Uticaj ekoloških faktora na srčani ritam	100
6.1.2.1. Opšti parametri kvaliteta vode na lokalitetu Orahovac	100
6.1.2.2. Povezanost srčanog ritma i fizičko-hemijskih parametara	110
6.1.3. Kontinuirani monitoring pokreta ljuštore dagnji	119
6.1.3.1. Dnevna dinamika pokreta ljuštore	119
6.1.3.2. Dinamika pokreta ljuštore tokom kontinuiranog monitoringa	127
6.2. Fiziološki biomarkeri dagnji kao odgovor na stres	134
6.2.1. Testovi saliniteta u kontinuiranom monitoringu	134
6.2.2. Primjena fizioloških biomarkera školjki u pasivnom biomonitoringu	157
6.3. Tehnički sistem	162
6.3.1. Problemi u održavanju sistema za monitoring	162
6.3.2. Unapređenje opreme u dijelu prenosa podataka	165
7. ZAKLJUČAK	167
LITERATURA	169

Lista skraćenica

- 2-ADNT – eng. 2-amino-4,6-dinitrotoluene – 2-amino-4,6-dinitrotoluen
- 4-ADNT – eng. 4-amino-2,6-dinitrotoluene – 4-amino-2,6-dinitrotoluen
- AChe – eng. acetylcholinesterase – acetilholinesteraza
- ADC – eng. analog-digital converter – analogno-digitalni konvertor
- ALAD – eng. aminolevulinic acid dehydratase – aminolevulinska kiselina dehidrataza
- B[a]P – eng. benzo[a]pirene – benzo[a]piren
- BFR – eng. brominated flame retardants – organobromni usporivači gorenja
- C 1,2 – eng. C 1,2 – Ce 1,2
- CA – eng. carbonic anhydrase – karbonska anhidraza
- CAT – eng. catalase – katalaza
- CE – eng. carboxylesterase – karboksilesteraza
- ChAT – eng. cholinacetyltransferase – holinacetiltransferaza
- COM – eng. communication port – komunikacijski port
- CV_{HR} – eng. coefficient of heart rate variation – koeficijent varijacije srčanog ritma
- DA – eng. domoic acid – domoična kiselina
- DAD – eng. Diode Array Detector – diodni detektor
- DBT – eng. dibenzothiophenes – dibenzotiofen
- dcSTX – eng. decarbamoylsaxitoxin – dekarbamoiilsaksitoksin
- DDT – eng. dichloro-diphenyl-trichloroethane – dihlor-difenil-trihloretan
- DOT – eng. dioctyltin – dioktiltin
- DPhT – eng. diphenyltin – difeniltin
- ERND – eng. erythromycin N-demethylase – eritromicin N-demetilaza
- FAO – eng. Food and Agriculture Organisation – Organizacija za hranu i poljoprivredu
- GD – Granica detekcije
- GK – Granica kvantifikacije
- GPx – eng. glutathione reductase – glutation reduktaza
- GST – eng. glutathione S-transferase – glutation S-transferaza
- GTX 1,4 – eng. gonyautoxin 1,4 – gonuautoksin 1,4
- GTX 2,3 – eng. gonyautoxin 2,3 – gonuautoksin 2,3
- HSP – eng. heat shock protein – stres proteini
- ICES – eng. International Council for the Exploration of the Sea – Međunarodno vijeće za istraživanje mora

ICP-OES – eng. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscop – Indukovani kuplovani plazma-optički emisioni spektrometar

IEA – eng. Integrated Ecosystem Assesment – Razvijena integrisana procjena ekosistema

JGOFS – eng. Protocols for the joint global ocean flux study core measurements

LFOP – eng. photoplethysmograph – fotopletizmograf

LPO – eng. lipid peroxidation – lipidna peroksidacija

MDA – eng. malondialdehyde – malondialdehid

MDK – Maksimalna dozvoljena koncentracija

MoA – eng. Mode of Action – mehanizam toksičnog dejstva

MPhT – eng. monophenyltin – monofeniltin

MT – eng. metallothionein – metalotionenin

MTB – eng. monobutyltin – monobutiltin

NEO – eng. neosaxitoxin – neosaksitoksin

HPLC – eng. High Performance Liquid Chromatograph – tečni hromatograf visokih performansi

HR – eng. heart rate – srčani ritam

HRm – eng. mean value of heart rate – srednja vrijednost broja otkucaja srca

PAHs – eng. polycyclic aromatic hydrocarbons – policiklični aromatični ugljovodonici

PC – eng. personal computer – računar

PCA – eng. Principal Components Analysis – Analiza glavnih komponenti

PCBs – eng. polychlorinated bifenylenes – polihlorovani bifenili

POPs – eng. persistent organic pollutants – perzistentni organski polutanti

ROS – eng. reactive oxygen species – produkcija reaktivnih vrsta kiseonika

SAD – Sjedinjene Američke Države

SD – eng. standard deviation – standardna devijacija

SI – eng. stress index – stres indeks

SOD – eng. superoxid dismutase – superoksid dismutaza

SoS – eng. stress on stress – preživljavanje na vazduhu

SRCES RAS – eng. Scientific Research Center for Ecological Safety, RAS – Naučni istraživački centar za ekološku bezbjednost

STX – eng. saxitoxin – saksitoksin

T_{rec} – eng. heart rate recovery time – vrijeme oporavka srčanog ritma

TBARS – eng. thiobarbituric acid reactive substances – tiobarbiturinska kiselina

TBT – eng. tributyltin – tributil derivati četvorovalentnog kalaja

TNT – eng. 2,4,6-trinitrotoluene – 2,4,6-trinitrotoluen

TPhT – eng. triphenyltin – trifeniltin

UDPGT – eng. UDP glucurontransferase – UDP glukuronoziltransferaza

UNEP – eng. United Nations Environmental Program – Program za životnu sredinu
Ujedinjenih Nacija

UPS – eng. Uninterruptible Power Supply – neprekidno napajanje

VG – eng. valve gape – otvorenost ljuštura

VP – eng. Variation pulsometry – Varijacijska pulsometrija

WFD – eng. Water Framework Directive – Okvirna direktiva o vodama

WHO – eng. World Health Organisation – Svjetska zdravstvena organizacija

WOE – eng. Weight of Evidence

1. UVOD

Intenzivna urbanizacija i industrijalizacija dovode do promjena prirodne ravnoteže u svim, pa i u vodenim ekosistemima. Zbog toga se velika pažnja mora posvetiti praćenju stanja i promjena ekosistema kako bi se negativne posljedice čovjekovog djelovanja maksimalno ublažile.

Akvatični ekosistemi su konstantno izloženi multistres uslovima, jer na njih simultano djeluju različiti tipovi pritiska, od globalnih promjena preko hidro-morfoloških izmjena vodenih tijela do zagađenja porijeklom iz koncentrisanih i rasutih izvora. Zagađenje akvatičnih ekosistema je u konstantnom porastu na svjetskom nivou, što iziskuje uvođenje kontrolnih strategija i stalan monitoring ksenobiotika (Faggio i sar., 2018).

Efikasnost upravljačkih mjera u cilju zaštite ili unapređenja statusa akvatičnih ekosistema zavisi u velikoj mjeri od pouzdane procjene rizika i precizne identifikacije ključnih pritiska, što u multistres uslovima nije jednostavno. U ovakvim uslovima, zagađenje dodatno ugrožava ekosistemski integritet, ali i ekosistemске usluge što može da dovede i do značajnih ekosistemskih troškova koji u velikoj mjeri zavise od brzine donošenja upravljačkih odluka i preduzetih mjera za otklanjanje zagađenja i posljedica na nivou ekosistema (Altenburger i sar., 2015). Iskustva u svijetu pokazuju da bilo kakvo odlaganje pravovremenog djelovanja u cilju spriječavanja zagađenja, drastično povećava uticaj na životnu sredinu, ali i direktne troškove zbog gubitka ekosistemskih usluga kao i sanacije (Brack i sar., 2015). Iz tog razloga je unapređenje metoda i alata za rano upozorenje na havarijska i akcidentna zagađenja od velikog značaja (Bae i Park, 2014).

Regulatorno uslovljeni monitoring programi, posebno operativni, nadzorni i istražni monitoring prema odredbama Okvirne direktive o vodama (WFD, 2000/60/EC) imaju za cilj procjenu hemijskog i ekološkog statusa/potencijala vodenih tijela, uključujući i vode obalnog mora, retrospektivnu procjenu rizika i procjenu uspješnosti mjera za očuvanje/dostizanje dobrog statusa voda. Međutim, dugogodišnja iskustva pokazuju da ocjene statusa na osnovu ova dva ključna kriterijuma nijesu saglasne, pa je teško ustanoviti jasne uzročno – posledične veze između zagađenja hazardnim supstancama i promjena na nivou akvatičnih životnih zajednica. Učestalost uzorkovanja i analiza je takva da ovi programi ne mogu pružiti blagovremene informacije o iznenadnom, havarijskom ili akcidentnom zagađenju, a posebno

ne daju informacije o negativnim biološkim efektima koji mogu biti posledica ovakvih situacija. Jedna od mogućnosti za prevazilaženje ovog problema je primjena bioanalitičkih metoda i biomarkera – biomonitoring, kao spona između hemijskog i ekološkog monitoringa (Altenburger i sar., 2019; Brack i sar., 2019).

Biomarkeri kao rani pokazatelji prisustva i/ili efekta hemijskog stresa mogu u realnom vremenu ukazati na akcidentne situacije, doprinijeti u identifikaciji prioritarnih lokacija i pokazati izloženost biote određenim klasama ksenobiotika ili njihovim smjesama u životnoj sredini, sa efektima uočenim na višim nivoima biološke organizacije. Kontinuirani biomonitoring u realnom vremenu može spriječiti nekontrolisano ispuštanje nedovoljno prečišćenih efluenta u vodoprijemnike čime se štiti integritet prirodnih ekosistema, zdravlje ljudi i životinja, kao i privredno važni resursi (akvakultura, poljoprivreda, turizam, itd.). U mnogim studijama je pokazano da su fiziološki biomarkeri/odgovori poput srčanog ritma i stepena otvorenosti/zatvorenosti ljuštura dobri biomarkeri zagađenja (Kuznetsova i Kholodkevich, 2015).

Kao česte vrste koje se koriste u biomonitoringu morskih ekosistema se izdvajaju školjke iz roda *Mytilus*, mediteranska dagnja – *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 i plava dagnja – *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 (Dailianis, 2011; Capillo i sar., 2018). Dagnje su filtracioni organizmi koji zauzimaju važnu kariku u lancu ishrane. Sésilne su vrste, uzgajaju se širom svijeta i koriste u ljudskoj ishrani. Takođe, imaju sposobnost akumulacije ksenobiotika u svojim tkivima u većim koncentracijama u odnosu na koncentracije u spoljašnjoj sredini (Torre i sar., 2013), što ih zajedno sa prethodnim osobinama svrstava u jako dobre bioindikatore stanja morskog ekosistema (Torre i sar., 2013; Savorelli i sar., 2017).

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je optimizacija sistema za biomonitoring zasnovanog na fiziološkim biomarkerima kod mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) sa ciljem moguće implementacije u kontinuiranim monitoring programima u realnom vremenu, kao i u periodičnom monitoringu stanja životne sredine, primarno morskog ekosistema.

U Crnoj Gori se do sada sprovodio isključivo ekološki monitoring morskog ekosistema koji je bio baziran na fizičko-hemijskim parametrima (osnovni parametri kvaliteta vode i specifični ksenobiotici) i biološkim elementima kvalitetata (struktura i sastav tipičnih životnih

zajednica). Monitoring fizioloških biomarkera bi predstavljao vezu između hemijskog i biološkog monitoringa i omogućio bi potpuniji i stalni (svakodnevni) uvid u stanje kvaliteta morskog ekosistema, posebno stepena hemijskog stresa. Jasna je stoga potreba za dodatnim kompleksnijim istraživanjima i to ne samo iz istraživačkog interesa, već i u funkciji regulative i potencijalnih promjena u programskim rješenjima. Da bi se implementirao neki oblik biomonitoringa zasnovanog na praćenju fizioloških biomarkera *in situ/ex situ* neophodno je testirati cijeli sistem i procijeniti njegovu pouzdanost, primjenjivost i robusnost u odnosu na prirodna variranja ekoloških faktora. Najrelevantniji biomonitoring se sprovodi primjenom autohtonih vrsta. Zato je posebno važno detaljno proučiti odabrani bioindikatorski organizam, što je u ovom slučaju mediteranska dagnja. Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj disertaciji mogle bi se dati preporuke o primjeni mediteranske dagnje u biomonitoring sistemima koji su bazirani na praćenju fizioloških biomarkera.

2. PREGLED LITERATURE

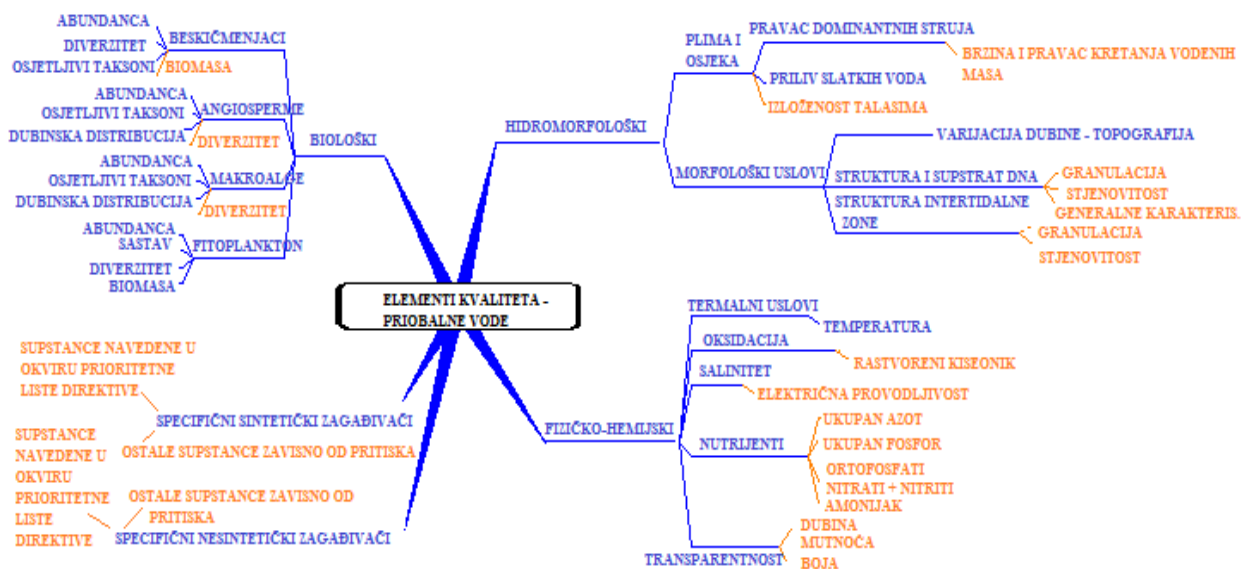
2.1. Monitoring

Termin monitoring podrazumijeva praćenje stanja životne sredine u cilju njenog očuvanja i spriječavanja štetnih efekata ksenobiotika na cjelokupni živi svijet. Prema definiciji UNEP-a monitoring predstavlja svako ponovljeno mjerenje, sa definisanom svrhom, jednog ili više hemijskih i/ili bioloških parametara prema unaprijed određenom rasporedu u prostoru i vremenu, koristeći metode koje su uporedive i standardizovane (Despotović, 2013). Danas se u Evropi sprovodi monitoring prema Okvirnoj direktivi o vodama (WFD, 2000/60/EC), a to znači nadzorni, operativni i istraživački monitoring sa ciljem utvrđivanja hemijskog i ekološkog statusa. Ciljevi nadzornog monitoringa površinskih voda su dobijanje informacija vezanih za: dopunjavanje i validiranje procedure procjene uticaja u skladu sa Aneksom II, efikasnu i efektivnu izradu budućih programa monitoringa, procjenu dugoročnih promjena prirodnih uslova i procjenu dugoročnih promjena kao posledicu rasprostranjenih antropogenih aktivnosti. Ciljevi operativnog monitoringa površinskih voda su: ustanoviti status onih tijela koja su identifikovana kao rizična u smislu nemogućnosti ispunjenja zadatih okolišnih ciljeva i procjeniti svaku promjenu statusa ovih tijela kao rezultat programa mjera. Istraživački monitoring se može zahtijevati u sledećim specijalnim slučajevima: kada je razlog bilo koje vrste prekoračenja (okolišnih ciljeva) nepoznat, kada nadzorni monitoring pokazuje da ciljevi zadati Članom 4 za vodna tijela vjerovatno neće biti postignuti a operativni monitoring još uvijek nije ustanovljen, u cilju utvrđivanja razloga zbog kojih vodno tijelo ili vodna tijela ne ispunjavaju okolišne ciljeve i da bi se utvrdila veličina i uticaji slučajnih/incidentnih zagađenja (Office for Official Publications of the European Communities, 2003a).

Okvirnom direktivom o vodama je uspostavljen novi pristup u politici voda, okvir za upravljanje kopnenim površinskim vodama, podzemnim vodama, prelaznim i obalnim vodama u cilju spriječavanja i smanjenja zagađivanja, promovisanja održivog korišćenja voda, zaštite vodenih ekosistema, unapređenja stanja akvatičnih ekosistema i rješavanja problema nastalih usled poplava i suša. Okvirna direktiva o vodama pokriva oblasti svih postojećih direktiva i daje cjelovit okvir "kišobran" za integralno upravljanje vodama.

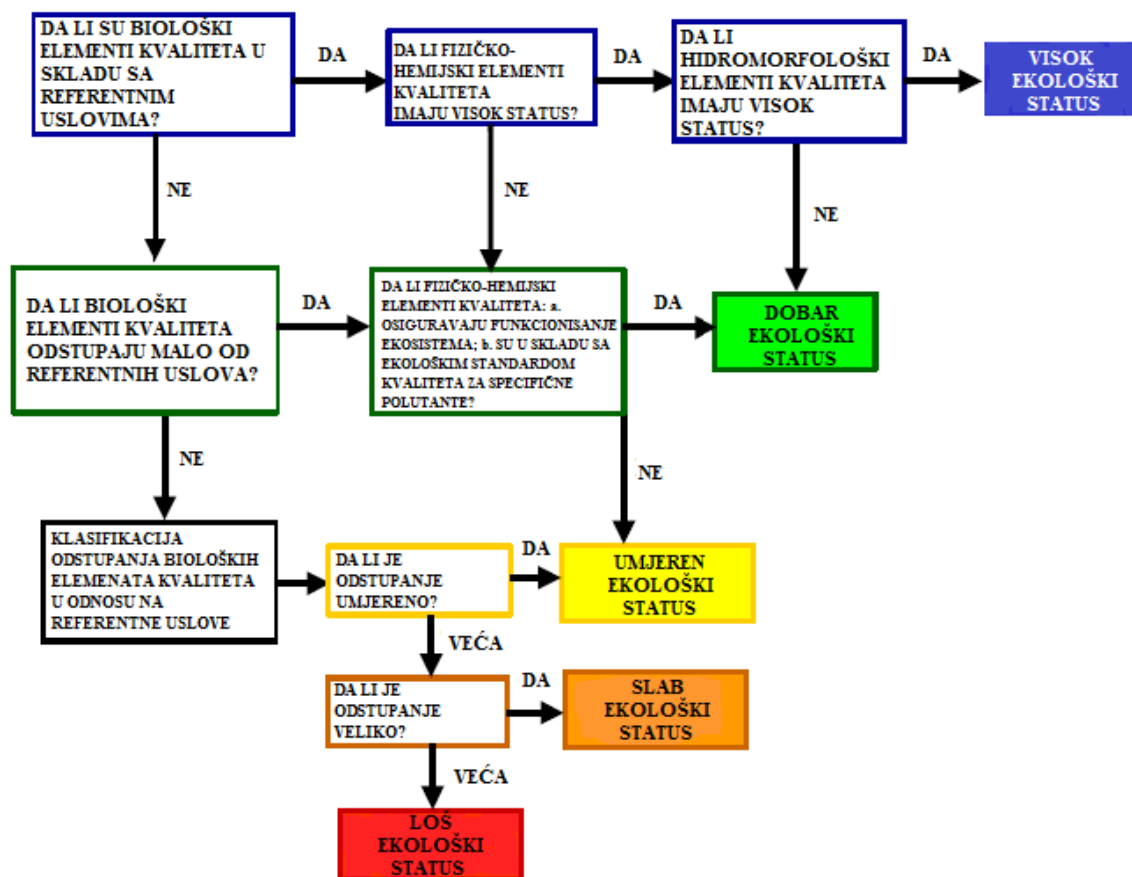
Elementi kvaliteta za priobalne vode prema Okvirnoj direktivi su: biološki, hidromorfološki, fizičko-hemijski, posebni sintetički zagađivači i posebni nesintetički

zagađivači (Slika 2.1). U biološke elemente kvaliteta spadaju: monitoring beskičmenjaka (diverzitet, biomasa, osjetljive taksonomske grupe); angiosperma (diverzitet, abundanca, osjetljive taksonomske grupe, distribucija u zavisnosti od dubine); makroalgi (diverzitet, abundanca, osjetljive taksonomske grupe, distribucija u zavisnosti od dubine) i fitoplanktona (diverzitet, biomasa, sastav zajednica). U hidromorfološke elemente kvaliteta spadaju: režim plime i osjeke; pravac dominantnih struja; priliv slatke vode, izloženost talasima, kretanje vodene mase (vjetar), topografija, struktura i supstrat dna, struktura međuplimne zone. U fizičko-hemijske elemente kvaliteta spadaju: temperatura, salinitet, rastvorenost kiseonika, nutrijenti, transparentnost. U posebne sintetičke i nesintetičke zagađivače spadaju sve supstance koje se nalaze kao prioritetne u okviru ove Direktive.



Slika 2.1. Selekcija elemenata kvaliteta za priobalne vode (Preuzeto iz: Office for Official Publications of the European Communities, 2003a)

Svaki od navedenih elemenata kvaliteta određuje konačni ekološki status voda. Na slici 2.2 je dat šematski prikaz veze između elemenata kvaliteta i klasifikacije ekološkog statusa za sve kategorije vodenih tijela.



Slika 2.2. Veza između bioloških, fizičko-hemijskih i hidromorfoloških elemenata kvaliteta u klasifikaciji ekološkog statusa vodenih tijela (Preuzeto iz: Office for Official Publications of the European Communities, 2003b)

2.2. Bioindikatori

Bioindikatori su organizmi koji su osjetljivi na promjene uslova spoljašnje sredine, tačnije svojim prisustvom, abundancom, fiziologijom i ponašanjem mogu ukazivati na postojanje stresora, odnosno ukazivati da je došlo do promjene nekog ekološkog faktora ili grupe ekoloških faktora datog staništa (Martin i Caughtrey, 1982; Gerhardt, 2002). Po Allaby (1992) vrsta indikator je ona koja ima usku amplitudu (variranja) u odnosu na jedan ili više ekoloških faktora. Bioindikatorske vrste su vrste koje prirodno naseljavaju ekosistem u okviru kojeg se vrši biomonitoring i razlikuju se od model vrsta koje se koriste u toksikološkim testovima i istraživanjima (Nikinmaa, 2014). Idealni bioindikatori bi trebali da zadovolje sledeće kriterijume (cit. Bošković, 2018):

- da su široko rasprostranjeni, jednostavni za uzorkovanje, da imaju dug životni vijek, veliku abundancu ili veličinu tijela, da su laki za laboratorijsko gajenje (Zhou i sar., 2008);
- da direktno ukazuju na uzrok promjene u ekosistemu, a ne samo na njeno postojanje (Herricks i Schaeffer, 1985);
- da obezbjeđuju kontinuiranu procjenu stresova širokog opsega i različitog inteziteta (Noss, 1990; Woodley, 1993; Gibbs i sar., 1999);
- da su ekonomični i isplativi, praktični, kao i da mjerenja mogu lako i precizno da izvrše sve osobe koje su uključene u monitoring (Kriesel, 1984; Davis, 1989; di Castri i sar., 1992).

Vrste roda *Mytilus* su se kao bioindikatori morskog ekosistema počele intenzivno koristiti od 1975. godine kada je u SAD započeo program pod nazivom “*Mussel Watch*” (Goldberg, 1975; Goldberg i sar., 1978). Vrste roda *Mytilus* se danas širom svijeta koriste u biomonitoringu morskog ekosistema, a mediteranska i plava dagnja su dominantne vrste (Bakhmet i sar., 2012; 2019; Mitrić i sar., 2012; Martinović i sar., 2016; Balbi i sar., 2017; Redmond i sar., 2017).

Biološka svojstva dagnji su ih nametnula kao izvrsne indikatorske organizme u praćenju stanja morskog ekosistema (Gosling, 1992 – cit. Ravlić, 2014):

- Geografski široko rasprostranjenje i dominantnost u obalnim zajednicama utiču na to da se ne javljaju problemi u prikupljanju uzoraka i upoređivanju podataka različitih istraživanja;
- Dagnje su sedentarni organizmi, zbog čega su kao integrator hemijskog zagađenja u datoj sredini bolji izbor od pokretnih vrsta;
- Dagnje su relativno otporne na široki raspon spoljašnjih uslova/faktora, uključujući umjereno povećane nivoa mnogih ksenobiotika;
- Zbog načina ishrane, kontinuiranog filtriranja morske vode, u tkivima dagnji se akumuliraju ksenobiotici iz morske vode;
- Mjerenje koncentracije ksenobiotika u tkivima dagnji omogućuje procjenu biološke dostupnosti, što nije moguće dobiti iz mjerenja koncentracije ksenobiotika samo u vodi i/ili sedimentu;
- U poređenju sa ribama i rakovima enzimski sistemi odgovorni za metabolizam ksenobiotika kod dagnji se odlikuju niskim nivoom aktivnosti. Stoga, koncentracija ksenobiotika u tkivima dagnji preciznije pokazuje opseg zagađenja morskog ekosistema;
- Populacije dagnji su relativno stabilne, čime se osigurava prikupljanje podataka za studije kratkoročnih i dugoročnih promjena nivoa zagađenja;
- Dagnje se lako mogu prenijeti i održavati u kavezima, ili u zoni plime i osjeke, ili na određenoj dubini (pričvršćene na sidrišta) gdje zbog manjka supstrata za pričvršćivanje, populacije dagnji nijesu u mogućnosti prirodno rasti;
- Dagnje imaju komercijalnu važnost (kao visoko-kvalitetna hrana) pa je mjerenje hemijskog zagađenja od velikog interesa za ljudske populacije.

2.3. Biomarkeri

Biomarker u najširem smislu predstavlja svako mjerenje koje reflektuje interakciju između biološkog sistema i potencijalne opasnosti, koja može biti hemijskog, fizičkog ili biološkog tipa (WHO, 1993 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2015). Prema definiciji Peakall-a (1994 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2015) biomarker je svaka promjena u biološkom odgovoru (od molekularnog, preko ćelijskog i fiziološkog, do promjena u ponašanju), koja

može biti povezana sa izloženošću hemikalijama prisutnim u sredini ili njihovim toksičnim efektom. Biomarkeri se mogu podijeliti u tri grupe (WHO, 1993 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2015):

- **Biomarkeri izlaganja** obuhvataju detektovanje egzogene supstance ili njenih metabolita ili produkata nastalih u interakciji ksenobiotika sa ciljnim molekulom i ćelijom unutar organizma. Biomarkeri izloženosti mogu da se koriste za potvrdu ili procjenu izloženosti jedinke ili populacije određenoj supstanci, obezbjeđujući vezu između spoljašnje izloženosti i unutrašnjeg mjerenja. Bioakumulacija određenih ksenobiotika u životinjskim tkivima spada u biomarkere izloženosti.
- **Biomarkeri efekta** uključuju mjerenje biohemijskih, fizioloških ili drugih promjena unutar tkiva ili tjelesnih tečnosti koje se mogu povezati sa mogućim ili postojećim bolestima ili narušenim zdravljem. Biomarkeri efekta imaju upotrebu u potvrđivanju prekliničkih promjena ili različitih efekata na zdravlje na osnovu izloženosti i apsorpcije hemijskih supstanci.
- **Biomarkeri osjetljivosti** ukazuju na urođene ili stečene sposobnosti organizma da odgovori na izloženost specifičnim ksenobioticima, uključujući genetičke faktore i promjene u receptorima koji mijenjaju osjetljivost organizma na tu izloženost. Biomarkeri osjetljivosti pomažu u rasvijetljavanju variranja stepena odgovora na izloženost zagađivačima kod različitih jedinki.

Ključna funkcija biomarkera je da obezbijede rani upozoravajući signal značajnih bioloških efekata u vidu odgovora, koji se prvo dešava na subćelijskom nivou (molekularnom, biohemijskom i fiziološkom), nakon čega slijede promjene na višim nivoima biološke organizacije (Lam, 2009). Prema Viarengo i sar. (2007) set biomarkera čija analiza bi pružila potpune informacije o efektima hemijskog stresa na različitim nivoima i na osnovu kojih bi se rangirao stepen odgovora organizma na hemijski stres obuhvata:

- biomarkere koji su osjetljivi na stres na molekularnom i ćelijskom nivou (da mogu brzo da se aktiviraju i da daju rane upozoravajuće signale efekata ksenobiotika);

- biomarkere koji procjenjuju nivo oštećenja na nivou tkiva, a koje je nastalo dejstvom ksenobiotika;
- biomarkere koji procjenjuju efekte ksenobiotika na nivou organizma, dajući podatke o potencijalnom kapacitetu preživljavanja, kao i reproduktivnoj sposobnosti. Ovi biomarkeri su esencijalni za procjenjivanje efekta ksenobiotika na pojedinačne jedinke, kao i moguće promjene na nivou populacije.

U biomonitoring studijama u kojima se kao model organizmi koriste ribe, predloženi su biomarkeri koji imaju najveći značaj za dobijanje podataka o kvalitetu životne sredine (van der Oost i sar., 2003). Tu spadaju: enzimi biotransformacije ksenobiotika, produkti biotransformacije ksenobiotika, parametri oksidativnog stresa, proteini stresa, hematotoksični parametri, imunološki parametri, reproduktivni i endokrinološki parametri, neurotoksični parametri, genotoksikološki parametri, fiziološki i morfološki parametri.

Većina ovih biomarkera se može analizirati i u tkivima mekušaca i koristiti u procjeni kvaliteta životne sredine što je pokazano u brojnim studijama (Wilbrink i sar., 1991; Grundy i sar., 1996; Dauberschmidt i sar., 1997; Goldberg i Bertine, 2000; Dyrinda i sar., 2000; Hoarau i sar., 2006; Park i sar., 2009; Despotović, 2013; Agata i sar., 2014; Turja i sar., 2014; Faria i sar., 2014; Martinović i sar., 2015; 2016; Vidal-Liñán i sar., 2016; Beyer i sar., 2017; Faggio i sar., 2018; Perić i Burić, 2019).

Školjke, primarno dagnje iz roda *Mytilus* se danas intenzivno koriste u biomonitoring studijama kako bi se ispitaio uticaj različitih organskih i neorganskih ksenobiotika. Dailianis (2011) daje pregled najznačajnijih biomarkera kod vrsta roda *Mytilus* koji se koriste u biomonitoring studijama za procjenu stanja morskog ekosistema: stabilnost membrane lizozoma, akumulacija neutralnih lipida u lizozomima, katalaza (eng. catalase – CAT), superoksid dismutaza (eng. superoxide dismutase – SOD), glutation S-transferaza, (eng. glutathione S-transferase – GST), proliferacija peroksizoma, acetilholinesteraza (eng. acetylcholinesterase – AChE), metalotionein, oštećenje DNK. Međutim, mora se naglasiti da se u poslednjih desetak godina upotrebljava i sve veći broj drugih biomarkera poput: CYP enzima (Zhang J. i sar., 2019), stres proteina (eng. heat shock proteins – HSP) (Xu K. i sar., 2018), aminolevulinske kisele dehidrataze (eng. aminolevulinic acid dehydratase – ALAD)

(Company i sar., 2011), otvorenost ljuštura (eng. valve gape – VG) (Comeau i sar., 2018) i srčani ritam (eng. heart rate – HR) (Hagger i sar., 2010; Martinović i sar., 2016; Turja i sar., 2014). Škrge, digestivna žlijezda i hemolimfa su prepoznati kao idealna tkiva/organi za analizu različitih biomarkera kod dagnji iz razloga što su u stalnom kontaktu sa vodenim medijumom i “centri” su svih metaboličkih procesa koji se odvijaju u organizmu. Pregled biomarkera kod vrsta roda *Mytilus* koji se koriste u biomonitoringu morskog ekosistema su dati u tabeli 2.1.

Među najčešće praćenim biomarkerima kod dagnji se izdvajaju enzimi antioksidativne zaštite: SOD, CAT, glutation peroksidaza (eng. glutathione peroxidase – GPx), lipidna peroksidacija (eng. lipid peroxidation – LPO). Osnovna uloga ovih enzima je odbrana organizma od reaktivnih vrsta kiseonika koje nastaju usled izloženosti ksenobioticima poput teških metala, mikroplastike, nafte, pesticida, policikličnih aromatičnih ugljovodonika (eng. polycyclic aromatic hydrocarbons – PAHs) (Beyer i sar., 2017; Counihan, 2018; Revel i sar., 2019). Analiza navedenih biomarkera se uglavnom radi u digestivnoj žlijezdi i škragama dagnji (Katalay i sar., 2016; Faggio i sar., 2018).

Biomarkeri genotoksičnosti, kao što su kidanje lanca DNK i frekvencija mikronukleusa se koriste za praćenje promjena na genetskom materijalu usled djelovanja ksenobiotika. Detekcija kidanja lanca DNK se vrši komet testom na gel elektroforezi i bazira se na sposobnosti odvojenih – otkinutih djelova lanca DNK da se kreću ka anodi – suprotno od negativno naelektrisanog ostatka molekula DNK, što izgleda kao kometa koja ima glavu i rep, na osnovu čega i sam test nosi naziv “*comet assay*”. Mikronukleusi se detektuju mikronukleusnim testom koji je baziran na učestalosti mikronukleusa. Mikronukleusi su hromozomske strukture koje nastaju usled oštećenja i “lomova” hromozoma ili hromozoma zaostalih u anafazi ćelijske deobe i kao takvi se koriste kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija hromozoma u ćelijama (Brozović, 2007). Kod vrsta roda *Mytilus* upotreba biomarkera genotoksičnosti je našla široku primjenu u monitoringu akvatičnih ekosistema (Agata i sar., 2014; Avio i sar., 2015; Martinović i sar., 2015; 2016; Capoluopo i sar., 2016; Revel i sar., 2019). Među glavnim ksenobioticima koji uzrokuju genotoksične promjene se izdvajaju: benzo[a]piren (eng. benzo[a]pirene – B[a]P), tributil derivati četvorovalentnog kalaja (eng. tributyltin – TBT), PAHs, teški metali, nafta (Daillianis, 2011;

Agata i sar., 2014; Martinović i sar., 2015; 2016). Biomarkeri genotoksičnosti se uglavnom testiraju u hemocitama i škragama dagnji.

Integritet lizozoma je takođe jedan od ključnih biomarkera kod vrsta roda *Mytilus* (Hagger i sar., 2010; Agata i sar., 2014; Matozzo i sar., 2018). Integritet lizozoma spada u grupu biomarkera koji se koriste za procjenu citotoksičnih/proliferativnih efekata ksenobiotika (Teodorović i Kaišarević, 2015). U ranijim studijama je ovaj biomarker praćen u ćelijama digestivne žlijezde kod dagnji, međutim u novijim istraživanjima se koriste isključivo hemocite dagnji zbog lakšeg uzorkovanja i lakše metodologije (upotreba neutralcrveno testa) (Beyer i sar., 2017). Neutralcrveno test se zasniva na sposobnosti vijabilnih ćelija da usvoje boju neutralcrveno u lizosome (Teodorović i Kaišarević, 2015). Prema Daillianis (2011) i Martinović i sar. (2015; 2016) teški metali, azbest, PAHs, TBT, nafta i polihlorovani bifenili (eng. polychlorinated biphenyls – PCBs) su ksenobiotici koji utiču na destabilizaciju lizozoma.

Enzimi biotransformacije ksenobiotika su takođe grupa biomarkera koji nalaze široku primjenu u monitoring studijama u kojima su uključene vrste roda *Mytilus*. Kao što sam naziv govori, radi se o enzimima koji učestvuju u metabolizmu i detoksifikaciji ksenobiotika – biotransformacija, a analize obuhvataju praćenje enzimske aktivnosti i genske ekspresije (Teodorović i Kaišarević, 2015). Biotransformacija podrazumijeva prevođenje ksenobiotika u polarne metabolite koji su manje toksični i kao takvi se lakše izbacuju iz organizma. Metabolizam ksenobiotika se sastoji iz dvije faze, faza I i faza II, koje se razlikuju po tipovima reakcija i enzimima kojima su katalizovane (Teodorović i Kaišarević, 2015). Kada su u pitanju vrste roda *Mytilus*, najčešći biomarkeri iz ove grupe koji se koriste u monitorinzima su: CYP enzimi i GST (Attig i sar., 2014; Agata i sar., 2014; Balbi i sar., 2017; Counihan, 2018; Perić i Burić, 2019; Revel i sar., 2019). Genska ekspresija kao proces sinteze funkcionalnog produkta – proteina na osnovu genske informacije je takođe u zadnjim godinama našla široku primjenu u biomonitoring studijama i koristi se kao adekvatan biomarker uticaja ksenobiotika. Tako se npr. p53 porodica gena nameće kao dobar kandidat za korišćenje u biomonitoringu, pa su brojna istraživanja strukture i funkcije ove porodice gena kod različitih vrsta mekušaca pokrenuta upravo sa ciljem razvoja gena porodice p53 kao biomarkera (Baričević, 2015). Banni i sar. (2009) su u različitim tkivima kod mediteranske dagnje posmatrali uticaj subletalne doze karcinogena B[a]P i nakon 24 h izloženosti dozi od 75nM uočena je povećana

ekspresija p53 gena u probavnoj žlijezdi i značajno smanjenje ekspresije u hemocitima, dok u škrgama, plaštu i mišiću promjene nijesu uočene. Zhang J. i sar. (2019) su kod vrste *Mytilus trossulus* identifikovali dva nova CYP3A gena – McCYP3A-1 i McCYP3A-2. Rezultati studije navedenih autora ukazuju da je povećana ekspresija ova dva gena rezultat dejstva ksenobiotika kao što su PAHs i teški metali.

Fiziološki biomarkeri su biomarkeri na višim nivoima odgovora i najčešće su indikatori ireverzibilnih promjena (Teodorović i Kaišarević, 2015). Najčešći biomarkeri iz ove grupe koji se prate kod vrsta roda *Mytilus* su: kondicioni indeks, VG, HR, rast, preživljavanje na vazduhu (eng. stress on stress – SoS) i produkcija bisusnih niti (Hagger i sar., 2010; Ayad i sar., 2011; Strogyloudi i sar., 2012; Bakhmet i sar., 2012; 2019; Martinović i sar., 2013a; 2013b; Balbi i sar., 2017; Redmond i sar., 2017; Lehtonen i sar., 2019). Ovi biomarkeri se koriste za praćenje efekta stresa i promjena koje nastaju kako usled uticaja različitih ksenobiotika, tako i usled promjena ekoloških parametara (Krishnakumar i sar., 2018). Kondicioni indeks je važan parametar koji ukazuje na nutritivni kvalitet školjki (Župan i Šarić, 2014). Veliki je broj “formula” koje se koriste za preračunavanje kondicionog indeksa, koje uključuju različite parametre – suva masa tkiva, mokra masa tkiva, ukupna masa, dužina ljuštore (Irisarri i sar., 2014; Župan i sar., 2014; Gvozdrenović i sar., 2017). Kondicioni indeks je biomarker čija je sezonska fluktuacija kod dagnji pod velikim uticajem fizičko-hemijskih i bioloških parametara vode (Gosling, 1992), a takođe se može mijenjati i zavisno od prisustva i uticaja ksenobiotika. Mitrić i sar. (2012) za oblast Bokokotorskog zaliva navode niže vrijednosti kondicionog indeksa kod vrste *M. galloprovincialis* sa zagađenih lokaliteta. Takođe, Turja i sar. (2014) kod vrste *M. trossulus* u oblasti Baltičkog mora navode niže vrijednosti kondicionog indeksa kod jedinki sa zagađenih lokaliteta. SoS se smatra jednim od najbitnijih biomarkera koji se prate na nivou cijelog organizma (Viarengo i sar., 2007). Ovaj biomarker je usvojen kao biomarker opšteg stresa od strane UNEP/RAMOGGE (1999). Generalno ovaj biomarker ima trend smanjenja – smanjeno vrijeme preživljavanja na vazduhu usled prisustva većeg stresa (Dagnino i sar., 2007; Viarengo i sar., 2007). Balbi i sar. (2017) ukazuju na sezonske promjene u vremenu preživljavanja na vazduhu kod vrste *M. galloprovincialis* i navode kraće vrijeme preživljavanja na vazduhu tokom zime u poređenju sa ljetnjim periodom. Ove rezultate autori dovode u vezu sa mrijestom koji se javlja tokom

hladnijeg perioda godine i sniženim vrijednostima kondicionog indeksa, što utiče da jedinke budu slabe i pod stresom i da im je vrijeme preživljavanja na vazduhu kraće. Otvorenost ljuštura (VG) je fiziološki biomarker školjki koji pokazuje određeni ritam u zavisnosti od fizičko-hemijskih i bioloških parametara vode. Vrijeme trajanja otvorenosti ljuštura, kao i vrijeme tokom kojeg su ljuštura zatvorene mogu biti pokazatelji prisustva ksenobiotika. U normalnim uslovima, dagnje otvaraju svoje ljuštura da bi filtrirale vodu i uzimale kiseonik. U takvim uslovima dagnje drže ljuštura maksimalno otvorene sa periodima kratkih zatvaranja – adukcije (Kramer i Foekema, 2001). Ukoliko većina ispitivanih jedinki zatvori ljuštura na duže od 5 minuta, to je znak upozorenja – alarma da je kvalitet vode promijenjen (Kramer i Foekema, 2001; Gnyubkin, 2009). Poznato je da je otvorenost ljuštura u pozitivnoj korelaciji sa stepenom filtracije, pa samim tim usled uticaja ksenobiotika kada jedinke zatvaraju ljuštura dolazi i do smanjenja stepena filtracije (Newton i Cope, 2006). Redmond i sar. (2017) su kod vrste *M. edulis* uočili zatvaranje ljuštura pri velikim koncentracijama nafte i ukazuju da je VG kod *M. edulis* koristan biomarker izlaganja nafte. Srčani ritam (HR) se intenzivno koristi u biomonitoring studijama kao fiziološki biomarker efekta ksenobiotika. Bakhmet i sar. (2012) ukazuju na veliku osjetljivost HR kod vrste *M. edulis* usled uticaja kadmijuma i bakra. Na osnovu rezultata *in situ* biomonitoringa, ukazano je na činjenicu da je HR kod vrste *M. edulis* dobar biomarker fluktuacije fizičko-hemijskih i bioloških parametara vode (Bakhmet i sar., 2019).

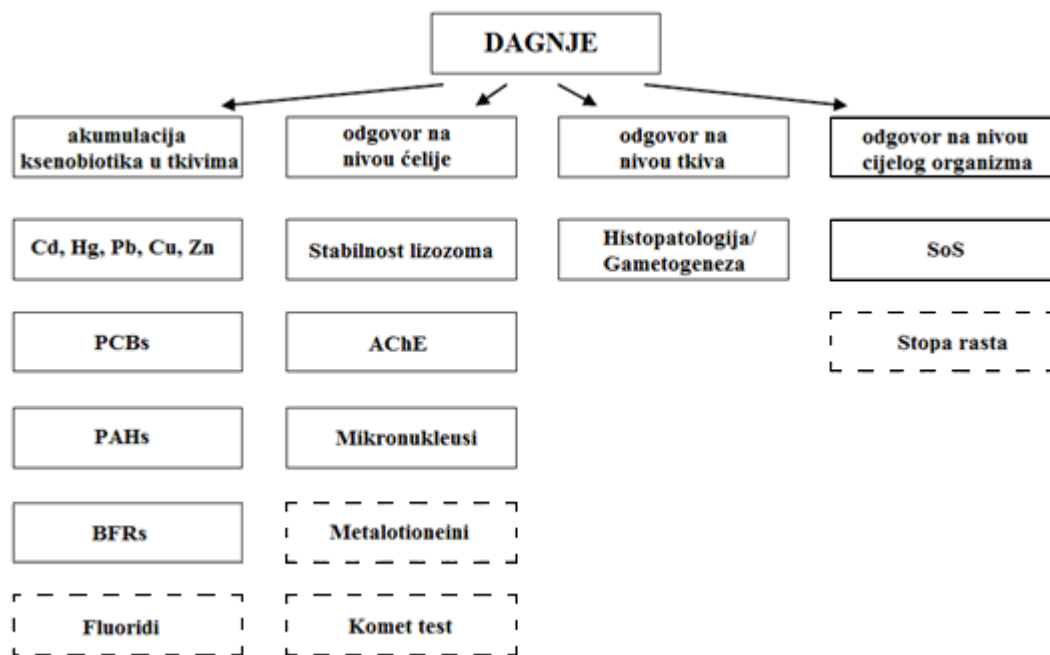
Tabela 2.1. Pregled najčešće korišćenih biomarkera kod vrsta roda *Mytilus*

Biomarkeri	Referenca
Aktivnost enzima koji učestvuju u biotransformaciji ksenobiotika CYP enzimi, GST, UDP glukuronoziltransferaza (eng. UDP glucurontransferase – UDPGT), Eritromicin N-demetilaza (eng. erythromycin N-demethylase – ERND), Ekspresija gena koji kodiraju enzime biotransformacije	Trisciani i sar., 2012; Agata i sar., 2014; Attig i sar., 2014; Turja i sar., 2014; Moschino i Da Ros, 2015; Rocha i sar., 2015; Mejdoub i sar., 2017; Ozkan i sar., 2016; Piscopo i sar., 2016; Vidal-Liñán i sar., 2016; Balbi i sar., 2017; Oliveira P. i sar., 2017; Counihan, 2018; Matozzo i sar., 2018; Lehtonen i sar., 2019; Perić i Burić, 2019; Revel i sar., 2019; Zhang J. i sar., 2019
Biomarkeri oksidativnog stresa CAT, SOD, GPx, LPO, Malondialdehid (eng. malondialdehyde – MDA), Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika (eng. reactive oxygen species – ROS)	Attig i sar., 2014; Turja i sar., 2014; Capolupo i sar., 2016; Mejdoub i sar., 2017; Ozkan i sar., 2016; Vidal-Liñán i sar., 2016; Oliveira P. i sar., 2017; Counihan, 2018; Matozzo i sar., 2018; Xu K. i sar., 2018; Lehtonen i sar., 2019; Perić i Burić, 2019; Revel i sar., 2019
Stres proteini HSP	Jones i sar., 2010; Counihan, 2018; Xu K. i sar., 2018
Metalotioneini	Calisi i sar., 2008; Stroglyoudi i sar., 2012; Attig i sar., 2014; Balbi i sar., 2017; Xu K. i sar., 2018; Perić i Burić, 2019

Tabela 2.1. Nastavak

Biomarkeri		Referenca
Biomarkeri neurotoksičnosti	AChE	Agata i sar., 2014; Attig i sar., 2014; Turja i sar., 2014; Moschino i Da Ros, 2015; Capolupo i sar., 2016; Ozkan i sar., 2016; Vidal-Liñán i sar., 2016; Matozzo i sar., 2018; Lehtonen i sar., 2019; Perić i Burić, 2019
Biomarkeri genotoksičnosti	Oštećenje DNK	Rađa i sar., 2012; Agata i sar., 2014; Turja i sar., 2014; Martinović i sar., 2015; 2016; Capolupo i sar., 2016; Ozkan i sar., 2016; Touahri i sar., 2016; Pearson i sar., 2018; Xu K. i sar., 2018; Revel i sar., 2019
Hematotoksični biomarkeri	ALAD	Company i sar., 2011
Fiziološki biomarkeri	VG, Produkcija bisusnih niti, SoS, HR, Kondicioni indeks, Stepen filtracije	Hagger i sar., 2010; Ayad i sar., 2011; Bakhmet i sar., 2012; 2019; Mitrić i sar., 2012; Stroglyoudi i sar., 2012; Turja i sar., 2014; Martinović i sar., 2013a; 2013b; 2015; 2016; Touahri i sar., 2016; Balbi i sar., 2017; Oliveira P. i sar., 2017; Redmond i sar., 2017; Comeau i sar., 2018; Lehtonen i sar., 2019
Biomarkeri citotoksičnih/proliferativnih ksenobiotika	efekata Stabilnost lizozoma, Fagocitoza, Vijabilnost hemocita, Morfoloģija, broj i proliferacija hemocita, Kaspaza, Ukupan nivo proteina	Calisi i sar., 2008; Hagger i sar., 2010; Agata i sar., 2014; Turja i sar., 2014; Höher i sar., 2015; Moschino i Da Ros, 2015; Rocha i sar., 2015; Martinović i sar., 2015; 2016; Capolupo i sar., 2016; Balbi i sar., 2017; Matozzo i sar., 2018
Reproduktivni i endokrini biomarkeri	Gametogeneza	Balbi i sar., 2017

U prirodnim populacijama dagnje su istovremeno izložene smješama (koktelima) velikog broja ksenobiotika različitih koncentracija, zbog čega je vrlo važno ustanoviti kakav je njihov odgovor u takvim multistres uslovima. Zbog toga je posljednjih godina od strane ICES (eng. International Council for the Exploration of the Sea) razvijena integrisana procjena ekosistema IEA (eng. Integrated Ecosystem Assessment) koja uključuje biološke odgovore kod dagnji na različitim nivoima organizacije, uključujući ćelijske odgovore, odgovore na nivou tkiva i odgovore na nivou cijelog organizma zajedno sa mjerenjem koncentracije ksenobiotika u tkivu (Slika 2.3) (Davies i Vethaak, 2012 – cit. Beyer i sar., 2017).



Slika 2.3. Integrisana procjena ekosistema na osnovu bioloških odgovora kod vrsta roda *Mytilus* na osnovu preporuka ICES. Pune linije predstavljaju osnovne metode, isprekidane linije predstavljaju dopunske metode; Polihlorovani bifenili (eng. Polychlorinated biphenyls – PCBs); Policiklični aromatični ugljovodonici (eng. Polycyclic aromatic hydrocarbons – PAHs); Organobromni usporivači gorenja (eng. Brominated Flame Retardants – BFRs) (Preuzeto iz: Beyer i sar., 2017)

Danas se koristi integralni multiparametarski pristup – WOE (eng. *weight of evidence*) koji kod vrsta roda *Mytilus* pored biomarkera na ćelijskom i molekularnom nivou podrazumijeva i monitoring hemijskih parametara ekosistema (vode i sedimenta), podatke

laboratorijskih bioloških testova na nivou organizma kao i procjenu biodostupnosti ksenobiotika (Beyer i sar., 2017).

S druge strane, smatra se da upotreba novih molekularnih alata, poput “omik” tehnologija i istraživanja, ima veliki potencijal za prepoznavanje novih biomarkera efekta i izloženosti bez prethodnog znanja konkretnih mehanizama toksičnosti (Gomes i sar., 2014). Krajnji cilj ovakvog pristupa jeste definisanje “omik potpisa” na svim nivoima od genomike do metabolomike, karakterističnih za određene ksenobiotike (Teodorović i Kaišarević, 2015). Molekularne tehnologije kao što su transkriptomika, proteomika i metabolomika su sve više u upotrebi u sve većem broju *in/ex situ* studija na vrstama roda *Mytilus* sa ciljem definisanja i identifikacije ksenobiotika i njihovog mehanizma toksičnog dejstva (engl. *mode of action* – MoA) (Veldhoen i sar., 2012; Tomanek, 2014; Beyer i sar., 2017; Oliveira F. i sar., 2020).

2.4. Mekušci u biomonitoring programima sa osvrtom na školjke

Mekušci se zbog niza osobina izdvajaju kao vrlo pogodna grupa organizama za biomonitoring slatkovodnih i morskih ekosistema: sesilan način života, široko rasprostranjenje, dug životni vijek, prisustvo ljušture, tolerantnost na akvarijumske uslove, osjetljivost na ksenobiotike i akumulacija ksenobiotika usled slabije sposobnosti njihovog metabolisanja (Marhán i sar., 1999; Curtis i sar., 2000; Kholodkevich i sar., 2009a; Bae i Park, 2014). Prvi program praćenja kvaliteta životne sredine uz upotrebu školjki kao indikatorskih vrsta “*Mussel Watch*” je započeo u SAD-u 1975. godine (Goldberg, 1975; Goldberg i sar., 1978). Tokom ovoga perioda, započeta su i druga regionalna istraživanja sezonske akumulacije ksenobiotika u tkivima morskih i slatkovodnih školjki (Anderson, 1977; Frazier, 1975; 1976). U Mediteranu su tokom 1976. godine sprovedene prve studije akumulacije dihlor-difenil-trihloretana (DDT) i polihlorovanih bifenila (PCB) (Marchand i sar., 1976). Nakon ovih inicijalnih istraživanja, školjke (posebno dagnje i ostrige) se počinju široko upotrebljavati kao bioindikatori nivoa zagađenja u morskom ekosistemu.

Školjke se u biomonitoringu koriste na različite načine. Klasičan pristup podrazumijeva mjerenje sadržaja akumuliranih ksenobiotika u tkivima jedinki iz nativnih populacija ili jedinki iz laboratorijskog uzgoja, eksponiranih na lokalitetima u gradijentu zagađenja tokom određenog perioda.

Jedan od bitnih preduslova za sprovođenje biomonitoringa jeste postojanje referalnih uslova/lokaliteta i/ili poznavanja bazalnog nivoa genske ekspresije/enzimske aktivnosti i sl. odabrane vrste u uslovima odsustva značajnih antropogenih pritisaka. Referalni nivoi su ne samo specifični za svaku vrstu, već su često i specifični za vodno tijelo/ekosistem. Prema Bakhmet i sar. (2009) biološki odgovori iz ove kategorije često predstavljaju adaptivni odgovor koji spriječava ispoljavanje stvarnih fizioloških i potencijalno ekoloških efekata uzrokovanih hemijskim stresom.

Takođe je neizostavno ukazati i na činjenicu da u biomonitoring studijama veliki broj drugih faktora ima uticaj na individualnu varijabilnost jedinki i pouzdanost bioloških odgovora poput: temperature (Braby i Somero, 2006), reproduktivnog ciklusa (Hagger i sar., 2010; Bakhmet i sar., 2019), dostupnosti hrane, starosti, uhranjenosti i ukupnog kondicionog statusa (Bakhmet, 2017; Bakhmet i sar., 2005; 2019), plime i osjeke (Bakhmet i Zdrovenov, 2010), epibionata (Khalaman i sar., 2017), parazita (Bakhmet i sar., 2017).

Ono što takođe treba napomenuti jeste da se biomonitoring studije u zavisnosti od perioda trajanja mogu podijeliti na kratkotrajna i dugotrajna izlaganja. Kod biomonitoringa koji se bazira na kratkotrajnom izlaganju jedinki na referentnom i lokalitetu od interesa, prate se odabrani biomarkeri i analizira sadržaj akumuliranih ksenobiotika sa ciljem njihovog međusobnog poređenja, kao što je prikazano u studiji od strane Agata i sar. (2014). Comeau i sar. (2018) takođe sprovode kratkotrajna izlaganja u trajanju od deset dana i prate promjene VG kod dagnji u zavisnosti od variranja ekoloških parametara vode, tačnije temperature, saliniteta, kiseonika i hlorofila *a*. Za razliku od kratkotrajnog, kod dugotrajnog kontinuiranog izlaganja se prate odabrani biomarkeri i/ili analizira sadržaj akumuliranih ksenobiotika u tkivima ispitivanih jedinki tokom dužeg vremenskog perioda (Balbi i sar., 2017). Kontinuirani biomonitoring se može razlikovati u zavisnosti od frekvencije, odnosno učestalosti mjerenja ispitivanih biomarkera. Ovaj vid biomonitoringa se najčešće sprovodi tokom jednogodišnjeg ciklusa sa mjesečnom frekvencijom uzorkovanja (Hagger i sar., 2010; Jones i sar., 2010; Stroglyoudi i sar., 2012; Dallarés i sar., 2018; Bakhmet i sar., 2019). Kontinuirani biomonitoring u realnom vremenu, koji podrazumijeva upotrebu automatskih on-line sistema i bioindikatorskih organizama (vidjeti Chen i sar., 2012; Kuklina i sar., 2013; Bakhmet i sar., 2019), nalazi široku primjenu u ekotoksikološkim istraživanjima i kao takav pruža uvid u rane

reakcije bioindikatora na stres usled zagađenja. Real-time biomonitoring pruža informacije o stanju ekosistema u svakom momentu, odnosno realnom vremenu, i kao takav daje prostor za pravovremeno djelovanje u cilju spriječavanja i otklanjanja potencijalnog zagađenja. Primjer takvog monitoringa je praćenje variranja HR kod dagnji u zavisnosti od ekoloških parametara tokom jednogodišnjeg ciklusa (Bakhmet i sar., 2019).

2.4.1. Aktivni i pasivni biomonitoring

Aktivni biomonitoring se definiše kao translokacija jedinki sa nezagađenog – referentnog lokaliteta na zagađen lokalitet ili više lokaliteta u gradijentu zagađenja, radi praćenja promjena na biohemijском, fiziološkom nivou ili na nivou cijelog organizma, koje nastaju kao odgovori na zagađenje (De Kock i Kramer, 1994; Lacroix i sar., 2015). Suprotno aktivnom, pasivni biomonitoring podrazumijeva upotrebu jedinki nativnih populacija/vrsta sakupljenih na lokalitetima od interesa, uz obavezni referentni lokalitet i idealno, takođe u gradijentu zagađenja (De Kock i Kramer, 1994; Lacroix i sar., 2015).

Prve studije koje obuhvataju upotrebu vrsta roda *Mytilus* u aktivnom biomonitoringu (eng. mussel transplant caging) datiraju od početka devedesetih godina u SAD i Evropi (Martinčić i sar., 1992; Salazar and Salazar, 1996).

Osnovni princip aktivnog biomonitoringa se zasniva na tome da se odabere homogena grupa jedinki: jedinke iz prirodnih populacija ili jedinke sa uzgajališta, jedinke iste starosti, veličine i fiziološkog stanja, da se jedinke podijele u grupe i postave u kaveznom sistemu izlaganja na lokalitete od interesa, odnosno lokalitete u gradijentu zagađenja. Nakon određenog perioda, dan/mjesec/godina, vrši se analiza ciljnih biomarkera na ćelijskom nivou, nivou tkiva ili organizma (Beyer i sar., 2017).

Prema Smolders i sar. (2003) prednosti aktivnog biomonitoringa nativnim jedinkama su: manji stres odnosno, kraći period prilagođavanja na uslove *in situ*, u odnosu na korišćenje jedinki standardnih laboratorijskih vrsta; precizno definisan period izlaganja (trajanja eksperimenta); poredivost lokaliteta. Upotreba translociranih jedinki daje preciznije rezultate u odnosu na nativne jedinke, jer npr. u pasivnom monitoringu nezanemarljiv faktor predstavlja adaptiranost jedinki na konkretne uslove sredine. Isti autori navode i neke od mana aktivnog biomonitoringa, kao što je ograničena ili neujednačena količina dostupne hrane u kaveznom

sistemu izlaganja na različitim lokalitetima, što takođe predstavlja stres. Na kraju, gubitak kaveza predstavlja jedan od nedostataka ovog tipa biomonitoringa.

U nekim studijama se koristi i pristup unakrsne translokacije (eng. cross-translocation), koji podrazumijeva translokaciju jedinki sa referentnih na zagađene lokalitete, a istovremeno i translokaciju jedinki sa zagađenih na referentne lokalitete (Serafim i sar., 2011; Lopes i sar., 2012 – cit. Beyer i sar., 2017).

Takođe se može uporedno pratiti uticaj i akumulacija ksenobiotika kod nativnih i translociranih jedinki, na primer Schøyen i sar. (2017) su u monitoringu kvaliteta priobalnih voda Sjevernog mora pratili akumulaciju PAH-ova, PCB-a i teških metala kod translociranih i nativnih jedinki tokom šest mjeseci. Uvidjeli su da je kod translociranih jedinki došlo do brze akumulacije teških metala u tkivima koja je potom dostigla stabilan nivo, dok je akumulacija PAH-ova i PCB-a bila spora i manja u poređenju sa nativnim jedinkama.

Ne postoji standardizovan, odnosno harmonizovan međunarodno prihvaćen protokol za aktivni biomonitoring priobalnih voda uz upotrebu dagnji kao bioindikatorskih vrsta, ali na primer, Norveška agencija za zaštitu životne sredine primjenjuje biomonitoring uz upotrebu kaveznog sistema izlaganja dagnji za praćenje uticaja industrije nafte i gasa na moru (Iversen i sar., 2015), a u toku je standardizacija nacionalnog monitoringa morskog ekosistema koji bi uključivao i aktivni i pasivni biomonitoring (Beyer i sar., 2017).

2.5. Fiziološki biomarkeri kod markoinvertebrata

Tokom poslednjih 20 godina u ekotoksikološkim studijama se široko upotrebljavaju fiziološki biomarkeri poput varijabilnosti HR, disanja, stepena filtracije, VG (Belanger i sar., 2017; Ogunola, 2017; Redmond i sar., 2017; Collins i sar., 2019), koji u suštini predstavljaju odgovor organizma kao cjeline na promjene u ekosistemu (Depledge i sar., 1995).

Jedna od glavnih fizioloških reakcija/odgovora na stres kod morskih beskičmenjaka jeste upravo promjena u funkcionisanju kardiovaskularnog sistema. Tako su promjene u srčanom ritmu, posebno varijabilnost srčanog ritma, našle primjenu kao biomarkeri fiziološkog stanja i opšteg zdravlja organizma (Kuznetsova i Kholodkevich, 2015). Pored promjena srčanog ritma, stepen otvorenosti/zatvorenosti ljuštura takođe nalazi primjenu kao

biomarker. Promjene srčanog ritma i promjene u stepenu otvaranja/zatvaranja ljuštura kod školjki su odgovori koji često udruženo reaguju na stres.

2.5.1. Srčani ritam (HR) kao fiziološki biomarker kod makroinvertebrata sa akcentom na školjke

Pionirska istraživanja srčanog ritma morskih školjki kao fiziološkog biomarkera datiraju iz šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog vijeka (vidjeti Schlieper, 1955; Trueman, 1967; Helm i Trueman, 1967; Brand i Roberts, 1973). Srčana aktivnost, odnosno srčani ritam, može da se posmatra i kao indikator respiratorne funkcije i fiziološkog stanja (Bayne, 1971; Coleman T. G., 1974; Depledge, 1985; Feder i sar., 1987; Depledge i Andersen, 1990; Marshall i McQuaid, 1993 – cit. iz Collins i sar., 2019). Promjene i poremećaji u funkcionisanju kardiovaskularnog sistema mogu biti rezultat štetnog uticaja ksenobiotika na cijeli organizam, zbog čega je HR, a posebno varijabilnost HR prihvaćen kao biomarker opšteg stresa koji može da ukazuje na pogoršan status ekosistema (Depledge i sar., 1995; Brown i sar., 2004 – cit. iz Kuznetsova i Kholodkevich, 2015). Sa razvojem neinvazivnih metoda, HR se kod školjki počeo široko upotrebljavati kao fiziološki odgovor organizma na uticaj raznih ksenobiotika (Kuznetsova i sar., 2010; Bini i sar., 2015; Kuznetsova i Kholodkevich, 2015; Martinović i sar., 2013b; 2015; 2016), ali i ekoloških faktora (Bakhmet i Zdorovenov, 2010; Bakhmet, 2017; Bakhmet i sar., 2019).

Helm i Trueman (1967) opisuju prvi sistem za praćenje HR školjki. Međutim, pošto je metoda bila invazivna (podrazumijevala je bušenje ljuštura u regionu srca i postavljanje elektroda u oblasti srca) i destruktivno je djelovala na eksperimentalne jedinke, srčani ritam se nije mogao pratiti u dužem vremenskom periodu. U posljednje tri decenije je učinjen značajan pomak u razvoju metoda i tehničkih sredstava za automatski biomonitoring u realnom vremenu, zasnovan na biohemijским, fiziološkim i biomarkerima ponašanja kod beskičmenjaka. Prvi neinvazivni sistem za praćenje srčanog ritma i ventilacije dekapodnih rakova je razvijen od strane Depledge (1984a), koji je dalje usavršavan od strane Depledge i Anderson (1990) (CAPMON) i Depledge i sar. (1996) (AIDA). Ovakvi i slični monitoring sistemi na bazi praćenja srčanog ritma viših rakova i mekušaca (vidjeti Reguera i sar., 2018) su se sporadično koristili sve do 2000-tih godina, kada je nastupio razvoj informacionih tehnologija zahvaljujući čemu je sistem značajno unaprijeđen (Fedotov i sar., 2000) što je

omogućilo njegovu široku primjenu u biomonitoringu vodenih ekosistema (Kholodkevich i sar., 2008; 2009a; 2009b; 2011; 2016; Fedotov i sar., 2009; Martinović i sar., 2013a; 2015; Kuznetsova i sar., 2018). Sve intezivnije unapređivanje i usavršavanje opreme za praćenje HR kod morskih beskičmenjaka je omogućilo i sprovođenje monitoringa u realnom vremenu, tzv. *real time* monitoringa u *in situ* uslovima (Tagliarolo i McQuaid, 2015; Bakhmet i sar., 2019).

Srčani ritam se osim u *in situ/ex situ* biomonitoring programima, koristi i kao biomarker u laboratorijskim istraživanjima efekta pojedinačnih ksenobiotika ili njihovih smjese, kao i u istraživanjima uticaja ekoloških faktora na štetno djelovanje ksenobiotika.

U istraživanjima se prate različiti parametri poput: broja otkucaja srca u jedinici vremena, varijabilnosti HR izražene kao odnos HR nakon izlaganja datom ksenobiotiku i HR prije izlaganja, prosječne razlike HR prije i posle izlaganja ksenobiotiku, oscilacija HR, vrijeme oporavka srčanog ritma nakon ekstremnog stresa (eng. heart rate recovery time – T_{rec}).

Kondicioni, odnosno fiziološki status jedinki, koji zavisi od nivoa stresa na staništu, direktno je povezan sa brzinom oporavka od ekstremnog stresa (Bakhmet i sar., 2005), što se u potpunosti uklapa u koncept vulnerabilnosti koji se promovise u ekosistemske ekotoksikologiji (Teodorović i Kaišarević, 2015). Tako se jedinke u automatizovanim sistemima, ali i jedinke nativnih populacija – transplantirane jedinke ili jedinke iz laboratorijskih eksperimenata, eksponirane ciljanim uticajima na lokalitetima od interesa (najčešće u gradijentu zagađenja) ili pojedinačnim ksenobioticima u laboratorijskim eksperimentima, podvrgavaju *ex situ* ekstremnom stresu (drastična promjena saliniteta – test saliniteta) i prati se T_{rec} nakon povratka saliniteta na normalne vrijednosti u cilju procjene njihovog fiziološkog statusa (Martinović i sar., 2013a; Turja i sar., 2014; Kuznetsova i Kholodkevich, 2015; Kholodkevich i sar., 2019a). Prema Kholodkevich i sar. (2019a) fiziološki status jedinki na lokalitetima pod uticajem stresa (npr. zagađenje) je lošiji u poređenju sa jedinkama sa lokaliteta koji nijesu pod uticajem stresa, pa je samim tim T_{rec} kod jedinki sa zagađenih lokaliteta nakon testa saliniteta duže. Vrijeme oporavka srčanog ritma (T_{rec}) i koeficijent varijabilnosti srčanog ritma (eng. coefficient of heart rate variation – CV_{HR}) nakon testa saliniteta su predloženi kao fiziološki biomarkeri adaptiranosti kardiovaskularnog sistema kod beskičmenjaka sa ljušturoom – školjki i rakova u odnosu na kvalitet ekosistema (Kholodkevich i sar., 2011; 2019a). Kholodkevich i sar. (2019a) predlažu klasifikaciju

ekološkog stanja (statusa) vodenih ekosistema na osnovu vrijednosti T_{rec} na pet kategorija: visok ($T_{rec} < 50$ min), dobar ($T_{rec} 50\text{--}70$ min), srednji ($T_{rec} 70\text{--}100$ min), loš ($T_{rec} 100\text{--}200$ min) i veoma loš ($T_{rec} > 200$ min).

2.5.1.1. Uticaj ekoloških faktora na srčani ritam

Promjene uslova spoljašnje sredine imaju direktan uticaj na fiziološke odgovore jedinki, o čemu se mora voditi računa pri postavci ali posebno pri interpretaciji rezultata monitoring programa u *in situ/ex situ* eksperimentalnim postavkama. Među ekološkim faktorima u morskoj sredini koji imaju uticaj na varijacije HR kod morskih beskičmenjaka kao najbitniji se mogu izdvojiti temperatura i salinitet.

Opšte je poznato da kod ektotermnih organizama, kao što su vrste roda *Mytilus*, od temperature morske sredine zavisi i temperatura njihovog tijela, što se direktno odražava i na njihovu fiziologiju (Kern i sar., 2015; Collins i sar., 2019). Prema Hagger i sar. (2010) i Bakhmet i sar. (2019) postoji pozitivna linearna korelacija između HR i temperature morske vode kod vrsta iz roda *Mytilus*. Za ove organizme je karakteristično da imaju optimalni temperaturni opseg u okviru kojeg organizam normalno funkcioniše i nije pod stresom, međutim van ovog temperaturnog opsega se javlja termalni stres i dolazi do aktiviranja mehanizama odbrane počevši od ćelijskih odgovora pa sve do promjena u fiziološkim odgovorima poput promjena i poremećaja srčanog ritma (Lockwood i Somero, 2011; Collins i sar., 2019). Varijabilnost HR kao fiziološki odgovor na temperaturni stres kod morskih beskičmenjaka istraživali su Braby i Somero (2006), Dong i Williams (2011), Zhang S. i sar. (2014), Collins i sar. (2019), Moyen i sar. (2019).

U pogledu saliniteta, vrste roda *Mytilus* spadaju u grupu osmokonformista, pa je kod njih koncentracija tjelesnih tečnosti direktno proporcionalna salinitetu morske vode. U uslovima akutnog osmotskog stresa kod vrsta roda *Mytilus* dolazi do smanjenja HR, što je primarno uslovljeno zatvaranjem ljuštura, smanjenim stepenom ili pak potpunom redukcijom filtracije, smanjenim unosom kiseonika i prelaskom sa aerobnog na anaerobni metabolizam (Gracey i Connor, 2016). U uslovima hroničnog osmotskog stresa vrste roda *Mytilus* se adaptiraju na taj način što mijenjaju koncentracije soli u citosolu, za šta je po nekim autorima neophodno nekoliko dana (de Vooy, 1991; Gosling, 1992; Hawkins i Bayne, 1992 – cit. iz

Braby i Somero, 2006). Varijabilnost HR u uslovima osmotskog stresa kod vrsta roda *Mytilus* dokazali su Bakhmet i sar. (2005), Braby i Somero (2006), Martinović i sar. (2013a), Turja i sar. (2014), Kholodkevich i sar. (2009a; 2016), Khalaman i sar. (2017).

Vrste koje naseljavaju oblast plime i osjeke, poput vrsta roda *Mytilus*, su izložene stalnim oscilacijama novoa vode, tokom kojih su potpuno uronjene, djelimično uronjene u vodi ili su pak na suvom. Tokom perioda osjeke, kada su jedinke izložene suvom peridu, izložene su i drugim stresorima poput povećanja temperature, odsustva kiseonika i nedostupnosti hrane, što ukazuje da su tokom suvog perioda jedinke izložene multi-stres uslovima. Različite su fiziološke promjene koje se javljaju kao odgovor organizma na ovakve uslove, a jedna od njih su promjene i varijabilnost HR (Helmuth i sar., 2010). Bakhmet i Zdrovenov (2010) su u eksperimentu u prirodnim *in situ* uslovima ukazali da ciklus plime i osjeke ima uticaja na oscilacije HR kod vrsta *Mytilus edulis* i *Modiolus modiolus*. Connor i Gracey (2012) kao i Gracey i Connor (2016) ukazuju da kod vrste *Mytilus californianus* dolazi do smanjenja HR kada jedinke pređu sa aerobnog na anaerobni metabolizam tokom suvog perioda koji je simuliran u laboratorijskim uslovima.

Varijacije HR kod školjki su zavisne i od količine dostupne hrane u vodenom medijumu (Cheng i sar., 2018; Bakhmet i sar., 2019). Prema Bakhmet i sar. (2019) dostupnost hrane u pojedinim periodima godine ima veći uticaj na varijacije HR nego što to ima temperatura koja se smatra jednim od najbitnijih ekoloških parametara. U ranijoj studiji (Bakhmet, 2017) ukazuje da kod vrste *Mytilus edulis* dolazi do povećanja HR sa povećanjem brojnosti fitoplanktona u vodi, na šta ukazuju i Cheng i sar. (2018) kod vrste *Perna viridis*. Suprotno ovim rezultatima, Hagger i sar. (2010) ukazuju da kod vrste *Mytilus edulis* dolazi do povećanja HR tokom ljetnjeg perioda, dok su u isto vrijeme stepen filtracije i usvajanje hrane smanjeni.

Varijacije HR kod morskih školjki se mogu javljati i u prisustvu toksičnog fitoplanktona, na šta ukazuju Gainey i Shumway (1988). Autori su u laboratorijskim uslovima pratili uticaj toksične alge *Protogonyaulax tamarensis* i zaključili da uzrokuje varijacije HR kod vrsta *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis* i *Mya arenaria*.

Tabela 2.2. Pregled uticaja ekoloških faktora na HR kao biomarker

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
T_{rec} ; CV_{HR}	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke sa tri različita lokaliteta (referentni lokalitet i dva lokaliteta koja se smatraju zagađenim) izlagane osmotskom stresu - brzo smanjenje saliniteta vode za 50 %, izloženost jedinki samnjenom salinitetu tokom 1h, nakon čega je salinitet vraćen na prirodne vrijednosti. Jedinke sa potencijalno zagađenih lokaliteta imale duže T_{rec} što dokazuje prisustvo stresa na ova dva lokaliteta usled zagađenja.	Martinović i sar., 2013a
HR otkucaja/sek)	(broj Studija slučaja	<i>Mytilus edulis</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke uzorkovane u dvije ekološke zone litoral i sublitoral i izlagane osmotskom stresu – brzo smanjenje saliniteta sa 25 ‰ na 15 ‰, tokom 1h. Uočeno da sublitoralne jedinke imaju veće vrijednosti HR kao i da je usled osmotskog stresa došlo do pada HR koji je bio izraženiji kod sublitoralnih jedinki.	Bakhmet i sar., 2005

Tabela 2.2. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR otkucaja/min)	(broj Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus edulis</i>	Prirodni uslovi	<i>in situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Praćeni HR od marta do aprila na jednom lokalitetu i uticaj temperature i fitoplanktona na HR. Uočeno je da sa porastom temperature dolazi do porasta HR ispitivanih jedinki, ali autor ukazuje da je ipak dostupnost hrane primarni faktor koji utiče na HR.	Bakhmet, 2017
HR otkucaja/min)	(broj Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus edulis</i> <i>Modiolus modiolus</i>	Prirodni uslovi	<i>in situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Kontinuirano praćenje HR tokom jedne godine uključujući i praćenje temperature, saliniteta, fitoplanktona i reprodukcije. Autori ukazuju da iako postoji linearna korelacije HR i temperature, količina dostupne hrane kao i reproduktivni ciklus imaju značajan uticaj na HR u pojedinim periodima godine.	Bakhmet i sar., 2019

Tabela 2.2. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR (broj otkucaja/min)	Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus edulis</i>	Paraziti	<i>in situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke eksperimentalno inficirane trematodama i postavljene <i>in situ</i> tokom godinu dana da im se prati HR. Uporedo praćene i neinficirane jedine kao kontrolna grupa. HR kontrolnih jedinki je bio statistički značajno višoj u poređenju sa inficiranim jedinkama, a takođe je uočena i značajna razlika između kontrolnih i inficiranih jedinki u korelacije HR i temperature.	Bakhmet i sar., 2017
HR (broj otkucaja/min)	Kontinuirani monitoring	<i>Mytilus edulis</i>	Prirodni uslovi	<i>ex situ</i>	CAPMON sistem	Jedinke uzorkovane svakoga mjeseca, aklimatizovane 30 minuta i praćen im HR tokom 1h. Uočene veće vrijednosti HR ispitivanih jedinki tokom toplijeg perioda godine (april – septembar), kada su temperature vode bile višoj i kada su jedinke bile u fazi mrijesta i fazi mirovanja nakon mrijesta.	Hagger i sar., 2010

Tabela 2.2. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR (broj otkucaja/min)	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	HR praćen u laboratorijskim uslovima tokom izlaganja osmotskom stresu – brzom smanjenju saliniteta sa 18 ‰ na 12 ‰ promila. Uočeno smanjenje HR tokom trajanja testa saliniteta, kao i povratak HR na početne vrijednosti nakon povećanja saliniteta na 18 ‰.	Kholodkevich i sar., 2009a
HR (broj otkucaja/min), oscilacije HR	Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus edulis</i> <i>Modiolus modiolus</i>	Prirodni uslovi	<i>in situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Praćen HR tokom zime kod dvije vrste školjki. Autori su ukazali da su oscilacije HR u korelaciji sa ciklusom plime i osjeke.	Bakhmet i Zdrovenov, 2010

Tabela 2.2. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR (broj otkucaja/min)	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Temperaturni stres	<i>ex situ</i>	Infracrveni senzor sa Picoscope 2200 konventorom (IR metoda)	<p>Praćenje i poređenje HR subtidalnih i intertidalnih jedinki tokom povećanja temperature za 4°C na svakih 1h kada su izložene na vazduhu i u vodi.</p> <p>Autori ukazali da fiziološki odgovori ispitivanih jedinki na temperaturni stres zavise od mikrolokaliteta koji naseljavaju. Subtidalne jedinke su pokazale smanjenje HR u uslovima termalnog stresa u vodi ali ne i na vazduhu. Suprotno, intertidalne jedinke su pokazale povećan anaerobni kapacitet na vazduhu, ali ne i sa povećanjem temperature.</p>	Collins i sar., 2019
T_{rec}	Studija slučaja	<i>Mytilus edulis</i>	Osmotski stres, predatorstvo	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	<p>U laboratorijskim uslovima praćen T_{rec} nakon osmotskog stresa kod jedinki koje su bile izložene predatoru i kontrolnih jedinki.</p> <p>Autori ukazali na povećane vrijenosti T_{rec} kod jedinki koje su bile izložene uticaju predatora.</p>	Khalaman i sar., 2017

Tabela 2.2. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
T_{rec} , CV_{HR}	Studija slučaja	<i>Mytilus trossulus</i> <i>Macoma balthica</i> <i>Anodonta anatina</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke uzorkovane na referentnim i zagađenim lokalitetima i izlagane osmotskom stresu, sa ciljem poređenja T_{rec} i CV_{HR} . Autori ukazali da je T_{rec} nakon osmotskog stresa kod jedinki sa referentnog lokaliteta manji od 60 min, dok se kod jedinki sa zagađenih lokaliteta kreće od 110 – 130 min, što ukazuje da se ovaj biomarker može koristiti u procjeni ekološkog stanja odabranih lokaliteta.	Kholodkevich i sar., 2016
T_{rec} , CV_{HR}	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke uzorkovane na referentnom i zagađenom lokalitetu i izlagane osmotskom stresu, sa ciljem poređenja T_{rec} i CV_{HR} . Autori ukazali da je na lokalitetu koji je zagađen povećan T_{rec} 76.8 min, kao i CV_{HR} koji je iznosio 24 %, u poređenju sa nezagađenim lokalitetom ($T_{rec} = 35.3$ min, $CV_{HR} = 9$ %), kao i da su biohemijske analize pokazale iste rezultate.	Kholodkevich i sar., 2018

Tabela 2.2. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
T_{rec} , CV_{HR}	Studija slučaja	<i>Mytilus trossulus</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke transportovane na četiri lokaliteta, dva nezagađena i dva zagađena. Nakon tri mjeseca jedinke u laboratorijskim uslovima izlagane osmotskom stresu, sa ciljem poređenja T_{rec} i CV_{HR} . Autori ukazali na povećane T_{rec} vrijednosti kod jedinki koje su uzorkovane sa zagađenih lokaliteta, što se poklapa i sa rezultatima analize ostalih ispitivanih biomarkera. Autori ukazuju da dobijeni rezultati podržavaju upotrebu baterija biomarkera u procjeni nivoa zagađenja.	Turja i sar., 2014
HR (broj otkucaja/sek)	Studija slučaja	<i>Cellana toreuma</i>	Temperaturni stres	<i>ex situ</i>	Infracrveni senzor sa Picoscope 2200 konventorom (IR metoda)	Praćenje HR kod jedinki koje su izlagane povećanju temperature sa 16°C na 34°C, kao i tokom smanjenja temperature sa 34°C na 16°C. Autori ukazali na jaku korelaciju HR i stres proteina i da su fiziološki odgovori osjetljivi na temperaturni stres.	Zhang S. i sar., 2014

2.5.1.2. Osjetljivost srčanog ritma na specifične klase ksenobiotika

Među najznačajnijim ksenobioticima u morskom ekosistemu se izdvajaju teški metali i perzistentni organski polutanti (eng. persistent organic pollutants – POPs). Ovi ksenobiotici čak i pri malim koncentracijama mogu dovesti do raznih poremećaja kod morskih beskičmenjaka na svim nivoima biološke organizacije (Chandurvelan i sar., 2015; Renault, 2015; Kuznetsova i Kholodkevich, 2015), uključujući i fiziološke biomarkere kao što je HR (Martinović i sar., 2013b; Bini i sar., 2015).

Kadmijum je jedan od neesencijalnih metala za koji je dokazano da ima uticaj na varijabilnost HR kod morskih beskičmenjaka. Martinović i sar. (2013b) su u laboratorijskim uslovima akutnog izlaganja kadmijumu jedinki vrste *Mytilus galloprovincialis* ustanovili da dolazi do bradikardije i da je sa povećanjem koncentracije Cd vrijeme oporavka srčanog ritma duže. Bakhmet i sar. (2012) su u istim eksperimentalnim uslovima ustanovili pojavu tahikardije kod vrste *Mytilus edulis* pri tretiranju različitim koncentracijama Cd, dok Lannig i sar. (2008) ne nalaze promjene u HR kod školjke *Crassostrea virginica* tokom akutnog izlaganja kadmijumu. Promjene u HR usled različitih koncentracija Cd u laboratorijskim uslovima nijesu identifikovane ni kod slatkovodnog raka *Procambarus clarkii* (Bini i sar., 2015). Varijacije HR kod morskih beskičmenjaka mogu da indukuju i esencijalni metali poput Cu. Tako prema Brown i sar. (2004) i Bakhmet i sar. (2012) akutno izlaganje bakru indukuje pojavu tahikardije kod vrste *Mytilus edulis*, dok kod iste vrste pri sličnim koncentracijama Cu Grace i Gainey (1987) i Curtis i sar. (2000) uočavaju bradikardiju. Suprotno ovakvim rezultatima kod morskih priljepaka iz roda *Patella* se pri akutnom izlaganju Cu javlja isključivo bradikardija, koja je i vremenski zavisna, odnosno što je izlaganje duže broj otkucaja srca se smanjuje (Marchán i sar., 1999; Brown i sar., 2004; Bini i sar., 2008).

Nafta, naftni disperzanti su jedan od glavnih izvora organskih ksenobiotika u morskom ekosistemu. U laboratorijskim testovima akutne toksičnosti, Bakhmet i sar. (2009) su uočili jake fluktuacije HR pri svim testnim koncentracijama nafte kod vrste *Mytilus edulis*. Na slične rezultate ukazuju i Martinović i sar. (2015) kod vrste *Mytilus galloprovincialis* u oblasti Bokokotorskog zaliva. Depledge (1984b) ukazuje na povećanje HR kod morskog raka *Carcinus maenas* u akutnom testu izlaganja nafte i naftnim disperzantima. Međutim, kod iste

vrste tokom hroničnog izlaganja nafti u trajanju od jedne godine, Bamber i Depledge (1997) ukazuju na smanjenje srčanog ritma.

Halldórsson i sar. (2007) su pratili efekat kratkotrajnog izlaganja benzo (a) pirenu (B[a]P, iz grupe PAH) na srčani ritam kod jedinki vrste *Mytilus galloprovincialis* i ukazali da jedinke sa referentnih lokaliteta pri izlaganju B[a]P-u ne pokazuju promjene u HR, za razliku od jedinki sa zagađenih lokaliteta kod kojih je došlo do povećanja HR, što ukazuje da se u akutnim testovima izlaganja i praćenja biomarkera kao odgovora jedinki mora imati u vidu i ekološki status lokaliteta sa kojih se jedinke uzorkuju. I drugi organski ksenobiotici dovode do varijacija HR kod morskih školjki. Tako Galloway i sar. (2002) nalaze značajnu pozitivnu korelaciju između HR i koncentracije PCB-a i PAH-a u mekom tkivu kod vrste *Geukensia demissa*. Suprotno ovim rezultatima, Sabourin i Tullis (1981) ukazuju na pojavu bradikardije kod vrste *Mytilus californianus* u *ex situ* uslovima pri različitim koncentracijama toluena i benzena, ali takođe zaključuju da su promjene HR reverzibilne i da se vrijednosti HR brzo vraćaju na one koje su bile prije izlaganja ksenobioticima, kada se jedinke vrate u svježu morsku vodu.

Jedan od vrlo interesantnih i važnih ksenobiotika kada su u pitanju morski mekušci jeste tributil kalaj (TBT) i srodna jedinjenja. TBT i srodna jedinjenja su dugi niz godina korišćena kao premazi za sprječavanje obraštaja na brodovima i čamcima i na taj način su dospjeli u morski ekosistem. Prema Goldberg (1986), TBT je jedna od natoksičnijih supstanci koja je unešena u morski ekosistem. TBT izaziva niz negativnih posledica kod morskih mekušaca, od kojih je najpoznatiji endokrini poremećaj – imposeks (Nicolaus i Barry, 2015). Martinović i sar. (2016) ukazuju da tokom kratkotrajnog izlaganja TBT-u u *ex situ* uslovima kod vrste *Mytilus galloprovincialis* dolazi i do značajnih variranja i razlika HR u poređenju sa periodom predtretmana i da su ta variranja direktno proporcionalna koncentraciji TBT-a. Takođe, u laboratorijskim uslovima kod vrste *Perna viridis* je uočena pojava tahikardije kao odgovor na izlaganje TBT-u (Nicholson, 2003).

Tabela 2.3. Pregled osjetljivosti HR na specifične klase ksenobiotika

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR (broj otkucaja/min)	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Nafta, naftni disperzant S-25	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke uzorkovane sa dva lokaliteta i izložene različitim koncentracijama nafte i naftnog disperzanta kao i njihovim smješama tokom 72h u labaratorijskim uslovima. Poremećaji HR uočeni tokom izlaganja nafti koncentracije od 1 ml/l, kao i naftnog disperzanta koncentracije 50µl/l.	Martinović i sar., 2015
dHr (prosječna razlika Hr u odnosu na period prije tretmana)	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TBT-Cl	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke izložene u akvarijumima različitim koncentracijama (10, 100, 1000 µg/l) TBT-Cl tokom 96h uz konstantnu temperaturu i salinitet. Autori ukazali da su promjene HR bile zavisne od koncentracije TBT-Cl i da se HR može smatrati pouzdanim biomarkerom prisustva i uticaja ksenobiotika.	Martinović i sar., 2016

Tabela 2.3. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR (broj otkucaja/min), prosječan HR tokom 24 h	Studija slučaja	<i>Mytilus edulis</i>	Nafta	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke izlagane različitim koncentracijama nafte tokom šest dana uz konstantno praćenje HR. Uočene jake fluktuacije i velika varijabilnost HR pri svim ispitivanim koncentracijama nafte. Autori ukazali da je HR visoko osjetljiv biomarker prisustva nafte.	Bakhmet i sar., 2009
HR (broj otkucaja/min), prosječan HR tokom 8h	Studija slučaja	<i>Mytilus edulis</i>	Cd, Cu	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Jedinke izlagane različitim koncentracijama Cu i Cd tokom 4 dana uz konstantno praćenje HR. Uočeno povećanje HR pri svim ispitivanim koncentracijama Cu i Cd. Takođe ukazano da su promjene HR tokom izlaganja Cu i Cd vremenski zavisne.	Bakhmet i sar., 2012

Tabela 2.3. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
T_{rec}	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cd	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Pri konstantnoj temperaturi jedinke izlagane različitim koncentracijama (4, 40 i 100 $\mu\text{M/l}$) Cd tokom 2h i praćen HR. Najmanja koncentracija Cd nije imala nikakav efekat na HR ispitivanih jedinki, dok je pri ostalim ispitivanim koncentracijama došlo do pada HR. Uočeno je da je T_{rec} zavisi od koncentracije Cd, T_{rec} je bilo duže kod jedinki koje su izlagane koncentraciji od 100 $\mu\text{M/l}$.	Martinović i sar., 2013b
HR (broj otkucaja/min)	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hidrohinon	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	HR praćen u laboratorijskim uslovima tokom akutnog izlaganja (2h) hidrohinonu u koncentraciji 1g/l. Uočeno da dolazi do smanjenja HR, što je praćeno i zatvaranjem ljuštura. Nakon otklanjanja stresora, vrijeme koje je bilo potrebno da se HR vrati na prvobitne vrijednosti je iznosilo 3h i 15min.	Kholodkevich i sar., 2009a

Tabela 2.3. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
HR (broj otkucaja/min), individualna varijacija HR (odnos HR nakon izlaganja i HR prije izlaganja)	Studija slučaja	<i>Procambarus clarkii</i>	Cd, Zn, Cu	<i>ex situ</i>	CAPMON sistem	U laboratorijskim uslovima praćen HR kod jedinki koje su izlagane različitim koncentracijama Cd i Zn. Praćen i HR kod jedinki koje su izlagane Cd i Zn tokom 96h, a potom su izlagane Cu i poređene sa kontrolnim jedinkama. Rezultati ukazuju da Cd nije uticao na promjene HR ispitivanih jedinki, dok Zn jeste. Takođe je dokazano da kod jedinki koje su prethodno izlagane uticaju Cd i Zn ne dolazi do bradikardije usled uticaja Cu, dok je kod kontrolnih jedinki Cu izazvao bradikardiju, što ukazuje na adaptiranje jedinki.	Bini i sar., 2015

Tabela 2.3. Nastavak

Biomarkeri	Studija	Vrsta	Prirodni uslovi/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
T_{rec} , CV_{HR}	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Deterdženti	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Poređenje T_{rec} nakon osmotskog stresa kod jedinki koje su prethodno izlagane različitim koncentracijama deterdženata (0.33 mg/l i 1.9 mg/l). Veće vrijednosti T_{rec} su bile kod jedinki koje su izlagane koncentraciji deterdženta od 0.33 mg/l. Autori zaključuju da su manje koncentracije deterdženta više toksične za ispitivane jedinke, jer u ovim uslovima jedinke nisu potpuno zatvorile svoje ljuštore, što je bio slučaj kada su izlagane koncentraciji od 1.9 mg/l.	Kuznetsova i Kholodkevich, 2015
HR (broj otkucaja/min), stres indeks (stress index – SI)	Studija slučaja	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	Hidrohinon	<i>ex situ</i>	Laser fiber-optička fotopletizmografija	Praćenje HR kod jedinki koje su izlagane hidrohinonu tokom 1h i tokom 24 h. Tokom kratkotrajnog izlaganja hidrohinonu od 1h došlo je do povećanja HR i SI, dok je izlaganje od 24 h dovelo do značajne tahikardije kod ispitivanih jedinki.	Kuznetsova i sar., 2010

2.5.2. Otvorenost ljuštura (VG) kao fiziološki biomarker kod školjki

Školjke imaju dvokapku ljušturu koja ima primarno zaštitnu ulogu. U prirodnim uslovima ljušture školjki su otvorene i više od 70 % vremena zbog obavljanja fizioloških procesa – respiracije i ishrane (Kramer i Foekema, 2001; Redmond i sar., 2017). Zatvaranje ljuštura na duži vremenski period predstavlja reakciju – odgovor na stres (Kramer i sar., 1989; de Zwart D. i sar., 2006; Borcharding, 2006; Martinović i sar., 2015), pa se varijabilnost VG i drugi (statistički) parametri vezani za VG smatraju dobrim upozoravajućim signalima promjena u ekosistemu (Redmond i sar., 2017).

Može se izdvojiti nekoliko parametara koji se koriste kao biomarkeri: broj individua koje su zatvorile ljušture i/ili dužina vremena tokom kojeg su ljušture otvorene/zatvorene (Kramer i sar., 1989; de Zwart L. L. i sar., 1999; Kramer i Foekema, 2001), potpuno zatvorene ljušture duži period – izbjegavanje stresa, brzo i naizmjenično otvaranje i zatvaranje ljuštura (Hartmann i sar., 2016), broj adukcija (Durrieu i sar., 2016), broj promjena od otvorenih ka zatvorenim ljušturama i obrnuto – frekvencija tranzicije (Hartmann i sar., 2016), veličina ugla između ljuštura (Robson i sar., 2007) (Tabela 2.4).

Prva istraživanja vezana za VG kod školjki datiraju još iz 1909. godine gdje je korišćen mehanički sistem za praćenje promjena VG kod dagnji (Marceau, 1909). Praćenje VG pomoću elektromagnetnog sistema su prvi put primjenili Kramer i sar. (1989) kao sistem za rano upozorenje zagađenja akvatičnih ekosistema. Pored ovog sistema, danas je za praćenje VG školjki u upotrebi i oprema zasnovana na magnetnom sistemu sa Hall sensorima (elektromagnetni senzor koji radi na principu Holovog efekta – efekat koji nastaje kada se poluprovodnik kroz koji teče struja unese u magnetno polje) (Wilson i sar., 2005; Robson i sar., 2007), kao i metoda zasnovana na fiber-optičkim sensorima (Frank i sar., 2007). Međutim, kako svi ovi tipovi opreme podrazumijevaju “kontakt” sa eksperimentalnim jedinkama i na taj način dodatno mogu uticati na stres jedinki, Redmond i sar. (2017) razvijaju opremu koja je bazirana na upotrebi lasera koji detektuje promjene VG iz daljine, bez kontakta sa eksperimentalnim jedinkama. Metodologija koja ne podrazumijeva kontakt sa eksperimentalnim jedinkama je i metoda snimanja jedinki i pokreta ljuštura kamerom (Riisgård i sar., 2006). Takođe, treba napomenuti i mogućnost vizuelnog praćenje pokreta ljuštura kod eksperimentalnih jedinki (Kholodkevich i sar., 2009a), međutim ovakva

metodologija je izvodljiva isključivo u laboratorijskim uslovima i to u akutnim testovima, i ne omogućuje kontinuirano praćenje, već samo praćenje promjena u određenom momentu, pa je samim tim najmanje pouzdana. Danas postoji nekoliko komercijalnih monitoring sistema za praćenje stepena otvorenosti ljuštura školjki kao biomarkera, poput Mosselmonitor i Dreissena Monitor (Bae i Park, 2014).

Kao i kod srčanog ritma, osim ksenobiotika, na varijabilnost otvorenosti ljuštura u uslovima multistresa utiču i brojni ekološki faktori, o čemu se takođe mora voditi računa pri postavljanju i interpretaciji rezultata dobijenih biomonitoringom u *in situ/ex situ* eksperimentalnim postavkama.

2.5.2.1. Uticaj ekoloških faktora na otvorenost ljuštura školjki

U prirodnim uslovima, bez uticaja zagađenja ljuštura školjki su veći dio vremena otvorene, na šta ukazuju Comeau i sar. (2018) kod vrste *M. galloprovincialis* u *in situ* uslovima. Uočeno je da jedinke 97 % vremena drže ljuštura otvorene. Isti autori ukazuju i na cirkadijalni obrazac u pogledu VG. Gnyubkin (2010) u laboratorijskim uslovima takođe ukazuje na cirkadijalni ritam VG kod iste vrste i smatra da je količina dostupne svjetlosti jedan od najbitnijih parametara koji utiču na varijabilnost VG. Sezonske razlike u varijabilnosti VG kod vrste *Pinna nobilis* su pratili i García-March i sar. (2016) u prirodnim *in situ* uslovima. Ustanovljena su dva obrazca ponašanja koji su takođe bili vezani za dinamiku dostupne svjetlosti.

Dostupnost hrane, odnosno koncentracija fitoplanktona u vodi se smatra jednim od najbitnijih bioloških parametara koji ima uticaj na VG kod školjki. U mnogim laboratorijskim studijama je dokazano da su koncentracija fitoplanktona i stepen otvorenosti ljuštura pozitivno korelisani (Riisgård i sar., 2006; Robson i sar., 2010; Riisgård i Larsen, 2015). Riisgård i sar. (2006) u *ex situ* uslovima ukazuju da jedinke vrste *M. edulis* zatvaraju svoje ljuštura kada je koncentracija alge *Rhodomonas* sp. manja od 700 ćel/l. Takođe i u *in situ* uslovima Riisgård i sar. (2006) ukazuju da su ove varijable (VG i količina dostupne hrane) u pozitivnoj korelaciji. Autori navode da je granična vrijednost koncentracije hlorofila *a* u prirodnim uslovima iznad koje jedinke vrste *M. edulis* drže svoje ljuštura otvorene 1µg/l. U laboratorijskom testu

gladovanja kod vrste *Mytilus edulis*, Riisgård i Larsen (2015) ukazuju da jedinke tokom gladovanja smanjuju stepen otvorenosti ljuštura što je u vezi sa smanjenim stepenom filtracije.

Toksične fitoplanktonske alge, poput vrsta iz roda *Alexandrium*, mogu da luče biotoksine koje u procesu filtracije školjke unose u svoj organizam i akumuliraju u svojim tkivima. Vrlo je interesantno pratiti i utvrditi varijabilnost VG školjki kada su toksične fitoplanktonske vrste prisutne u vodenom medijumu, posebno u *in situ* uslovima. U laboratorijskim uslovima je uočen gotovo identičan obrazac promjena VG kod različitih vrsta školjki *Crassostrea gigas* (Haberkorn i sar., 2011), *Pinctada fucata* (Kiyohito i sar., 2006) i *Mytilus galloprovincialis* (Comeau i sar., 2019), koji se ogleda u povećanju broja adukcija kada je brojnost toksičnih dinoflagelata bila povećana u vodenom medijumu. Pojava većeg broja adukcija je u suštini promjena ponašanja u cilju što efikasnijeg izbjegavanja kontakta sa toksičnim algama i samim tim akumulacije biotoksina u svojim tkivima (Haberkorn i sar., 2011).

Proces filtracije vode kod školjki podrazumijeva kako unos hrane tako i respiraciju, pa se i koncentracija kiseonika u vodi dovodi u tijesnu korelaciju sa varijabilnošću VG. Porter i Breitburg (2016) su u laboratorijskim uslovima pratili uticaj hipoksije na VG kod vrste *Crassostrea virginica*. Uočeno je da eksperimentalne jedinke u uslovima hipoksije zatvaraju ljušturu, ali i to da kada se izlože uslovima optimalne koncentracije kiseonika jedinke otvaraju ljušturu i brzo ih vraćaju u prvobitni položaj.

U uslovima osmotskog stresa kod školjki dolazi do promjena u VG, kao odgovora na stres. Tako Kholodkevich i sar. (2009a) kod vrste *M. galloprovincialis* u laboratorijskim uslovima prate promjene VG kada se jedinke izlože jednosatnom naglom sniženju saliniteta u vodenom medijumu. U takvim uslovima jedinke odgovaraju zatvaranjem ljuštura koje traje sve dok se jedinke ne vrate u vodeni medijum sa optimalnim salinitetom.

Tabela 2.4. Pregled uticaja ekoloških faktora na otvorenost ljušture školjki

Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
Broj adukcija	Studija slučaja	<i>Pinctada fucata</i>	Toksični fitoplankton	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall sensorima	Povećanje broja adukcija sa povećanjem brojnosti toksičnog dinoflagelata <i>Heterocapsa circularisquama</i> , sa vraćanjem jedinki u čistu morsku vodu broj adukcija je odmah počeo da se smanjuje	Kiyohito i sar., 2006
Broj adukcija	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Toksični fitoplankton	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall sensorima	Povećan broj adukcija kod jedinki koje su izložene brojnosti toksičnog dinoflagelata <i>Alexandrium minutum</i> od 1000 ćel./l u odnosu na kontrolne uslove	Comeau i sar., 2019
Stepen otvorenosti ljuštura	Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Prirodni uslovi	<i>in situ</i>	Magnetni sistem sa Hall sensorima	Jedinke sa Hall sensorima postavljene na uzgajalište i tokom 10 dana je praćen stepen otvorenosti ljuštura u prirodnim uslovima. Uočen cirkadijalni ritam u pogledu otvorenosti ljuštura	Comeau i sar., 2018
Broj adukcija	Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Crassostrea gigas</i>	Prirodni uslovi	<i>in situ</i>	Sistem na bazi elektronskih pločica	Tokom perioda od 18 mjeseci praćen VG kod jedinki i uporedo praćena aktivnost enzima GST i AChE. Dokazana zavisnost između ispitivanih enzima i VG, što ukazuje pogodnost upotrebe VG za procjenu kvaliteta vode.	Durrieu i sar., 2016

Tabela 2.4. Nastavak

Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Osmotski stres	<i>ex situ</i>	Vizuelno praćenje	VG praćen u laboratorijskim uslovima tokom izlaganja osmotskom stresu – brzom smanjenju saliniteta sa 18 ‰ na 12 ‰. Uočeno zatvaranje ljuštura tokom trajanja testa saliniteta, kao i ponovno otvaranje nakon povratka saliniteta na početne vrijednosti.	Kholodkevich i sar., 2009a
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Studija slučaja i kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus edulis</i>	Fitoplankton, hlorofil <i>a</i> , morske struje	<i>ex situ</i> i <i>in situ</i>	Snimanje kamerom	U laboratorijskim uslovima jedinke hranjenje mikro algama iz roda <i>Rhodomonas</i> sp. i uočeno da pri koncentraciji od 700 ćel./l dagnje zatvaraju svoje ljuštore. U <i>in situ</i> uslovima uočeno da su ljuštore jedinki otvorene kada je koncentracija chl <i>a</i> veća od 1 µg/l	Riisgård i sar., 2006
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Studija slučaja	<i>Perna canaliculus</i>	SoS	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall senzorima	Poređenje VG jedinki koje su imale visok i nizak procenat preživljavanja na vazduhu. Uočeno da jedinke koje su imale visok stepen preživljavanja na vazduhu ranije otvaraju ljuštore	Powell i sar., 2017

Tabela 2.4. Nastavak

Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Uticaj svjetlosti	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall sensorima	Praćen VG tokom dvije godine i uočeno da količina svjetlosti ima više uticaja na VG nego što imaju uticaj endogeni faktori. Tokom dana jedinke zatvaraju ljušturu češće nego tokom noći, što se dovede u vezu sa izbjegavanjem predatora	Gnyubkin, 2010
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Kontinuirani <i>real-time</i> monitoring	<i>Pinna nobilis</i>	Prirodni uslovi	<i>in situ</i>	Magnetna senzorska oprema Honeyell	Tokom dvije godine praćen VG i fizičko-hemijski i biološki parametri vode. Uočene sezonske promjene u VG, tačnije dva obrazca VG, jedan koji je dominantan tokom ljeta i drugi dominantan tokom ostalog dijela godine. Nije uočena korelacije VG sa kiseonikom i chl <i>a</i> , ali je uočeno da je VG direktno pod uticajem jačine i smjera struja.	García-March i sar., 2016
Otvorenost ljuštura i broj adukcija	Studija slučaja	<i>Crassostrea gigas</i>	Toksični fitoplankton	<i>ex situ</i>	Sistem na bazi elektromagnetnih elektroda	Uočen povećan broj adukcija pri većim koncentracijama <i>A. minutum</i> , što je odgovor ponašanja u cilju što efikasnijeg izbjegavanja kontakta sa toksičnim algama	Haberkorn i sar., 2011

Tabela 2.4. Nastavak

Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/ Rezultata	Referenca
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Kontinuirani monitoring	<i>Mytilus edulis</i>	Izgladnjivanje	<i>ex situ</i>	Vizuelno praćenje	Uočeno da se tokom gladovanja smanjuje stepen otvorenosti ljuštura, što je u vezi sa smanjenim stepenom filtracije i respiracijom	Riisgård i Larsen, 2015
Ugao između ljuštura	Studija slučaja	<i>Mytilus edulis</i>	Fitoplankton	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall senzorima	Uočeno da je ugao između ljuštura veći, odnosno stepen otvorenosti ljuštura, sa povećanjem koncentracije hrane u vodenom medijumu	Robson i sar., 2010
Zatvaranje i otvaranje ljuštura, broj adukcija	Studija slučaja	<i>Crassostrea virginica</i>	Hipoksija	<i>ex situ</i>	Strain gauge senzorska oprema	Uočeno zatvaranje ljuštura u uslovima hipoksije, kao i brzi povratak i otvaranje ljuštura kada se vrati optimalna koncentracija kiseonika u vodi	Porter i Breitburg, 2016

2.5.2.2. Osjetljivost otvorenosti ljuštura na različite grupe ksenobiotika

U zimskim periodima se velike količine soli, odnosno NaCl koriste u cilju otapanja snijega i leda na magistralnim putevima. Na taj način NaCl dospjeva u vodene ekosisteme i narušava njihovu ravnotežu. Efekat NaCl kao stresora na promjene VG kod slatkovodne školjke *Anodonta anatina* u *ex situ* uslovima je istraživan od strane Hartmann i sar. (2016). Testirane jedinke su imale povećanu frekvenciju tranzicije i zatvarale su svoje ljuštura na duži period. Autori ukazuju da ispitivani parametri mogu biti korisni u ekotoksikološkim studijama koje uključuju školjke kao bioindikatore hemijskog stresa.

Varijabilnost VG kod školjki se javlja i kao odgovor na druge stresore poput insekticida (npr. Cipermetrina) ili sastojaka kozmetičkih proizvoda (npr. Hidrohinon). Efekat cipermetrina na broj adukcija i zatvaranje ljuštura kod vrste *M. galloprovincialis* je praćen u *ex situ* uslovima i uočeno je zatvaranje ljuštura na duži period, zavisno od koncentracije i dužine vremena izlaganja jedinki (Ayad i sar., 2011). Akutni efekat ekstremno visokih koncentracija hidrohinona na VG kod iste vrste u laboratorijskim uslovima ispitivali su Kholodkevich i sar. (2009a). Tokom jednosatnog izlaganja hidrohinonu u koncentraciji od 1 g/l jedinke su zatvorile svoje ljuštura. Nakon ispiranja stresora i vraćanja jedinki u vodeni medijum bez stresora jedinke su i naredna tri sata držale ljuštura zatvorene, a potom su tokom narednih 10h otvarale i zatvarale ljuštura naizmjenično, nakon čega su ih u potpunosti otvorile. Ovakve promjene i varijacije VG i nakon uklanjanja stresora u suštini ukazuju da jedinke “testiraju” vodu i da im je neophodno određeno vrijeme da bi povratile svoje fiziološke funkcije na prvobitno stanje.

Ispitivanje VG kod vrste *M. edulis* u laboratorijskim uslovima je pokazalo da su jedinke osjetljive na naftu i da je pri najvećim koncentracijama srednja otvorenost ljuštura smanjena, povećano je naizmjenično otvaranje i zatvaranje ljuštura i jedinke su veći dio vremena držale ljuštura zatvorene (Redmond i sar., 2017). Rezultati ukazuju da je VG dobar biomarker za praćenje izloženosti nafti. Martinović i sar. (2015) ukazuju da je zatvaranje ljuštura kod školjke *M. galloprovincialis* u suštini odbrambeni mehanizam koji jedinkama omogućuje da umanje štetne efekte tokom izlaganja nafti.

S obzirom da kanalizacione otpadne vode predstavljaju veliki problem i prijetnju morskome ekosistemu, Beyer i sar. (2013) su pratili uticaj ovog tipa zagađenja na VG kod vrsta

roda *Mytilus*. U laboratorijskim uslovima tokom naizmjeničnog izlaganja čistoj i zagađenoj vodi u trajanju od devet dana, nijesu uočene nikakve razlike u stepenu otvorenosti ljuštura kod ispitivanih jedinki.

Varijabilnost VG usled uticaja teških metala je dokazana u brojnim studijama. Rezultati akutnih *ex situ* izlaganja ukazuju da različiti metali imaju različit efekat na VG ispitivanih jedinki (Fdil i sar., 2006), kao i to da iste koncentracije metala imaju različit efekat na VG kod različitih vrsta školjki (Liu i sar., 2015).

Tabela 2.5. Pregled uticaja različitih grupa ksenobiotika na otvorenost ljuštore školjki

Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
Broj adukcija i zatvaranje ljuštura	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cipermetrin	<i>ex situ</i>	Sistem baziran na modifikaciji induktivnosti prekidača	Jedinke izlagane uticaju pet koncentracija cipermetrina (50, 100, 200, 400 i 800 µg/l). Generalno, kada su izložene uticaju cipermetrina jedinke reaguju smanjenjem stepena otvorenosti ljuštura i povećanjem broja adukcija. Što je koncentracija veća, to je i broj adukcija veći i zatvaranje ljuštura je sve duže. Pri koncentracijama od 400 i 800 µg/l je došlo do potpunog zatvaranja ljuštura kao odgovora na stres. EC ₅₀ za potpuno zatvaranje ljuštura je iznosio 491.67 µg/l.	Ayad i sar., 2011
Frekvencija tranzicije i izbjegavanje ponašanja	Studija slučaja	<i>Anodonta anatina</i>	NaCl	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall senzorima	Jedinke izlagane različitim koncentracijama NaCl Uočena povećanja frekvencija tranzicije kao i zatvaranje ljuštura na duži period kod jedinki u funkciji porasta koncentracija NaCl	Hartmann i sar., 2016

Tabela 2.5. Nastavak

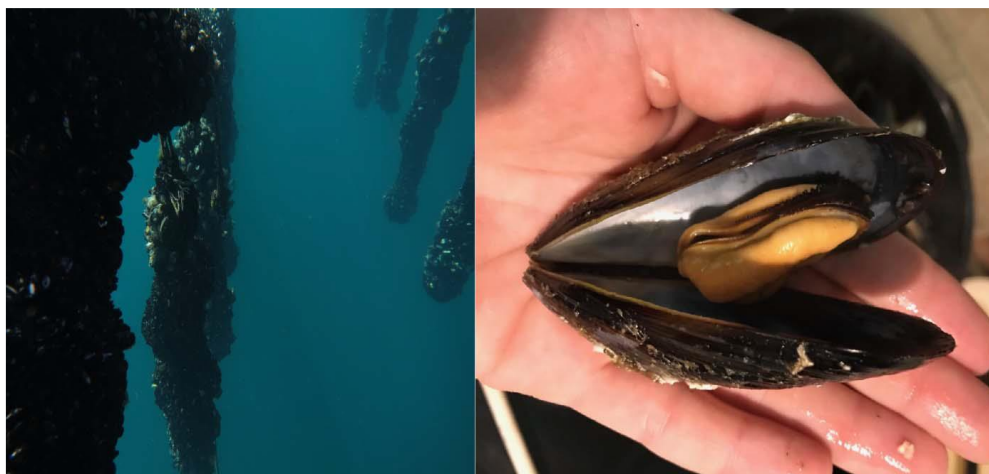
Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
Zatvaranje i otvaranje ljuštura	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hidrohinon	<i>ex situ</i>	Vizuelno praćenje	VG praćen u laboratorijskim uslovima tokom akutnog izlaganja (2h) hidrohinonu u koncentraciji 1g/l. Uočeno da dolazi do zatvaranja ljuštura tokom uticaja stresora. Tek 12h nakon uklanjanja stresora je došlo do stabilizacije VG.	Kholodkevich i sar., 2009a
% otvorenosti ljuštura, brzo otvaranje i zatvaranje ljuštura	Studija slučaja	<i>Mytilus edulis</i>	Nafta	<i>ex situ</i>	Laser senzor koji prati pokrete ljuštura iz daljine bez kontakta sa eksperimentalnim jedinkama	Praćen VG u laboratorijskim uslovima kod jedinki koje su izlagane uticaju nafte i uporedo praćena kontrolna grupa jedinki. Uočena smanjena srednja otvorenost ljuštura, povećano naizjениčno otvaranje i zatvaranje ljuštura, kao i izbjegavanje ponašanja. Rezultati ukazuju da je VG dobar biomarker za praćenje izloženosti nafte	Redmond i sar., 2017
% otvorenosti ljuštura	Studija slučaja	<i>Mytilus</i> sp.	Kanalizacione otpadne vode	<i>ex situ</i>	VG senzorski sistem implementiran od strane IRIS i Biota Guard AS – Norveška	Praćen VG kod jedinki tokom devet dana naizmjeničnog izlaganja čistoj i zagađenoj vodi. Nijesu evidentirane nikakve razlike u VG	Beyer i sar., 2013

Tabela 2.5. Nastavak

Posmatrani parametar	Studija	Vrsta	Ekološki faktor/Stresor	In situ/ex situ	Tehnika	Opis eksperimenta/Rezultata	Referenca
Zatvaranje i otvaranje ljuštura, broj adukcija	Studija slučaja	<i>Corbicula fluminea</i> <i>Hyriopsis cumingii</i> <i>Anodonta woodiana</i>	Cu	<i>ex situ</i>	Magnetni sistem sa Hall sensorima	Uočeno da različite vrste imaju različitu osjetljivost na iste koncentracije Cu u vodenom medijumu	Liu i sar., 2015
Otvorenost ljuštura, izbjegavanje ponašanja, broj adukcija	Studija slučaja	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cu, Cd, Hg, Zn	<i>ex situ</i>	Sistem baziran na modifikaciji induktivnosti prekidača	Uočeno da iste koncentracije različitih metala utiču na različite promjene VG. Generalno pri uticaju teških metala dolazi kako do potpunog zatvaranje ljuštura, tako i do povećanja broja adukcija	Fdil i sar., 2006

2.6. Opis vrste *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

Mytilus galloprovincialis L. 1819, (mediteranska dagnja) (Slika 2.4) je rasprostranjena u oblasti Sredozemnog i Crnog mora, na atlanskoj obali Španije, Portugala i Francuske, sjeverno do Velike Britanije (Gosling, 1992). Najgušće populacije ove vrste u Crnoj Gori se sreću u unutrašnjem dijelu Bokotorskog zaliva. Vrsta preferira zonu plime i osjeke, najčešće do 4 metra dubine (Miletić, 2016). Mediteranska dagnja je jedna od najčešćih vrsta roda *Mytilus*, a tu su još i: *M. edulis*, *M. trossulus* i *M. californianus* (Dailianis, 2011). Vrste roda *Mytilus* su jedne od glavnih uzgojnih vrsta u sektoru morske akvakulture širom Evrope. Mediteranska dagnja je dominantna uzgojna vrsta u marikulturi u Sredozemnom moru.



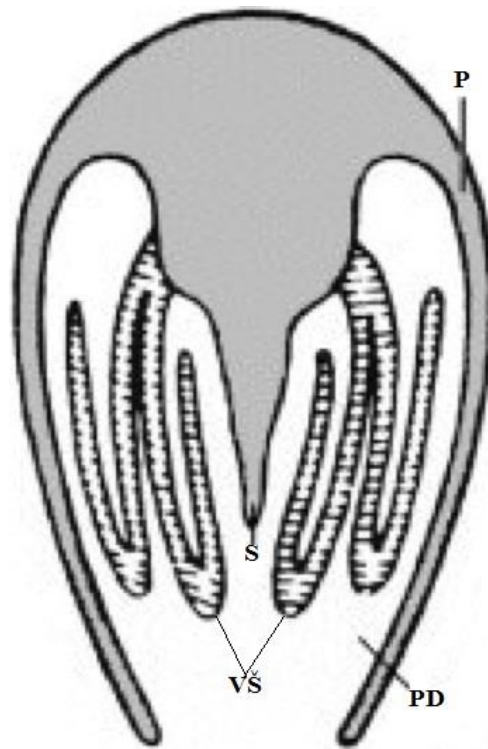
Slika 2.4. *Mytilus galloprovincialis* (Fotografija: Milica Mandić)

Mediteranska dagnja ima trouglastu ljušturu koja je spolja crno-modre boje, dok je unutrašnjost ljušture sedefasta. Uloga ljušture je primarno zaštitna (Dailianis, 2011). U predjelu umba se nalaze bisusne niti koje služe za pričvršćivanje za tvrdi podlogu. Dagnja posjeduje stopalo koje joj pomaže pri kretanju, mada je vrsta generalno slabo pokretna i ubraja se u sesilnu grupu organizama. Ljuštura se sastoji od dva kapaka koji su međusobno spojeni elastičnim ligamentom. Otvaranje i zatvaranje ljuštura se vrši opuštanjem i kontrakcijom mišića zatvarača – aduktora. Proces otvaranja i zatvaranja ljuštura je u tijesnoj vezi sa stepenom filtracije vode i reguliše protok vode kroz plaštanu duplju (Gosling, 1992).

Kod mediteranske dagnje je zastupljen filtracioni način ishrane. Zbog ovakvog načina ishrane mediteranska dagnja se smatra prirodnim “čistačem” morske vode. Količina vode koju

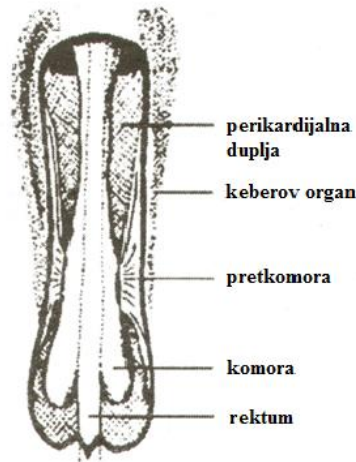
daginja profiltrira je velika, od autora do autora se prikazuju različiti podaci. Tako se količina vode koju daginja profiltrira kreće od 5 – 6 l/h pa do više od 7 l/h (Gosling, 2003; Stabili i sar., 2005; FAO, 2011). Glavni organi hranjenja kod dagnje su škrge i usni nabori, pomoću kojih vrše filtraciju i ingestiju suspendovanih materija u vodi (Ivošević, 2013). Dakle, uloga škrge kod dagnji je dvojak i veoma važna kako u procesu respiracije tako i u ishrani. Glavnu hranu mediteranske dagnje predstavlja fitoplankton, a pored toga vrsta se takođe hrani zooplanktonom, bakterioplanktonom i detritusom (Davenport i sar., 2000; Prato i sar., 2010). Dominantne fitoplanktonske grupe u ishrani su dijatomeje, dinoflagelate i silikoflagelate (Jasprica, 2003). Filtracija vode zavisi od količine rastvorenih materija u vodi, pa tako kada je količina rastvorenih materija u vodi mala (najčešće tokom zimskih mjeseci) dagnje ne vrše filtraciju i na taj način štede energiju (Gosling, 1992). Suprotno, kada je količina rastvorenih materija iznad koncentracije koja odgovara zasićenju digestivnog sistema, količina usvojenih materija ostaje približno konstantna, a višak se izbacuje kao pseudofeces (Ivošević, 2013). Svi organi osim stopala su pokriveni trepljastim epitelom, pa tako plašt i cijela površina tijela imaju ulogu u respiraciji i ishrani (Ivošević, 2013; Raković, 2015).

Škrge kod dagnji dijele plaštanu šupljinu na inhalacionu i ekshalacionu komoru. Voda koja ulazi kroz ulazni (inhalacioni) otvor se usmjerava u inhalacionu, a zatim u ekshalacionu komoru pomoću cilija na škragama i na površini plašta, te izlazi kroz izlazni (ekshalacioni) otvor (Ivošević, 2013). Škrge dagnji su građene od škržnih vlakana na kojima se nalaze tri vrste cilija (lateralne, laterofrontalne i frontalne) i svaka od njih ima određenu dužinu, raspored, smjer i ulogu, a škržna vlakana su međusobno spojena i ojačana na način što su njihove cilije isprepljetane (Matoničkin i sar., 1998; Gosling, 2003 – cit. Ivošević, 2013). Ovakav tip škrge se označava kao filibranhijalne škrge (Slika 2.5) i na osnovu građe škrge dagnje su svrstane u podklasu Filibranchia. Ulogu u transportu i prikupljanju hrane pored cilija ima i mukus koji luče mukozne ćelije škržnih vlakana (Beninger i Dufour, 1996; Beninger i sar. 1997; Dufour i Beninger, 2001 – cit. Ivošević, 2013) i kao krajnji rezultat zajedničkog djelovanja cilija je transport za sluz vezanih čestica hrane prema bazi škrge ili prema njihovim slobodnim rubovima, odakle se transportnim cilijarnim žljebovima prebacuju do usnih nabora (Jørgensen, 1990; Gosling, 2003 – cit. Ivošević, 2013).



Slika 2.5. Vlaknaste – filibranhijalne škrge, P – plašt; PD – plaštana duplja; S – stopalo; VŠ – škržna vlakanca
(Preuzeto sa sajta: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/filibranchia/24484>)

Sistem za cirkulaciju kod školjki se sastoji od srca, prednje i zadnje aorte i sistema lakuna i sinusa (Eggermont i sar., 2020). Srce je smješteno u perikardijumu i sastoji se od dvije pretkomore i jedne komore (Zelić, 2015; Eggermont i sar., 2020). Kroz sistem cirkuliše hemolimfa, a glavni pigmenti su hemocijanin i hemoglobin. Prikaz srca školjki sa dorzalne strane je dat na slici 2.6.

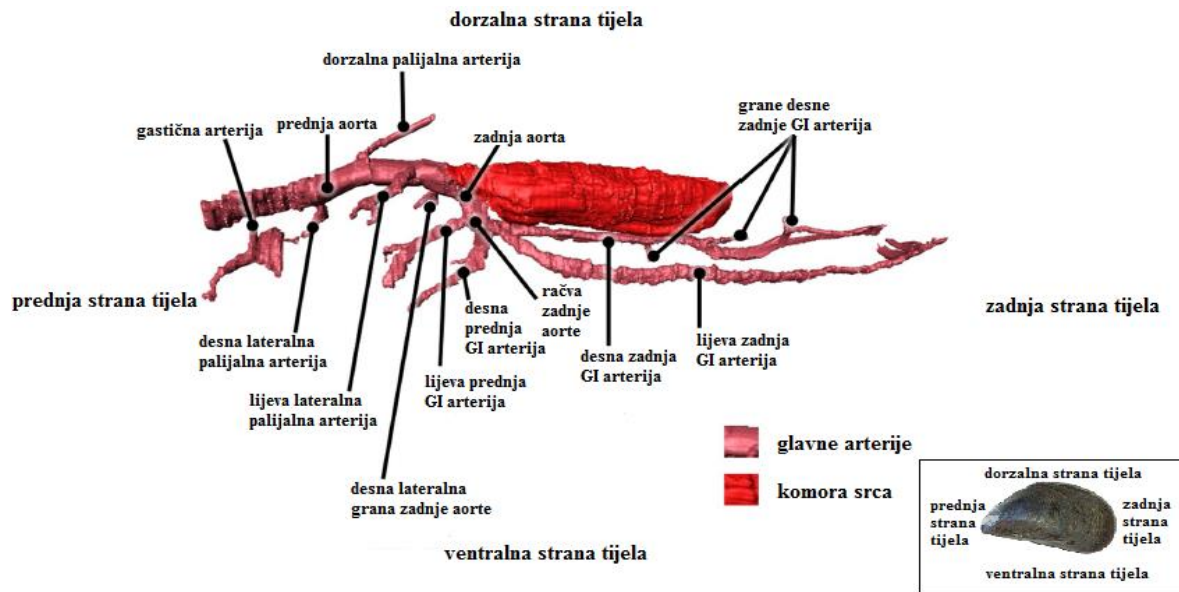


Slika 2.6. Prikaz srca školjki sa dorzalne strane tijela (Preuzeto sa sajta:

<https://slideum.com/doc/1629388/classis-bivalvia>)

Srce se kod dagnji nalazi na dorzalnoj strani tijela i smješteno je u blizini bubrega odnosno Bojanusovih organa (Zelić, 2015; Eggermont i sar., 2020). Ka prednjoj strani tijela od komore srca se nastavljaju prednja i zadnja aorta. Aorte izlaze iz komore na istom nivou, s tim što je zadnja aorta zaokrenuta za 180° i ide prema zadnjem dijelu tijela. Zadnja aorta se račva na dvije glavne arterije, a to su lijeva i desna gastrointestinalna arterija i obje prate prvi gastrointestinalni segment u zadnjem dijelu tijela. Zadnja arterija takođe ima manju granu, odnosno desnu lateralnu granu koja ide prema plaštu. Prednja aorta se račva na lijevu i desnu prednju gastrointestinalnu arteriju koje prate prvi gastrointestinalni segment u prednjem dijelu tijela. Ostale grane prednje aorte su: dorzalna palijalna arterija, lijeva i desna lateralna palijalna arterija i gastrična arterija (Eggermont i sar., 2020) (Slika 2.7).

Na ventralnoj strani komore su dva otvora koji je povezuju sa dvije pretkomore i tu se nalaze atrio-ventrikularni zalisci. Zidovi pretkomora su naborani i imaju brojne divertikulume čija je uloga u filtriranju hemolimfe kao perikardijalna žlijezda – Keberov organ (Pirie i George, 1979; Andrews i Jennings, 1993; Seo i sar., 2014). Na ventrolateralnoj strani lijeve i desne pretkomore ulaze lijeva i desna kosa vena (Eggermont i sar., 2020).

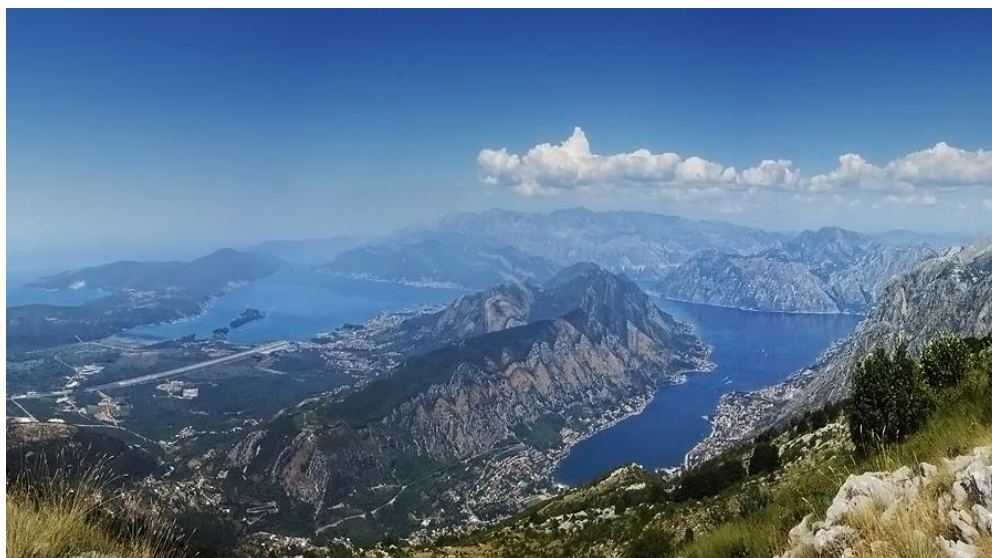


Slika 2.7. Građa kardiovaskularnog sistema kod vrsta roda *Mytilus* (Preuzeto iz: Eggermont i sar., 2020)

Fiziološki odgovori organizma na stres se dešavaju na različitim nivoima biološke organizacije. Boljim razumijevanjem fizioloških odgovora kod morskih beskičmenjaka se mogu bolje predvidjeti moguća ograničenja njihove aklimatizacije i identifikovati evolucione adaptacije specifičnih osobina nastalih usled dejstva jednog ili više stresora (Solan i Whiteley, 2016). U zavisnosti od izvora i inteziteta stresa zavisi i samo aktiviranje odgovora organizma, odnosno mehanizama zaštite i strategija preživljavanja. Dagnje su korisni organizmi za procjenu stanja životne sredine putem biomonitoring programa jer pružaju ćelijske i fiziološke odgovore/reakcije na različita stresna stanja (Garmendia i sar., 2011). Izvori fiziološkog stresa kod dagnji mogu biti različiti: abiotički stres poput termalnog (Collins i sar., 2019), osmotskog stresa (Bakhmet i sar., 2005) i hipoksije (Sui i sar., 2017), potom biotički stres poput dostupnosti hrane (Lesser i sar., 2010) i toksičnog fitoplanktona i biotoksina (Oliveira F. i sar., 2020) ili pak različiti oblici zagađenja (Bakhmet i sar., 2009; Bellas i sar., 2014; Prinz i Korez, 2020). U uslovima stresa dagnje prvo zatvaraju svoje ljuštore i na taj način trenutno štite organizam od nepovoljnog djelovanja stresora (Kramer i sar., 1989; Martinović i sar., 2015). Tako u uslovima termalnog i osmotskog stresa, dagnje zatvaraju svoje ljuštore, smanjuju srčani ritam i prelaze sa aerobnog na anaerobni metabolizam (Kholodkevich i sar., 2009a; Tagliarolo i McQuaid, 2015).

3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA – BOKOKOTORSKI ZALIV

Bokokotorski zaliv je poluzatvoreni akvatorijum smješten na jugoistoku Jadranskog mora (Slika 3.1). Zaliv zauzima površinu od oko 87 km² (Joksimović i sar., 2016). Na osnovu morfologije se može podijeliti u tri manja basena: Hercegnovski zaliv, Tivatski zaliv i Kotorsko-Risanski zaliv, koji su međusobno povezani tjesnacima Kumbor i Verige (Bortoluzzi i sar., 2016). Srednja dubina zaliva je 27.3 m, dok maksimalna dubina ne prelazi 65 m (Joksimović i sar., 2016). Prema Milojević (1953) postanak zaliva se pripisuje dejstvu tektonskih sila i fluvijalne erozije. Dno zaliva je uglavnom prekriveno glinom i glinastim pijeskom (Lepetić, 1965).



Slika 3.1. Bokokotorski zaliv (Fotografija: <https://www.google.com>)

Struje u zalivu pri površini imaju uglavnom izlazni tok, koji primarno zavisi od vjetrova, dok u pridnenim slojevima strujanje ima ulazni tok koji uglavnom zavisi od priliva slatkih voda (Bellafiore i sar., 2011). U unutrašnjem dijelu zaliva se od jesenjeg do proljećnog perioda javljaju i vertikalne struje koje podižu nutrijente i detritus sa dna i time doprinose kvantitativnom povećanju nutrijenata u vodi i većoj produktivnosti (Mandić S. i sar., 2016).

Slatke vode koje dolaze sa kopna, kao i iz podzemnih izvora imaju značajan uticaj na fizičko-hemijske parametre vode u zalivu. U zaliv se uliva 9 rijeka i četiri podzemna izvora od kojih je jedan na samom ulazu u zaliv (Bellafiore i sar., 2011). Rijeka Škudra i Široka su

aktivne tokom cijele godine, dok su ostale rijeke aktivne samo za vrijeme kasne jeseni, zime ili ranog proljeća. Svi ovi izvori i rijeke dobijaju vodu iz Lovćenskog i Orjenskog masiva gdje se nalazi i najkišovitije područje u Evropi, Crkvice sa 5840 mm godišnjih padavina (Magaš, 2002 – cit. Pestorić, 2013).

Zaliv se takođe karakteriše i obilnim padavinama u periodu od jeseni do proljeća, što takođe ima velikog uticaja na fizičko-hemijske parametre vode. Tako su u periodu od jeseni do proljeća usled velikog priliva slatke vode snižene vrijednosti temperature i saliniteta, što se posebno odražava na površinski sloj vode, dok je tokom ljeta situacija suprotna, odnosno usled manje količine ili potpunog odsustva padavina, kao i manjeg priliva slatke vode sa kopna, dolazi do povećanja temperature i saliniteta vode, posebno u površinskom sloju.

Boja vode u zalivu se kreće od plave do zelenkaste, a tokom perioda jakih kiša usled spiranja zemljišta sa okolnog terena boja može biti i braon-žuta. Providnost vode se kreće u opsegu od 3 do 16 m (Mandić S. i sar., 2016) zavisno od perioda godine i uslova koji u tom periodu preovlađuju.

Zaliv je pod intenzivnim negativnim antropogenim pritiskom, usled konstantnog rasta broja stanovnika, kao i sve većeg broja kruzera (Stanković i sar., 2011; Joksimović i Stanković, 2012). Ovi faktori dovode do sve većeg organskog opterećenja zaliva. Posebno treba istaći još uvijek neregulisani kanalizacioni sistem, gdje se otpadne vode ispuštaju direktno u zaliv. Takođe je neophodno pomenuti bivše brodogradilište koje je smješteno u Bijeloj i koje je izvor toksičnog grita, koji je neadekvatno odložen. Zbog svega navedenog, jasno je da je u skorijoj budućnosti neophodno implementirati urgentni monitoring zagađenja (integrirani hemijski i biološki monitoring) u cilju pravovremenog djelovanja i spriječavanja negativnih posledica po morski ekosistem, kao i samog čovjeka.

4. CILJEVI

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je optimizacija sistema za kontinuirano praćenje statusa voda obalnog mora korišćenjem fizioloških biomarkera mediteranske dagnje: srčanog ritma i pokreta ljuštare.

Tokom kontinuiranog eksperimenta u trajanju od godinu dana ispitana je osjetljivost odabrane vrste i automatizovanog *ex situ* sistema na prirodna variranja ekoloških faktora (koji su praćeni mjesečnom dinamikom).

Ispitana je pouzdanost sistema za rano upozorenje, varijabilnost fizioloških biomarkera kod dagnje, optimalno vrijeme korišćenja odabranog bioindikatora u procesu kontinuiranog biomonitoringa, kao i nedostaci postojećeg biomonitoring sistema u cilju njegovog daljeg usavršavanja i implementacije, uključujući i unapređenja postojećeg automatizovanog sistema za praćenje srčane aktivnosti u dijelu vezanom za transfer i obradu signala.

Primjenjivost odabranih fizioloških biomarkera u pasivnom biomonitoringu na nativnim jedinkama mediteranske dagnje sa odabranih lokaliteta u gradijentu zagađenja ispitana je na odabranoj studiji slučaja u Bokokotorskom zalivu.

Istraživanja u okviru ove disertacije treba da daju doprinos u primjeni biomonitoring sistema zasnovanog na praćenju fizioloških parametara dagnje kao sistema za rano upozorenje, koji bi u kombinaciji sa ekološkim monitoringom, baziranim na određivanju fizičko-hemijskih i bioloških parametara, omogućio potpuniji uvid u stanje morskog ekosistema, rano otkrivanje ekosistemski relevantnih promjena ekoloških faktora i blagovremeno upozorenje na potencijalne akcidentne situacije izazvane hemijskim stresorima.

5. MATERIJAL I METODE

5.1. Eksperimentalna postavka

Eksperimentalna postavka je obuhvatala kontinuirani biomonitoring, tj. primjenu automatizovanog sistema za kontinuirani monitoring fizioloških odgovora dagnji na uzgajalištu školjki u Orahovcu i studiju slučaja, tj. primjenu automatizovanog sistema za procjenu ekotoksikološkog stanja odabranih lokaliteta u Bokokotorskom zalivu.

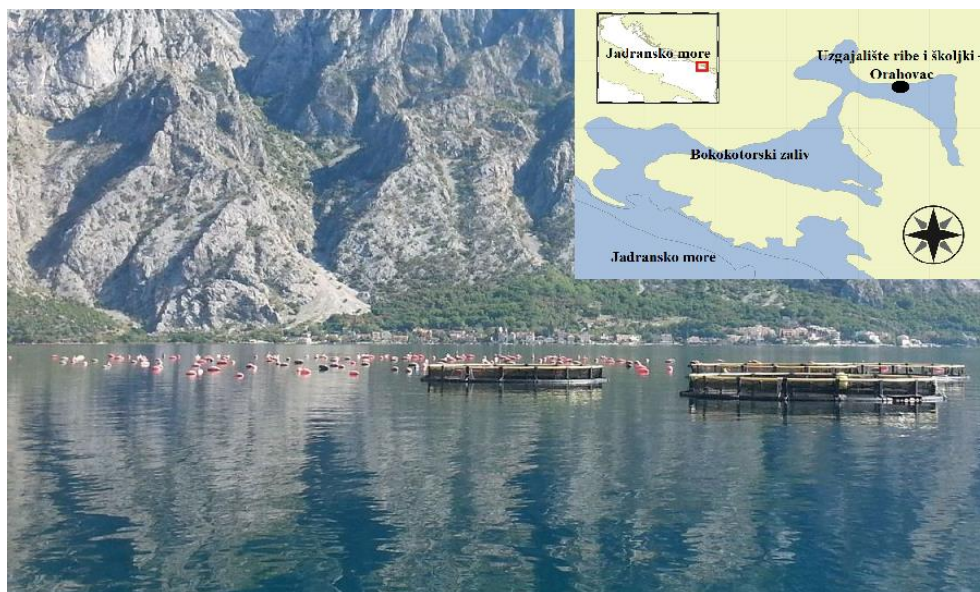
Kontinuirani monitoring fizioloških odgovora dagnji, u trajanju od godinu dana je obuhvatao praćenje bazalnog HR i VG školjki u kontrolnim uslovima, bez prisustva stresora, definisanje opsega prirodne individualne i grupne varijabilnosti eksponiranih jedinki u funkciji vremenske varijabilnosti (sezonska dinamika, starenje jedinki). Tokom kontinuiranog monitoringa fizioloških odgovora dagnji izvođeni su testovi saliniteta mjesečnom dinamikom u trajanju od godinu dana, sa ciljem praćenja promjena srčanog ritma, stepena i trajanja zatvorenosti ljuštura školjki u uslovima ekstremnog stresa i praćenja oporavka jedinki i grupe eksponiranih individua od stresa, definisanja opsega individualne i grupne varijabilnosti u odgovoru na stres i oporavku na stres u funkciji vremenske varijabilnosti (sezonska dinamika, starenje eksponiranih individua) i adaptacije na stres tokom ekperimentalnog perioda.

U studiji slučaja uzorkovane su reprezentativne populacije školjki sa odabranih lokaliteta u Bokokotorskom zalivu tokom dvije sukcesivne godine. U laboratoriji Instituta za biologiju mora izvođeni su testovi saliniteta na automatskom sistemu u cilju praćenja promjena fizioloških markera i vremena potrebnog za oporavak nakon stresa u funkciji procjene fiziološkog stanja jedinki/populacija sa različitih lokaliteta u gradijentu zagađenja. U okviru studije slučaja izvršeno je koreliranje biološkog odgovora sa podacima fizičko – hemijskog i biološkog monitoringa morske vode odabranih lokaliteta od interesa.

5.1.1. Kontinuirani monitoring fizioloških odgovora dagnji

Kontinuirani monitoring HR i VG dagnji je sproveden na uzgajalištu ribe i školjki u Orahovcu (Kotorski zaliv), u periodu od 1. aprila 2016. do 31. marta 2017. godine (Slika 5.1).

Automatizovani sistem za kontinuirani monitoring fizioloških biomarkera odabrane bioindikatorske vrste je postavljen *ex situ* u laboratoriji izgrađenoj na samoj obali mora. U laboratoriji su instalirani akvarijumi sa protočnim sistemom. Kroz akvarijume je konstantno proticala morska voda, koja se sistemom cijevi i pomoću električne protočne pumpe dopremala sa dubine od 4 m. Ova dubina je odabrana zbog minimalnih varijacija saliniteta, s obzirom da je Kotorski zaliv pod jakim uticajem slatkih voda kako sa kopna tako i iz podzemnih izvora u moru, što značajno utiče na snižavanje saliniteta posebno u površinskom sloju vode. Takođe, u prirodnim uslovima, dagnje preferiraju zonu plime i osjeke, najčešće do 4 metra dubine.



Slika 5.1. Uzgajalište riba i školjki u Orahovcu

Uslovljeno specifičnostima mjerne opreme, za kontinuirani monitoring je korišćeno 16 jedinki, jer su bila uvezana dva seta opreme za praćenje HR, kao i jedan set (16 kanala) za praćenje VG školjki (Slika 5.2). Jedinke približno iste dužine (50 mm) su uzete sa uzgajališta, sa dubine od 4 m i smještene u akvarijume, nakon čega su postavljeni senzori za monitoring

HR i VG. Praćeni su sledeći biomarkeri: HR (broj otkucaja/minuti), VG (%) i broj adukcija. Tokom jednogodišnjeg trajanja monitoringa od ukupno 16 jedinki cijeli eksperiment je preživjelo 12 jedinki.

Sa ciljem određivanja prirodne individualne i grupne varijabilnosti eksponiranih jedinki u funkciji vremenske varijabilnosti odabrane su najbolja, prosječna i najlošija školjka. Procenat otvorenosti ljuštura školjki i konstantnost srćanog ritma ispitivanih jedinki svakog mjeseca tokom trajanja kontinuiranog monitoringa predstavljali su kriterijume za odabir najbolje, prosjećne i najlošije školjke. Sa ciljem analiziranja individualne varijabilnosti tokom trajanja monitoringa odabrani su početni mjesec monitoringa (april 2016), mjesec sredinom trajanja monitoringa (avgust 2016) i poslednji mjesec monitoringa (mart 2017).



Slika 5.2. Automatizovani sistem za kontinuirani monitoring fizioloških biomarkera dagnji

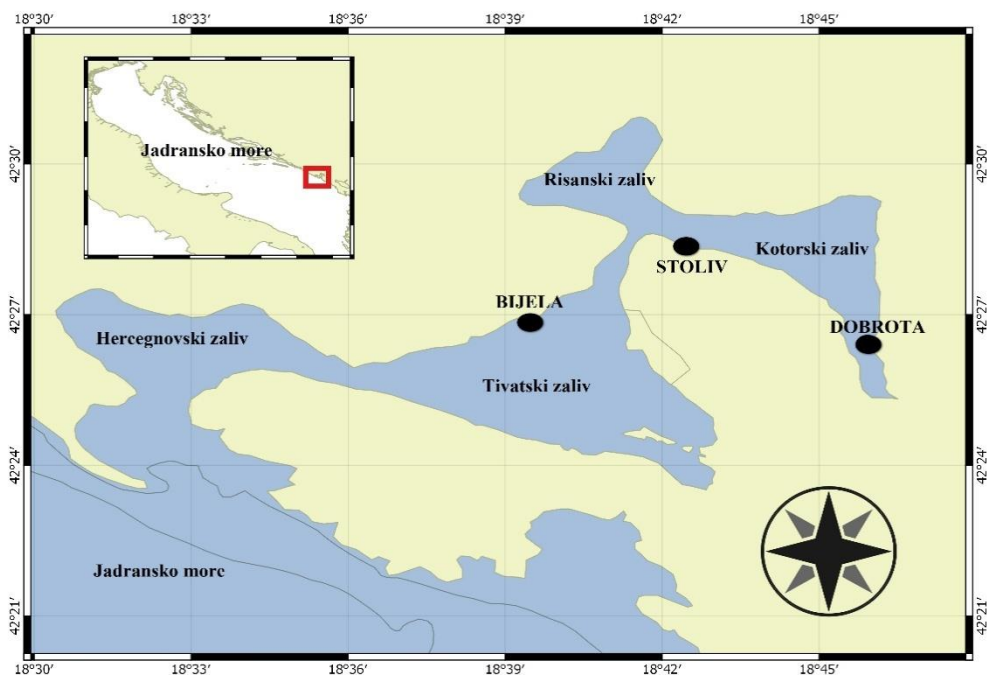
Tokom kontinuiranog monitoringa fizioloških odgovora dagnji, mjesećnom dinamikom su izvođeni testovi saliniteta. Test saliniteta, brzo smanjenje (tokom 2–3 minuta) saliniteta vode za 50 % u odnosu na prirodne vrijednosti, se koristio za procjenu fiziološkog stanja jedinki (prema Kuznetsova, 2013). Smanjenje saliniteta je postignuto dodavanjem destilovane vode (prema Turja i sar., 2014). Dagnje su izlagane smanjenom salinitetu u trajanju od 1 h, nakon ćega je uslijedilo brzo vraćanje (tokom 2–3 minuta) saliniteta na početnu vrijednost, tako što je voda iz akvarijuma ispušćena i zamijenjena sa vodom iz prirodnog staništa. Tokom cjelokupnog perioda trajanja testa praćeni su temperatura i salinitet vode. Temperatura i salinitet su mjereni sondom (Multiline P4; WTW). Temperatura vode

tokom trajanja testa je varirala ± 0.2 °C u odnosu na temperaturu prije početka testa. Tokom trajanja eksperimenta, HR dagnji je registrovan i čuvan u formatu binarnih (*.bin) i tekstualnih datoteka (*.txt). U ovom tesu T_{rec} i CV_{HR} su se koristili kao biomarkeri fiziološkog stanja dagnji (prema Kholodkevich i sar., 2016).

T_{rec} je izračunat kao vrijeme koje je dagnjama potrebno da nakon testa saliniteta povrate inicijani srčani ritam, ritam koji su imale prije izlaganja stresu (smanjenom salinitetu). T_{rec} je izračunat za svaku jedinku posebno, a zatim je izračunata srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki. Koeficijent varijacije srčanog ritma CV_{HR} (%) je izračunat po formuli $CV_{HR} = SD/HR_m$, gdje je SD standardna devijacija, a HR_m je srednja vrijednost srčanog ritma analizirane grupe, izmjerena nakon oporavka dagnji (prema Kuznetsova i sar., 2018).

5.1.2. Studija slučaja

Studija slučaja je obuhvatila praćenje HR usled simulacije fiziološkog stresa (brzo smanjenje saliniteta vode) kod dagnji sa odabranih lokaliteta u Bokokotorskom zalivu: Dobrota, Stoliv i bivše brodogradilište Bijela, tokom dvije sukcesivne godine (Slika 5.3). Lokaliteti su odabrani na osnovu različitih antropogenih uticaja kojima su izloženi. Dobrota je pod jakim uticajem nereguliranih kanalizacionih otpadnih voda, a takođe se u blizini nalazi i luka Kotor. Bivše brodogradilište Bijela predstavlja deponiju neregulisanog grita, dok je Stoliv odabran kao referentna lokacija na osnovu literaturnih podataka (Martinović i sar., 2013a).



Slika 5.3. Lokaliteti na kojima je sprovedena studija slučaja

U prvoj godini istraživanja sa svakog odabranog lokaliteta je uzorkovano 30–35 adultnih jedinki dužine ljuštura (50–60 mm), dok je u drugoj godini istraživanja sa svakog odabranog lokaliteta uzorkovano 18–20 adultnih jedinki približno iste dužine ljuštura (50–55 mm), što je definisano Naredbom o zabrani lova i stavljanja u promet riblje mladi, nedoraslih riba i drugih morskih organizama (Sl. list CG, 65/15). Uzorkovane jedinke su transportovane do laboratorije. U laboratoriji je u prvoj godini istraživanja odabrano 16 jedinki sa svakog od pomenutih lokaliteta, koje su očišćenje od obraštajnih organizama i na ljušturu u regionu srca su im postavljeni senzori sa ciljem registrovanja HR (korišćena su dva seta opreme za praćenje HR). U drugoj godini istraživanja, u laboratoriji je odabrano 8 jedinki sa svakog od pomenutih lokaliteta, koje su očišćenje od obraštajnih organizama i na ljušturu u regionu srca su im postavljeni senzori sa ciljem registrovanja HR (korišćen je jedan set opreme za praćenje HR). Grupa od 16 odabranih jedinki u prvoj godini istraživanja, odnosno 8 odabranih jedinki u drugoj godini istraživanja, sa svakog od lokaliteta je potom stavljena u zasebne akvarijume sa morskom vodom koja je donesena sa lokaliteta na kojima su školjke uzorkovane i aklimatizovala se tokom naredna 24 h sa primarnim ciljem stabilizacije HR. Nakon

stabilizacije HR dagnje su podvrgnute testu saliniteta koji je opisan u poglavlju 5.1.1 uključujući i opis praćenih biomarkera (T_{rec} i CV_{HR}).

U studiji slučaja su se na pomenutim lokalitetima tokom obje godine istraživanja pratili sledeći fizičko-hemijski i biološki parametri vode: temperatura, salinitet, koncentracija kiseonika, sadržaj nitrita, ukupne koliformne i fekalne koliformne bakterije. Ovi parametri su izdvojeni na osnovu Uredbe o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (Službeni list CG, 27/2007). U prvoj godini istraživanja temperatura i salinitet su mjereni *in situ* refraktometrom WY-100. U drugoj godini istraživanja temperatura i salinitet su mjereni *in situ* sandom (Multiline P4; WTW). Tokom obje godine istraživanja, koncentracija kiseonika u vodi je određena metodom po Winkleru (Winkler, 1888), dok je određivanje sadržaja nitrita izvršeno metodom Strickland i Parsons (1972) koja je modifikovana prema „Protocols for the joint global ocean flux study (JGOFS) core measurements (1994)”. Za ukupne i fekalne koliformne bakterije je korišćena metoda MEST EN ISO 9308–1:2011.

5.2. Fizičko-hemijski i biološki parametri morske vode i tkiva dagnji

Na uzgajalištu školjki u Orahovcu mjesečnom dinamikom u trajanju od godinu dana (april 2016. – mart 2017. godine) su praćeni fizičko-hemijski i biološki parametri morske vode, sadržaj biotoksina u tkivu dagnji i kondicioni indeks dagnji. Akumulacija 11 metala u tkivu dagnji je praćena tokom četiri sezone u periodu od aprila 2016. do marta 2017. godine.

Sa ciljem procjene varijabilnosti odgovora eksponiranih jedinki u funkciji uobičajenih mjesečnih i sezonskih promjena ekoloških faktora praćeni su sledeći fizičko-hemijski i biološki parametri morske vode: temperatura, salinitet, koncentracija i zasićenje kiseonikom, providnost vode, sadržaj nutrijenata i koncentracija hlorofila *a*. Voda je uzorkovana sa dubine od 4 m Niskin crpcem zapremine 5 l.

Temperatura i salinitet su mjereni *in situ* sandom (Multiline P4; WTW). Koncentracija kiseonika u vodi je određena metodom po Winkleru (Winkler, 1888). Providnost vode je mjerena pomoću Secchi diska prečnika 30 cm. Određivanje sadržaja nutrijenata (nitrata, nitrita, fosfata, silikata) izvršeno je metodom Strickland i Parsons (1972) koja je modifikovana prema „Protocols for the joint global ocean flux study (JGOFS) core measurements (1994)”.

Biološka analiza morske vode je uključivala kvantitativno-kvalitativnu analizu fitoplanktona, koncentraciju hlorofila *a*, kao i kvantitativno-kvalitativnu analizu bakterioplanktona – indikatora fekalnog zagađenja.

Kvantitativna i kvalitativna analiza fitoplanktona su vršene metodom po Utermöhl (1958), odnosno upotrebom invertnog mikroskopa Leica DMI4000 B uz korišćenje komorica za sedimentaciju zapremine 25 cm³, kao i upotrebom ključeva za determinaciju (Cupp, 1943; Hustedt, 1930; Schiller, 1933, 1937; Peragallo i Peragallo, 1965; Dodge, 1985; Sournia, 1989).

Koncentracija hlorofila *a* je određena spektrofotometrijskom metodom, prema APHA (1995) koja je u skladu sa procedurom koju predlažu Jeffrey i sar. (1997).

Za ukupne i fekalne koliformne bakterije je korišćena metoda MEST EN ISO 9308-1:2015, a za intestinalne enterokoke metoda (MEST EN ISO 7899 - 2:2011). Prvo su sterilizovani filteri, potom je filtrirano po 100 ml uzorka i napravljena razređenja (10 ml i 1 ml). Inkubacija filter papira na CCA agru za utvrđivanje *E. coli* na 36 ± 2°C je trajala 24 h, a na Slanetz & Bartley agru za utvrđivanje streptokoka na 36 ± 2°C 48h. Potom su na CCA agru prebrojane karakteristične modroplave kolonije koje formira *E. coli*. Filter sa Slanetz & Bartley agra je prenesen na Bile esculin agar i inkubiran najviše 2h na 44 ± 0.5°C. Potom su izbrojane crne kolonije sa karakterističnim oreolom kao intestinalne enterokoke.

Za kvantitativnu i kvalitativnu analizu biotoksina u tkivu dagnji je izdvojeno oko 100g tkiva dagnji koje je smrznuto na -18°C do obrade. Analizirano je ukupno sedam biotoksina (DA, STX, dcSTX, GTX 1,4, GTX 2,3, NEO, i C 1,2) po metodologiji koju predlažu Quilliam i sar. (1995) i AOAC (2005). Korišćen je tečni hromatograf visokog pritiska (eng. High performance liquid chromatography – HPLC) sa DAD i fluorescentnim detektorom. Priprema uzoraka je obuhvatala: homogenizaciju tkiva, ekstrakciju metanolom i sirćetnom kiselinom, centrifugiranje, filtriranje, ekstrakciju na čvrstoj fazi i oksidaciju (za saksitoksine). Granice detekcije i kvantitacije su određene na osnovu standardne devijacije slijepe probe.

Za kvantitativnu i kvalitativnu analizu metala u tkivu dagnji je takođe izdvojeno oko 100 g tkiva koje je do analize smrznuto na -18°C. Analizirano je ukupno 11 metala (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn i Hg) pomoću indukovano kuplovanog plazma-optičkog emisionog spektrometra (ICP-OES), dok je živa analizirana pomoću direktnog živinog

analizatora. Priprema uzoraka je obuhvatala hladno sušenje tkiva na -40°C , usitnjavanje i homogenizovanje. Uzorci su rastvoreni u smješi azotne kiseline i vodonik-peroksida. Za svaku seriju uzoraka su pripremljene i dvije slijepe probe (Perošević i sar., 2018).

Sa uzgajališta školjki u Orahovcu (sa dubine od 4 m), tokom jednogodišnjeg ciklusa, svakog mjeseca je uzimano po 30 dagnji sa ciljem analize kondicionog stanja jedinki (KI) na odabranom lokalitetu za eksperiment prema metodi Davenport i Chen (1987). Procedura je obuhvatala čišćenje ljuštura od obraštaja, a zatim kuvanje dagnji u ključaloj vodi u trajanju od 5 minuta (Slika 5.4). Na digitalnoj vagi preciznosti 0.01 g je mjerena masa skuvanog mesa i masa prazne ljušture. Kondicioni indeks je izračunat po formuli:

$$KI = \frac{\text{masa skuvanog mesa}}{\text{masa skuvanog mesa} + \text{masa ljuštura}} * 100$$



Slika 5.4. Obrada dagnji za preračunavanje kondicionog indeksa po metodi Davenport i Chen (1987)

5.3. Automatizovani sistem za kontinuirani monitoring fizioloških biomarkera

Automatizovani sistem za kontinuirani monitoring fizioloških odgovora dagnji se zasniva na dvije biomonitring metode – metoda za praćenje srčanog ritma dagnji i metoda za praćenje otvaranja i zatvaranja ljuštura školjki. Ovaj sistem ne ograničava aktivnost životinja i ne dovodi do stresa kod životinja. Može se koristiti u laboratorijskim uslovima i na terenu, a prednost korišćenja na terenu jeste rana detekcija prisustva potencijalnih ksenobiotika. Oprema i metode su razvijene u laboratoriji za ekperimentalnu ekologiju Naučno-istraživačkog centra za ekološku bezbjednost u Sankt Peterburgu (eng. Scientific Research Center for Ecological Safety, RAS – SRCES RAS).

5.3.1. Oprema za praćenje srčane aktivnosti (HR oprema)

HR oprema se zasniva na upotrebi neinvazivnog laser fiber-optičkog metoda kod beskičmenjaka koji posjeduju ljušturu (mekušci i rakovi) (Fedotov i sar., 2000; Kholodkevich i sar., 2013). Oprema za snimanje HR se sastoji od osam senzora (težina senzora < 2 g) koji se postavljaju na ljušturu dagnji u predjelu srca (Slika 5.5).



Slika 5.5. Položaj senzora za snimanje srčane aktivnosti dagnji

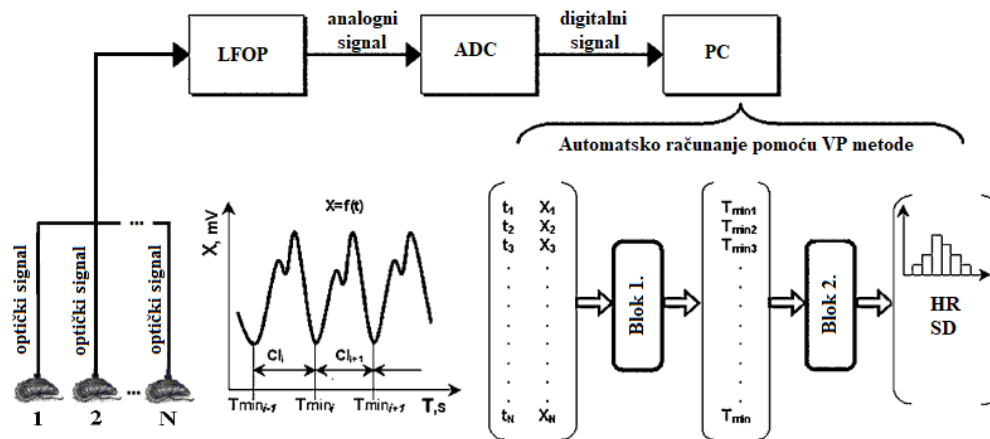
Senzori su preko fiber optičkih kablova povezani sa laserskim optičkim fotopletizmografom (LFOP) koji šalje infracrvene zrake koji osvjetljavaju predio srca. Optički signali modulirani srčanim kontraktilnim aktivnostima životinja sadrže informacije o srčanim aktivnostima. Nakon odgovarajućeg povećanja i filtracije u LFOP, analogni signali se konvertuju u digitalni oblik preko 14-bit 16-kanalnog analogno-digitalnog konvertora (ADC) i preko USB kabla

prenose na računar (PC). Na računaru se za svaki kanal posebno dobija panel sa trenutnim informacijama u grafičkom i numeričkom obliku (Slika 5.6). Svaki panel se sastoji od područja fotopletizmograma (grafički dio) i područja trenutnih vrijednosti parametara srčanog ritma (numerički dio). Područje fotopletizmograma za svaki kanal prikazuje: početni digitalni signal koji se čita sa izlaza ADC (početni fotopletizmogram), sekundarni signal nakon digitalne obrade (filtracije), nulti nivo signala (0 V), oznake za vrijeme od jedne sekunde, ograničenje minimalnog nivoa (amplitude) sekundarnog signala potrebnog za određivanje srčanog intervala, detekciju srčanog intervala, broj kanala i boju zastave, informacije o čuvanju datoteka, prosječnu amplitudu početnog signala (V). Područje trenutnih vrijednosti parametara srčanog ritma prikazuje: broj srčanog intervala, prosječan srčani interval (msec), parametre digitalnog filtera, srčani ritam (broj otkucaja/min), standardnu devijaciju, stres indeks, promjenu srčanog ritma (%) i oznaku cirkadijske aktivnosti (Anonymus, 2013).



Slika 5.6. Panel sa grafičkim i numeričkim prikazom informacija

Softverski program (VarPulse® software) automatski čita podatke sa ADC-a, određuje trajanje svakog srčanog intervala (Blok 1) i onda računa skup karakteristika varijabilnosti srčanog ritma (Blok 2) u realnom vremenu, koristeći metodu varijacijske pulsometrije (eng. variation pulsometry – VP) koja se zasniva na studiji distribucije srčanih intervala i analizi odnosa između oblika i funkcionisanja kardio sistema (Kholodkevich i sar., 2008) (Slika 5.7). Softverski program VarPulse koristi različite tipove datoteka i one su predstavljene u tabeli 5.1. (Anonymus, 2013). Sistem za praćenje HR oglašava alarmni signal u situacijama kada $\geq 50\%$ eksponiranih jedinki istovremeno pokažu značajnu reakciju (Kholodkevich i sar., 2008).



Slika 5.7. Faze analize podataka za uzorak srčanih intervala (obično ne manje od 100 intervala) radi dobijanja karakteristika varijantnih pulsometara (iz Kholodkevich i sar., 2008)

Tabela 5.1. Tipovi datoteka koje koristi VarPulse program (iz Anonymus, 2013)

Naziv datoteke	Oznaka	Format (ekstenzija)	Podaci	Napomene
«xxxx_c6_300_YYMMDDhhmmss.bin» («xxxx» – korisnik određuje, «c6» (c – «srčani», 6 – broj kanala), «300» (stopa uzorkovanja kanalaADC), «YY» (godina), «MM» (mjesec), «DD» (dan), «hh» (sati), «mm» (minuti) i «ss» (sekunde) – dodaje VarPulse program)	bin	Binarna datoteka (.bin)	Početni signal (fotopletizmogram) za sve kanale	Čuvanje podataka. Jedna datoteka za sve kanale. Automatsko prepisivanje u 00:00.
«xxxx_int3_300_YYMMDDhhmmss.txt» («xxxx» – korisnik određuje, «int3» (int – «intervali», 3 – broj kanala), «300» (stopa uzorkovanja kanalaADC), «YY» (godina), «MM» (mjesec), «DD» (dan), «hh» (sati), «mm» (minuti) i «ss» (sekunde) – dodaje VarPulse program)	int	Tekstualna datoteka (.txt)	Vrijednosti srčanih intervala (msec) i trenutne amplitude (mV)	Čuvanje podataka. Zasebna datoteka za svaki kanal. Automatsko prepisivanje u 00:00.

Tabela 5.1. Nastavak

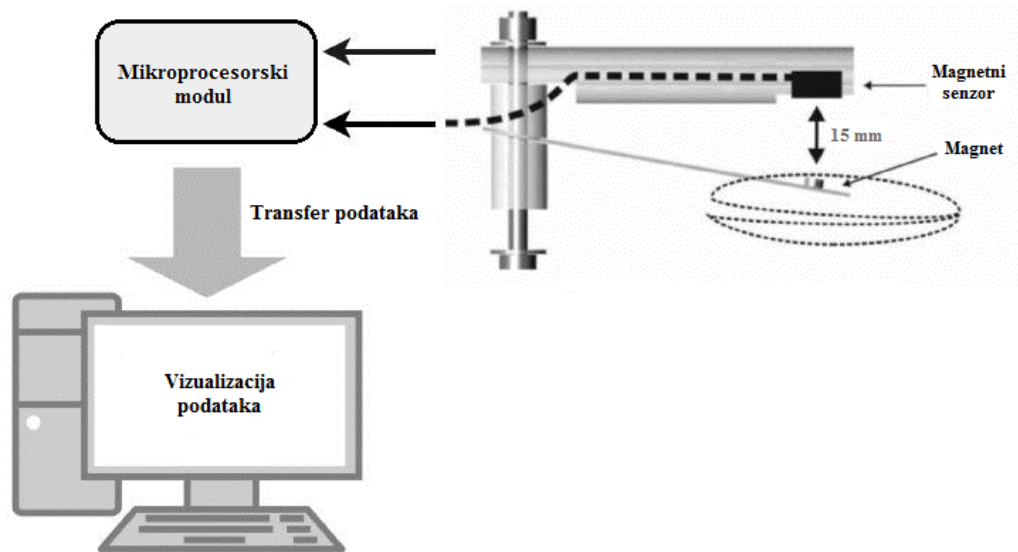
Naziv datoteke	Oznaka	Format (ekstenzija)	Podaci	Napomene
«xxxx_vp3_300_YYMMDDhhmmss.txt» («xxxx» – korisnik određuje, «vp3» (vp – «varijabilnost», 3 – broj kanala), «300» (stopa uzorkovanja kanalaADC), «YY» (godina), «MM» (mjesec), «DD» (dan), «hh» (sati), «mm» (minuti) i «ss» (sekunde) – dodaje VarPulse program)	vp	Tekstualna datoteka (.txt)	Vrijednosti karakteristika varijabilnosti: HR, SD, SI i druge u zavisnosti od verzije programa	Čuvanje podataka. Zasebna datoteka za svaki kanal. Automatsko prepisivanje u 00:00.
«xxxx_cf3_300_YYMMDDhhmmss.txt» («xxxx» – korisnik određuje, «cf3» (cf – «cirkadijska zastava», 3 – broj kanala), «300» (stopa uzorkovanja kanalaADC), «YY» (godina), «MM» (mjesec), «DD» (dan), «hh» (sati), «mm» (minuti) i «ss» (sekunde) – dodaje VarPulse program)	cf	Tekstualna datoteka (.txt)	Vrijednosti zastave (CF) i parametri cirkadijske aktivnosti	Čuvanje podataka. Zasebna datoteka za svaki kanal.
«flag1.txt...flag8.txt» (automatski postavlja VarPulse program)	flag	Tekstualna datoteka (.txt)	Trenutne vrijednosti F, CF, HR, SD, SI, dHR	Čuvanje podataka. Zasebna datoteka za svaki kanal.
«xxxx_1h_300_YYMMDDhhmmss.txt» («xxxx» – korisnik određuje, «1h» (jednočasovna datoteka), «300» (stopa uzorkovanja kanalaADC), «YY» (godina), «MM» (mjesec), «DD» (dan), «hh» (sati), «mm» (minuti) i «ss» (sekunde) – dodaje VarPulse program)	1h	Tekstualna datoteka (.txt)	Vrijednosti karakteristika varijabilnosti	Čuvanje podataka. Jedna datoteka za sve kanale. Automatsko prepisivanje na svakih sat vremena.
«ch3_YYMMDDhhmmss.bmp» («ch3» (3 – broj kanala), «YY» (godina), «MM» (mjesec), «DD» (dan), «hh» (sati), «mm» (minuti) i «ss» (sekunde) – (određuje VarPulse program)	bmp	Grafička datoteka (.bmp)	Područje prikaza fotopletizmograma	Čuvanje podataka. Zasebna datoteka za svaki kanal.

Tabela 5.1. Nastavak

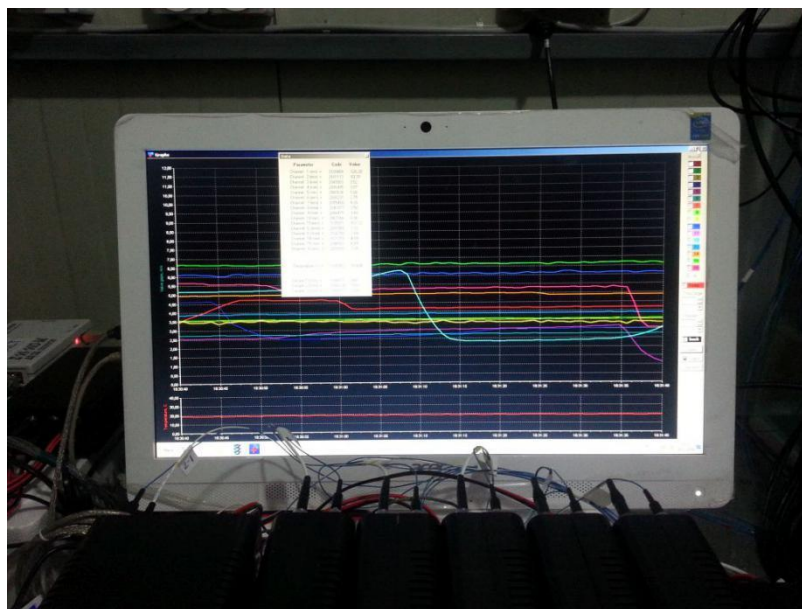
Naziv datoteke	Oznaka	Format (ekstenzija)	Podaci	Napomene
«vp8set.txt» (automatski postavljiva set VarPulse program)		Tekstualna datoteka (.txt)	Podršavanja programa	Čuvanje podataka. Jedna datoteka za sve kanale.
«flag9.txt» (automatski postavljiva - VarPulse program)		Tekstualna datoteka (.txt)	Trenutne vrijednosti za temperaturu i pražnjenje iz VKT-7 računarske jedinice	Čuvanje podataka. Kreira VarPulse program sa VKT-7 uređajem i aplikacijom Vkt7Easy2.

5.3.2. Oprema za praćenje otvaranja i zatvaranja ljuštura školjki (VG oprema)

Oprema za praćenje otvaranja i zatvaranja ljuštura školjki se sastoji od: 16 magnetnih senzora (Hall senzor), mikroprocesorskog modula (upravljačke jedinice), senzora za mjerenje temperature vode i potapajućeg modula sa perforiranim pločama na koje se postavljaju školjke i magnetni senzori. Magnetni senzori se oslanjaju na ljušturu školjki i služe za mjerenje otvorenosti ljuštura (u milimetrima). Potencijalna greška mjerenja magnetnih senzora iznosi +0.1 mm. Senzori su kablovima povezani sa mikroprocesorom u kom se analogni signal transformiše u digitalni oblik koji se dalje prenosi na računar. Na računaru se očitavaju grafici sa vremenom i podacima o otvorenosti ljuštura. Oprema takođe bilježi i temperaturu vode, i daje numeričku i grafičku vizualizaciju dobijenih podataka. Potencijalna greška mjerenja temperaturnog senzora iznosi +0.05 °C. Elektronske komponente VG opreme su dizajnirane za rad u temperaturnom opsegu od -40 °C do +60 °C. Maksimalna dubina uranjanja potapajućeg modula iznosi 3 m i uslovljena je dužinom kablova kojima su magnetni senzori povezani sa mikroprocesorskim modulom (Slike 5.8 i 5.9) (ALLIANCE, 2015).



Slika 5.8. Šematski prikaz opreme za praćenje otvorenosti ljuštura školjki (modifikovano po ALLIANCE, 2015)



Slika 5.9. Grafički i numerički prikaz informacija o otvorenosti ljuštura školjki i temperaturi vode u realnom vremenu

VG oprema se može koristiti za mjerenja pokreta ljuštura školjki u režimu telemetrije (eng. telemetry mode) ili režimu slobodnog rada (eng. free running mode). U režimu telemetrije aplikacija Biomon.exe komunicira sa mikroprocesorskim modulom i obavlja sledeće funkcije: primanje podataka o mjerenjima sa navedenog komunikacijskog porta (eng.

communication port – COM) ili kodne datoteke, snimanje početnih mjerenja kao kodnih datoteka, primarnu i sekundarnu obradu podataka mjerenja sa numeričkim i grafičkim prikazom. U režimu slobodnog rada aplikacija Databiom.exe komunicira sa mikroprocesorskim modulom i obavlja funkcije automatske registracije podataka i njihovog skladištenja na računarskom disku i slanja/primanja podataka putem elektronske pošte (ALLIANCE, 2015).

Softverski program (Biomonitor software) računa otvorenost ljuštura školjki na osnovu formule:

$$Otvorenost\ ljuštura\ (mm) = a4 - \frac{1}{a0 + Nx(a1 + Nx(a2 + Nx * a3))}$$

gdje su: Nx – kod senzora; $a0$ - $a3$ – kalibracioni koeficijenti; $a4$ – maksimalno rastojanje između dva magnetna senzora kada su ljuštura zatvorene. Softverski program Biomonitor koristi različite tipove datoteka i one su predstavljene u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Tipovi datoteka koje koristi Biomonitor program (modifikovano po ALLIANCE, 2015)

Naziv datoteke	Format (ekstenzija)	Napomene
Biomon.exe	Izvršna programska datoteka (.exe)	Izvršna datoteka aplikacije za režim telemetrije
Databiom.exe	Izvršna programska datoteka (.exe)	Izvršna datoteka aplikacije za režim slobodnog rada
Biomon.ini	Konfiguraciona datoteka za pokretanje operativnog sistema (.ini)	Tekstualna datoteka za inicijalizaciju (poslednje sačuvane postavke interfejsa za Biomon.exe)
Databiom.ini	Konfiguraciona datoteka za pokretanje operativnog sistema (.ini)	Tekstualna datoteka za inicijalizaciju (poslednje sačuvane postavke interfejsa za Databiom.exe)
Grafiki.ini	Konfiguraciona datoteka za pokretanje operativnog sistema (.ini)	Tekstualna datoteka za inicijalizaciju (poslednje sačuvane grafičke postavke za Databiom.exe)

Tabela 5.2. Nastavak

Naziv datoteke	Format (ekstenzija)	Napomene
Biomon.grd	Binarna datoteka (.grd)	Datoteka kalibracionih koeficijenta mjernih kanala VG opreme
*.byt	Binarna datoteka (.byt)	Početna mjerenja (kodovi) binarnih datoteka koja se koriste za dalju obradu
*.txt	Tekstualna datoteka (.txt)	Tekstualne datoteke podataka (podaci su odvojeni sa ';' za učitavanje i obradu u MS Excel-u)
Bytsave\	-	Direktorijum za čuvanje podataka od strane Databiom.exe (automatski kreiran)
Bytmail\	-	Direktorijum za podatke primljene elektronskom poštom od strane Databiom.exe (automatski kreiran)
Bytnotmail\	-	Direktorijum za čuvanje podataka od strane Databiom.exe u slučaju greške prilikom slanja podataka putem Interneta (automatski kreiran)
.bmp/.jpg /*.wmf	Datoteke slike (.bmp)/(./jpg)/(./wmf)	Datoteke sačuvanih grafikona
Pkzip.exe/Pkunzip.exe	Izvršna programska datoteka (.exe)	Datoteke programa za automatsko arhiviranje/raspakivanje paketa podataka prilikom slanja/prijema elektronske pošte (kompatibilno samo sa 32-bitnim operativnim sistemom)

5.4. Obrada podataka

5.4.1. Obrada podataka dobijenih pomoću opreme za praćenje srčane aktivnosti

Kada se pokrene VarPulse program, zadana datoteka se automatski prepisuje svakih 10 sekundi (Anonymus, 2013). Softverski program VarPulse skladišti podatke na računarskom disku u formatu binarnih datoteka (*.bin) i u formatu tekstualnih datoteka (*.txt).

VarPulse program omogućuje pregled i analizu podataka iz binarnih datoteka u brzom režimu (eng. fast mode) i režimu u realnom vremenu (eng. real time mode). U okviru brzog režima analiza podataka se vrši maksimalnom dostupnom brzinom procesora, bez prikazivanja signala (fotopletizmograma i sekundarnih signala) i bez mogućnosti promjene postavki ili brzine analize. Režim u realnom vremenu omogućuje analizu podataka u realnom vremenu, uz prikazivanje signala (fotopletizmograma i sekundarnih signala) i uz mogućnost promjene većine podešavanja i brzine analize (Anonymus, 2013).

Format tekstualne datoteke omogućuje dalju obradu i analizu podataka korišćenjem Microsoft Excel programa (ALLIANCE, 2015). Tekstualne datoteke su pomoću Excel makroa konvertovane u format Microsoft Excel radne sveske (*.xlsx), koji je korišćen za dalju statističku obradu i grafički prikaz dobijenih podataka.

5.4.2. Obrada podataka dobijenih pomoću opreme za praćenje otvaranja i zatvaranja ljuštura školjki

Podaci dobijeni u režimu telemetrije se skladište na računarskom disku u formatu kodnih binarnih datoteka (*.byt) – neobrađeni podaci i/ili u formatu tekstualnih datoteka (*.dat/* .txt) sa obrađenim linijama podataka. Kada se pokrene aplikacija Biomon.exe kodne informacije u binarnom formatu se zapisuju svake sekunde, a podaci u formatu tekstualnih datoteka se zapisuju svakih 10 sekundi (ALLIANCE, 2015).

U režimu slobodnog rada aplikacija Databiom.exe skladišti podatke na računarskom disku samo u formatu binarnih datoteka (*.byt) (ALLIANCE, 2015). Binarne datoteke su pomoću aplikacije Biomon.exe konvertovane u format tekstualnih datoteka (*.txt) koji omogućuje dalju obradu i analizu podataka pomoću Microsoft Excel programa i SuperKlop2.0 programa. Dobijene tekstualne datoteke su pomoću Excel makroa konvertovane u format

Microsoft Excel radne sveske (*.xlsx), koji je korišćen za dalju statističku obradu i grafički prikaz dobijenih podataka.

5.5. Statistička obrada podataka

Rezultati jednogodišnjeg *ex situ* eksperimenta kontinuiranog praćenja HR i VG školjki, kao i rezultati praćenja ova dva biomarkera u uslovima stresa (ekstreman pad saliniteta) i oporavka nakon stresa (mjesečnom dinamikom) su obrađeni deskriptivnom statistikom i grafički prikazani korišćenjem Microsoft Excel programa. Normalnost distribucije je analizirana pomoću Shapiro-Wilk testa.

Za poređenje vrijednosti HR najbolje, prosječne i najlošije školjke tokom prvog i poslednjeg mjeseca kontinuiranog monitoringa prvo je korišćen Levenov test homogenosti, a potom Kruskal-Walis test sa Dunn *post hoc* komparacijom.

Za poređenje vrijednosti HR najbolje školjke tokom tri mjeseca (april 2016, avgust 2016, mart 2017) je prvo korišćen Levenov test homogenosti, a potom Kruskal-Walis test sa Dunn *post hoc* komparacijom.

Povezanost fizioloških biomarkera odabranog bioindikatora sa varijabilnim ekološkim faktorima je utvđena multivarijantnim analizama (eng. Principal component analysis – PCA), korišćenjem Excel add-in, Addinsoft, 2019, XLSTAT statistical and data analysis solution. Long Island, NY, USA. (<https://www.xlstat.com>). Korelacije su utvrđene Parsonovim korelacionim koeficijentima, na nivou značajnosti 0.05.

U monitoring studiji slučaja za normalnost distribucije i homogenost varijanse korišćen je Levenov test. Razlike u fiziološkim odgovorima na stres (ekstreman pad saliniteta) populacija sa različitih lokaliteta u gradijentu zagađenja su određene Fišerovim testom (uz analizu varijanse ANOVA) korišćenjem Data Analysis ToolPack in MS Excel 2003 for Windows.

6. REZULTATI I DISKUSIJA

Poglavlje je podijeljeno u tri tematske cjeline. Prva obuhvata rezultate kontinuiranog monitoringa u trajanju od jedne godine. Prikazani su i prodiskutovani rezultati dobijeni jednogodišnjim praćenjem odabranih fizioloških biomarkera kod školjki u *ex situ* monitoring sistemu (srčani ritam i pokreti ljuštore) sa aspekta dnevne i sezonske dinamike u funkciji promjenjivih ekoloških parametara. Drugu cjelinu čini prikaz i diskusija odgovora odabranih biomarkera na ekstremnu promjenu uslova sredine u kontinuiranom i pasivnom biomonitoringu. Prikaz tehničkih problema koji su se javili tokom monitoringa, načina njihovog prevazilaženja kao i aktivnosti u cilju unapređenja opreme za monitoring u dijelu prenosa podataka dat je trećoj cjelini.

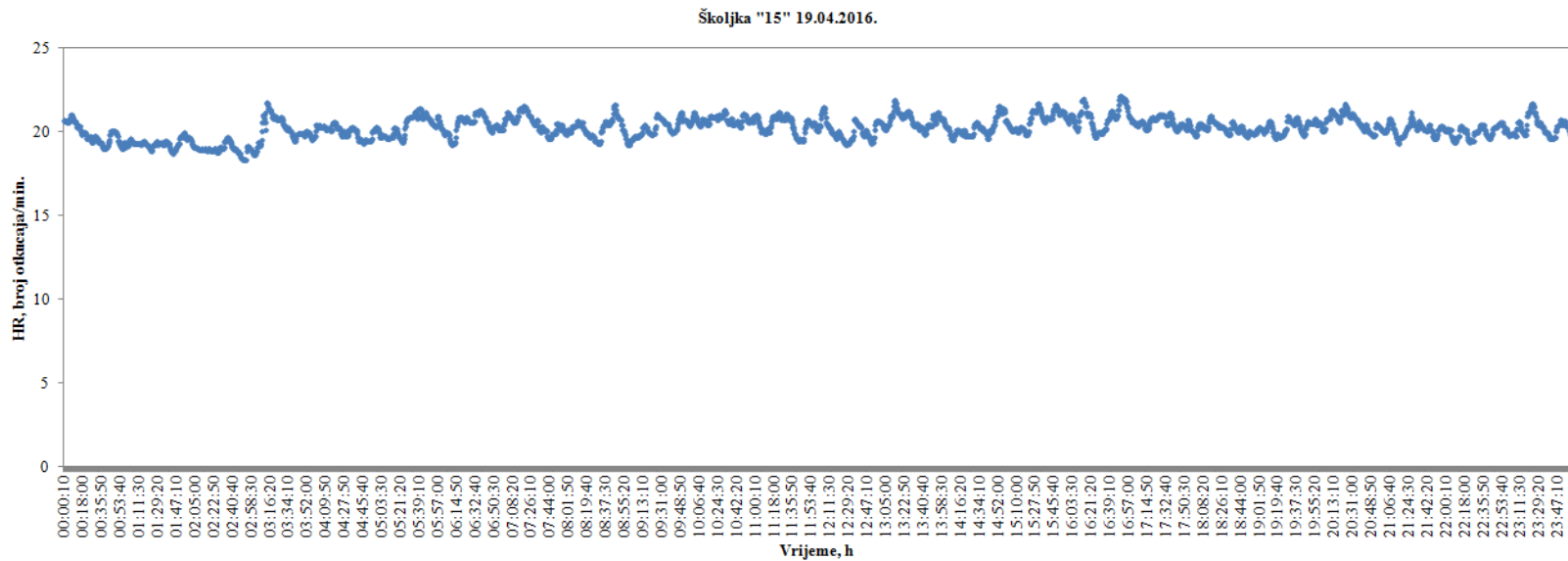
6.1. Kontinuirani monitoring fizioloških biomarkera dagnji

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio da se ispita prirodna individualna i grupna varijabilnost fizioloških odgovora test organizma tokom kontinuiranog *ex situ* monitoringa u trajanju od godinu dana. Odabir lokacije, izostanak akcidentnih situacija i direktnog zagađenja tokom perioda ispitivanja omogućio je određivanje dnevne i sezonske varijabilnosti odabranih fizioloških odgovora u odsustvu značajnog hemijskog pritiska. Kondiciono stanje jedinki u testu je praćeno mjesečnom dinamikom na osnovu odgovora test sistema na ponovljene ekstremne promjene saliniteta. Ovi podaci su neophodni da bi se utvrdila pouzdanost monitoring sistema u realnim *ex situ* uslovima u dužem vremenskom periodu.

6.1.1. Kontinuirani monitoring srčanog ritma dagnji

6.1.1.1. Dnevna dinamika srčanog ritma

Na slici 6.1 je prikazan srčani ritam jedne reprezentativne jedinke, sniman svakih deset sekundi tokom 24 h. Rezultati su preračunati na standardni parametar – broj otkucaja u minuti. Slika je prikazana samo kao ilustracija količine dobijenih podataka ovako frekventnim mjerenjima na dnevnom nivou za svaku od 16 jedinki u monitoring sistemu. U cilju optimizacije sistema i pojednostavljenja postupka obrade i analize dobijenih podataka, pristupilo se unapređenju opreme u dijelu automatizacije obrade podataka (Personalna komunikacija sa Kholodkevich i Kurakin).

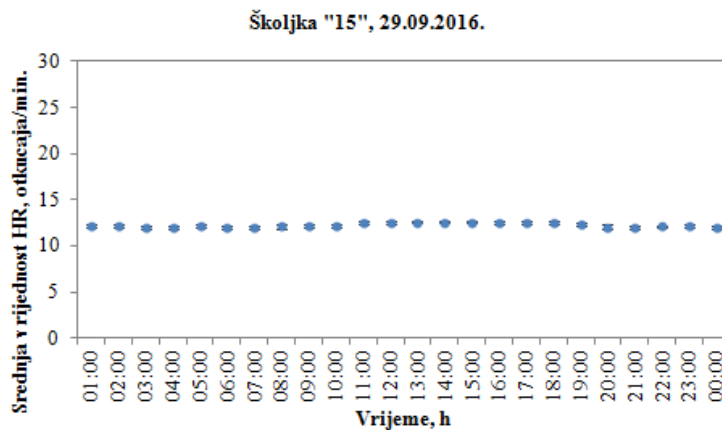


Slika 6.1. Srčani ritam (HR, broj otkucaja/minuti), reprezentativne dagnje “Školjka 15” iz sistema za kontinuirani monitoring:
HR je mjereno tokom 24 h na svakih deset sekundi

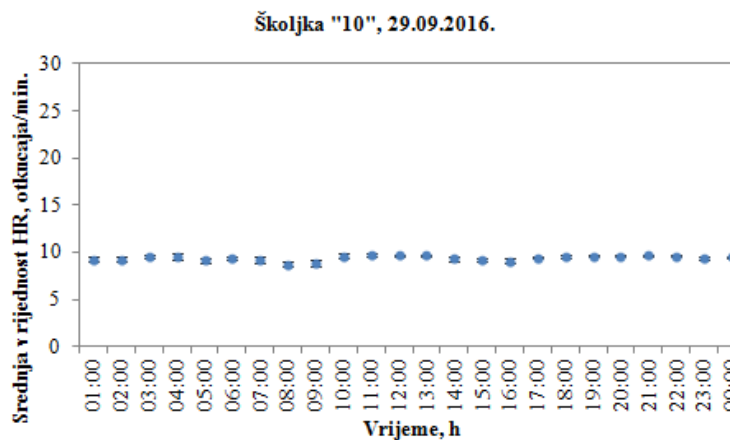
Na osnovu ovako velike količine podataka dobijene visoko-frekventnim mjerenjima, za svaku jedinku u monitoringu je bilo moguće odrediti dnevnu dinamiku, odnosno, dijapazon variranja srčanog ritma tokom dana, za svaki dan tokom ispitivanog perioda od godinu dana. U slučaju akcidentne situacije prilikom primjene ovakvog sistema u monitoringu (npr. neočekivanog izlivanja nafte, naglog pogoršanja kvaliteta vode zbog ispuštenih otpadnih voda, i sl.) važno je da sistem ne zavisi od prirodne dnevne dinamike jedinki, odnosno, da sistem jednako pouzdano može detektovati potencijalne promjene srčanog ritma kao direktnog odgovora na zagađenje, bez obzira u koje se doba dana desi akcidentna situacija na koju sistem treba očekivano da odreaguje alarmom.

Dnevne promjene srčanog ritma (HR) reprezentativnih jedinki iz monitoring sistema su ilustrovane slikama 6.2 – 6.6. Rezultati dobijeni mjerenjem HR na svakih 10 sekundi su kondenzovani i prikazani kao srednje vrijednosti HR za jedan sat tokom 24 h. Na slici 6.2 poređen je HR tri reprezentativne jedinke tokom istog nasumično odabranog dana. Slike 6.3 – 6.5 pokazuju HR iste tri reprezentativne školjke tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima. Na slici 6.6 prikazan je HR jedne specifične jedinke tokom tri ciljano odabrana dana u toplom periodu. Prikazani rezultati ukazuju da postoje određene individualne razlike u srčanom ritmu jedinki iz monitoring sistema, ali da srčani ritam ne prati cirkadijalnu dinamiku u *ex situ* monitoring sistemu. Razlike u HR u odnosu na sezonsku dinamiku biće prodiskutovane dalje u tekstu, ali na ovom mjestu treba istaći odsustvo cirkadijalnog karaktera srčanog ritma kod većine jedinki, bez obzira na godišnje doba. Nešto izraženije promjene HR u režimu dan – noć uočene su samo kod školjke “2” tokom ljetnjih mjeseci, gdje su srednje vrijednosti HR tokom noći nešto veće u odnosu na srednje vrijednosti HR tokom dana. Međutim, ukupno gledajući, može se konstatovati da su promjene HR jedinki u *ex situ* monitoring sistemu zanemarljivo male u režimu dan – noć.

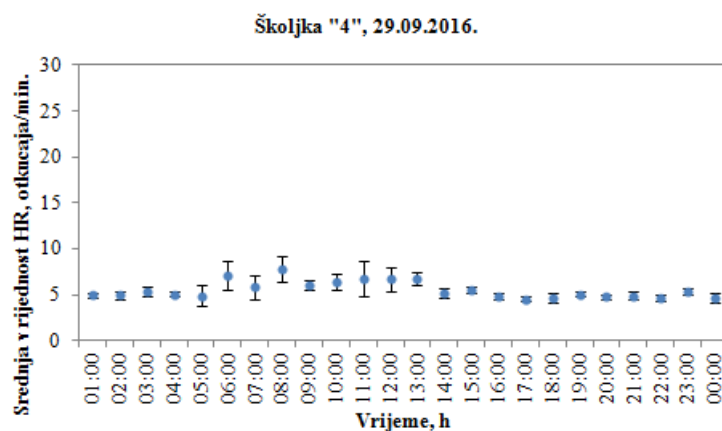
a)



b)

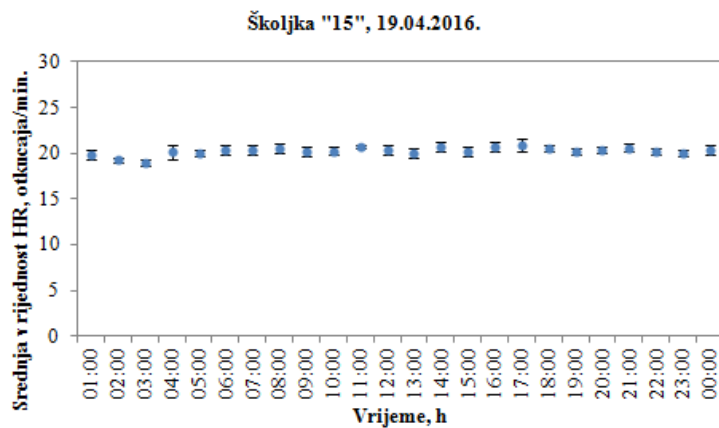


c)

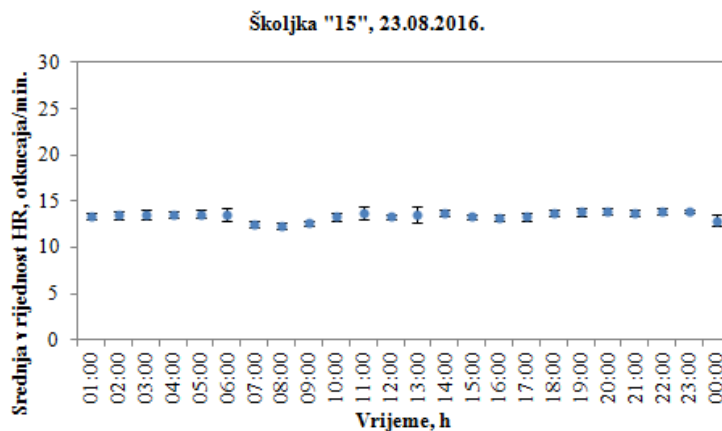


Slika 6.2. Srčani ritam (HR) tri reprezentativne jedinke: Panel a – Školjka “15”, Panel b – Školjka “10” i Panel c – Školjka “4”, iz sistema za monitoring tokom jednog nasumično odabranog dana u septembru 2016. godine. Prikazane su srednje vrijednosti srčanog ritma (HR, broj otkucaja/minuti) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana (24 h)

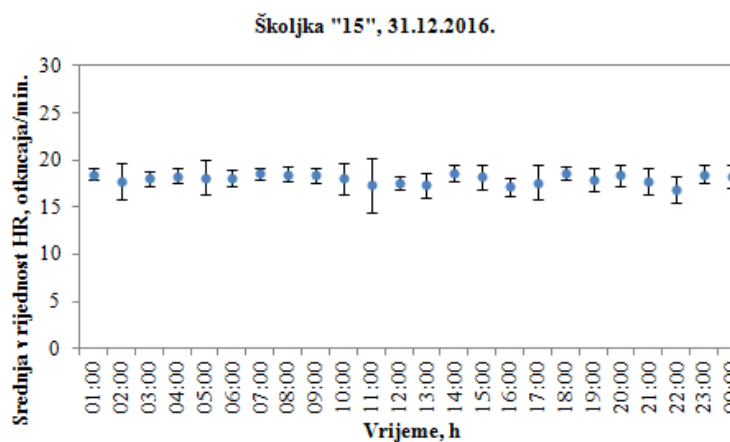
a)



b)

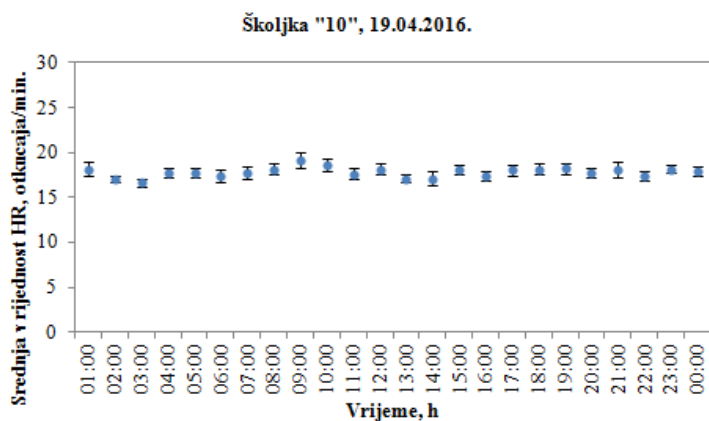


c)

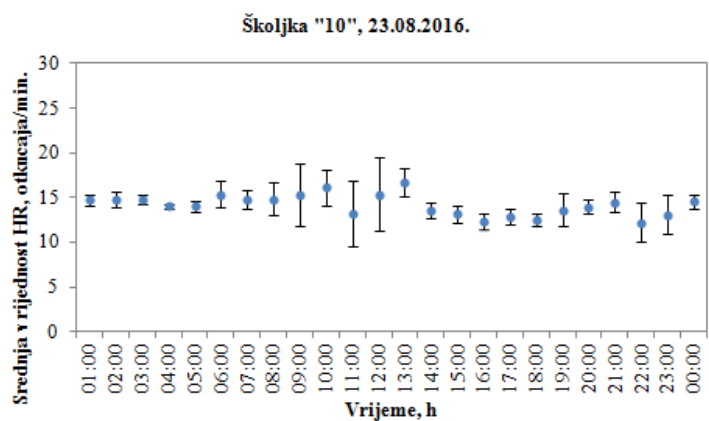


Slika 6.3. Srčani ritam (HR) jedne reprezentativne jedinice (Školjka "15") iz sistema za monitoring tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima 2016. godine (Panel a – proljeće, Panel b – ljeto, Panel c – zima). Prikazane su srednje vrijednosti srčanog ritma (HR, broj otkucanja/minuti) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana (24 h)

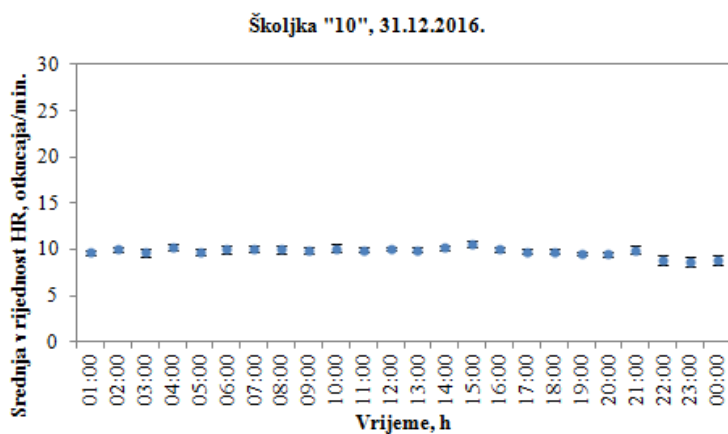
a)



b)

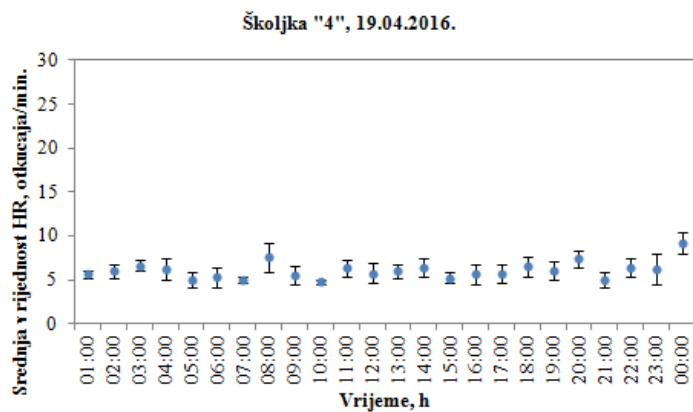


c)

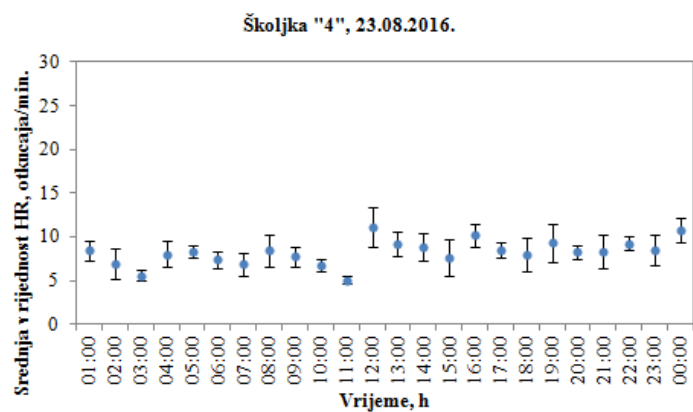


Slika 6.4. Srčani ritam (HR) jedne reprezentativne jedinice (Školjka "10") iz sistema za monitoring tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima 2016. godine (Panel a – proljeće, Panel b – ljeto, Panel c – zima). Prikazane su srednje vrijednosti srčanog ritma (HR, broj otkucaja/minuti) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana (24 h)

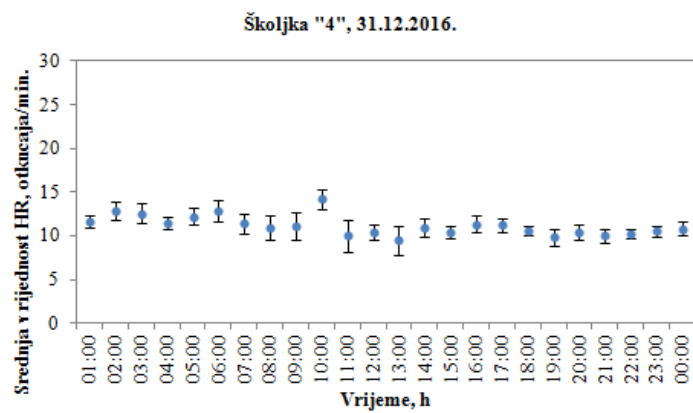
a)



b)

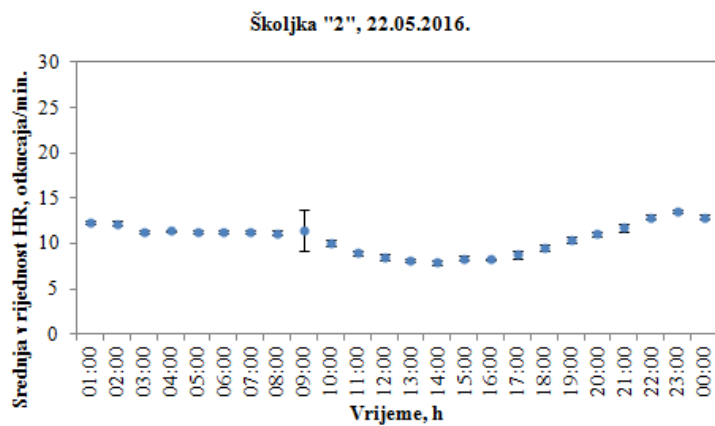


c)

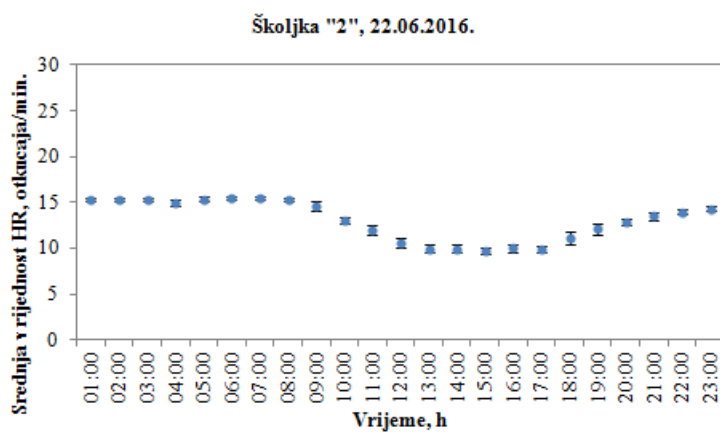


Slika 6.5. Srčani ritam (HR) jedne reprezentativne jedinke (Školjka "4") iz sistema za monitoring tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima 2016. godine (Panel a – proljeće, Panel b – ljeto, Panel c – zima). Prikazane su srednje vrijednosti srčanog ritma (HR, broj otkucaja/minuti) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana (24 h)

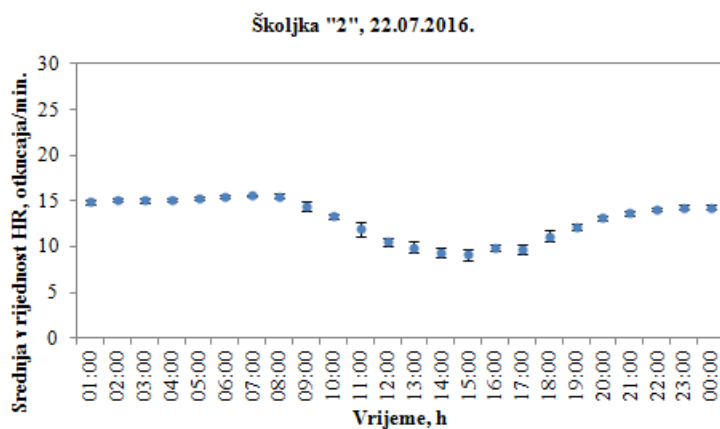
a)



b)



c)



Slika 6.6. Srčani ritam (HR) jedne specifične jedinke (Školjka “2”) iz sistema za monitoring tokom tri ciljano odabrana dana 2016. godine (Panel a – 22.05.2016, Panel b – 22.06.2016, Panel c – 22.07.2016). Prikazane su srednje vrijednosti srčanog ritma (HR, broj otkucaja/minute) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana (24 h)

Promjene HR akvatičnih organizama na dnevnom nivou predstavljaju individualnu karakteristiku i dešavaju se pod uticajem različitih endogenih i egzogenih faktora. Ansell (1973) je pratio dnevni ritam potrošnje kiseonika i broja otkucaja srca kod morske krabe *Cancer pagurus* i uočio maksimalnu potrošnju kiseonika i najveće vrijednosti HR tokom noći. Kuznetsova i sar. (2010) ukazuju da dugotrajno povećanje HR u noćnom periodu kod vrste *Pontastacus leptodactylus* odražava posebnosti ponašanja rakova odnosno njihovu noćnu aktivnost naročito vezano za ishranu. Kod vrste *Chlamys farreri* utvrđene su promjene HR tokom jednog dana, pri čemu do značajnog povećanja srčanog ritma dolazi tokom noći, tj. u periodu od 01 – 08 h i od 17 – 19 h, što se takođe tumači većom aktivnošću ove vrste tokom noći (Xing i sar., 2019). Cândido i Romero (2006) čak ukazuju da različite populacije iste vrste pokazuju izrazite razlike u promjenama HR tokom dana. Autori konstatuju da su kod populacije slatkovodne vrste školjki *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) iz lotičkog ekosistema srednje vrijednosti HR veće tokom dana u odnosu na noć, dok su srednje vrijednosti HR kod populacije iz lentičkog ekosistema bile niže i veoma stabilne tokom dana, tj. nijesu pokazale fluktuacije u režimu dan – noć.

Opšte je poznato da dagnje naseljavaju staništa koja karakteriše ritmička promjena stepena uronjenosti u vodeni medijum (plima – oseka) ali i česta kolebanja fizičko-hemijskih parametara vode (temperatura, salinitet, rastvoreni kiseonik). U istraživanju koje je sproveo Gudimov (2008) srednje vrijednosti HR kod vrste *Mytilus galloprovincialis* su bile veće u popodnevnim satima, u odnosu na noć i jutro. U toku jednog dana HR je ponekad varirao od 0 do 22 otkucaja/min. Autor smatra da značajno smanjenje stepena otvorenosti ljuštura i blagi porast HR tokom dana ukazuju na redovan ili „uobičajen“ stres i zaštitnu strategiju školjki (naročito protiv predatora).

Tokom kontinuiranog monitoringa sprovedenog u okviru istraživanja za potrebe ove disertacije, ispitivane jedinke su bile smještene u akvarijume sa stalnim protokom vode, bile su konstantno uronjene u vodu i nalazile su se u relativno stabilnim hidrološkim uslovima, što je najvjerojatnije uticalo na neznatnu varijabilnost HR u režimu dan – noć. Na slične rezultate ukazuje i Nicholson (2002) kod vrste *Perna viridis*, kod koje takođe nijesu bile vidljive dnevne varijacije HR pri relativno stabilnim uslovima sredine. Prema Trueman i sar. (1973) pri stabilnim hidrološkim uslovima i kada su jedinke konstantno uronjene u vodu, osim u

slučaju dužeg zatvaranja ljuštura školjki ili u slučaju adukcija, fluktuacije srčanog ritma su neznatne.

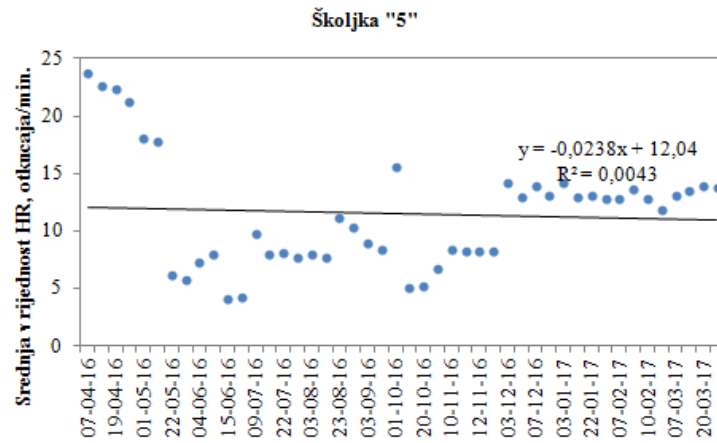
Na osnovu dobijenih rezultata, zaključuje se da dnevna dinamika ne predstavlja faktor koji bi značajno uticao na konzistentnost i pouzdanost odgovora monitoring sistema u slučaju akcidentne situacije u bilo koje vrijeme tokom dana ili noći.

6.1.1.2. Dinamika srčanog ritma tokom jednogodišnjeg monitoringa

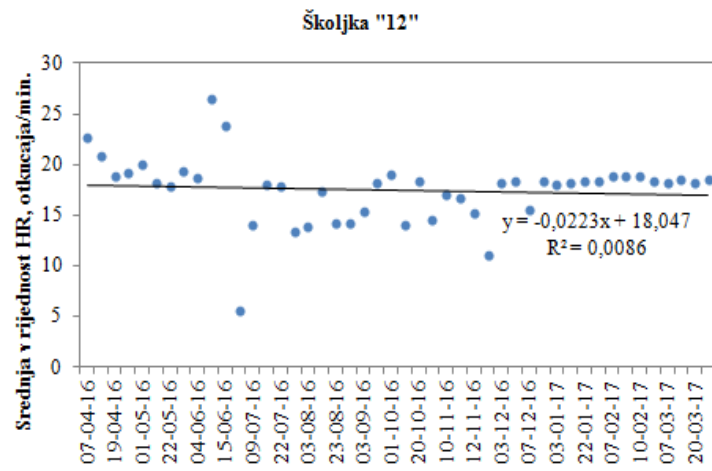
Jedan od ciljeva ove disertacije je takođe bio da se ispita i prirodna varijabilnost eksponiranih jedinki u funkciji vremena. Ovi rezultati bi trebali da ukažu na optimalni vremenski okvir u kome se očekuje stabilan individualni i grupni odgovor jedinki u sistemu. Koliko je to eksperimentalna postavka i dužina trajanja monitoringa dozvolila, učinjen je pokušaj da se odgovori na pitanje da li varijabilnost srčanog ritma u monitoring sistemu zavisi od variranja ekoloških faktora, sezonske dinamike uslovljene biologijom vrste, ili su u pitanju starenje jedinki odnosno “zamor” monitoring sistema.

Rezultati trend analize promjena srednje dnevne vrijednosti HR u funkciji vremena su prikazani na slikama 6.7 – 6.10. Za sve školjke, prikazani su rezultati za ista dva (nasumično odabrana) dana tokom svakog mjeseca monitoringa. Po pravilu, veće varijacije HR zabilježene su u prvoj polovini perioda monitoringa koji se poklapa sa toplijim periodom godine (proljeće – ljeto). U drugoj polovini sprovođenja kontinuiranog monitoringa (tokom jesenjeg i zimskog perioda) varijacije HR kod većine jedinki nijesu bile tako izražene. Može se primjetiti da se srednje vrijednosti HR kod ispitivanih jedinki smanjuju tokom trajanja monitoringa, ali je trend značajno izražen samo kod dvije jedinke (Slika 6.10).

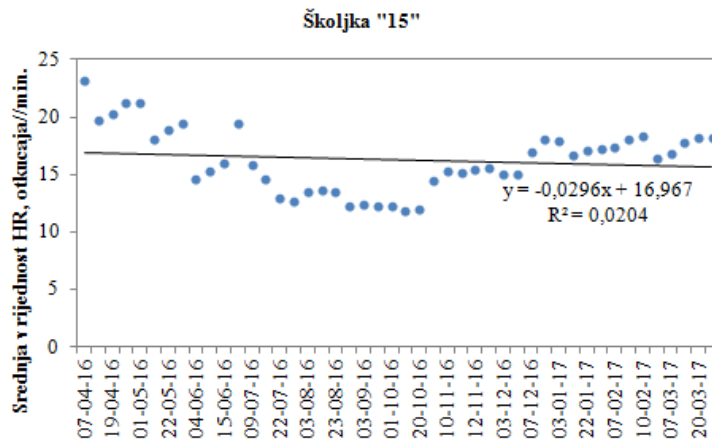
a)



b)

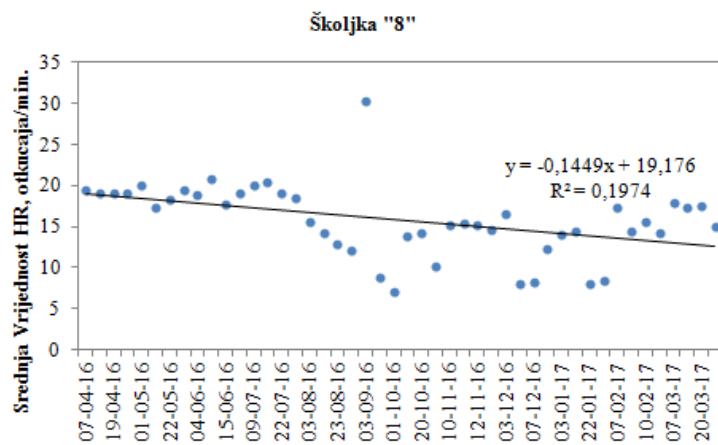


c)

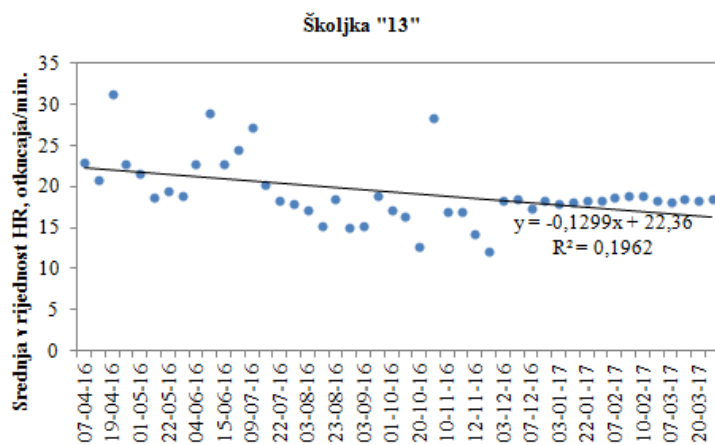


Slika 6.7. Trend analiza srednje dnevne vrijednosti HR: Panel a – “Školjka 5”, Panel b – “Školjka 12” i Panel c – “Školjka 15” za period april 2016 – mart 2017. godine. Linearan trend nije statistički značajan

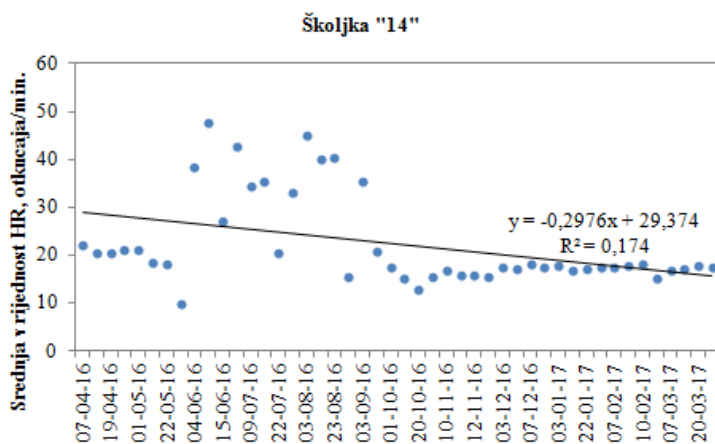
a)



b)

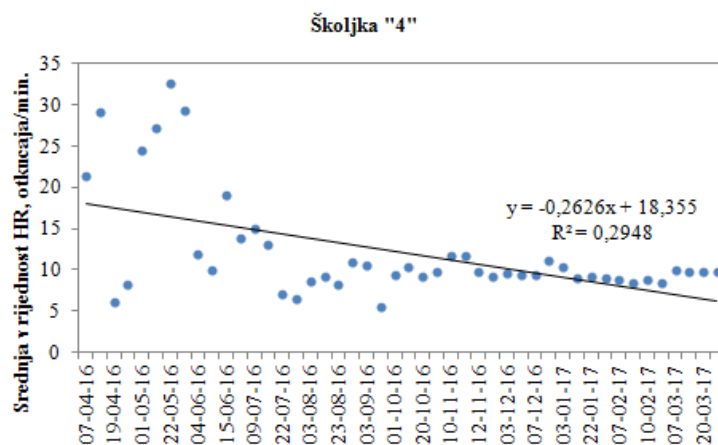


c)

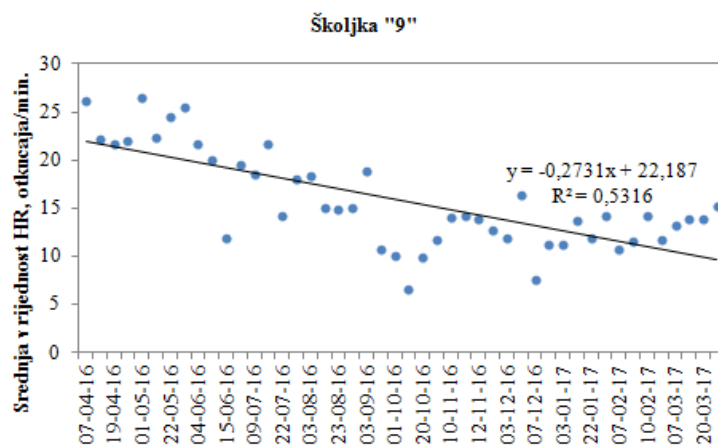


Slika 6.8. Trend analiza srednje dnevne vrijednosti HR Školjke "8" (Panel a), Školjke "13" (Panel b) i Školjke "15" (Panel c) za period april 2016 – mart 2017. godine. Linearan trend nije statistički značajan

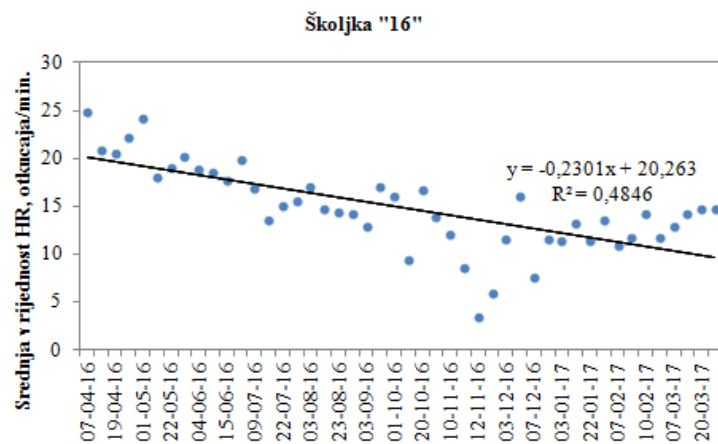
a)



b)

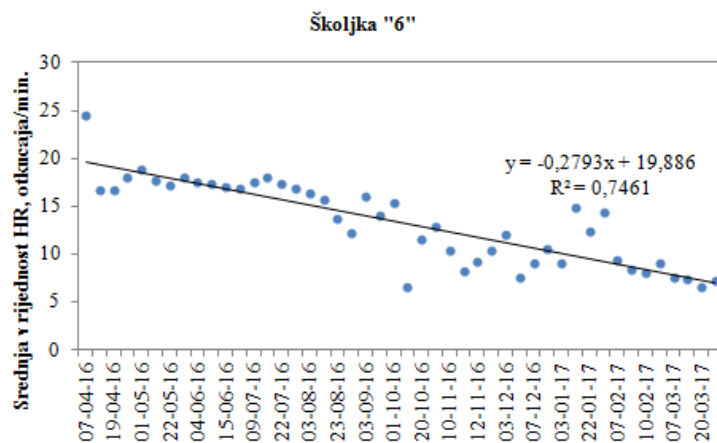


c)

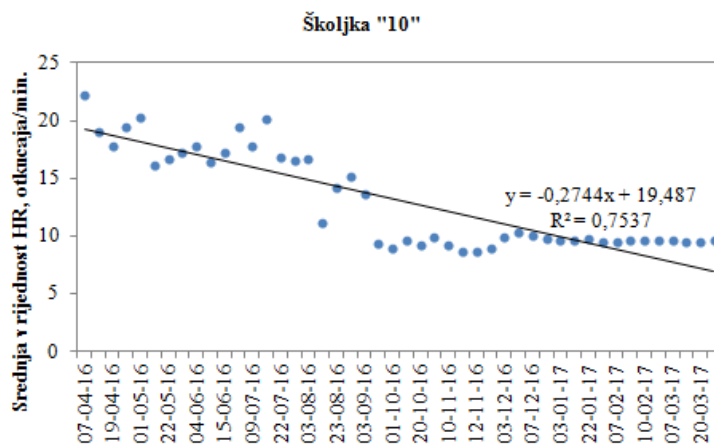


Slika 6.9. Trend analiza srednje dnevne vrijednosti HR Školjke "4" (Panel a), Školjke "9" (Panel b) i Školjke "16" (Panel c) za period april 2016 – mart 2017. godine. Linearan trend izražen, ali nije statistički značajan

a)



b)



Slika 6.10. Trend analiza srednje dnevne vrijednosti HR Školjke “6” (Panel a) i Školjke “10” (Panel b) za period april 2016 – mart 2017. godine. Linearan trend izražen i statistički značajan

Srednje dnevne vrijednosti HR ispitivanih jedinki su po pravilu najveće u prvom mjesecu monitoringa (april 2016). Već od narednog mjeseca (maj 2016), pa kontinuirano tokom kasnog proljeća, ljeta i jeseni, kod većine jedinki dolazi do pada vrijednosti HR. Tokom posljednjih mjeseci monitoringa (zima) kod većine jedinki vrijednosti HR bilježe stagnaciju ili blagi trend porasta, ali posljednjeg mjeseca monitoringa (mart 2017) vrijednosti HR ni kod jedne jedinke ne dostižu vrijednosti zabilježene prvog mjeseca monitoringa (april 2016).

Poređenje srčanog ritma najbolje (Školjka “15”), prosječne (Školjka “10”) i najlošije školjke (“4”) tokom prvog (april 2016. godine) i posljednjeg mjeseca kontinuiranog monitoringa (mart 2017. godine) je prikazano u tabelama 6.1 i 6.2. Date su srednje vrijednosti,

medijana i standardna devijacija srčanog ritma, kao i rezultati Kruskal-Wallis testa sa Dunn *post hoc* komparacijom.

Dobijeni rezultati ukazuju da postoji znatna razlika između srčanog ritma ove tri školjke tokom aprila mjeseca. Vrijednosti HR najbolje i prosječne školjke tokom prvog mjeseca monitoringa se međusobno ne razlikuju, ali su statistički značajno različite od vrijednosti HR najlošije školjke.

Tokom posljednjeg mjeseca monitoringa, vrijednosti HR prosječne i najlošije školjke bile su međusobno slične, ali su se statistički značajno razlikovale od vrijednosti HR najbolje školjke.

Tabela 6.1. Statistička analiza HR najbolje, prosječne i najlošije školjke tokom aprila 2016; X – srednja vrijednost HR; MED – medijana HR; SD_{HR} – standardna devijacija HR

Školjka	X	MED	SD_{HR}	Kruskal-Wallis test	Dunn <i>post hoc</i> komparacija
Najbolja	21.03	20.57	2.32		
Prosječna	19.53	19.80	2.49	H = 295.36	najlošija < prosječna = najbolja
Najlošija	15.89	11.07	10.11	P < 0.05	

Tabela 6.2. Statistika HR najbolje, prosječne i najlošije školjke tokom marta 2017; X – srednja vrijednost HR; MED – medijana HR; SD_{HR} – standardna devijacija HR

Školjka	X	MED	SD_{HR}	Kruskal-Wallis test	Dunn <i>post hoc</i> komparacija
Najbolja	17.73	18.15	1.97		
Prosječna	9.53	9.55	0.19	H = 2978.51	najlošija = prosječna < najbolja
Najlošija	9.85	9.63	1.22	P < 0.05	

Poređenje srčanog ritma najbolje školjke za tri mjeseca po izboru april 2016 (prvi mjesec monitoringa), avgust 2016 (sredina perioda monitoringa) i mart 2017. godine (poslednji mjesec monitoringa) dato je u tabeli 6.3. Prikazane su srednje vrijednosti, medijana i standardna devijacija srčanog ritma najbolje školjke, kao i rezultati Kruskal-Wallis testa sa Dunn *post hoc* komparacijom. Dobijeni rezultati ukazuju da postoji statistički značajna razlika između srčanog ritma najbolje školjke tokom ova tri mjeseca.

Tabela 6.3. Statistika HR najbolje školjke tokom aprila 2016, avgusta 2016. i marta 2017; X – srednja vrijednost HR; MED – medijana HR; SD_{HR} – standardna devijacija HR

Mjesec	X	MED	SD_{HR}	Kruskal-Wallis test	Dunn <i>post hoc</i> komparacija
April 2016	21.03	20.57	2.32		
Avgust 2016	13.52	13.61	1.41	H = 3440.04	April 2016 > Mart 2017 > Avgust 2016
Mart 2017	17.73	18.15	1.97	p < 0.05	

Osim prethodno prikazane individualne, analizirana je i grupna varijabilnost srčanog ritma tokom trajanja kontinuiranog monitoringa. U tabeli 6.4 su prikazane srednje mjesečne vrijednosti HR za 16 jedinki sa standardnom devijacijom, kao i minimalne i maksimalne vrijednosti za svaki mjesec tokom jednogodišnjeg perioda istraživanja.

Tabela 6.4. Vrijednosti HR tokom jednogodišnjeg monitoringa; X – srednja vrijednost HR (broj otkucaja u minuti, n = 16); SD_{HR} – standardna devijacija HR; Min – minimalna vrijednost HR; Max – maksimalna vrijednost HR

Mjesec	X (otkucaja/minuti)	SD_{HR}	Min	Max
April 2016	20.32	5.18	3.77	50.42
Maj 2016	19.02	5.47	3.35	49.72
Jun 2016	18.63	10.08	2.85	54.55
Jul 2016	16.69	7.97	3.06	53.25
Avgust 2016	16.13	9.37	4.06	54.05
Septembar 2016	14.28	6.52	2.94	49.59
Oktobar 2016	12.52	5.21	2.60	51.58
Novembar 2016	12.72	4.36	2.47	27.44
Decembar 2016	14.23	5.04	3.32	34.95
Januar 2017	14.36	4.63	3.51	31.09
Februar 2017	14.36	4.70	3.03	31.09
Mart 2017	14.63	4.38	3.38	29.65

Najveća srednja vrijednost srčanog ritma je zabilježena tokom aprila mjeseca 2016. godine (prvi mjesec monitoringa) i iznosila je 20.32 otkucaja/minuti, a najmanja tokom oktobra 2016. godine, 12.52 otkucaja/minuti. Generalno, promjene srednje vrijednosti HR podudaraju se sa individualnim trendovima jedinki koje čine grupu, ali razlike između sezona i mjeseci nijesu izražene. Najniže srednje vrijednosti srčanog ritma su registrovane tokom

jeseni, nakon čega se bilježi blagi porast tokom posljednjih (zimskih) mjeseci monitoringa. Maksimalne izmjerene vrijednosti HR značajno variraju (od 27.44 do 54.55 otkucaja/minuti), a najviše vrijednosti su zabilježene tokom toplijih mjeseci, uprkos padu srednjih vrijednosti HR registrovanom u ovom periodu u odnosu na početak monitoringa. Minimalne vrijednosti HR tokom monitoring perioda variraju u uskom rasponu. Shapiro-Wilk test je pokazao normalnu distribuciju vrijednosti HR ($W = 7.94, p > 0.05$).

Na fiziološke odgovore jedinki direktan uticaj imaju promjene uslova spoljašnje sredine, ali pri interpretaciji dobijenih podataka treba uzeti u obzir i endogene faktore, koji takođe imaju uticaj na fiziološke odgovore jedinki kako bi se dobila relevantnija slika o njihovom fiziološkom stanju. Iako neki autori, kao npr. Bakhmet i Khalaman (2006) navode da fluktuacije HR kod školjki predstavljaju individualnu karakteristiku, ne smije se zanemariti činjenica da promjene uslova spoljašnje sredine imaju direktan uticaj na fiziološke procese akvatičnih organizama. Među ekološkim faktorima u morskom ekosistemu koji dominantno utiču na vitalne funkcije morskih beskičmenjaka ističu se temperatura i salinitet.

Hagger i sar. (2010) su istraživali sezonske varijacije HR kod plave dagnje *Mytilus edulis* i ustanovili su veće vrijednosti HR u periodu april – avgust u odnosu na period oktobar – mart. Takođe, Bakhmet i sar. (2019) ukazuju da su vrijednosti HR kod vrsta iz roda *Mytilus* veće tokom toplijih mjeseci u odnosu na hladnije mjesece istraživanja.

Varijacije HR kod školjki su zavisne i od količine dostupne hrane u vodenom medijumu (Widdows, 1973; Hagger i sar., 2010; Cheng i sar., 2018; Bakhmet i sar., 2019), ali i od reproduktivnog ciklusa (Widdows, 1973; Hagger i sar., 2010; Bakhmet i sar., 2019). Prema Bakhmet i sar. (2019) dostupnost hrane i reproduktivni status u pojedinim periodima godine imaju veći uticaj na varijacije HR nego što to ima temperatura koja se smatra jednim od najbitnijih ekoloških parametara. Bakhmet (2017) ukazuje da kod vrste *Mytilus edulis* dolazi do povećanja HR sa povećanjem brojnosti fitoplanktona u vodi, na šta ukazuju i Cheng i sar. (2018) kod vrste *Perna viridis*. Hagger i sar. (2010) ukazuju da kod vrste *Mytilus edulis* dolazi do povećanja HR tokom ljetnjeg perioda, dok su u isto vrijeme stepen filtracije i usvajanje hrane smanjeni. Prema Hagger i sar. (2010) veće vrijednosti HR tokom toplijih mjeseci su se poklopile i sa periodom mrijesta i obnove gonada nakon mrijesta. Tokom kontinuiranog monitoringa za potrebe ove disertacije nije praćena reproduktivna aktivnost

ispitivanih jedinki, ali rezultati Gvozdrenović (2020) ukazuju da se kod mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* u Bokokotorskom zalivu mrijest dešava tokom zime i proljeća dok je tokom ljetnjih mjeseci većina jedinki u stadijumu mirovanja.

Analiza individualne i grupne varijabilnosti jedinki u sistemu za monitoring nije pokazala jasan sezonski karakter srčanog ritma. Da bi se odgovorilo na pitanje da li i u kojoj mjeri uočena varijabilnost HR zaista predstavlja individualnu karakteristiku jedinki ili pokazuje jasnu zavisnost od promjenljivih fizičko-hemijskih i bioloških karakteristika medijuma, pristupilo se analizi uticaja ekoloških faktora na srčani ritam.

6.1.2. Uticaj ekoloških faktora na srčani ritam

Tokom jednogodišnjeg kontinuiranog monitoringa fizioloških biomarkera dagnji mjesečnom dinamikom je praćen veći broj fizičkih, hemijskih i bioloških parametara kvaliteta vode na lokalitetu sa koga je zahvatana voda za monitoring sistem. U ovom poglavlju prikazani su rezultati i prodiskutovan je uticaj ovih ekoloških faktora na srčani ritam. Analiza je poslužila da se utvrdi zavisnost srčanog ritma jedinki u sistemu za monitoring od uobičajenog variranja ekoloških faktora u odsustvu ekstremnog stresa.

6.1.2.1. Opšti parametri kvaliteta vode na lokalitetu Orahovac

U tabeli 6.5 su prikazane vrijednosti fizičko-hemijskih parametara morske vode na uzgajalištu u Orahovcu tokom jednogodišnjeg perioda istraživanja.

Temperatura vode se kretala od minimalne vrijednosti 10.7 °C u januaru 2017. godine do maksimalne vrijednosti 24.4 °C u julu 2016. godine. Srednja godišnja vrijednost temperature vode je iznosila 18.18 °C. Ovi rezultati se poklapaju sa rezultatima dosadašnjih istraživanja u Bokokotorskom zalivu (Pestorić i sar., 2011; Pestorić, 2013; Drakulović i sar., 2013; 2017; Mandić S. i sar., 2016; Redžić, 2016; Gvozdrenović i sar., 2017). Variranje temperature u površinskim slojevima (do 5m dubine) je karakteristično za Bokokotorski zaliv (Krivokapić, 2005; Drakulović, 2012) i ono je u skladu sa variranjem temperature površinskih slojeva vode u sjeveroistočnom Mediteranu (Balkis, 2009; Rubino i sar. 2009).

Tabela 6.5. Vrijednosti fizičko-hemijskih parametara morske vode na uzgajalištu ribe i školjki u Orahovcu

Datum uzorkovanja	Temperatura (°C)	Salinitet (‰)	Providnost (m)	Kiseonik (mg/l)	Kiseonik (%)	Fosfati (µg/l)	Silikati (µg/l)	Nitriti (µg/l)	Nitrati (µg/l)
20. april 2016	18.0	29.3	10.0	8.04	85.0	3.45	103.0	0.25	9.22
26. maj 2016	17.3	11.8	6.0	7.84	83.0	8.29	173.0	0.92	47.9
29. jun 2016	20.6	29.0	9.0	6.28	66.0	0.92	188.0	0.53	37.3
26. jul 2016	24.4	33.6	10.0	4.30	65.0	4.65	13.7	0.17	15.6
23. avgust 2016	22.2	33.8	10.0	7.23	80.0	7.88	154.0	0.61	36.0
20. septembar 2016	22.5	34.3	10.0	6.49	69.0	5.63	95.8	0.28	31.4
25. oktobar 2016	18.9	27.8	9.0	6.21	65.0	6.06	197.0	3.44	97.5
28. novembar 2016	20.0	35.2	7.0	7.11	77.0	22.20	176.0	1.58	19.3
21. decembar 2016	16.3	36.1	12.5	7.40	71.0	8.34	31.2	1.57	20.9
24. januar 2017	10.7	35.5	7.5	7.89	71.0	6.44	97.9	0.39	33.9
20. februar 2017	12.6	31.5	9.0	8.43	76.0	6.70	46.3	1.03	21.9
22. mart 2017	14.7	33.6	8.0	8.44	79.0	13.83	61.5	1.36	17.61

Salinitet se kretao od minimalne vrijednosti 11.8 ‰ u maju 2016. godine do maksimalne vrijednosti 36.1 ‰ u decembru 2016. godine. Srednja godišnja vrijednost saliniteta je iznosila 30.95 ‰. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja u akvatorijumu Bokokotorskog zaliva (Pestorić i sar., 2014; Mandić S. i sar., 2016). Bokokotrski zaliv, posebno unutrašnji dio zaliva je pod intenzivnim uticajem slatkih voda koje dolaze iz atmosfere, sa kopna, kao i iz podzemnih izvora (Magaš, 2002; Bellafiore i sar., 2011; Mandić S. i sar., 2016), pa su u periodima veće količine padavina uobičajene niže vrijednosti saliniteta. Drakulović (2012) i Redžić (2016) navode da je za područje Orahovca tokom zimskih i proljećnih mjeseci karakterističan vrlo nizak salinitet (sporadično samo 1 ‰). Prema Uredbi o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (Sl. list CG, 02/07) vrijednosti saliniteta za uzgoj školjki moraju biti manje od 40 ‰. Rezultati prikazani u tabeli 6.5 pokazuju da vrijednosti saliniteta tokom jednogodišnjeg ciklusa monitoringa nijesu prelazile ovu vrijednost. Prema Župan i Šarić (2014) niži salinitet je pogodan za prirast školjki, jer je u oblastima sa većim uplivom slatkih voda (i samim tim nižim salinitetom) količina hranjivih materija veća.

Providnost vode se kretala od minimalne vrijednosti 6 m u maju 2016. godine do maksimalne vrijednosti 12.5 m u decembru 2016. godine. Srednja godišnja vrijednost providnosti vode je iznosila 9 m. Providnost morske vode zavisi od više faktora: koncentracije fitoplanktona, količine organskih i neorganskih čestica, upliva slatkih voda, količine svjetlosti, vremenskih uslova. U Bokokotorskom zalivu providnost morske vode varira od 3 do 16 m (Mandić S. i sar., 2016; Redžić, 2016), što je skladu sa rezultatima datim u tabeli 6.5.

Koncentracija kiseonika se kretala od minimalne vrijednosti 4.3 mg/l u julu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 8.44 mg/l u martu 2017. godine. Srednja godišnja vrijednost rastvorenog kiseonika je iznosila 7.13 mg/l. Kada uzmemo u obzir zavisnost rastvorenosti kiseonika od temperature vode, dobijeni rezultati su i očekivani. Na sličan godišnji gradijent rastvorenosti kiseonika u Bokokotorskom zalivu ukazuju i Drakulović i sar. (2013; 2015). Takođe, prema Dorgham i sar. (2004) na smanjenje koncentracije kiseonika u vodi tokom ljeta utiče i povećana oksidacija organskih materija, dok prema Krivokapić (2005) pored niže temperature na povećanje koncentracije kiseonika tokom zime značajno utiču i vjetrovi. Prema Mandić S. i sar. (2016) na koncentraciju kiseonika u vodi utiču i morske struje. Veće

vrijednosti zasićenja kiseonikom u površinskim slojevima vode su rezultat odvijanja najvažnijeg biološkog procesa – fotosinteze (Stojanoski i Vukadin, 1996). Prema Uredbi o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (Sl. list CG, 02/07) vrijednosti zasićenja kiseonikom za uzgoj školjki moraju biti veće od 70 %. Tokom ovog istraživanja vrijednosti zasićenja morske vode kiseonikom su uglavnom bile veće od 70 %.

Koncentracija fosfata se kretala od minimalne vrijednosti 0.92 µg/l u junu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 22.20 µg/l u novembru 2016. godine. Srednja godišnja koncentracija fosfata je bila 7.86 µg/l. Koncentracija silikata se kretala od minimalne vrijednosti 13.7 µg/l u julu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 197.0 µg/l u oktobru 2016. godine. Srednja godišnja koncentracija silikata je bila 111.45 µg/l. Koncentracija nitrita se kretala od minimalne vrijednosti 0.17 µg/l u julu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 3.44 µg/l u oktobru 2016. godine. Srednja godišnja koncentracija nitrita je bila 1.01 µg/l. Koncentracija nitrata se kretala od minimalne vrijednosti 9.22 µg/l u aprilu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 97.5 µg/l u oktobru 2016. godine. Srednja godišnja koncentracija nitrata je bila 32.37 µg/l.

Nutrijenti predstavljaju važan faktor za odvijanje procesa u moru, međutim povećan unos prirodnim ili antropogenim putem može dovesti do promjena u ekosistemu. Iz tabele 6.5 vidi se da su koncentracije nutrijenata veće tokom hladnijeg perioda godine. Dobijeni rezultati su u skladu sa dosadašnjim istraživanjima za oblast Bokokotorskog zaliva (Krivokapić, 2005; Drakulović, 2012; Drakulović i sar., 2012; 2013; 2015; Joksimović i sar., 2016). Prema Uredbi o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (Sl. list CG, 02/07) za uzgoj školjki je neophodno da koncentracija nitrita nije veća od 30 µg/l. Koncentracija nitrita tokom perioda istraživanja nije prelazila ovu vrijednost.

U tabeli 6.6 su prikazane vrijednosti bioloških parametra kvaliteta morske vode na uzgajalištu u Orahovcu tokom jednogodišnjeg perioda istraživanja.

Tabela 6.6. Vrijednosti bioloških parametara morske vode na uzgajalištu ribe i školjki u Orahovcu

Mjesec	Hlorofil <i>a</i> (mg/m ³)	Ukupan mikroplankton (ćel/l)	Dijatomeje (ćel/l)	Dinoflagelate (ćel/l)	Kokolitoforide (ćel/l)	Silikoflagelate (ćel/l)	E.coli (ćel/100ml)	Enterokoke (ćel/100ml)	Fekalni koliformi (ćel/100ml)	Ukupni koliformi (ćel/100ml)
April 2016	1.98	76428	5730	34124	36574	0	2	3	2	4
Maj 2016	1.42	45480	18964	5096	21420	0	1	2	1	2
Jun 2016	0.61	26374	19050	2720	4604	0	1	12	2	4
Jul 2016	0.38	17468	10316	960	6192	0	3	0	0	5
Avgust 2016	0.43	18422	11110	5244	2068	0	0	0	0	0
Septembar 2016	0.44	278371	271607	2320	4444	0	0	4	0	2
Oktobar 2016	2.76	53568	40150	2622	10796	0	210	0	217	225
Novembar 2016	1.38	76912	73624	2548	740	0	3	2	5	8
Decembar 2016	0.76	59600	56406	2554	640	0	0	1	1	7
Januar 2017	1.10	99184	97910	1274	0	0	0	0	0	0
Februar 2017	2.10	48742	43738	5004	0	0	15	2	2	95
Mart 2017	1.21	25950	24122	1748	80	0	0	1	3	5

Koncentracija hlorofila *a* se tokom jednogodišnjeg ciklusa kretala od minimalne vrijednosti 0.38 mg/m³ u julu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 2.76 mg/m³ u oktobru 2016. godine. Srednja godišnja koncentracija hlorofila *a* je iznosila 1.21 mg/m³. Prema Krivokapić i sar. (2011) i Joksimović i Pestorić (2012) veće vrijednosti hlorofila *a* tokom hladnijeg perioda godine su rezultat većeg priliva slatke vode i povećanja koncentracije nutrijenata. Rezultati prikazani u tabeli 6.6 u skladu su sa rezultatima drugih autora za oblast Bokotorskog zaliva (Drakulović, 2012; Krivokapić i sar., 2009; Pestorić, 2013). Vremenske varijacije hlorofila *a* se poklapaju sa bimodalnim karakterom abundance fitoplanktona. Veća brojnost fitoplanktona registruje se tokom kasne zime i ranog proljeća, kao i tokom jeseni, a manje vrijednosti su karakteristične za ljetnji period (Pestorić, 2013).

Brojnost ukupnog mikroplanktona se kretala od 1.7 x 10⁴ ćel./l u julu 2016. godine do 2.7 x 10⁵ ćel./l u septembru 2016. godine. Brojnost dijatomeja se kretala od 5.7 x 10³ ćel./l u aprilu 2016. godine do 2.7 x 10⁵ ćel./l u septembru 2016. godine. Brojnost dinoflagelata se kretala od 9.6 x 10² ćel./l u julu 2016. godine do 3.4 x 10⁴ ćel./l u aprilu 2016. godine. Brojnost kokolitoforida se kretala od 80 ćel./l u martu 2017. godine do 3.6 x 10⁴ ćel./l u aprilu 2016. godine. U januaru i februaru 2017. godine kokolitoforida nije bilo u uzorku. Silikoflagelata nije bilo ni u jednom mjesečnom uzorku sa uzgajališta u Orahovcu tokom perioda istraživanja.

Fitoplanktonske alge su vrlo važna komponenta morskog ekosistema, s obzirom na njihovu esencijalnu ulogu u procesu primarne produkcije, a takođe predstavljaju primarni izvor hrane filtracionim organizmima kao što su školjke. Neke studije su pokazale da u obalnim vodama intenzivno hranjenje dagnje može uticati na smanjenje brojnosti fitoplanktona i na manje od 10³ ćel./l (Dolmer, 2000). Kod različitih vrsta školjki je različita grupa fitoplanktona primarni izvor hrane, ali generalno kod većine vrsta su to dijatomeje (Shumway i sar., 1987; Xu Q. i Yang, 2007). Koja će grupa biti dominantna zavisi i od tipa vodnog tijela, kao i od strukture fitoplanktonskih zajednica (Compton i sar., 2008).

Mikroplankton koji čine dijatomeje, dinoflagelate, kokolitoforide i silikoflagelate je imao različitu dinamiku tokom istraživanog perioda i generalno pokazao karakterističan bimodalni ciklus. U gotovo svim istraživanim mjesecima u mikroplanktonu su dominirale dijatomeje, na šta ukazuju i rezultati dosadašnjih istraživanja za akvatorijum zaliva (Bosak i

sar., 2012; Drakulović i sar., 2011; 2012; 2013; 2017). Dominantnost dijatomeja se objašnjava činjenicom da je to eurivalentna fitoplanktonska grupa sposobna da se adaptira na različite uslove spoljašnje sredine (Burić i sar., 2007). Dinoflagelate su grupa u koju spada najveći broj toksičnih i potencijalno toksičnih vrsta koje mogu da luče biotoksine i da uzrokuju štetna cvjetanja. Nešto veća brojnost ove grupe algi (3.4×10^3 ćel/l) tokom jednogodišnjeg istraživanja je zabilježena samo tokom aprila 2016. godine.

Maksimalna brojnost *Escherichia coli* od 210 ćel./100 ml zabilježena je u oktobru 2016. godine. U avgustu, septembru, decembru 2016, januaru i martu 2017. godine u uzorcima nije detektovana. Maksimalna brojnost Enterokoka od 12 ćel./100 ml zabilježena je u junu 2016. godine. U julu, avgustu, oktobru 2016. i januaru 2017. godine Enterokoka nije registrovana. Maksimalna brojnost fekalnih koliformnih bakterija od 217 ćel./100 ml zabilježena je u oktobru 2016. godine. U julu, avgustu, septembru 2016. i januaru 2017. godine fekalne koliformne bakterije nijesu registrovane. Maksimalna brojnost ukupnih koliformnih bakterija od 225 ćel./100 ml registrovana je u oktobru 2016. godine. U avgustu 2016. i januaru 2017. godine koliformne bakterije nijesu zabilježene.

Vrijednosti mikrobioloških parametara vode su tokom istraživanog perioda bile u dozvoljenim granicama koje su propisane Uredbom o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (Sl. list CG, 02/07), osim tokom oktobra 2016. godine kada su i fekalne i ukupne koliformne bakterije bile iznad maksimalno dozvoljene granice. U istom mjesecu je i brojnost *E. coli* prelazila vrijednost od 200 ćel./100 ml. Dobijene vrijednosti mikrobioloških parametara su dosta niže u poređenju sa literaturnim podacima (npr. Mandić M. i sar., 2012; Ilić, 2017). Osnovni izvor fekalnog zagađenja u akvatorijumu Bokokotorskog zaliva su neregulisani kanalizacioni ispusti (Drakulović, 2012). Na osnovu dobijenih rezultata, sanitarni kvalitet vode za uzgoj školjki je bio zadovoljavajući tokom cijelog istraživanog perioda, osim tokom oktobra 2016. godine. Ilić (2017) ukazuje da dagnje usled filtracionog načina ishrane imaju sposobnost akumuliranja *E. coli* u svojim tkivima, što indirektno putem lanca ishrane može dovesti do trovanja kod ljudi.

U mekom tkivu dagnji sa uzgajališta u Orahovcu mjereni su i neki biotoksini, prije svih domoična kiselina (DA) i saksitoksin (STX). Ni u jednom uzorku nije dokazano prisustvo biotoksina. Dobijene vrijednosti bile su ispod granice detekcije svakog od analiziranih

jedinjenja. Granice detekcije (GD) i granice kvantitacije (GK) svih sedam ispitivanih biotoksina su prikazane u tabeli 6.7. Kako je sistem za *ex situ* monitoring postavljen u neposrednoj blizini ovog uzgajališta i napaja se vodom sa tog lokaliteta, može se zaključiti da jedinke u sistemu za monitoring nijesu bile eksponirane biotoksinima tokom jednogodišnjeg perioda monitoringa.

Tabela 6.7. Granice detekcije (GD) i granice kvantitacije (GK) ispitivanih biotoksina; DA – domoična kiselina; STX – saksitoksin; dcSTX – dekarbamolsaksitoksin; GTX 1,4 – gonuautoksin 1,4; GTX 2,3 – gonuautoksin 2,3; NEO – neosaksitoksin; C 1,2 – Ce 1,2

Granica	DA	STX	dcSTX	GTX 1,4	GTX 2,3	NEO	C 1,2
	(mg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
GD	0.327	51.42	1.168	55.5	8.368	43.9	7.368
GK	0.928	62.32	1.99	74.57	14.36	49.8	12.28

Biotoksini kao produkti fitoplanktonskih algi, usled akumulacije u tkivima školjki mogu ući u lanac ishrane i uzrokovati različite simptome kod ljudi, a neki od njih mogu imati i letalan efekat. Odsustvo biotoksina u mesu dagnji posledica je male brojnosti dinoflagelata, grupe kojoj pripada najveći broj toksičnih i potencijalno toksičnih vrsta. Prema Ujević i sar. (2010) ukoliko brojnost vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* ne prelazi 10^5 ćel/l, oblast se može smatrati sigurnom sa aspekta pojave amnezijskog trovanja kod ljudi. Odsustvo biotoksina u akvatorijumu Bokotorskog zaliva pokazala su i ispitivanja Pestorić i sar. (2019) i Gvozdenović i sar. (2020).

U tabelama 6.8.a i 6.8.b su prikazane koncentracije (mg/kg suve mase) 11 metala u tkivu dagnji sa uzgajališta u Orahovcu tokom četiri sezone. Većina ispitivanih metala pripada grupi esencijalnih metala dok Cd, Pb i Hg pripadaju neesencijalnim, toksičnim metalima.

Tabela 6.8.a. Koncentracije ispitivanih metala u tkivu dagnji (mg/kg suve mase tkiva)

Sezona	Al (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)
Proljeće 2016	392.3	1.24	1.13	1.38	7.54
Ljeto 2016	108.5	1.37	0.77	0.81	5.22
Jesen 2016	82.2	1.16	0.56	0.67	5.75
Zima 2017	84.79	2.23	0.90	0.89	7.69

Tabela 6.8.b. Koncentracije ispitivanih metala u tkivu dagnji (mg/kg suve mase tkiva)

Sezona	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Hg (mg/kg)
Proljeće 2016	318.2	14.6	3.87	1.81	87.42	0.148
Ljeto 2016	121.1	9.55	1.76	1.41	124.3	0.121
Jesen 2016	104.6	6.26	1.59	1.15	84.1	0.100
Zima 2017	105.9	8.62	2.42	1.47	101.4	0.215

Uočene sezonske razlike koncentracija metala u tkivu dagnji u skladu su sa dosadašnjim istraživanjima za oblast Bokokotorskog zaliva (Stanković i sar., 2011; Perošević i sar., 2018). Koncentracije neesencijalnih metala su tokom svih ispitivanih sezona bile niže od maksimalno dozvoljenih koncentracija koje su propisane pravilnikom Crne Gore (Sl. list CG, 55/15). Neesencijalni metali mogu biti toksični i pri vrlo niskim koncentracijama i koncentracije ovih metala u tkivu vrste *Mytilus galloprovincialis* se koriste kao indikatori zagađenja mora (Stanković i sar., 2012). Cd, Pb i Hg su stabilni i perzistentni duži vremenski period u životnoj sredini, a dagnje kao filtratori mogu da akumuliraju velike koncentracije ovih elemenata u svojim tkivima i na taj način predstavljaju potencijalnu prijetnju u lancu ishrane. Unos visokih koncentracija Cd i Hg indukuje sintezu metalotioneina što predstavlja evoluciono konzerviran mehanizam detoksifikacije kod velikog broja vrsta, uključujući i dagnje (Stanković i sar., 2012, Teodorović i Kaišarević, 2015).

Kako je sistem za *ex situ* monitoring postavljen u neposrednoj blizini uzgajališta i napaja se vodom sa tog lokaliteta, može se zaključiti da su i jedinke u *ex situ* sistemu za monitoring tokom jednogodišnjeg monitoringa bile eksponirane istim koncentracijama metala u vodi (koje nijesu prelazile maksimalno dozvoljene koncentracije), odnosno da je

akumulacija metala kod jedinki u sistemu za monitoring slična prikazanim koncentracijama u jedinkama sa uzgajališta.

U tabeli 6.9 su prikazane vrijednosti kondicionog indeksa (KI) dagnji sa uzgajališta školjki u Orahovcu tokom jednogodišnjeg ciklusa. KI je varirao od minimalne vrijednosti 20.33 tokom januara 2017. godine do maksimalne vrijednosti 30.75 tokom maja 2016. godine.

Tabela 6.9. Vrijednosti kondicionog indeksa (KI) dagnji sa uzgajališta školjki u Orahovcu tokom istraživanog perioda

Mjesec	KI
April 2016	25.08
Maj 2016	30.75
Jun 2016	29.59
Jul 2016	24.55
Avgust 2016	22.69
Septembar 2016	26.39
Oktobar 2016	25.92
Novembar 2016	25.06
Decembar 2016	25.33
Januar 2017	20.33
Februar 2017	25.01
Mart 2017	23.58

Na kondicioni indeks utiču interakcije različitih ekoloških faktora: temperature, saliniteta, koncentracije kiseonika, dostupnosti hrane, ali i reproduktivni ciklus (Hrs-Brenko 1973; Marguš i Teskeredžić, 1984; Gosling, 1992; Ćelik i sar., 2012). Na sezonske varijacije KI kod dagnji ukazuju mnogi autori (Mladineo i sar., 2007; Marinković, 2010; Gavrilović i sar., 2011; Bhaby, 2015; Mitrić i sar., 2016; Gvozdenović, 2020). Prema Župan i Šarić (2014) kondicioni indeks je vrlo važan parametar koji ukazuje na kvalitet uzgajanih dagnji. Vrijednosti KI kod dagnji sa istog lokaliteta tokom sukcesivnih godina se mogu značajno razlikovati, što je rezultat promjena u reproduktivnoj aktivnosti. Dagnje su poznate po fleksibilnoj reproduktivnoj strategiji (Gosling, 1992) koja se mijenja u zavisnosti od promjene ekoloških faktora staništa, a samim tim dolazi i do promjena u vrijednostima KI. Ovu činjenicu potvrđuje i Bhaby (2015) za vrstu *Mytilus galloprovincialis*.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6.9 vidi se da su vrijednosti KI relativno stabilne tokom istraživanog perioda, što ukazuje da je lokacija povoljna za uzgoj dagnji. Na osnovu rezultata fizičko-hemijsko-bioloških analiza vode na uzgajalištu, jasno je da se radi o vodi dobrog kvaliteta, da odsustvo direktnog zagađenja, ali i pozicija uzgajališta, a time i pozicija *ex situ* sistema za monitoring obezbjeđuju povoljne i relativno stabilne ekološke uslove i dovoljnu količinu hrane za mediteransku dagnju.

6.1.2.2. Povezanost srčanog ritma i fizičko-hemijskih parametara

Veza između srčanog ritma školjki i osnovnih ekoloških faktora provjerena je multivarijantnom analizom osnovnih komponenti (PCA – Principal Component Analysis). Za analizu su korišćene vrijednosti temperature, saliniteta, providnosti vode, koncentracije rastvorenog kiseonika, procenta zasićenosti kiseonikom, koncentracije fosfata, silikata, nitrata i nitrita (Tabela 6.5), koncentracije hlorofila *a* (Tabela 6.6) i srednje dnevne vrijednosti srčanog ritma tri karakteristične školjke za dane u kojima su analizirani fizičko-hemijski parametri kvaliteta vode na lokalitetu (Tabela 6.10).

Tabela 6.10. Prosječne dnevne vrijednosti srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti) tri karakteristične školjke korišćene za PCA

Datum	Najlošija školjka “Školjka 4”	Prosječna školjka “Školjka 10”	Najbolja školjka “Školjka 15”
20. april 2016	25.94	17.40	19.75
26. maj 2016	31.87	17.75	20.15
29. jun 2016	21.37	22.35	20.27
26. jul 2016	6.41	16.41	12.96
23. avgust 2016	8.24	14.20	13.44
20. septembar 2016	10.35	9.64	11.86
25. oktobar 2016	9.88	9.86	14.45
28. novembar 2016	9.34	9.93	10.37
21. decembar 2016	8.62	9.86	14.89
24. januar 2017	8.44	9.76	17.29
20. februar 2017	8.32	9.69	16.25
22. mart 2017	9.89	9.57	18.15

U tabeli 6.11 su prikazani rezultati Pearsonove korelacije srčanog ritma (HR) najbolje, prosječne i najlošije školjke i fizičko-hemijskih parametara vode. Značajna pozitivna korelacija utvrđena je za HR najlošije i prosječne školjke ($r = 0.694$, $p < 0.05$), kao i za HR najlošije i najbolje školjke ($r = 0.726$, $p < 0.05$). Kada su u pitanju fizičko-hemijski parametri vode i njihova korelacija sa HR, značajna negativna korelacija ($r = -0.824$, $p < 0.05$) saliniteta i HR utvrđena je samo kod najlošije školjke. Vrijednosti HR ni kod jedne od karakterističnih jedinki nijesu povezane ni sa jednim drugim parametrom kvaliteta vode. Očekivano, značajna korelacija je utvrđena za koncentraciju kiseonika i temperaturu ($r = -0.775$, $p < 0.05$), koncentracije nitrata i silikata ($r = 0.625$, $p < 0.05$) nitrata i nitrita ($r = 0.703$, $p < 0.05$), kao i koncentracije hlorofila *a* i nitrita ($r = 0.647$, $p < 0.05$).

Tabela 6.11. Pearsonova korelacija HR najbolje, prosječne i najlošije školjke sa fizičko-hemijskim i biološkim parametrima

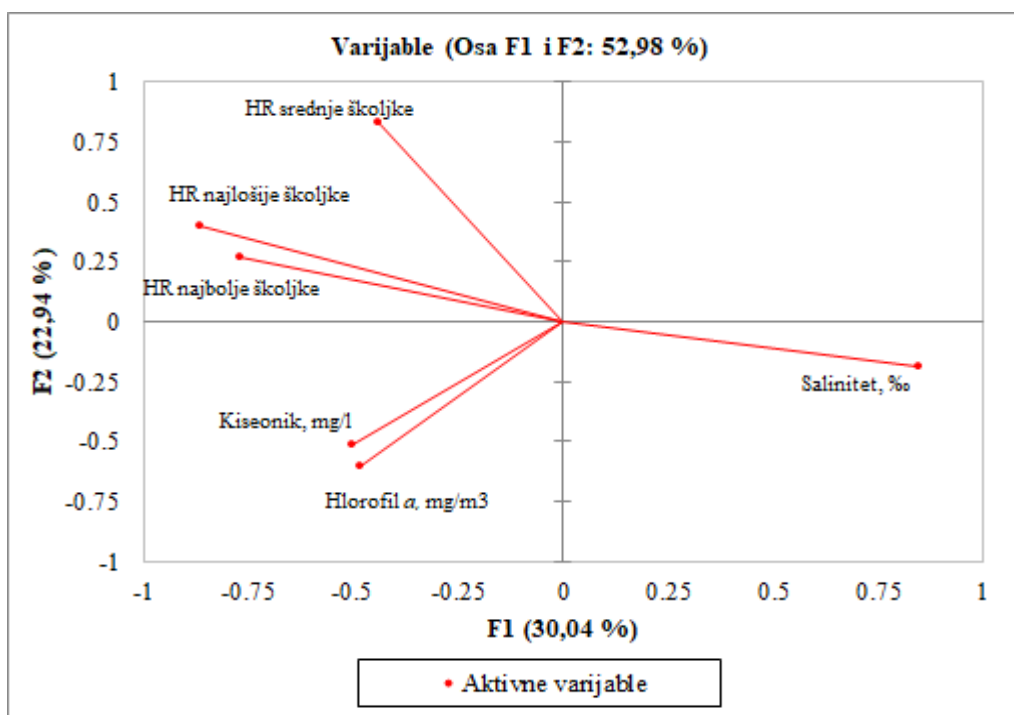
Varijable	Najlošija školjka	Prosječna školjka	Najbolja školjka	Temperatura, °C	Salinitet, ‰	Providnost, m	Kiseonik, mg/l	Kiseonik, ‰	Fosfati, µg/l	Silikati, µg/l	Nitriti, µg/l	Nitrati, µg/l	Hlorofil <i>a</i> , mg/m ³
Najlošija školjka	1												
Prosječna školjka	0.694	1											
Najbolja školjka	0.726	0.550	1										
Temperatura, °C	0.000	0.408	-0.453	1									
Salinitet, ‰	-0.824	-0.496	-0.558	0.014	1								
Providnost, m	-0.354	-0.062	-0.239	0.276	0.517	1							
Kiseonik, mg/l	0.241	-0.297	0.438	-0.775	-0.127	-0.271	1						
Kiseonik, ‰	0.479	0.070	0.326	-0.264	-0.336	-0.308	0.729	1					
Fosfati, µg/l	-0.270	-0.514	-0.460	-0.103	0.186	-0.404	0.272	0.331	1				
Silikati, µg/l	0.430	0.303	0.107	0.203	-0.454	-0.493	0.000	0.077	0.105	1			
Nitriti, µg/l	-0.198	-0.437	-0.186	-0.142	-0.092	-0.061	0.031	-0.207	0.325	0.352	1		
Nitrati, µg/l	0.053	-0.070	-0.003	0.049	-0.391	-0.194	-0.199	-0.370	-0.183	0.625	0.703	1	
Hlorofil <i>a</i> , mg/m ³	0.187	-0.243	0.219	-0.444	-0.319	-0.278	0.370	0.201	0.083	0.266	0.647	0.457	1

Masnim slovima su označene statistički značajne vrijednosti ($p < 0.05$)

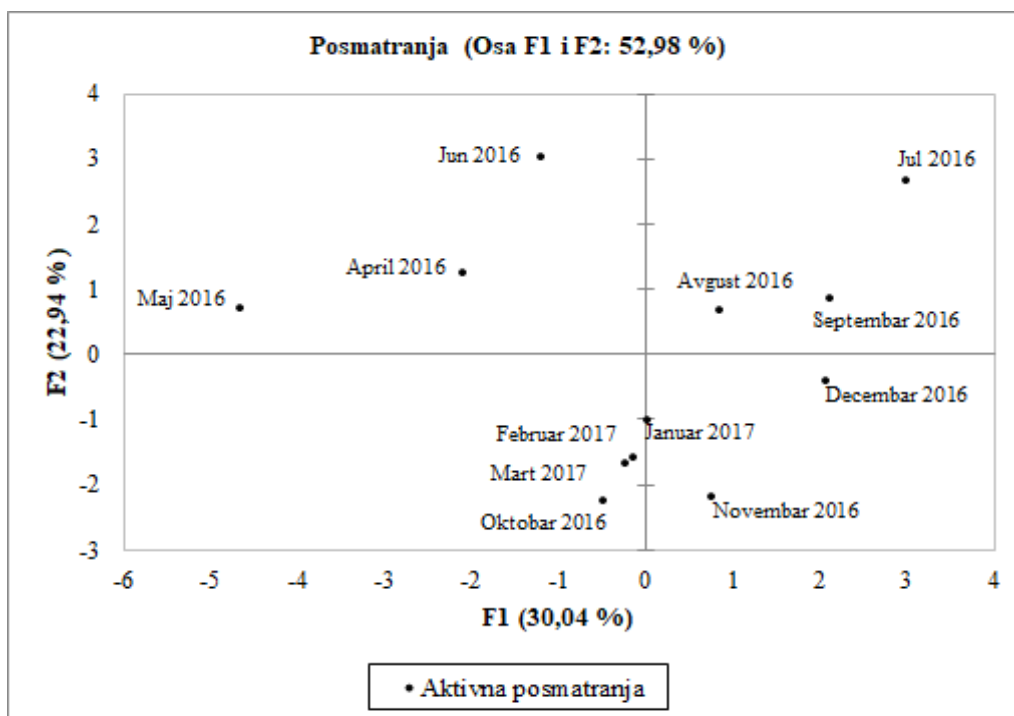
Svojstvene vrijednosti korelacione matrice su date u tabeli 6.12. Prve dvije PCA ose objašnjavaju 52.979 % varijabilnosti, dok prve četiri PCA ose objašnjavaju skoro 85 % varijabilnosti. Na slikama 6.11 i 6.12 su predstavljeni rezultati PCA analize. Slika 6.11 prikazuje međusobni odnos svih statistički značajnih parametara (ostali nijesu prikazani). Veoma je važno što se individue, bez obzira na znatne međusobne razlike, jasno grupišu na osnovu vrijednosti srčanog ritma. Takođe, jasno se vidi uticaj saliniteta na srčani ritam i značajna negativna korelacija HR najlošije školjke i saliniteta. Porastom saliniteta opada srčani ritam. Na slici 6.12 su prikazana grupisana posmatranja na osnovu prve dvije glavne komponente, na kojoj se vidi jasno razdvajanje toplijih i hladnijih mjeseci. Mada, interesantnije je dalje razdvajanje unutar grupe toplijih mjeseci i to tako što su prva tri mjeseca monitoringa (april, maj i jun 2016) jasno razdvojeni od naredna tri mjeseca monitoringa (jul, avgust, septembar). Ovdje treba posebno naglasiti da PCA analizom nije utvrđena značajna veza između temperature i srčanog ritma.

Tabela 6.12. Svojstvene vrijednosti korelacione matrice

Glavne komponente	Ejgin vrijednosti	Udio u ukupnoj varijabilnosti (%)	Kumulativna varijabilnost (%)
F 1	3.905	30.037	30.037
F 2	2.982	22.942	52.979
F 3	2.629	20.221	73.200
F 4	1.513	11.635	84.835
F 5	0.704	5.412	90.247
F 6	0.466	3.588	93.835
F 7	0.326	2.511	96.346
F 8	0.283	2.178	98.524
F 9	0.115	0.885	99.410
F 10	0.051	0.394	99.803
F 11	0.026	0.197	100.00



Slika 6.11. PCA analiza: Prikaz međusobnih odnosa svih analiziranih parametara (prikazani su samo statistički značajni parametri). Prve dvije PCA ose objašnjavaju 53 % varijabilnosti



Slika 6.12. PCA analiza: Prikaz rasporeda (grupisanja) posmatranja (srednjih mjesečnih vrijednosti HR) Prve dvije PCA ose objašnjavaju 53 % varijabilnosti

Značajna korelacija između HR najbolje, prosječne i najlošije školjke, ukazuje da sve školjke, bez obzira na individualne varijacije, daju isti trend ponašanja, pa se tako mogu i posmatrati kao grupa, odnosno da se od jedinki u monitoring sistemu može očekivati sinhroni odgovor srčanog ritma.

Statistički značajna negativna korelacija saliniteta i HR uočena je samo kod najlošije školjke. Sličan trend povezanosti saliniteta i HR je zabilježen i za prosječnu i najbolju školjku, ali bez statističke značajnosti, što pokazuje da kod školjki u dobroj kondiciji varijacije saliniteta u granicama uobičajenih vrijednosti ne utiču na srčani ritam. Tokom jednogodišnjeg trajanja monitoringa na uzgajalištu u Orahovcu salinitet se kretao u opsegu od 11.8 – 36.1 ‰. Bayne (1973) ukazuje da kod vrste *Mytilus edulis* ne dolazi do promjene HR u rasponu saliniteta 16.3 – 32.3 ‰. Prema Nicholson (2002) kod vrste *Perna viridis* salinitet u širokom rasponu (15 – 35 ‰) nije imao značajnog uticaja na HR, odražavajući eurihalnost vrste. Prema Gosling (2003; 2015) salinitet utiče na HR školjki na taj način što ometa osmotsku ravnotežu srčanog tkiva, ali školjke mogu podnijeti izuzetno širok raspon saliniteta u svom prirodnom okruženju.

U pogledu saliniteta, vrste roda *Mytilus* spadaju u grupu osmokonformista, pa je kod njih koncentracija soli u tjelesnim tečnostima direktno proporcionalna salinitetu morske vode. U uslovima akutnog osmotskog stresa kod vrsta roda *Mytilus* dolazi do smanjenja HR, što je primarno uslovljeno zatvaranjem ljuštura, smanjenim stepenom ili potpunom redukcijom filtracije, smanjenim unosom kiseonika i prelaskom sa aerobnog na anaerobni metabolizam (Gracey i Connor, 2016). U uslovima hroničnog osmotskog stresa vrste roda *Mytilus* se adaptiraju na taj način što mijenjaju koncentracije soli u citosolu, za šta je po nekim autorima neophodno i do nekoliko dana (de Vooy, 1991; Gosling, 1991; Hawkins i Bayne, 1992 – cit. iz Braby i Somero, 2006).

Izostanak značajne korelacije između HR i koncentracije kiseonika je u skladu sa literaturnim podacima. Nicholson (2002) je pokazao da pri optimalnim koncentracijama kiseonika, HR kod jedinki vrste *Perna viridis* pokazuje male varijacije, dok se u uslovima hipoksije javlja bradikardija. Pri smanjenim koncentracijama kiseonika dolazi do smanjenja HR kod vrsta *Pecten maximus*, *Mytilus edulis*, *Modiolus demissus*, *Noetia ponderosa*, *Arctica islandica* i *Mya arenaria* ukazuju (Bayne, 1971; Brand i Roberts, 1973; Lowe i Trueman,

1972; Taylor i Brand, 1975; Booth i Mangum, 1978; Deaton i Mangum, 1978). Na lokalitetu Orahovac tokom perioda istraživanja nije zabilježen značajan pad koncentracije rastvorenog kiseonika niti zasićenja vode kiseonikom, pa se može konstatovati da su jedinke u monitoring sistemu tokom cijelog perioda bile u povoljnom kiseoničnom režimu.

Opšte je poznato da kod ektotermnih organizama, kao što su vrste roda *Mytilus*, od temperature morske vode zavisi i temperatura njihovog tijela, što se direktno odražava i na njihove fiziološke funkcije (Kern i sar., 2015; Collins i sar., 2019). Gosling (2003; 2015), Hagger i sar. (2010), kao i Bakhmet i sar. (2019) ukazuju da postoji pozitivna linearna korelacija između HR i temperature morske vode kod vrsta iz roda *Mytilus*. Kod vrsta *Mytilus galloprovincialis*, *Anodonta cygnea*, *Aequipecten opercularis* i drugih mekušaca je takođe uočena pozitivna korelacija između temperature i srčane aktivnosti (Sommerville, 1975; Kamenos i sar., 2006; Kholodkevich i sar., 2009b). Santini i sar. (1999) kod vrste *Patella caerulea* ukazuje na statistički značajnu pozitivnu korelaciju HR i temperature. Takođe, prema Nicholson (2002) temperatura ima značajan pozitivan uticaj na HR vrste *Perna viridis*. Značajan uticaj temperature na HR potvrđuju i (Pickens, 1965; Trueman i Lowe, 1971; Lowe i Trueman, 1972; Coleman N., 1972; 1974; De Fur i Mangum, 1979; Dietz i Tomkins, 1980; Davenport i Carrion-Cotrina, 1981, Akberali i Trueman, 1985; Braby i Somero, 2006; Xing i sar., 2019). Uprkos značajnoj korelaciji temperature i HR kod vrste *Mytilus edulis*, Bahmet i sar. (2019) ukazuju da postoje periodi kada temperatura i HR nijesu u korelaciji, kao i da tokom tih perioda na varijacije HR primarno utiče dostupnost hrane, što je ranije uočio i Loo (1992). Takođe, Bakhmet (2017) ukazuje da kod vrste *Mytilus edulis* dolazi do povećanja HR sa povećanjem brojnosti fitoplanktona u vodi, na šta ukazuju i Cheng i sar. (2018) kod vrste *Perna viridis*.

Rezultati dobijeni tokom jednogodišnjeg monitoringa ukazuju da korelacija između HR školjki i temperature nije bila statistički značajna, odnosno da uobičajena temperaturna variranja karakteristična za odabrani lokalitet ne predstavljaju razlog izražene varijabilnosti srčanog ritma školjki iz monitoring sistema. Razlog za odstupanje od literaturnih podataka možemo naći u relativno uskom opsegu variranja temperature (10 – 25 °C) tokom cijele godine na odabranom lokalitetu. Jasno je iz prethodnog da varijabilnost vrijednosti HR tokom jednogodišnjeg monitoringa nije posledica temperaturnih razlika između toplijih i hladnijih

mjeseci. Kako je već rečeno, u grupi toplijih mjeseci se prema HR evidentno izdvajaju prva tri mjeseca monitoringa (april, maj, jun) od naredna tri mjeseca (jul, avgust, septembar), ali temperatura vode tokom prva tri mjeseca monitoringa ne predstavlja ekstremne vrijednosti tokom perioda istraživanja. Naime, temperatura vode je tokom druga tri topla mjeseca viša, a u periodu jesen – zima niža nego u prva tri mjeseca), pa se može zaključiti da promjene srčanog ritma nijesu posledica niti sezonske dinamike niti temperaturnih promjena. Izražene razlike u srčanom ritmu jedinki u monitoringu tokom prva tri mjeseca u odnosu na ostatak godine ne mogu se dakle tumačiti uticajem ekoloških faktora ni biologije odabrane vrste. O razlozima za znatno niže vrijednosti HR tokom ostalih mjeseci monitoringa u odnosu na početna tri mjeseca ne može se zaključiti na osnovu raspoloživih podataka i rezultata monitoringa.

Po svemu sudeći, u monitoring sistemu treba obratiti pažnju na efekat starenja, odnosno na “zamor” sistema. Sukhotin i sar. (2003) navode da veličina i starost utiču na fiziološke procese plave dagnje *Mytilus edulis*. Motley (1934) primjećuje da kod slatkovodnih školjki efekat starenja dovodi do smanjenja HR. Nasuprot tome, Xing i sar. (2019) kod vrste *Chlamys farreri* ukazuju da efekat starenja značajno utiče na HR i smatraju da efekat starenja kod vrsta školjki iz familije kapica dovodi do povećanja HR, što je u suprotnosti sa rezultatima ove disertacije.

Tokom kontinuiranog monitoringa na uzgajalištu u Orahovcu eksponirane jedinke su smještene u akvarijume sa stalnim protokom vode, bile su konstantno uronjene i nalazile su se u relativno stabilnim hidrološkim uslovima. Prema Trueman i sar. (1973) pri stabilnim hidrološkim uslovima i konstantnoj uronjenosti jedinki u vodu, fluktuacije HR su neznatne, osim za vrijeme adukcija ili tokom dugotrajnog zatvaranja ljuštura školjki. Vrste *Mytilus edulis*, *Anodonta anatina*, *Mya arenaria* i *Ostrea edulis* pri stabilnim uslovima pokazuju određeni nivo aktivnosti sa relativno malim promjenama HR, ali neki autori pokazuju da tokom vremena može doći do smanjenja HR (Coleman N., 1974; Earll, 1975).

Analiza rezultata dobijenih visoko-frekventnim mjerenjima HR kod eksperimentalnih jedinki pokazuje da se u vještačkim *ex situ* uslovima promjene HR ne podudaraju sa literaturno navedenim trendovima. Individualne, a posebno grupne prosječne mjesečne vrijednosti HR tokom toplih mjeseci pokazuju blag, ali konstantan pad u odnosu na

maksimalne vrijednosti zabilježene u prvom mjesecu monitoringa (poljeće). Kako se individualne i grupne prosječne vrijednosti HR u prvom i posljednjem mjesecu monitoringa znatno razlikuju, uprkos činjenici da je monitoring i započet i završen u proljeće, promjene srčanog ritma jedinki u sistemu za monitoring se ne mogu objasniti sezonskom dinamikom. Jasno je da jedinke u monitoring sistemu žive u vještački stabilnim uslovima koji donekle nivelišu promenljive *in situ* uslove. Međutim, u takvim, relativno stabilnim uslovima, očekivala bi se manja variranja srčanog ritma nego što su eksperimentalno pokazana. I individualne razlike u HR se mogu smatrati znatno većim nego što bi se očekivalo od aklimatizovanih jedinki u kontrolisanim uslovima. Kako je alarmni sistem koncipiran tako da se aktivira grupnim odgovorom na stres, velike individualne razlike, kao i pad HR u funkciji vremena upravo mogu da onemoguće sinhroni grupni odgovor i alarmni signal u slučaju značajnijeg stresa, ma kakve prirode on bio. O ovome svakako treba voditi računa kod održavanja sistema za kontinuirani monitoring. Potrebno je mnogo češće analizirati rezultate mjerenja i na taj način pratiti ukupni status jedinki u sistemu. Redovnim praćenjem individualnog i grupnog statusa eksperimentalnih jedinki, posebno variranja srčanog ritma kao jednog od dva osnovna biomarkera na kojima se bazira monitoring sistem, omogućilo bi isključivanje nepouzdatih jedinki iz sistema i/ili zamjenu jedinkama stabilnijeg odgovora. Analizom prikupljenih rezultata mora se konstatovati da je sistem sklon “zamoru”, što potencijalno može kompromitovati pouzdanost monitoring sistema usled nesinhronog ili nedovoljno jasnog signala (alarma).

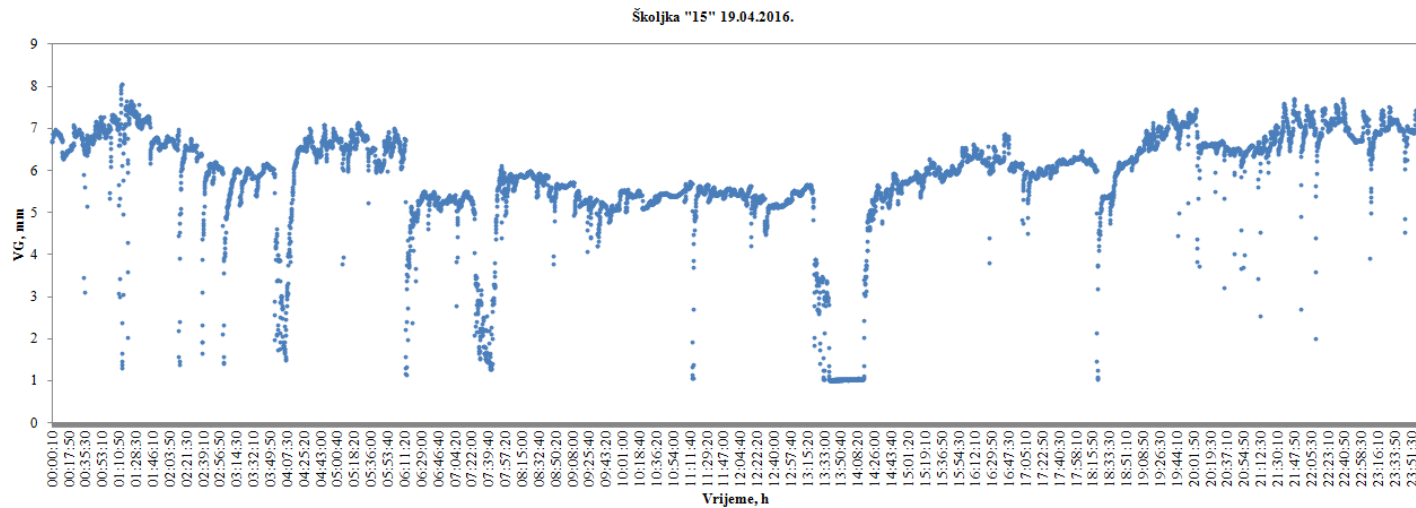
6.1.3. Kontinuirani monitoring pokreta ljušture dagnji

Drugi fiziološki biomarker koji je kontinuirano praćen tokom jednogodišnjeg monitoringa je pokret ljuštura dagnji, i to preko dva parametra – otvorenosti ljušture i broja adukcija.

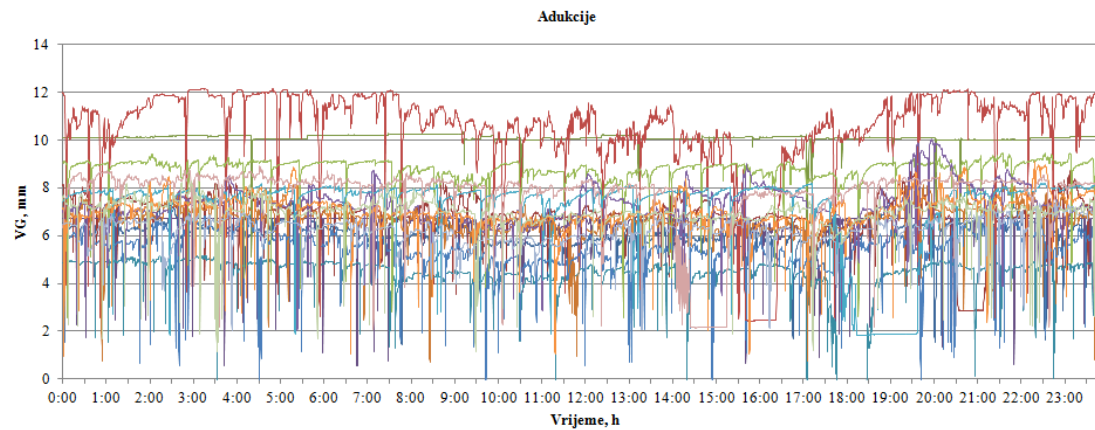
6.1.3.1. Dnevna dinamika pokreta ljušture

Na slici 6.13 je prikazana otvorenost ljušture jedne reprezentativne jedinke, snimana svakih deset sekundi tokom 24 h, a na slici 6.14 je zbirni prikaz adukcija svih jedinki u monitoring sistemu tokom 24 h. Slike ilustruju količinu dobijenih podataka ovako frekventnim mjerenjima na dnevnom nivou za svaku jedinku u monitoring sistemu. U cilju optimizacije sistema i pojednostavljenja postupka obrade i analize dobijenih podataka, pristupilo se unapređenju opreme u dijelu automatizacije obrade podataka (Personalna komunikacija sa Kholodkevich i Kurakin).

Na osnovu ovako velike količine podataka dobijene visoko-frekventnim mjerenjima, za svaku od jedinki u monitoringu je bilo moguće odrediti dnevnu dinamiku, odnosno, dijapazon variranja otvorenosti ljušture i broja adukcija tokom dana, za svaki dan tokom ispitivanog perioda. Kao i kod prethodno diskutovanog biomarkera, u slučaju bilo kakve akcidentne situacije važno je da sistem za monitoring ne zavisi od prirodne dnevne dinamike jedinki, odnosno, da sistem sa jednakom pouzdanošću može detektovati akcidentnu situaciju preko pokreta ljušture kao direktnog sinhronog odgovora na stres, bez obzira u koje se doba dana desi akcidentna situacija na koju sistem treba očekivano da odreaguje.



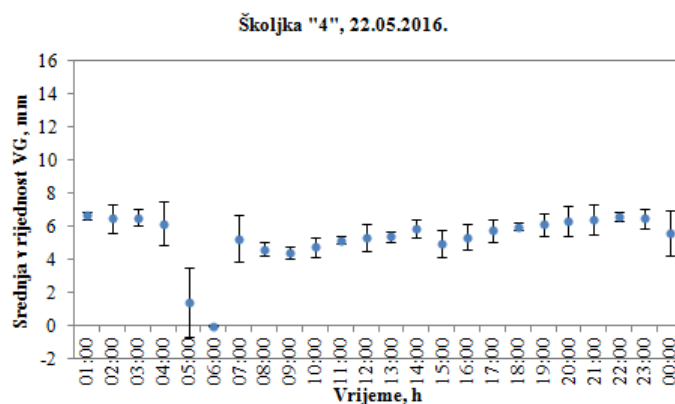
Slika 6.13. Kontinuirani monitoring otvorenosti ljušture jedne dagnje svakih deset sekundi tokom 24 h



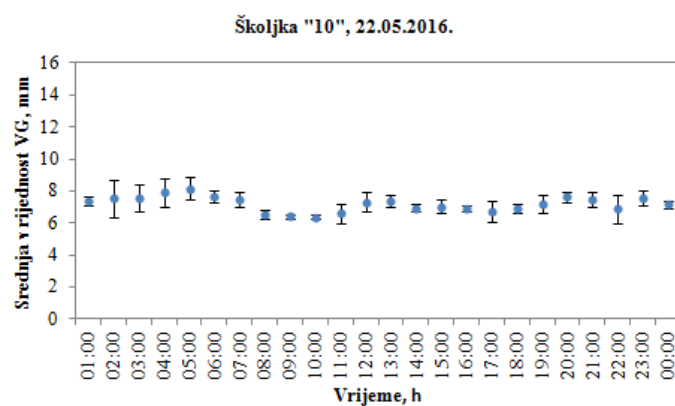
Slika 6.14. Prikaz adukcija (potpuno i djelimično zatvaranje kapaka ljuštura) ispitivanih jedinki tokom jednog dana monitoringa

Promjene VG najbolje, prosječne i najlošije školjke tokom jednog odabranog dana svakog mjeseca trajanja monitoringa su prikazane na slikama 6.15 – 6.18. Rezultati dnevnog ritma ukazuju da otvaranje i zatvaranje ljuštura nije sinhronizovano između ispitivanih jedinki. Generalno, na osnovu dobijenih rezultata za najbolju, prosječnu i najlošiju školjku, uočavaju se promjene VG u režimu dan – noć gdje su srednje vrijednosti VG tokom noći veće u odnosu na srednje vrijednosti VG tokom dana. Kod najbolje i srednje školjke su zabilježene veće srednje vrijednosti VG tokom noći u devet od dvanaest odabranih dana tokom jednogodišnjeg ciklusa (po jedan dan je odabran svakog mjeseca trajanja monitoringa). Kod najlošije školjke su zabilježene veće srednje vrijednosti VG tokom noći u šest od dvanaest odabranih dana tokom jednogodišnjeg ciklusa.

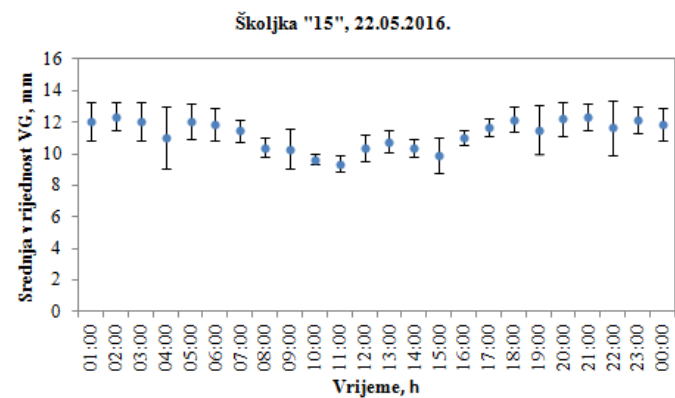
a)



b)

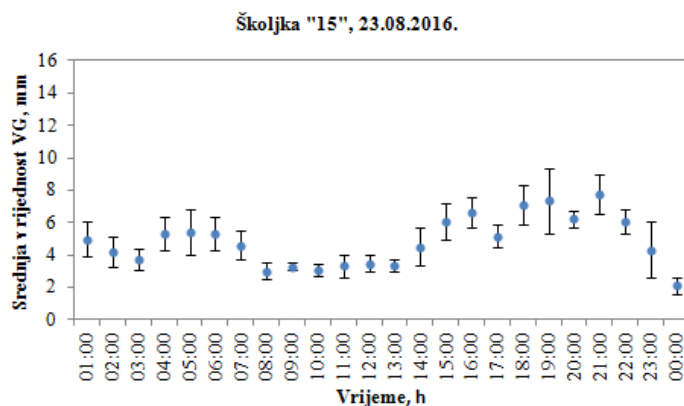


c)

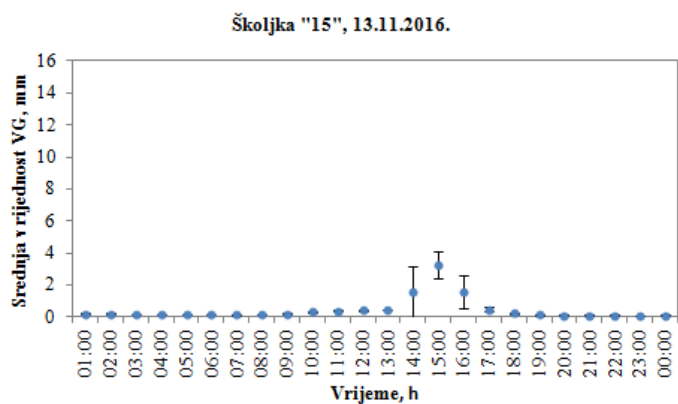


Slika 6.15. Dnevna dinamika otvorenosti ljušture (VG) tri reprezentativne jedinke (Panel a – Školjka “4”, Panel b – Školjka “10” i Panel c – Školjka “15”) tokom jednog nasumično odabranog dana tokom jednogodišnjeg kontinuiranog monitoringa (maj 2016). Prikazane su srednje vrijednosti VG (mm) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana

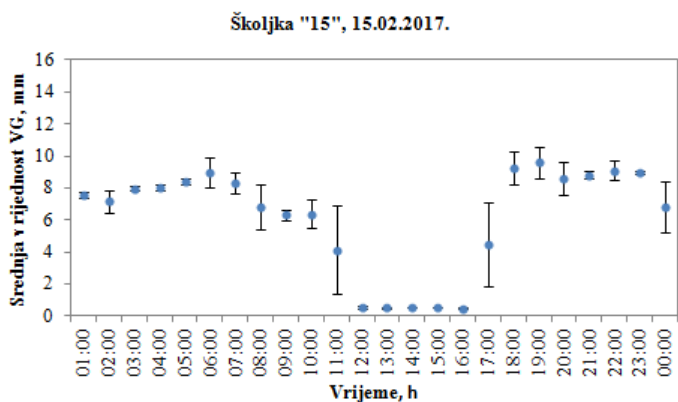
a)



b)

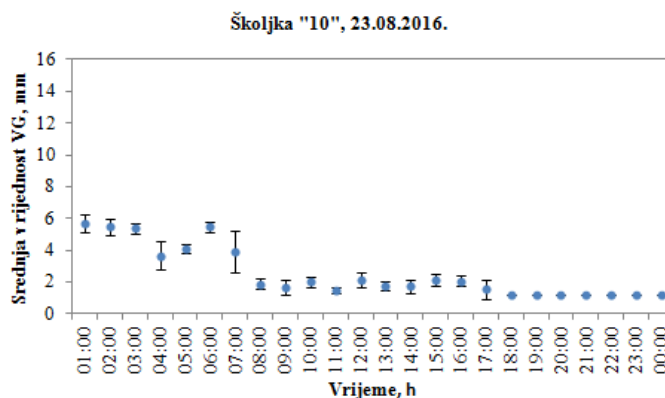


c)

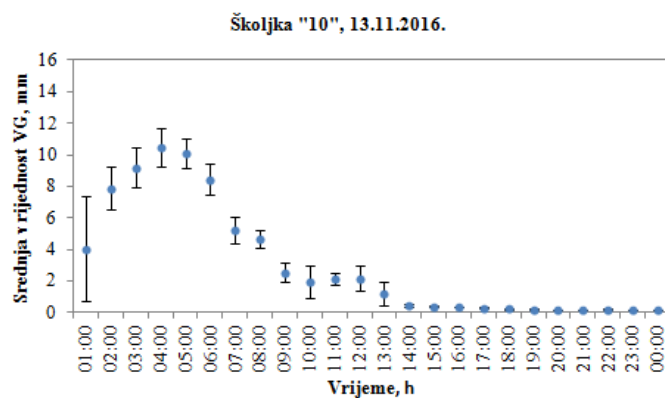


Slika 6.16. Dnevna dinamika otvorenosti ljušture (VG) najbolje školjke ("15") tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima tokom jednogodišnjeg kontinuiranog monitoringa (Panel a – Ljeto, Panel b – Jesen, Panel c – Zima). Prikazane su srednje vrijednosti VG (mm) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana

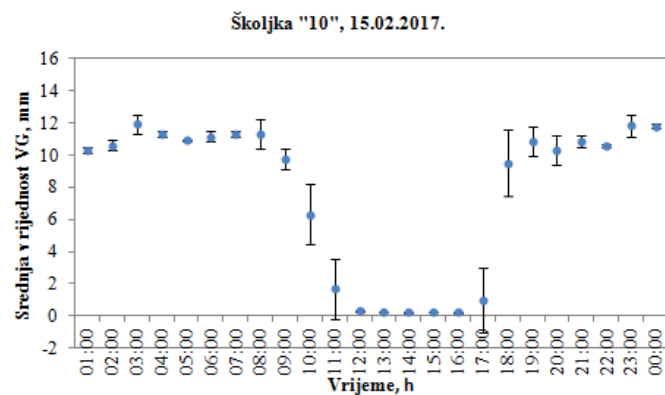
a)



b)

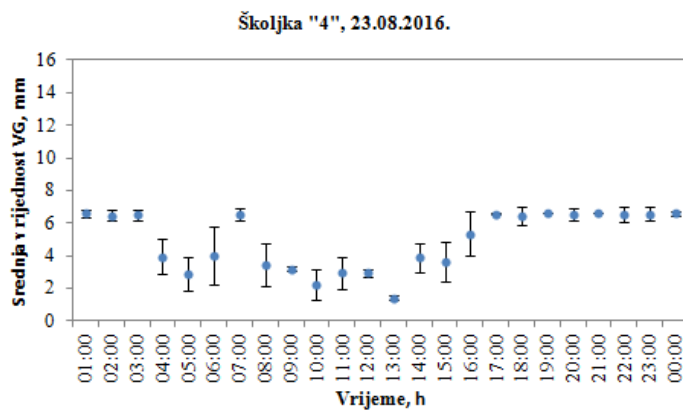


c)

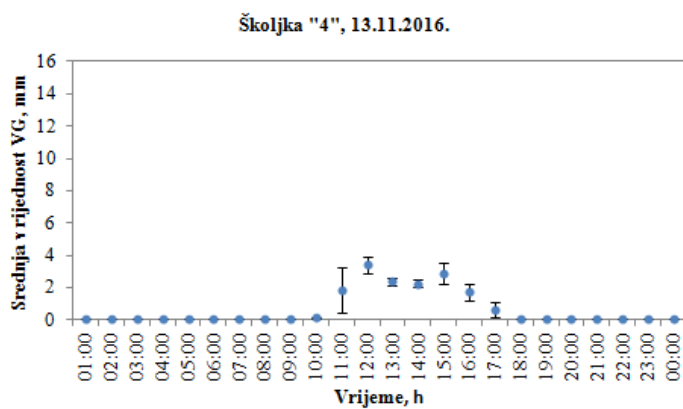


Slika 6.17. Dnevna dinamika otvorenosti ljuštore (VG) prosječne školjke ("10") tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima tokom jednogodišnjeg kontinuiranog monitoringa (Panel a – Ljeto, Panel b – Jesen, Panel c – Zima). Prikazane su srednje vrijednosti VG (mm) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana

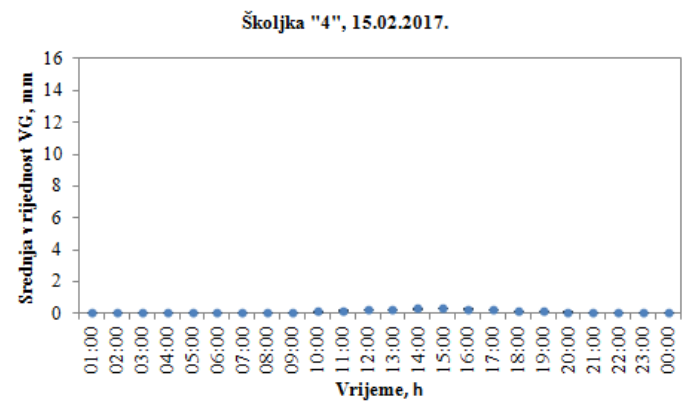
a)



b)



c)



Slika 6.18. Dnevna dinamika otvorenosti ljušture (VG) najlošije školjke ("4") tokom tri nasumično odabrana dana u različitim godišnjim dobima tokom jednogodišnjeg kontinuiranog monitoringa (Panel a – Ljeto, Panel b – Jesen, Panel c – Zima). Prikazane su srednje vrijednosti VG (mm) sa standardnom devijacijom za svaki sat tokom jednog dana

Za razliku od prikazanih rezultata koji ukazuju na nesinhronizovanu dnevnu aktivnost VG ispitivanih jedinki, Ballesta-Artero i sar. (2017) kod vrste *Arctica islandica* uočavaju veliku sinhronizovanost dnevne aktivnosti VG. Takođe i kod drugih vrsta školjki, kao što su *Mya arenaria*, *Dreissena polymorpha*, *Crassostrea gigas* i *Pinna nobilis* je primjećena velika sinhronizovanost VG (Thorin, 2000; Borchherding, 2006; Mat i sar., 2012; García-March i sar., 2016).

Comeau i sar. (2018) kod vrste *Mytilus galloprovincialis* ukazuju na postojanost cirkadijalnog ritma u *in situ* uslovima. Gnyubkin (2010) i u laboratorijskim uslovima ukazuje na cirkadijalni ritam VG kod iste vrste i smatra da je količina dostupne svjetlosti jedan od najbitnijih parametara koji utiču na varijabilnost VG. Uticaj svjetlosti na cirkadijalni ritam VG potvrđuju Wilson i sar. (2005) kod vrsta *Mytilus edulis* i *Astarte borealis*, kao i Robson i sar. (2010) kod vrste *Mytilus edulis*. Prema Gnyubkin (2010) tokom dana jedinke zatvaraju ljušturu češće nego tokom noći, što se dovodi u vezu sa izbjegavanjem predatora, na šta ukazuju i Ameyaw-Akumfi i Naylor (1987). Martella (1974) promjene VG u režimu dan – noć, tj. veću aktivnost plave dagnje tokom noći dovodi u vezu sa produkcijom bisusnih niti, koja je veća tokom noći u odnosu na dan.

Gudimov (2003) ukazuje da u uslovima konstantne izloženosti neprekidnom protoku vode, plava dagnja *Mytilus edulis* tokom perioda mirovanja samo djelimično zatvara ljušturu, a Ameyaw-Akumfi i Naylor (1987) kod neuhranjenih jedinki plave dagnje u uslovima konstantne uronjenosti u vodu, potvrđuju slabu cirkadijalnu ritmičnost VG.

Prema Borchherding (2006) VG se može drastično promjeniti u zavisnosti od doba dana. Dnevna periodičnost VG je uočena kod vrsta *Corbicula fluminea* i *Dreissena polymorpha* u uslovima kada ove jedinke nijesu imale dovoljno hrane za svoje metaboličke potrebe (Borchherding i Volpers, 1994; Ortmann i Grieshaber 2003; Borchherding, 2006).

Tokom proučavanja aktivnosti ljuštura školjki u laboratorijskim uslovima može doći do promjena njihovog ponašanja karakterističnog za prirodne uslove (Williams i Pilditch, 1997; García-March i sar., 2016). Da bi se dobile potpune i precizne informacije o uticaju različitih faktora na aktivnost ljuštura školjki najbolje je istraživanja sprovesti u *in situ* uslovima, na šta ukazuju i García-March i sar. (2008; 2016).

Kod primjene u kontinuiranom monitoringu, nesinhronizovanost pokreta ljuštura na dnevnom nivou jedinki u monitoring sistemu ne bi smjela da predstavlja faktor koji bi onemogućio relevantan sinhroni odgovor jedinki u grupi u slučaju akcidentne situacije. Za primjenu ovog biomarkera zapravo je mnogo važnije da jedinke u sistemu ne pokazuju izrazitu dnevno – noćnu dinamiku, jer bi u slučaju dužeg perioda istovremene zatvorenosti ljuštura većine jedinki u sistemu mogla izostati reakcija (brzo zatvaranje ljuštura) u slučaju hemijskog akcidenta.

6.1.3.2. Dinamika pokreta ljuštura tokom kontinuiranog monitoringa

U tabeli 6.13 su prikazane srednje mjesečne vrijednosti biomarkera baziranih na pokretima ljuštura ispitivanih jedinki tokom jednogodišnjeg perioda istraživanja.

Tabela 6.13. Otvorenost ljuštura – VG (%) i broj adukcija tokom jednogodišnjeg monitoringa

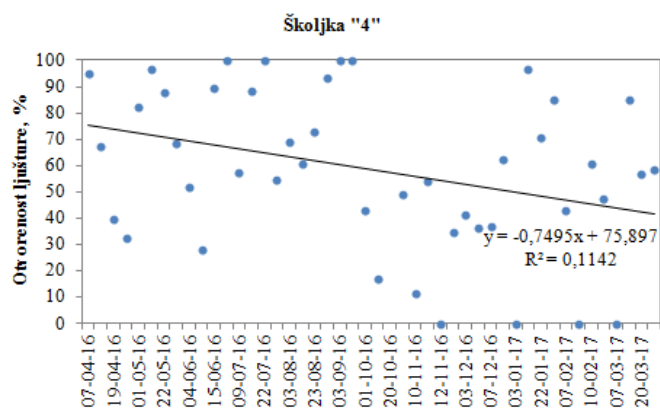
Mjesec	VG (%)	Broj adukcija
April 2016	76.75	113.46
Maj 2016	76.43	80.45
Jun 2016	67.92	69.65
Jul 2016	60.20	51.28
Avgust 2016	47.70	30.73
Septembar 2016	83.97	53.96
Oktobar 2016	59.63	17.82
Novembar 2016	60.62	13.55
Decembar 2016	70.26	13.30
Januar 2017	73.74	10.38
Februar 2017	59.97	9.36
Mart 2017	59.93	6.70

Ekstremi su zabilježeni u dva sukcesivna ljetnja mjeseca. Najveća otvorenost ljuštura je zabilježena tokom septembra 2016. godine i iznosila je 83.97 %, a najmanja tokom avgusta 2016. godine, 47.70 %, što ukazuje na odsustvo bilo kakvog sezonskog ritma kod ovog biomarkera. Generalno, vrijednosti VG su se tokom perioda istraživanja kretale u prosjeku od 60 – 75 %. Prosječan broj adukcija je bio najveći tokom prvog mjeseca monitoringa – aprila 2016. godine i iznosio je 113.46, dok je najmanji prosječan broj adukcija, 6.7 adukcija,

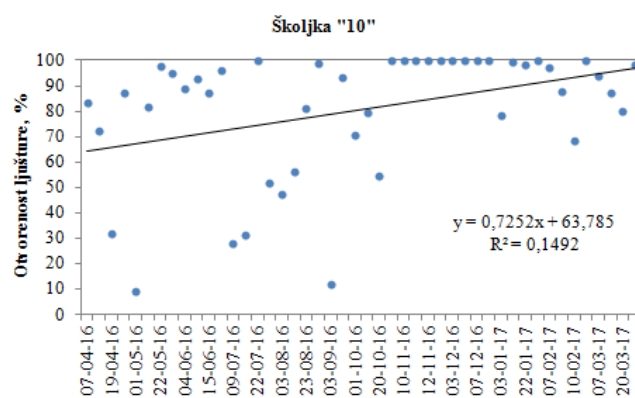
zabilježen tokom poslednjeg mjeseca monitoringa – mart 2017. godine. Shapiro-Wilk test je pokazao normalnu distribuciju vrijednosti otvorenosti ljuštura ($W = 32.75$, $p > 0.05$).

Trend analiza otvorenosti ljuštura u funkciji vremena urađena je za svaku školjku pojedinačno, ali su prikazani samo rezultati za tri karakteristične jedinke (Slika 6.19). Kod jedne polovine ispitivanih jedinki procenat otvorenosti ljuštura se linearno smanjivao tokom trajanja monitoringa, dok kod druge polovine ispitivanih jedinki procenat otvorenosti ljuštura se linearno povećavao tokom trajanja monitoringa, ali ni u jednom slučaju trend nije bio statistički značajan. Generalno, varijabilnost VG je bila velika kod većine ispitivanih jedinki tokom cjelokupnog trajanja monitoringa.

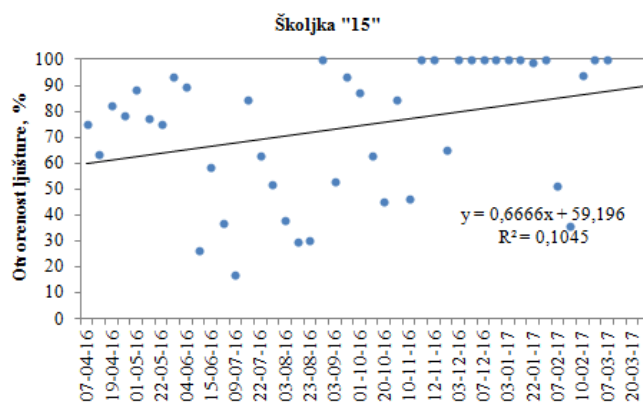
a)



b)



c)



Slika 6.19. Trend analiza otvorenosti ljuštare (%) tri reprezentativne školjke (Panel a – “Školjka 4”, Panel b – “Školjka 10” i Panel c – “Školjka 15”) tokom jednogodišnjeg monitoringa. Prikazane su srednje dnevne vrijednosti za četiri dana tokom svakog mjeseca u periodu april 2016 – mart 2017. godine. Trend nije statistički značajan.

Pokreti ljuštura školjki predstavljaju najuočljiviji i često jedini eksterni pokazatelj njihove aktivnosti, glavni oblik njihovog ponašanja (Gudimov, 2006). Na varijabilnost VG utiču brojni ekološki faktori. Prema García-March i sar. (2016) u prirodnim uslovima i bez prisustva ksenobiotika, može se očekivati velika varijabilnost VG u zavisnosti od vrste školjki, perioda godine i temperature vode. U prirodnim uslovima ljuštura školjki su otvorene i više od 70 % vremena zbog obavljanja fizioloških procesa – respiracije i ishrane (Kramer i Foekema, 2001; Redmond i sar., 2017). Tako su, Comeau i sar. (2018) kod vrste *M. galloprovincialis* u *in situ* uslovima bez prisustva zagađenja uočili da jedinke 97 % vremena drže ljuštura otvorene.

Proces filtracije vode kod školjki podrazumijeva kako unos hrane tako i respiraciju, pa se i koncentracija kiseonika u vodi dovodi u tijesnu vezu sa varijabilnošću VG. Porter i Breitburg (2016) su u laboratorijskim uslovima pratili uticaj hipoksije na VG kod vrste *Crassostrea virginica*. Uočeno je da eksperimentalne jedinke u uslovima hipoksije zatvaraju ljuštura, ali i to da kada se izlože uslovima optimalne koncentracije kiseonika jedinke otvaraju ljuštura i brzo ih vraćaju u prvobitni položaj. Prema Riisgård i Larsen (2015) kod vrste *Mytilus edulis* sa smanjenjem stepena filtracije i respiracije se smanjuje stepen otvorenosti ljuštura. Rezultati fizičko-hemijskih analiza pokazali su da je u cjelokupnom periodu istraživanja kiseonični režim bio povoljan, odnosno, rastvoreni kiseonik u vodi nije predstavljao faktor koji bi značajnije uticao na varijabilan procenat otvorenosti ljuštura jedinki u monitoring sistemu.

Tokom dvogodišnjeg ispitivanja uticaja različitih faktora životne sredine na promjene VG kod vrste *Arctica islandica* uočene su značajne razlike u prosječnoj mjesečnoj otvorenosti ljuštura školjki (Ballesta-Artero i sar., 2017). Autori su uočili dva nivoa aktivnosti ljuštura školjki. Aktivni nivo koji se javlja u periodu od februara do septembra, i neaktivni nivo (sa prosječnom dnevnom otvorenošću ljuštura < 23 %) koji se javlja u periodu od oktobra do januara. Autori smatraju da na sezonsku varijabilnost VG najvjerovatnije utiču hlorofil *a*, svjetlost i temperatura.

Kod vrste *Pinna nobilis* García-March i sar. (2016) u prirodnim *in situ* uslovima uočavaju sezonske promjene VG koje su u vezi sa dinamikom dostupne svjetlosti. Uočena su dva obrasca ponašanja, jedan koji je dominantan tokom ljeta i drugi dominantan tokom ostalog

dijela godine. Tokom istraživanja nije uočena korelacija VG sa kiseonikom i hlorofilom *a*, ali je uočeno da je VG bio direktno pod uticajem jačine i smjera struja. Kako je ranije navedeno, u jednogodišnjem monitoringu nije pokazan sezonski karakter promjena VG.

Anestis i sar. (2007) su pratili efekat uticaja temperature na otvaranje i zatvaranje ljuštura vrste *Mytilus galloprovincialis* i utvrdili da prilikom povećanja temperature vode od 7 °C do 16 °C dolazi do povećanja perioda otvorenosti ljuštura, dok pri daljem povećanju temperature vode do 24 °C dolazi do povećanja perioda zatvorenosti ljuštura ispitivanih jedinki. Usled povećanja temperature vode iznad 24 °C došlo je do ponovnog povećanja perioda otvorenosti ljuštura školjki. Temperatura vode na ispitivanom lokalitetu nije bilježila ekstremne vrijednosti, kretala se od 10 do 24 °C, pa se vrijednosti VG ne mogu vezati za temperaturne promjene tokom monitoringa.

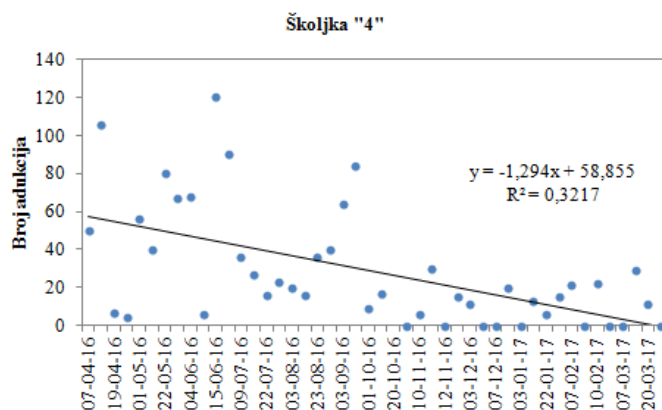
Sukhotin i sar. (2003) su ispitivali zavisnost starosti i veličine plave dagnje *Mytilus edulis* u odnosu na fluktuacije saliniteta i temperature i utvrdili da starost nije određivala „osjetljivost“ dagnji na niski salinitet i povišenu temperaturu. Autori su uočili individualnu varijabilnost ispitivanih jedinki različitih veličina. Veće jedinke su držale otvorene ljuštore i bile aktivne pri nižim vrijednostima saliniteta za razliku od manjih jedinki i pri kontrolnoj i pri povišenoj temperaturi.

Gudimov (2006) ukazuje na varijacije VG kod plave dagnje *Mytilus edulis* pri relativno stabilnim uslovima sredine. Isti autor takođe ukazuje da iste fluktuacije saliniteta i temperature u različitim sezonama uzrokuju različite varijacije VG kod jedinki ove vrste.

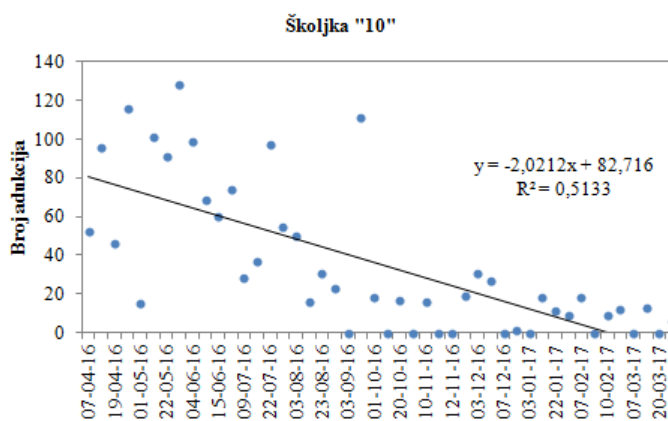
Tankersley i Dimock (1993) ukazuju da su kod slatkovodne školjke *Pyganodon cataracta* sezonske varijacije VG rezultat fluktuacije temperature i dostupne hrane, dok pol jedinki i reproduktivni ciklus nemaju uticaja na varijacije VG.

Trend analiza broja adukcija u funkciji vremena urađena je za svaku školjku pojedinačno, ali su prikazani rezultati samo za tri karakteristične jedinke (Slika 6.20). Rezultati ukazuju da je broj adukcija svih ispitivanih jedinki veći u prvim mjesecima monitoringa (tokom proljeća i ljeta) u odnosu na poslednje mjesece monitoringa (jesenji i zimski period) (Tabela 6.13). Uočava se da je kod svih ispitivanih jedinki varijabilnost dnevnog broja adukcija veća tokom perioda proljeća i ljeta u odnosu na jesenji i zimski period. Kod svih ispitivanih jedinki broj adukcija se linearno smanjuje tokom trajanja monitoringa.

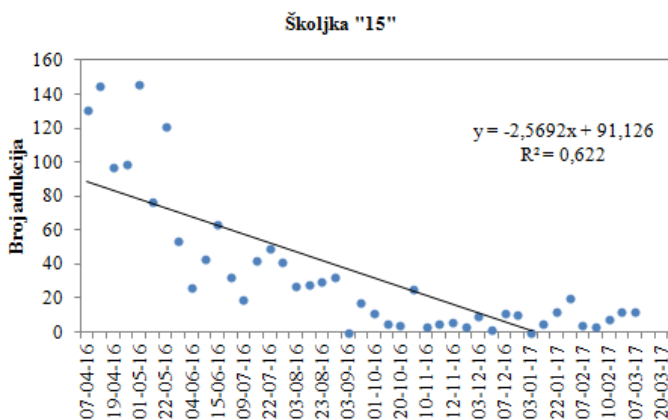
a)



b)



c)



Slika 6.20. Trend analiza broja adukcija tri reprezentativne školjke (Panel a – “Školjka 4”, Panel b – “Školjka 10” i Panel c – “Školjka 15”) tokom jednogodišnjeg monitoringa. Prikazane su srednje dnevne vrijednosti za četiri dana tokom svakog mjeseca u periodu april 2016 – mart 2017. godine

Adukcija se smatra najoštrijom i najčešćom dnevnom promjenom VG i predstavlja potpuno ili djelimično zatvaranje kapaka ljuštore (Gudimov, 2003). Prema Trueman (1966) adukcija istovremeno izaziva impulse pritiska u šupljini plašta i tkivima, što rezultira brzim izlivom vode iz šupljine plašta. Gudimov (2003) ukazuje da je kod plave dagnje *Mytilus edulis* tokom adukcija zatvaranje kapaka ljuštore uglavnom nepotpuno, što je primjećeno i tokom jednogodišnjeg monitoringa.

U laboratorijskim uslovima je uočen gotovo identičan obrazac promjena VG kod različitih vrsta školjki *Crassostrea gigas* (Haberkorn i sar., 2011), *Pinctada fucata* (Kiyohito i sar., 2006) i *Mytilus galloprovincialis* (Comeau i sar., 2019), koji se ogleda u povećanju broja adukcija kada je brojnost toksičnih dinoflagelata bila povećana u vodenom medijumu. Pojava većeg broja adukcija je u suštini strategija u cilju što efikasnijeg izbjegavanja kontakta sa toksičnim algama i samim tim sprječavanja unosa biotoksina (Haberkorn i sar., 2011). Niska koncentracija rastvorenog kiseonika i prisustvo toksičnih supstanci u vodi imaju veliki uticaj na stope i obrasce adukcija kod vrste *Pyganodon cataracta* (Tankersley i Dimock, 1993), kao i kod vrsta *Anodonta cygnea* i *Pleurobema coccineum* (Salánki, 1964; Badman, 1974; Salánki i Balogh, 1989). García-March i sar. (2008) ukazuju na povezanost adukcija sa ishranom, disanjem i metabolizmom kod vrste *Pinna nobilis*.

Prikazani rezultati ukazuju na različite trendove dva biomarkera bazirana na pokretima ljuštore. Dok srednje vrijednosti VG (otvorenost ljuštore) jedinki u monitoringu ne pokazuju jedinstven trend promjena vrijednosti tokom jednogodišnjeg perioda, prosječan broj adukcija se linearno smanjuje tokom trajanja monitoringa kod svih jedinki, slično smanjenju vrijednosti srčanog ritma o kome je bilo riječi u prethodnom poglavlju. Kako je prodiskutovano ranije u tekstu, promjene vrijednosti ovih biomarkera ne mogu se tumačiti niti sezonskom varijabilnošću, niti biologijom vrste, a nije utvrđena ni veza sa promjenljivim ekološkim faktorima.

6.2. Fiziološki biomarkeri dagnji kao odgovor na stres

6.2.1. Testovi saliniteta u kontinuiranom monitoringu

Ukupna kondicija jedinki, a time i performanse monitoring sistema provjerene su periodičnim izlaganjem sistema kratkotrajnom ekstremnom stresu. Zbirni odgovor grupe jedinki u monitoring sistemu na naglo smanjenje saliniteta medijuma praćen je mjesečnom dinamikom. Osim naglih promjena otvorenosti ljuštura i srčanog ritma neposredno nakon nagle promjene saliniteta medijuma, nakon kratkotrajne ekspozicije u trajanju od 1 h i vraćanja jedinki u morsku vodu uobičajenog saliniteta, praćen je oporavak jedinki preko vremena potrebnog za povratak vrijednosti HR na uobičajene nivoe. Dužina oporavka HR (T_{rec}) i koeficijent varijacije HR (CV_{HR}) odabrani su za indikatore stanja jedinki u sistemu. Duži oporavak implicira lošije ukupno stanje i obrnuto.

Rezultati testova saliniteta ukazuju da su tokom monitoringa dagnje različito reagovala na brzo smanjenje saliniteta. U tabeli 6.14 su prikazane vrijednosti biomarkera (T_{rec} i CV_{HR}) koji su se koristili za procjenu fiziološkog stanja dagnji na osnovu odgovora na ekstremni stres.

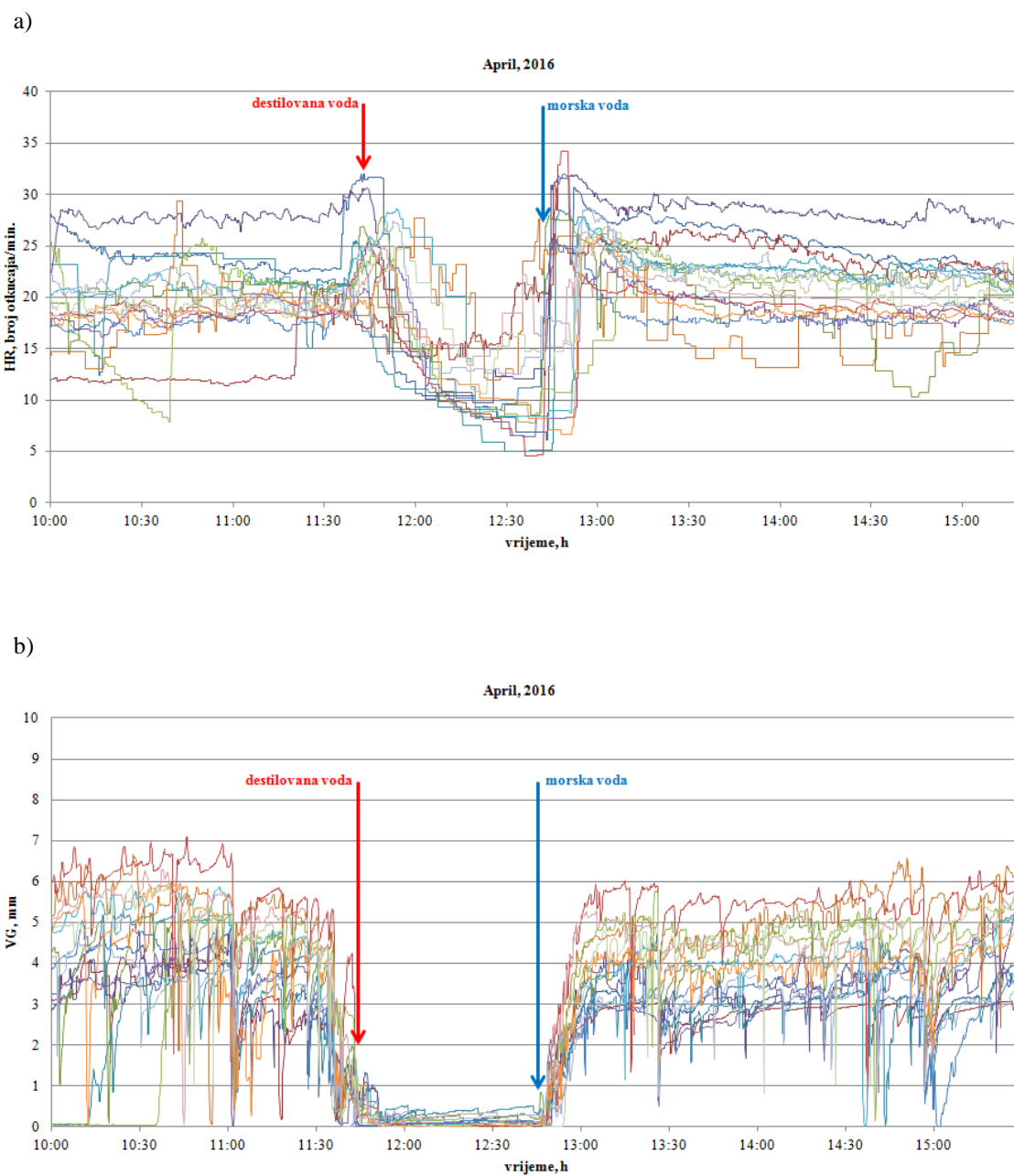
Tabela 6.14. Vrijednosti praćenih biomarkera u testovima saliniteta; T_{rec} – srednja vrijednost vremena oporavka HR (u minutima) za grupu eksponiranih jedinki; CV_{HR} – koeficijent varijacije srčanog ritma (%)

Mjesec	T_{rec} (minuti)	CV_{HR} (%)
April 2016	85.00 ± 8.80	16
Maj 2016	93.33 ± 6,41	22
Jun 2016	97.50 ± 7.89	35
Jul 2016	98.75 ± 14.20	21
Avgust 2016	91.67 ± 15.90	30
Septembar 2016	135.00 ± 15.00	22
Oktobar 2016	160.00 ± 55.65	50
Novembar 2016	95.00 ± 17.18	36
Decembar 2016	/	/
Januar 2017	/	/
Februar 2017	/	/
Mart 2017	/	/

Najmanja srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je zabilježena u prvom testu saliniteta u aprilu 2016. godine (prvi mjesec monitoringa) i iznosila je 85.00 ± 8.80 minuta, a najveća srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je zabilježena u oktobru 2016. godine i iznosila je 160.00 ± 55.65 minuta. Vrijednosti CV_{HR} u testovima saliniteta su se kretale od minimalne vrijednosti 16 % u aprilu 2016. godine do maksimalne vrijednosti 50 % u oktobru 2016. godine. Od decembra 2016. godine pa do kraja eksperimenta (mart 2017. godine) usled dejstva stresora nije došlo do očekivanih promjena HR kod eksponiranih jedinki. Ovdje je potrebno naglasiti da je do kraja eksperimentalnog perioda preživjelo 12 od inicijalno postavljenih 16 jedinki. Za razliku od HR, otvorenost ljuštura se pokazala pouzdanijim biomarkerom, jer je konzistentan odgovor grupe bilježen u svim testovima saliniteta tokom jednogodišnjeg monitoringa.

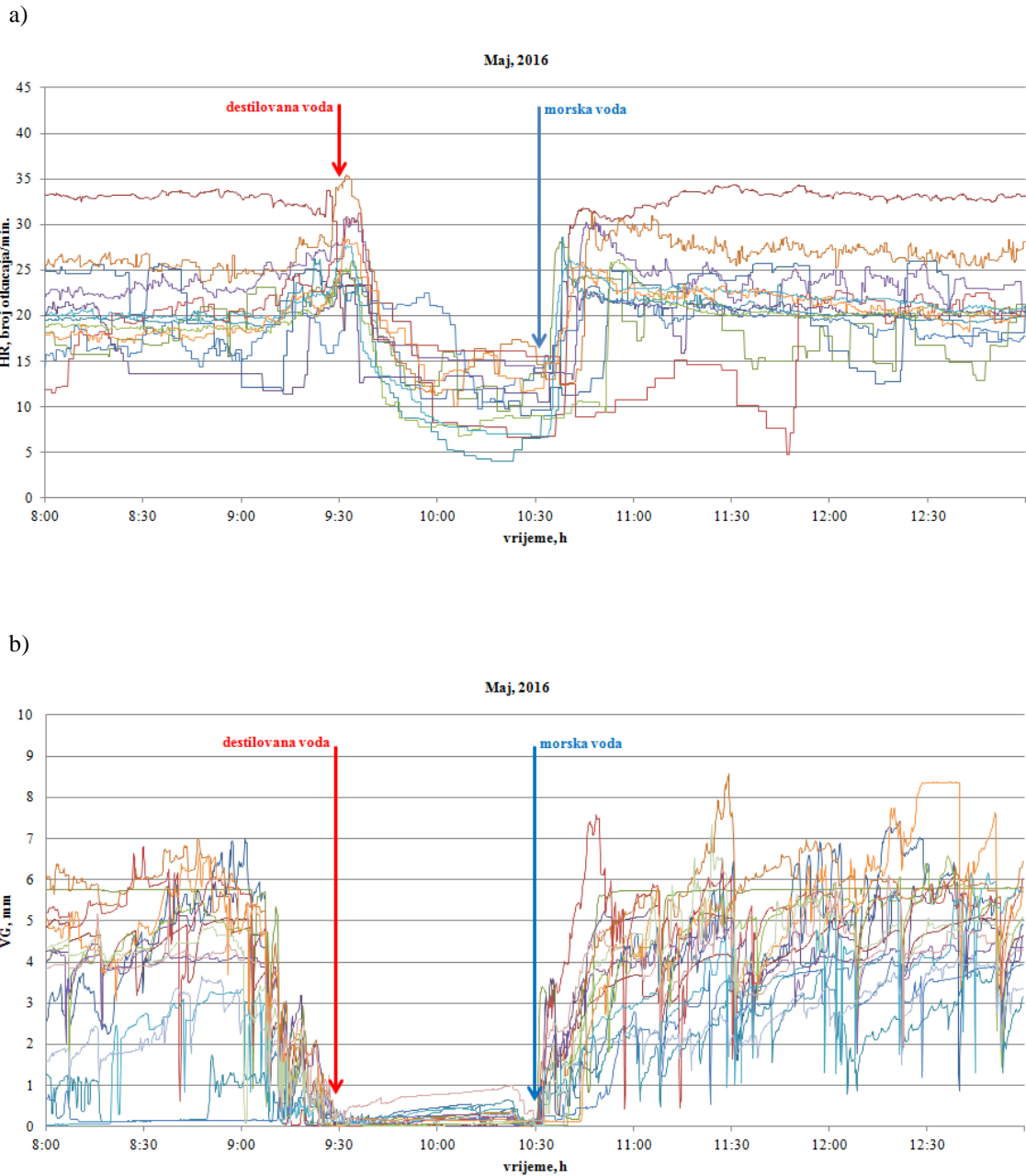
Efekat uticaja stresora (naglo smanjenje saliniteta morske vode za 50 %) na fiziološke biomarkere odabranog bioindikatora je prikazan na slikama 6.21 – 6.33. Svaka jedinka je na grafičkim prikazima predstavljena zapisom druge boje (konzistentno tokom trajanja monitoringa, za oba parametra), ali pošto se u testu saliniteta ne posmatra individualni, već grupni odgovor svih jedinki u monitoring sistemu, obilježavanje individualnih zapisa nije relevantno, a dodatno bi opteretilo grafičke prikaze.

U prvom testu saliniteta u aprilu 2016. godine usled dejstva stresora je došlo do brzog smanjenja HR kod svih eksponiranih jedinki i smanjene vrijednosti HR su se zadržale tokom cijelog perioda izloženosti smanjenom salinitetu (Slika 6.21a). Povratak HR na vrijednosti koje su bile prije nagle promjene saliniteta je uočen neposredno nakon vraćanja jedinki u morsku vodu, odnosno vraćanja vrijednosti saliniteta na prethodni, uobičajeni nivo. Srednja vrijednost vremena oporavka svih jedinki iz grupe (T_{rec}) je iznosila 85.00 ± 8.80 min, a CV_{HR} je iznosio svega 16 %. Takođe, usled dejstva stresora došlo je do zatvaranja ljuštura eksponiranih jedinki. Ljuštura su bile zatvorene tokom cijelog perioda izloženosti smanjenom salinitetu, a nakon uklanjanja stresora, odnosno, povratka vrijednosti saliniteta na uobičajeni nivo, uočeno je otvaranje ljuštura svih školjki u veoma kratkom vremenu (Slika 6.21b).



Slika 6.21. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u aprilu 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

U drugom testu u maju 2016. godine usled dejstva stresora je došlo do brzog smanjenja HR kod 14 jedinki i smanjene vrijednosti HR su se zadržale tokom cijelog perioda izloženosti smanjenom salinitetu. Povratak HR na prethodne, uobičajene vrijednosti trajao je nešto duže nego u prethodnom testu (Slika 6.22a). Srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je iznosila 93.33 ± 6.41 min, a CV_{HR} je porastao na 22 %. Takođe, usled dejstva stresora došlo je do zatvaranja ljuštura eksponiranih jedinki. Ljuštore su bile zatvorene tokom perioda izloženosti smanjenom salinitetu. Samo kod jedne školjke je uočeno otvaranje ljuštore tokom perioda izloženosti smanjenom salinitetu. Nakon uklanjanja stresora uočeno je brzo i sinhrono otvaranje ljuštura školjki (Slika 6.22b).



Slika 6.22. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u maju 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

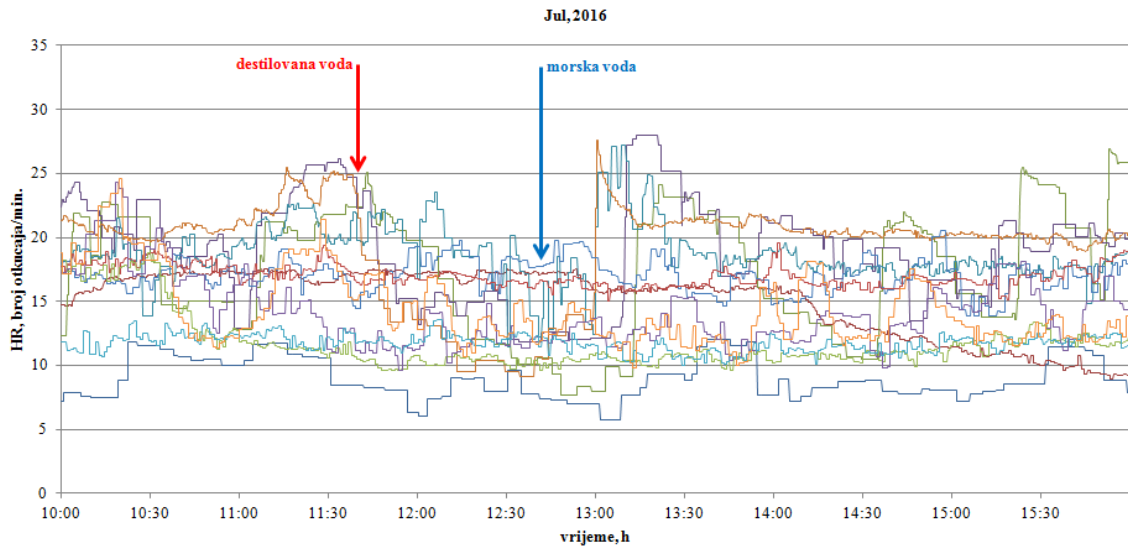
U trećem testu u junu 2016. godine usled dejstva stresora je došlo do smanjenja HR kod 12 jedinki (Slika 6.23a). Oporavak jedinki nakon uklanjanja stresora je bio efikasan. Srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je iznosila 97.50 ± 7.89 min, što je neznatno duže nego u pretodnom testu, ali je koeficijent variranja znatno veći, CV_{HR} je iznosio 35 %. Takođe, usled dejstva stresora došlo je do zatvaranja ljuštura eksponiranih jedinki. Ljuštura su bile zatvorene tokom trajanja testa saliniteta, a nakon uklanjanja stresora uočeno je otvaranje ljuštura svih školjki (Slika 6.23b).



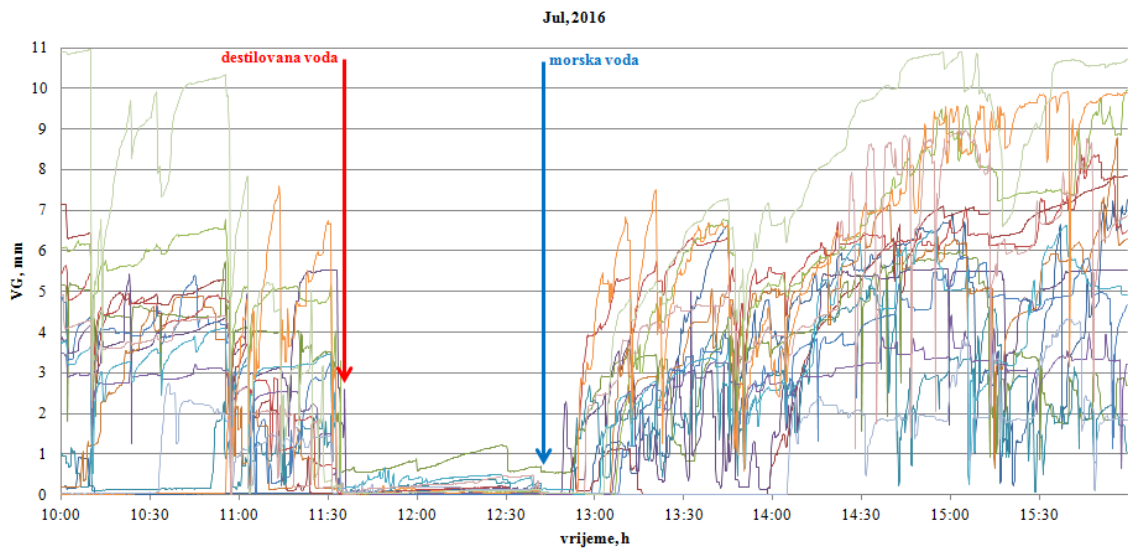
Slika 6.23. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u junu 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

Već kod četvrtog testa, u julu 2016. godine, došlo do drastičnog smanjenja broja jedinki kod kojih je registrovana promjena HR usled dejstva stresora – promjene HR su registrovane samo kod 4 jedinke (Slika 6.24a). Kod ostalih eksponiranih jedinki nije došlo do promjene HR usled dejstva stresora. Povratak HR na vrijednosti koje su bile prije smanjenja saliniteta je uočen nakon uklanjanja stresora. Srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki ne razlikuje se značajno od vrijednosti u prethodnom testu i iznosila je 98.75 ± 14.20 min, a CV_{HR} je iznosio 21 %. Za razliku od nekonzistentnog HR signala, djelovanje stresora i dalje dovodi do zatvaranja ljuštura svih eksponiranih jedinki. Samo kod jedne školjke je uočeno otvaranje ljuštura tokom perioda djelovanja stresora. Kao i u prethodnim testovima saliniteta, nakon uklanjanja stresora uočeno je otvaranje ljuštura svih školjki (Slika 6.24b).

a)



b)

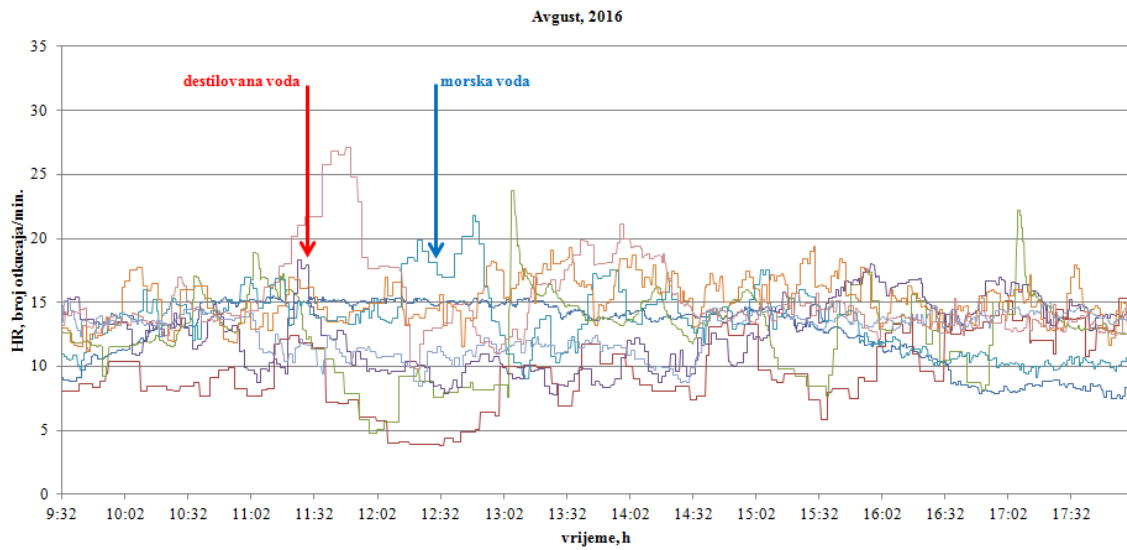


Slika 6.24. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u julu 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

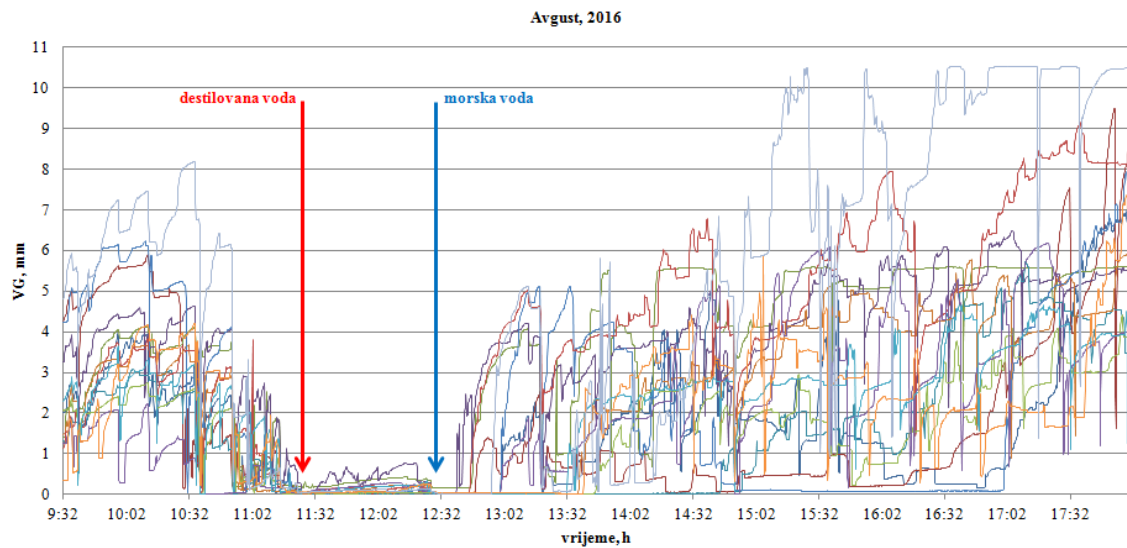
U petom testu u avgustu 2016. godine nastavlja se dalje smanjenje broja jedinki kod kojih je usled dejstva stresora došlo do smanjenja HR. Promjene su registrovane samo kod 3 jedinke. Povratak HR na vrijednosti koje su bile prije testa saliniteta je uočen nakon uklanjanja stresora (Slika 6.25a). Srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je iznosila 91.67 ± 15.90 min, a CV_{HR} je iznosio 30 %. Drugi biomarker – VG – i dalje daje konzistentan odgovor. Usled dejstva stresora došlo je do uobičajenog zatvaranja ljuštura svih eksponiranih jedinki. Osim kod jedne jedinke, ljuštura su bile zatvorene tokom perioda smanjenog saliniteta. Nakon uklanjanja stresora uočeno je otvaranje ljuštura školjki (Slika 6.25b).

U šestom testu u septembru 2016. godine smanjenje HR usled dejstva stresora je registrovano samo kod 2 jedinke, a povratak HR na vrijednosti koje su bile prije smanjenja saliniteta nakon uklanjanja stresora je znatno duži nego u ranijim testovima (Slika 6.26a). Srednja vrijednost T_{rec} je iznosila 135.00 ± 15.00 min, a CV_{HR} je iznosio 22 %. Odmah nakon smanjenja saliniteta došlo je do zatvaranja ljuštura eksponiranih jedinki. Samo kod jedne školjke je uočeno otvaranje ljuštura tokom perioda smanjenog saliniteta. Nakon uklanjanja stresora uočeno je otvaranje ljuštura školjki (Slika 6.26b).

a)

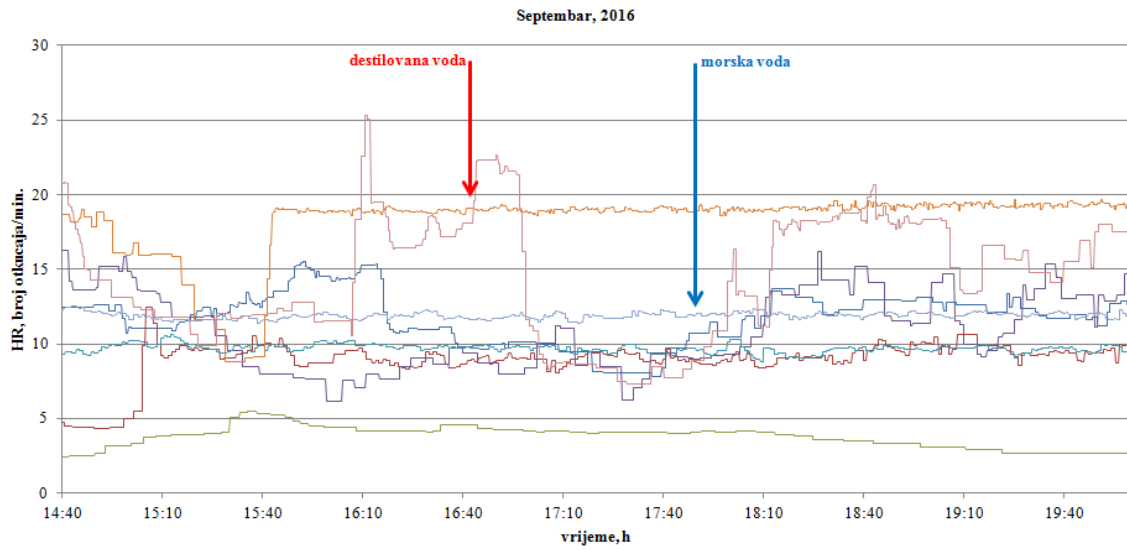


b)

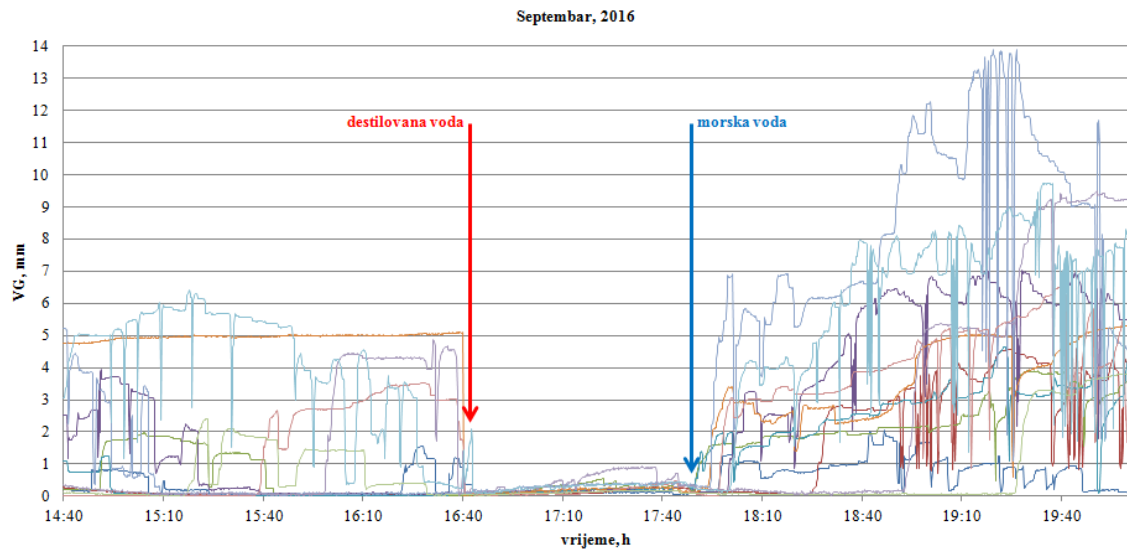


Slika 6.25. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u avgustu 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

a)



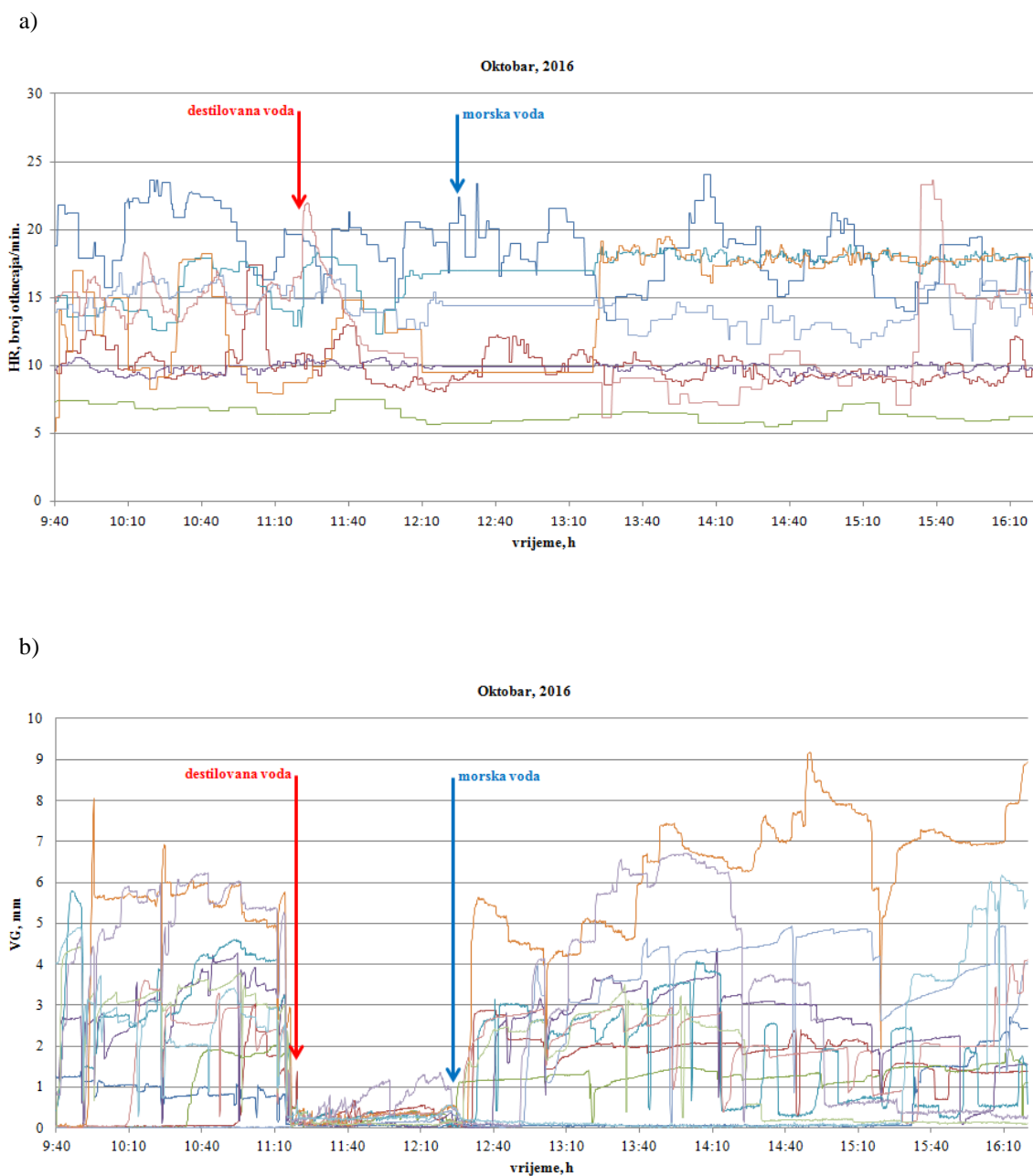
b)



Slika 6.26. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u septembru 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

Na drastično smanjenje saliniteta u oktobru 2016. godine su smanjenjem HR reagovale 3 jedinke. Kod ostalih eksponiranih jedinki nije došlo do promjene HR usled dejstva stresora. Nakon uklanjanja stresora povratak HR na vrijednosti koje su registrovane prije smanjenja saliniteta bio je još sporiji nego u prethodnom testu (Slika 6.27a). Srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je iznosila čak 160.00 ± 55.65 min, a CV_{HR} je iznosio čak 50 %. Nakon smanjenja saliniteta, zatvaranjem ljuštura su odreagovale sve eksponirane jedinke. Samo kod jedne školjke je uočeno otvaranje ljuštura u periodu smanjenog saliniteta. Nakon uklanjanja stresora uočeno je otvaranje ljuštura školjki (Slika 6.27b).

U testu u novembru 2016. godine došlo je do blagog porasta broja jedinki koje su na stres reagovale promjenom HR. Smanjenje vrijednosti HR je registrovano kod 5 jedinki. Povratak HR na vrijednosti koje su bile prije djelovanja stresora je efikasniji nego u prethodnom testu (Slika 6.28a). Srednja vrijednost T_{rec} za grupu eksponiranih jedinki je iznosila 95.00 ± 17.18 min, uz nižu varijabilnost nego u prethodnom testu – CV_{HR} je iznosio 36 %. Neposredno nakon smanjenja saliniteta, došlo je do zatvaranja ljuštura eksponiranih jedinki. Kod jedne školjke je došlo do hiperaktivnosti, tj. naizmjeničnog otvaranja i zatvaranja ljuštura tokom perioda smanjenog saliniteta. Nakon uklanjanja stresora uočeno je otvaranje ljuštura školjki (Slika 6.28b).



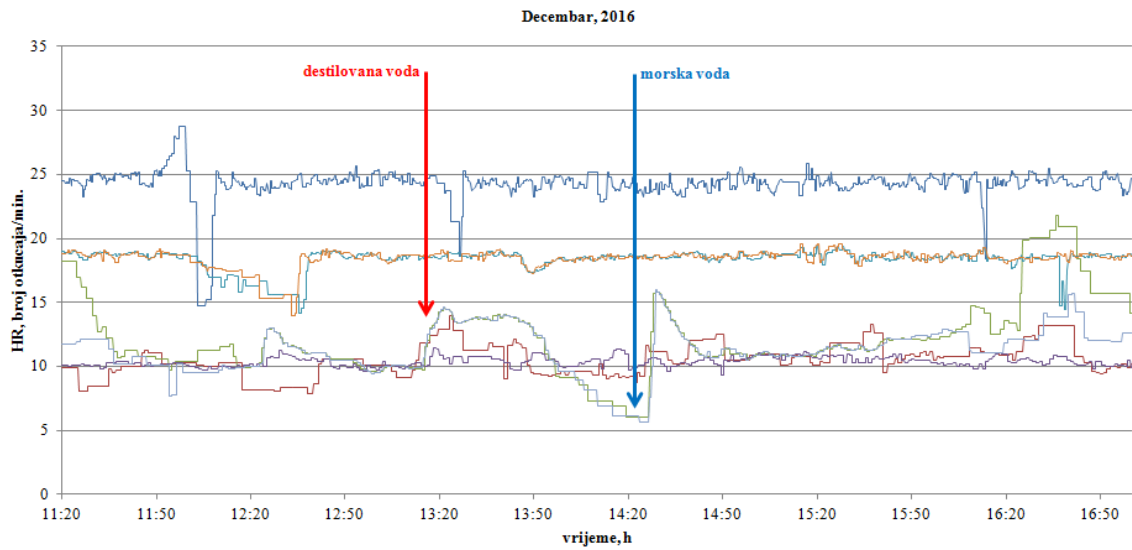
Slika 6.27. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u oktobru 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora



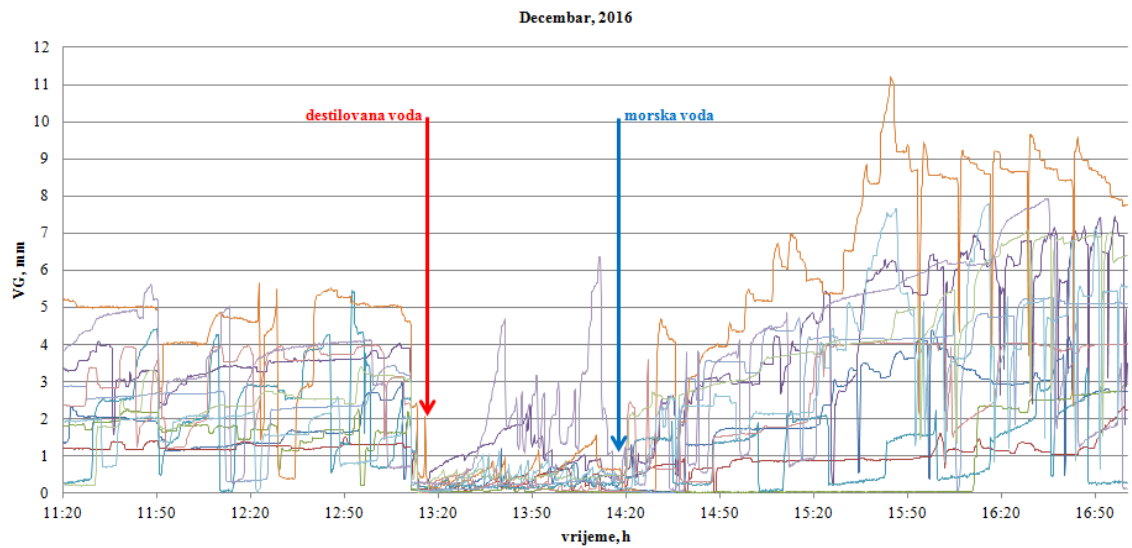
Slika 6.28. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u novembru 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

U testovima rađenim tokom poslednja četiri mjeseca monitoringa (decembar 2016. godine, januar, februar i mart 2017. godine) drastična promjena saliniteta nije dovela do promjena HR kod eksponiranih jedinki (Slike 6.29a – 6.32a). Međutim, eksponirane jedinke nastavljaju da na smanjenje saliniteta reaguju zatvaranjem ljuštore, iako se kod određenog broja jedinki registruje hiperaktivnost tokom perioda smanjenog saliniteta (u decembarskom testu kod četiri, a u narednim testovima kod pojedinačnih jedinki). Kod ostalih eksponiranih jedinki ljuštore su bile zatvorene u periodu smanjenog saliniteta (osim u martu kada je jedna školjka bila minimalno otvorena), a nakon povratka saliniteta na uobičajeni nivo uočeno je otvaranje ljuštura svih školjki (Slike 6.29b – 6.32b).

a)

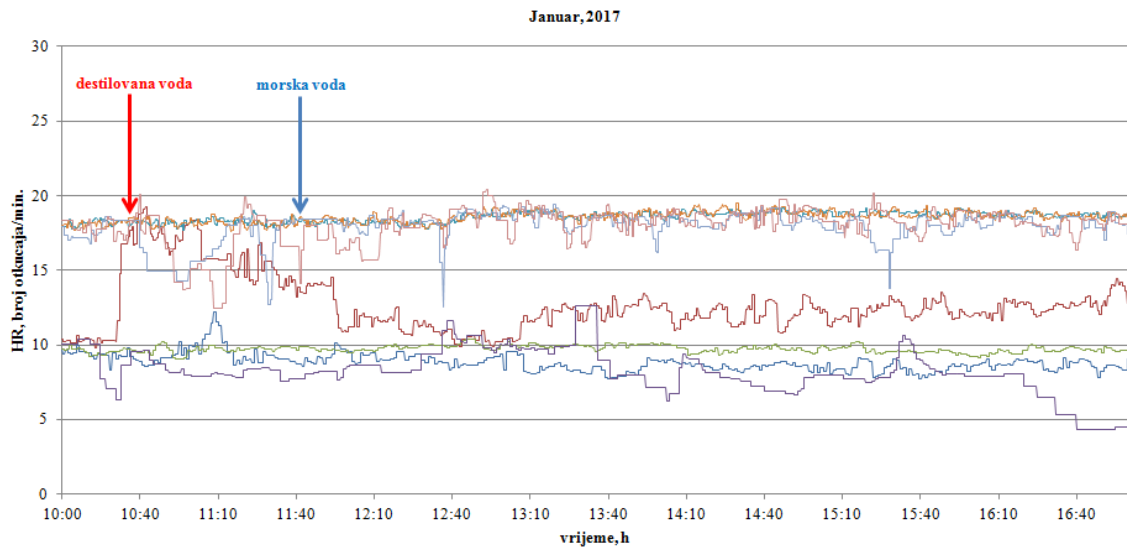


b)

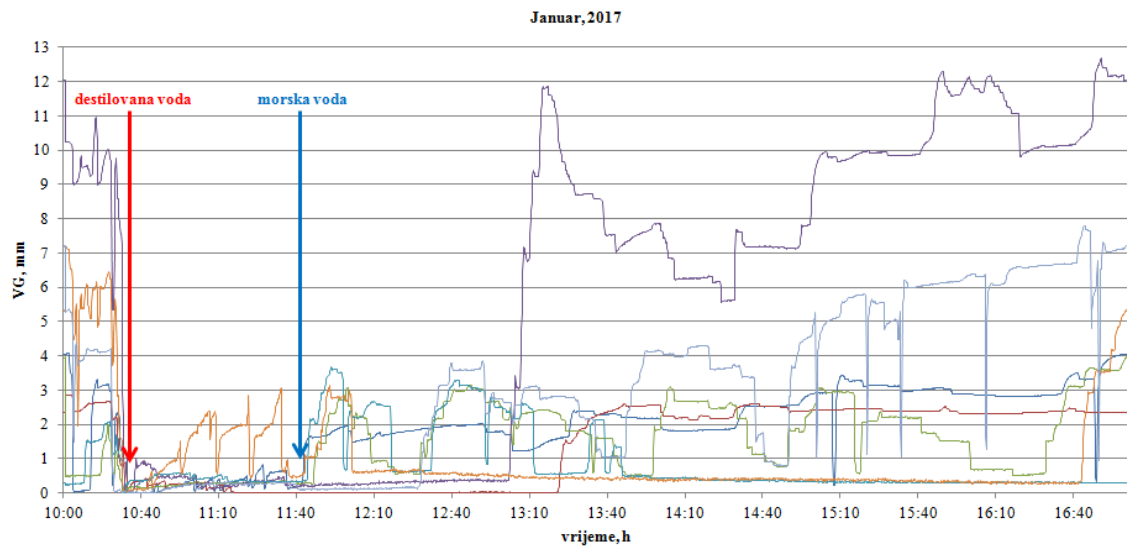


Slika 6.29. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u decembru 2016. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljuštore (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

a)

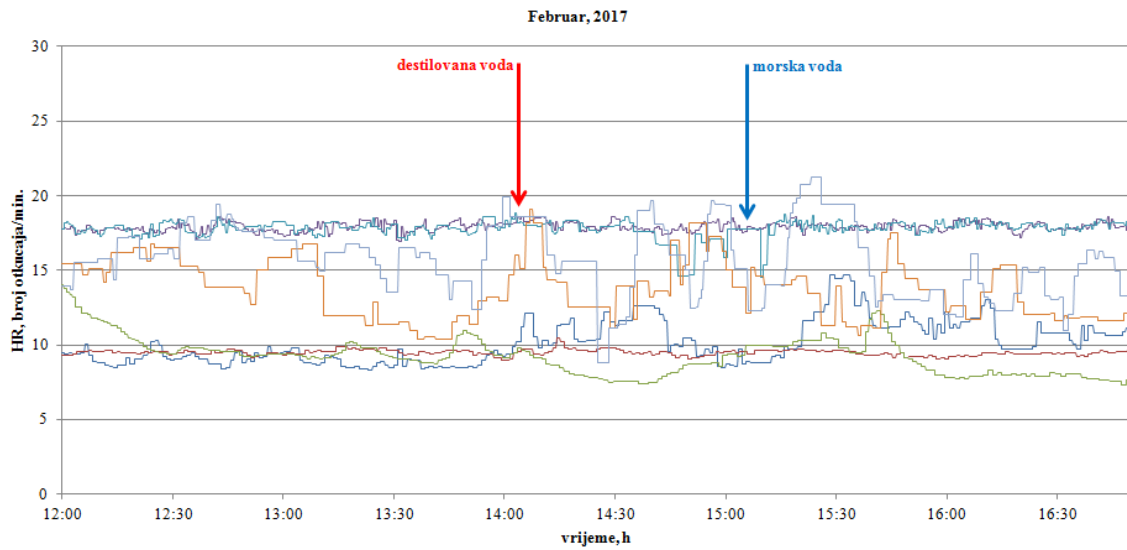


b)

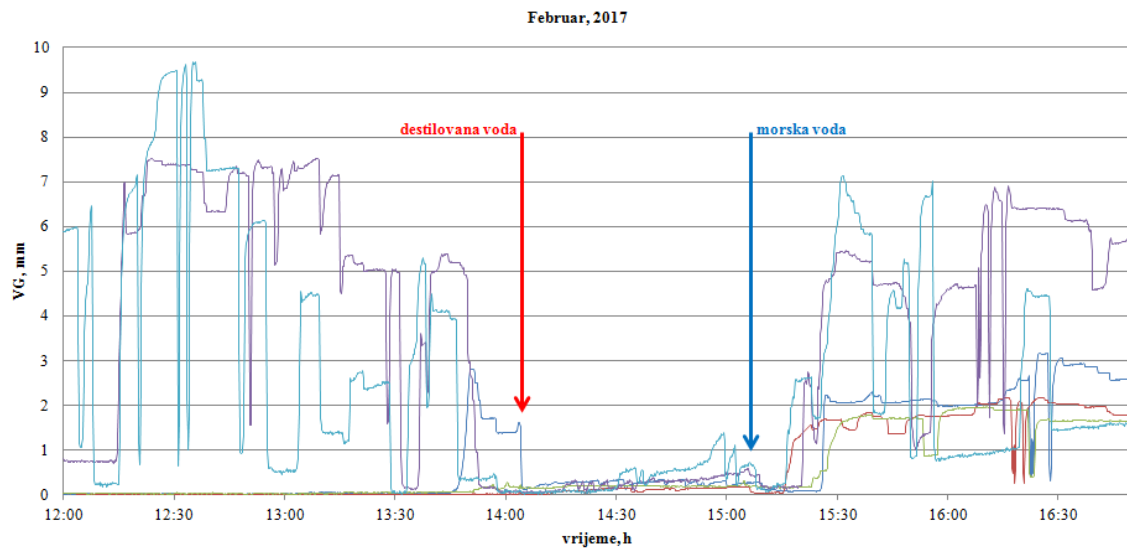


Slika 6.30. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u januaru 2017. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljuštire (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

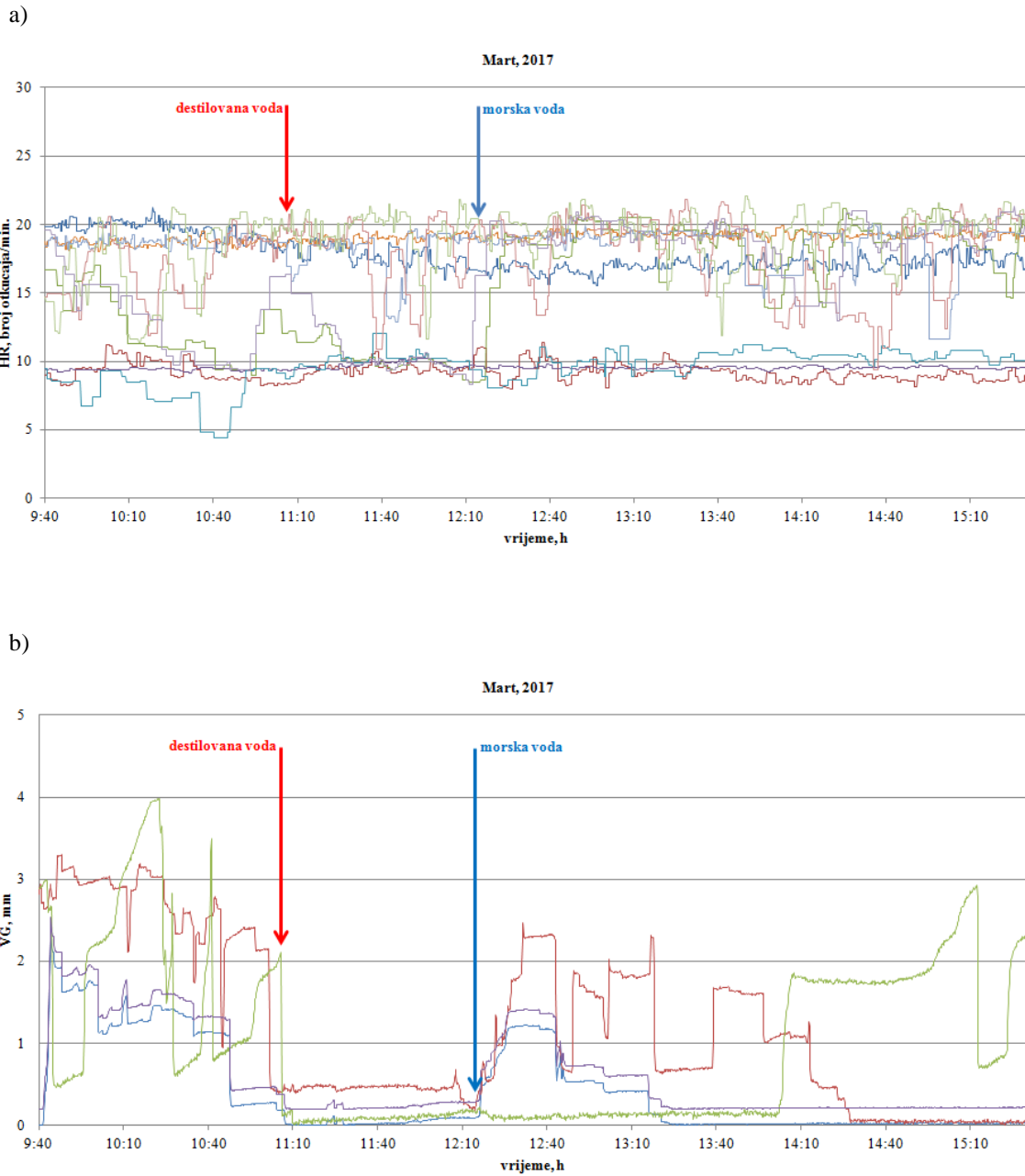
a)



b)



Slika 6.31. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u februaru 2017. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora



Slika 6.32. Test saliniteta (naglo smanjenje saliniteta za 50 %) u martu 2017. godine. Panel a – Promjene srčanog ritma (HR, otkucaja/minuti), Panel b – Otvorenost ljušture (VG, mm) eksponiranih jedinki prije, tokom i nakon prestanka uticaja stresora

Promjena u funkcionisanju kardiovaskularnog sistema kod morskih beskičmenjaka predstavlja jednu od glavnih fizioloških reakcija/odgovora na stres. Tako se promjene u srčanom ritmu, posebno varijabilnost HR, primjenjuju kao biomarkeri fiziološkog stanja i opšteg zdravlja organizma (Kuznetsova i Kholodkevich, 2015). Promjene HR i VG školjki su odgovori koji često sinhronizovano reaguju na stres, na šta ukazuju i rezultati sprovedenih testova saliniteta tokom prvih mjeseci jednogodišnjeg istraživanja.

Varijabilnost HR u uslovima osmotskog stresa kod vrsta roda *Mytilus* konstatuju mnogi autori, npr. Bakhmet i sar. (2005), Braby i Somero (2006), Turja i sar. (2014), Kholodkevich i sar. (2009a; 2016), Khalaman i sar. (2017). Prema Trueman i Lowe (1971) smanjenje HR usled osmotskog stresa može biti posledica smanjenja potrošnje kiseonika u periodu kada su ljuštura školjki zatvorene. Prilikom vraćanja jedinki u vodu početnog saliniteta dolazi do značajnog povećanja HR, što se može objasniti većim nivoom potrošnje kiseonika usled povećane filtracije nakon otvaranja ljuštura školjki (Kholodkevich i sar., 2009a). Prema Gracey i Connor (2016) u uslovima akutnog osmotskog stresa kod vrsta roda *Mytilus* dolazi do smanjenja HR, što je primarno uslovljeno zatvaranjem ljuštura, smanjenim stepenom ili pak potpunom redukcijom filtracije, smanjenim unosom kiseonika i prelaskom sa aerobnog na anaerobni metabolizam.

U uslovima osmotskog stresa kod ispitivanih jedinki iz monitoring sistema je uočena reakcija u vidu promjena VG, tačnije zatvaranja ljuštura. Ljuštura ispitivanih jedinki su uglavnom bile zatvorene tokom perioda smanjenog saliniteta, a nakon vraćanja saliniteta na uobičajeni nivo uočeno je otvaranje ljuštura svih eksponiranih jedinki. Ginetsinskiy (1963) ukazuje da usled smanjenja saliniteta vode ispod kritičnih vrijednosti, kod dagnji dolazi do povlačenja sifona i zatvaranja ljuštura školjki, a da nakon povećanja saliniteta dagnje otvaraju ljuštura i nastavljaju proces filtracije. Prema Sukhotin i sar. (2003) kod vrste *Mytilus edulis* dolazi do zatvaranja ljuštura usled smanjenja saliniteta vode. Isti autori ukazuju da pri povišenoj temperaturi veće jedinke ne zatvaraju ljuštura i ostaju aktivne pri niskom salinitetu, u odnosu na manje jedinke, što tumače njihovom većom otpornošću na osmotski stres ili većim metaboličkim potrebama. Kholodkevich i sar. (2009a) ukazuju da kod vrste *Mytilus galloprovincialis* kada se jedinke izlože jednosatnom naglom sniženju saliniteta dolazi do zatvaranja ljuštura eksponiranih jedinki, koje ostaju zatvorene sve dok se ne vrate u vodeni

medijum sa optimalnim salinitetom, što se u potpunosti poklapa sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

U testovima saliniteta u aprilu, maju i junu 2016. godine (prva tri mjeseca monitoringa) kod eksponiranih jedinki dolazi do brzog smanjenja HR nakon pada saliniteta medijuma i smanjene vrijednosti HR se zadržavaju tokom cijelog perioda smanjenog saliniteta. Povratak HR na vrijednosti prije smanjenja saliniteta uočen je nakon uklanjanja stresora, odnosno, povratkom vrijednosti saliniteta na uobičajeni nivo. Braby i Somero (2006) takođe pokazuju da kod tri vrste školjki *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis* i *Mytilus galloprovincialis* usled smanjenja saliniteta dolazi do smanjenja HR eksponiranih jedinki, kao i da nakon uklanjanja stresora dolazi do povećanja HR na pređašnji nivo. Kholodkevich i sar. (2009a) kod vrste *Mytilus galloprovincialis*, kao i Turja i sar. (2014) kod vrste *Mytilus trossulus* primjećuju isti obrazac ponašanja školjki tokom testa saliniteta.

Suprotno ovim istraživanjima, Bayne (1973) kod vrste *Mytilus edulis* nije konstatovao promjene srčanog ritma usled smanjenja saliniteta. I rezultati ove disertacije pokazuju da u testovima saliniteta već nakon trećeg mjeseca monitoringa, u periodu od jula do novembra 2016. godine, kod većine eksponiranih jedinki nije došlo do promjena HR, dok u poslednja četiri mjeseca monitoringa (period decembar 2016 – mart 2017. godine) na drastično smanjenje saliniteta promjenom HR ne reaguje nijedna od eksponiranih jedinki.

Vrsta *Mytilus galloprovincialis* preferira zonu plime i osjeke, najčešće do 4 metra dubine (Miletić, 2016) i samim tim je izložena čestim promjenama abiotičkih faktora (temperature, saliniteta). Takođe, za lokalitet Orahovac koji se nalazi u unutrašnjem dijelu Bokokotorskog zaliva su karakteristične fluktuacije saliniteta tokom godine (Drakulović, 2012; Mandić S. i sar., 2016). Prema Mainwaring i sar. (2014) dagnje su izuzetno tolerantne na varijacije fizičko-hemijskih parametara vode i adaptiraju se na uslove nestabilnog saliniteta. Bakhmet i sar. (2005) navode da jedinke plave dagnje *Mytilus edulis* iz litoralnog područja pokazuju manju osjetljivost na promjene saliniteta, što autori objašnjavaju upravo adaptiranošću litoralnih jedinki na česte promjene abiotičkih faktora, za razliku od sublitoralnih jedinki.

Iako se salinitet na lokalitetu tokom perioda istraživanja kretao od 11.8 do 36.1 ‰, mora se konstatovati da je ekstremno niska vrijednost zabilježena samo u maju 2016. godine

(drugi mjesec monitoringa). Ako se izuzme ova minimalna vrijednost (11.8 ‰), tokom ostalih 11 mjeseci monitoringa, salinitet se kretao u užem opsegu od 27.8 do 36.1 ‰ (srednja vrijednost 32.7, SD 2.8; medijana 32.7) a statistički značajna korelacija između saliniteta i srčanog ritma je utvrđena samo kod jedinke najlošijih ukupnih performansi. Tokom testa saliniteta, jedinke su bile eksponirane niskom salinitetu u veoma kratkom periodu (1 h). U prva tri testa saliniteta, jedinke u sistemu su savršeno sinhrono reagovale na ekstremne uslove. Međutim, tokom eksperimentalnog perioda, došlo je do desinhronizacije odgovora, odnosno, kontinuiranog pada broja jedinki koje su na stres uopšte i odreagovale promjenama HR, da bi tokom poslednja četiri mjesečna testa odgovor u potpunosti izostao. Rezultati testova saliniteta bi se možda mogli dijelom tumačiti adaptacijom dagnji na ekstremne promjene saliniteta tokom eksperimentalnog perioda, da istovremeno sa smanjenjem broja jedinki koje su reagovale naglim padom HR nije došlo do uginuća četvrtine jedinki u testu, ali i postepenog povećanja dužine perioda potrebnog za povratak HR na vrijednosti prije promjene saliniteta kod preživjelih jedinki. Povećanje vremena potrebnog za potpuni oporavak srčanog ritma nakon stresa ukazuje na postepeni pad ukupne kondicije jedinki u monitoring sistemu tokom kontinuiranog monitoringa. Sa druge strane, drugi korišćeni biomarker, VG, bilježi sinhron odgovor svih jedinki, i konzistentan je od početka do kraja monitoring perioda, pri svakom od sukcesivnih testova saliniteta, što ukazuje da je VG robusniji biomarker. Razlozi izostanka konzistentnog odgovora srčanog ritma moraju se potražiti i u konstantnom padu vrijednosti HR tokom jednogodišnjeg monitoringa kod svih jedinki (poglavlje 6.1), starenju jedinki, odnosno “zamoru” test sistema tokom dužeg perioda. Na osnovu dobijenih rezultata, nameće se zaključak da je za održavanje pouzdanosti i primjenjivosti sistema za kontinuirani monitoring, školjke potrebno zamjenjivati na svakih tri do četiri mjeseca.

Odabir lokacije za postavku sistema za kontinuirani monitoring omogućio je praćenje performansi sistema za monitoring u relativno stabilnim ekološkim uslovima. Tokom cjelokupnog perioda istraživanja, nije se dogodila akcidentna situacija kao ni značajno pogoršanje uslova životne sredine koje bi aktiviralo alarm i omogućilo analizu odgovora sistema na hemijski stres, odnosno značajno zagađenje. Zbog ograničenja u smislu broja raspoloživih setova mjerne opreme, nije bilo moguće postaviti dodatnu seriju eksperimenata kojim bi se ispitaio odgovor sistema na simulirani hemijski stres. Za potpuniju sliku o

moogućnostima i ograničenjima sistema za kontinuirani monitoring, ovakva istraživanja su neophodna.

6.2.2. Primjena fizioloških biomarkera školjki u pasivnom biomonitoringu

U okviru ovog poglavlja su predstavljeni rezultati primjene pasivnog biomonitoringa u pilot studiji slučaja u Bokokotorskom zalivu tokom dvije sukcesivne godine. Kondiciono stanje školjki sa odabranih lokaliteta je procijenjeno na osnovu vremena potrebnog za oporavak njihovog srčanog ritma nakon kratkotrajnog ekstremnog stresa u testu saliniteta. Kondicija jedinki bi trebala da odražava ukupno stanje životne sredine na tim lokalitetima i pruži komplementarne podatke standardnom monitoringu stanja životne sredine baziranom na fizičko-hemijskim i mikrobiološkim parametrima kvaliteta morske vode.

Dagnje sa odabranih lokaliteta su podvrgnute testu saliniteta na isti način kao i jedinke u kontinuiranom monitoring sistemu. Dagnje sa sva tri lokaliteta su pokazale brzu promjenu, tj. brzo smanjenje HR kada je salinitet vode rapidno (tokom 2 – 3 min) smanjen za 50 % (u odnosu na vrijednost na lokalitetu zahvata vode za monitoring sistem), a niske vrijednosti HR su se zadržale tokom cijelog perioda smanjenog saliniteta (1 h). Nakon uklanjanja stresora – povratkom jedinki u morsku vodu uobičajenog saliniteta, registruje se i povratak HR na vrijednosti izmjerene prije smanjenja saliniteta medijuma.

U tabeli 6.15 su prikazane srednje vrijednosti vremena oporavka (T_{rec} , minuti) za grupu eksponiranih jedinki i koeficijent varijacije srčanog ritma (CV_{HR}) (Iz Kholodkevich i sar., 2019b i Nikolić i sar., 2019).

Tabela 6.15. Rezultati testova saliniteta u pasivnom biomonitoringu tokom dvije sukcesivne godine. Prikazane su srednje vrijednosti vremena oporavka srčanog ritma za grupu eksponiranih jedinki – T_{rec} (u minutima) i koeficijent varijacije srčanog ritma – CV_{HR} (%)

Lokaliteti	T_{rec} (minuti)		CV_{HR} (%)	
	Prva godina	Druga godina	Prva godina	Druga godina
Stoliv	55.0 ± 3.5	47.3 ± 3.8	9	8.6
Dobrota	53.0 ± 2.9	53.3 ± 4.8	13	8
Bijela	*83.0 ± 8.1	*77.3 ± 7.2	18	10

* - statistički značajno veće vrijednosti u poređenju sa ostala dva lokaliteta u toj godini istraživanja (ANOVA, $p < 0.05$)

Kod dagnji sa lokaliteta Bijela period oporavka srčanog ritma je bio najduži (83.0 ± 8.1 min. i 77.3 ± 7.2 min). Kod jedinki sa ovog lokaliteta su takođe registrovane i najveće vrijednosti CV_{HR} , (18 % i 10 %). Tokom prve godine istraživanja, najniže srednje vrijednosti T_{rec} su uočene kod jedinki sa lokaliteta Dobrota (53.0 ± 2.9 min), a tokom druge godine istraživanja kod jedinki sa lokaliteta Stoliv (47.3 ± 3.8 min). CV_{HR} je kod ovih jedinki iznosio 13 %, odnosno 8.6 %. Rezultati ANOVA testa su pokazali da su srednje vrijednosti T_{rec} eksponiranih jedinki sa lokaliteta Bijela statistički značajno višije u poređenju sa srednjim vrijednostima T_{rec} eksponiranih jedinki sa preostala dva lokaliteta tokom obje godine istraživanja (ANOVA, $p < 0.05$). Razlike u srednjim vrijednostima T_{rec} između eksponiranih jedinki sa lokaliteta Dobrota i Stoliv nijesu pokazale statističku značajnost tokom istraživanja (ANOVA, $p > 0.05$).

U tabeli 6.16 su prikazani rezultati mjerenja fizičko-hemijskih parametara morske vode na ispitivanim lokalitetima u trenutku uzorkovanja jedinki (Iz Kholodkevich i sar., 2019b i Nikolić i sar., 2019). U prvoj godini istraživanja, salinitet se kretao od minimalne vrijednosti 23.1 ‰ u Dobroti do maksimalne vrijednosti 34.1 ‰ u Bijeloj. Vrijednosti ostalih mjerenih parametara su bile prilično ujednačene na svim ispitivanim lokalitetima.

Tabela 6.16. Fizičko-hemijski parametri morske vode na ispitivanim lokalitetima tokom obje godine istraživanja

Lokaliteti	Temperatura (°C)		Salinitet (‰)		O ₂ (%)		NO ₂ ⁻ (μmol/l)	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Stoliv	14.3	19.1	29.1	10.3	82.3	109	0.198	0.158
Dobrota	14.5	15.5	23.1	9.0	83.0	102	0.121	0.178
Bijela	13.6	19.9	34.1	27.9	83.5	108	0.138	0.217

U drugoj godini istraživanja znatno veće vrijednosti saliniteta su izmjerene u Bijeloj (27.9 ‰) u poređenju sa preostala dva lokaliteta. Vrijednosti ostalih mjerenih parametara su bile prilično ujednačene na sva tri lokaliteta.

Brojnost ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija na odabranim lokalitetima u dvije sukcesivne godine pokazuje isti obrazac. U Stolivu i Bijeloj, ukupne koliformne bakterije su imale brojnost manju od 100 ćelija/100 ml vode, dok su fekalne koliformne bakterije imale brojnost manju od 300 ćelija/100 ml vode. Za razliku od ova dva lokaliteta, u Dobroti je

tokom obje godine istraživanja brojnost ovih grupa bakterija bila značajno veća, ukupne koliformne bakterije su imale brojnost od 2000 ćelija/100 ml, a fekalne 500 ćelija/100 ml vode.

Fizičko-hemijski parametri morske vode na svim ispitivanim lokalitetima, tokom obje godine istraživanja ukazuju na dobar kvalitet vode. Svi ispitivani parametri, salinitet, O_2 , i NO_2^- su bili u dozvoljenim granicama (salinitet $< 40 \text{ ‰}$, $O_2 > 70 \text{ ‰}$, $NO_2^- < 0.652 \text{ } \mu\text{mol/l}$) na osnovu Uredbe o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (Sl. List CG, 2007). Na osnovu vrijednosti osnovnih fizičko-hemijskih parametara kvaliteta vode, nijedan od odabranih lokaliteta se ne izdvaja kao referalni lokalitet, ali ni kao lokalitet pod izraženim antropogenim pritiskom.

Brojnost ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija u Stolivu i Bijeloj je takođe bila u dozvoljenim granicama tokom obje godine istraživanja. Za razliku od ova dva lokaliteta, u Dobroti je tokom obje godine istraživanja brojnost ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija bila mnogo veća od maksimalno dozvoljene brojnosti koja je propisana Uredbom (Sl. List CG, 2007). Brojnost ukupnih koliformnih bakterija je bila čak 20 puta veća, dok je brojnost fekalnih koliformnih bakterija bila dvostruko veća od maksimalno dozvoljene brojnosti. Dobijeni rezultati se mogu objasniti slabim strujama koje su karakteristične za ovaj dio zaliva (Kotorski zaliv), konstantnim rastom broja stanovnika kao i neregulisanim kanalizacionim vodama (Stjepčević, 1974; Joksimović i sar., 2001; Drakulović, 2012). Iako mikrobiološki rezultati ukazuju na loš kvalitet vode u oblasti Dobrote sa mikrobiološkog aspekta, prema WHO (2010) fekalne koliformne bakterije nijesu sveobuhvatan pokazatelj zdravstvenog rizika, jer njihovo prisustvo u vodi nije direktno pozitivno korelirano sa bakterijskim i virusnim patogenima. Dagnje nijesu indikator mikrobiološkog kvaliteta vode s obzirom na to da fekalne koliformne bakterije predstavljaju i izvor hrane dagnjama. Šolić i sar. (1999) ukazuju na to da brojnost fekalnih koliformnih bakterija u vodi nema uticaja na brojnost istih u mesu samih dagnji. Dagnje su takođe poznate i po tome da su selektivni filtratori, tj. da imaju mogućnost odbacivanja određenih partikula iz vode u vidu pseudofecesa (Jørgensen, 1966).

Dagnje sa lokaliteta Bijela su pokazale najveću varijabilnost srčanog ritma i najduže srednje vrijeme oporavka T_{rec} , nakon izlaganja kratkotrajnom ekstremnom stresu u vidu smanjenog saliniteta. Na osnovu ovako procijenjenog fiziološkog stanja jedinki, lokalitet

Bijela se može izdvojiti kao lokalitet lošijeg ekološkog statusa u poređenju sa Dobrotom i Stolivom (Kholodkevich i sar., 2019b; Nikolić i sar, 2019).

Niske srednje vrijednosti T_{rec} kod dagnji sa lokaliteta Stoliv ukazuju na dobro fiziološko stanje jedinki sa ovog lokaliteta, kao i na činjenicu da je voda na ovom lokalitetu dobrog kvaliteta. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Martinović i sar. (2013a) za lokalitet Stoliv. Za ovu oblast su karakteristične jake morske struje (Stjepčević, 1974) koje mogu da utiču na disperziju potencijalno prisutnih zagađujućih materija čime se onemogućuje njihovo zadržavanje na lokalitetu. Takođe, ova oblast nije pod direktnim pritiskom industrijskog zagađenja i manje je naseljena u poređenju sa lokalitetima Dobrota i Bijela, pa se Stoliv može uslovno smatrati referentnim lokalitetom u ovoj studiji slučaja.

Statistički značajno veće srednje vrijednosti T_{rec} kod jedinki sa lokaliteta Bijela u poređenju sa vrijednostima kod jedinki sa lokaliteta Stoliv upućuju na prisustvo stresa kod jedinki sa lokaliteta Bijela. Prema Kholodkevich i sar. (2011) niže srednje vrijednosti T_{rec} (50 – 60 min) i niže vrijednosti CV_{HR} ukazuju na bolje fiziološko stanje ispitivanih jedinki, kao i na dobar kvalitet životne sredine (morskog ekosistema). Takođe, niže srednje vrijednosti T_{rec} ukazuju na bolji adaptivni kapacitet ispitivanih organizama (Kholodkevich i sar., 2009a; Kuznetsova i sar., 2010; 2016). Turja i sar. (2014) su u sličnom ispitivanju takođe zabilježili veće srednje vrijednosti T_{rec} kod dagnji sa kontaminiranih lokaliteta u oblasti Baltičkog mora. U oblasti Bokokotorskog zaliva je do sada sprovedeno samo jedno slično istraživanje. Martinović i sar. (2013a) su na osnovu testa saliniteta i T_{rec} vrijednosti identifikovali Stoliv kao referentni lokalitet sa T_{rec} vrijednostima manjim od 60 min.

U oblasti lokaliteta Bijela decenijama je radilo brodogradilište, a industrijske aktivnosti u regionu su predstavljale značajan pritisak na morski ekosistem. Opšte je poznato da brodogradilište i prateća industrija produkuju velike količine otpadnog grita. U Bijeloj, otpadni grit predstavlja izvor teških metala (AS, Ba, Cu, Zn, Cr, Sn, Co, Ni, Pb, Hg), TBT-a i PAH-ova (EPA, 2016). Svi navedeni polutanti su štetni za mekušce i uopšte sve akvatične bentosne zajednice (Gallo i sar., 2018; Kahlon i sar., 2018). Prema EPA (2016) tokom 2010. i 2011. godine koncentracije TBT-a u tkivu dagnji sa lokaliteta Bijela su bile 20 – 30 puta veće od MDK.

Rezultati testova saliniteta, odnosno, značajno duži oporavak od kratkotrajnog stresa dagnji sa ovog lokaliteta u odnosu na jedinke sa druga dva odabrana lokaliteta, mogli bi se tumačiti istorijskim zagađenjem na lokalitetu Bijela i ukupno lošijim ekološkim uslovima na ovom lokalitetu. Već i samo prisustvo, ali i zadovoljavajuća brojnost populacija dagnji na lokalitetu Bijela ukazuju da istorijsko zagađenje ne onemogućuje njihov opstanak na lokalitetu, ali bi se na osnovu lošije kondicije jedinki u odnosu na jedinke sa druga dva lokaliteta, lokalitet Bijela mogao označiti kao zagađen lokalitet.

Međutim, treba istaći da je salinitet, iako u dozvoljenim vrijednostima tokom obje godine istraživanja na sve tri odabrane lokacije, evidentno veći na lokalitetu Bijela, u odnosu na druga dva odabrana lokaliteta (Stoliv i Dobrota), naročito u drugoj godini istraživanja. Poznato je da salinitet vode u Bokokotorskom zalivu varira tokom godine i da je u velikoj zavisnosti od količine padavina, kao i upliva slatkih voda sa kopna i podzemnih izvora (Mandić S. i sar., 2016). Dobrota i Stoliv su oblasti zaliva za koje je karakteristična fluktuacija saliniteta, naročito tokom zimskog i proljećnog perioda (Drakulović, 2012; Mandić S. i sar., 2016). Populacije autohtonih vrsta se adaptiraju na uslove nestabilnog saliniteta, a vrste iz roda dagnji su poznate po tome da su izuzetno tolerantne na varijacije fizičkih i hemijskih parametara vode (Mainwaring i sar., 2014). Na lokalitetu Bijela promjene saliniteta nijesu učestale kao u Stolivu i Dobroti. Populacije dagnji sa lokaliteta Bijela su adaptirane na više vrijednosti saliniteta i manja variranja saliniteta tokom godine. Iz tog razloga nagle promjene saliniteta kod njih dovode do većeg stresa u odnosu na dagnje sa lokaliteta Stoliv i Dobrota, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi da je spor oporavak, odnosno veća srednja vrijednost T_{rec} kod dagnji sa lokaliteta Bijela u testu saliniteta isključivo posledica njihovog lošeg opšteg stanja uslovljenog lošijim ekološkim uslovima u ovoj oblasti. Bakhmet i sar. (2005) ukazuju da u uslovima čestih promjena abiotičkih faktora jedinke vrste *Mytilus edulis* pokazuju manju osjetljivost na promjene saliniteta u odnosu na jedinke koje se nalaze u stabilnijim uslovima staništa, što su ranije uočili (DeFur i Mangum, 1979) kod vrste *Spisula solidissima*. Takođe, Nicholson (2002) ističe da kod vrste *Perna viridis* prirodni stresori mogu uticati na promjene HR i ti efekti mogu maskirati reakcije/odgovore organizma na zagađenje.

Prikazani rezultati ukazuju da se metodologija zasnovana na fiziološkim biomarkerima T_{rec} i CV_{HR} može koristiti za identifikaciju kontaminiranih i referentnih lokaliteta, što je u

saglasnosti sa rezultatima prethodnih istraživanja sa različitim vrstama beskičmenjaka. Međutim, u slučaju praćenja stanja jedinki sa lokaliteta koje karakterišu međusobno značajno različiti ekološki uslovi, rezultati dobijeni ovom metodologijom moraju se uzeti uslovno. Abiotički faktori staništa koji određuju prisustvo i stabilnost lokalnih populacija moraju se uzeti u obzir kada se školjke koriste kao bioindikator za procjenu ekološkog stanja vodnih područja u kojima žive.

Zbog evidentnog uticaja promjenljivih abiotičkih faktora, a na prvom mjestu saliniteta, na reakciju jedinki iz različitih populacija na stres uzrokovan naglom promjenom saliniteta, pri planiranju i sprovođenju pasivnog biomonitoringa zasnovanog na fiziološkim odgovorima dagnje, bilo bi uputno umjesto testa saliniteta odabrati drugi tip stresora kome bi se jedinke sa referentnog i odabranih lokaliteta izložile na sličan način kao smanjenom salinitetu. Da bi rezultati dobijeni praćenjem promjena srčanog ritma nakon izlaganja kratkotrajnom stresu jednoznačno ukazali na problem zagađenja na odabranim lokalitetima, stresor ne bi smio biti iz grupe abiotičkih faktora na koje se različite populacije odabrane vrste lako adaptiraju. Na osnovu niza laboratorijskih istraživanja (detaljno dato u Uvodu) moguće je odabrati neki od sintetskih organskih polutanata na koji su dagnje dovoljno osjetljive, a nijesu adaptirane. Pri tome, trebalo bi odrediti subletalne koncentracije koje će izazvati željeni reverzibilni, a mjerljiv efekat na srčani ritam. Ovim se otvara prostor za neka dalja istraživanja koja bi imala za cilj odabir adekvatnog ksenobiotika u optimalnoj koncentraciji u cilju veće pouzdanosti i relevantnosti rezultata dobijenih pasivnim biomonitoringom zasnovanom na fiziološkim odgovorima odabranog test organizma na stres.

6.3. Tehnički sistem

6.3.1. Problemi u održavanju sistema za monitoring

Tehnički sistem se sastojao od: akvarijuma, sistema cijevi kojima se dopremala voda u akvarijume, električne protočne pumpe za morsku vodu sa predfilterom, manuelnog generatora (agregata) za snabdjevanje električnom energijom i uređaja za neprekidno napajanje (UPS) na koje su bili priključeni računari i oprema za mjerenje HR i VG.

Tokom jednogodišnjeg monitoringa dešavali su se različiti tehnički problemi u funkcionisanju sistema. Otvoreni sistem se zasnivao na konstantnom protoku vode. Različiti

morski organizmi su tokom vremena nastanjivali unutrašnjost cijevi, kao i filter pumpe i filter koji je postavljen na samom ulazu u sistem. Takođe, dolazilo je i do taloženja mulja, pa je usled svega toga protok morske vode kroz sistem cijevi tokom trajanja monitoringa bio slabijeg inteziteta, a u pojedinim situacijama je bio i prekinut. Zbog toga je bilo potrebno periodično čistiti filtere i cijevi kojima se dopremala voda iz mora, kako bi se obezbijedio konstantan dotok vode u akvarijume (Slika 6.33). Utvrđeno je da filtere i cijevi treba čistiti u vremenskom periodu od 3 do 6 mjeseci kako bi dotok vode u akvarijume bio konstantan i nesmetan.



Slika 6.33. Periodično čišćenje filtera i cijevi za dopremanje morske vode u akvarijume

Kod opreme za praćenje VG, školjke su jednom stranom ljuštura pričvršćene (zalijepljene) za perforirane ploče potapajućeg modula. Dagnje su se dodatno pomoću bisusnih niti pričvršćivale za ploče, ali i za magnetne senzore koji su pratili otvorenost ljuštura, pa je usled toga dolazilo do promjene položaja pojedinih školjki u odnosu na prvobitan položaj (Slika 6.34). U tim situacijama oprema za praćenje VG je bilježila određenu otvorenost ljuštura školjki, a one zapravo nijesu bile otvorene ili ukoliko su bile otvorene, dobijeni podaci nijesu bili tačni, jer su magnetni senzori kalibrisani za praćenje VG u odnosu na prvobitni

položaj pričvršćenih školjki za ploče potapajućeg modula. Zbog toga je bilo potrebno periodično skraćivati bisusne niti (svakih 7 – 10 dana). Rezultati dobijeni u takvim situacijama nijesu analizirani.



Slika 6.34. Pričvršćivanje dagnji pomoću bisusnih niti za ploče potapajućeg modula i magnetne senzore

Laboratorija izgrađena na uzgajalištu u Orahovcu, priključena je na staru elektrodistributivnu mrežu, pa je usled kvarova na elektrodistributivnoj mreži, kao i usled električnih pražnjenja iz atmosfere dolazilo do učestalih prekida napajanja laboratorije električnom energijom. Računari, kao i oprema za praćenje HR i VG su vrlo osjetljivi na anomalije koje se mogu javiti u naponskoj mreži, kao što su nagli skokovi napona (prenapon), varijacije vrijednosti napona, pad napona ili iznenadni nestanak napona, pa je usled ovih anomalija dolazilo do čestih prekida rada računara i opreme za praćenje HR i VG, a takođe i do kvarova određenih elektronskih komponenti računara (napojna jedinica i mrežna kartica) i opreme za praćenje HR (LFOP) i VG (mikroprocesorski modul). Prevazilaženje ovih problema je moguće instalacijom automatskog generatora (agregata) za snabdjevanje električnom energijom.

Svi navedeni problemi kao i intervencije u cilju njihovog prevazilaženja tokom trajanja jednogodišnjeg monitoringa sigurno su dijelom doprinijele da rezultati monitoringa fizioloških parametara ne budu konzistentni u mjeri u kojoj se to očekivalo.

6.3.2. Unapređenje opreme u dijelu prenosa podataka

U cilju unapređenja sistema za praćenje HR realizovano je novo rješenje u domenu prenosa podataka sa mjerne opreme na računar. Prije realizacije ovog rješenja mjerna oprema i centralni računar bili su žičano povezani. Žičano povezivanje otežava instaliranje mjerne opreme izvan laboratorije, na većoj udaljenosti od centralnog računara. U cilju realizacije bežične Wi-Fi veze, dizajnirana su dva mikrokontrolerska uređaja: uređaj za odabiranje signala i uređaj za rekonstrukciju signala. Uređaj za odabiranje signala se postavlja na stranu mjerne opreme (LFOP). On uzima odbirke signala sa izlaza fotopletizmografa i Wi-Fi bežičnom vezom šalje prema uređaju za rekonstrukciju. Uređaj za odabiranje može uzimati odbirke sa najviše 8 fotopletizmografa. Rekonstrukcioni uređaj bežičnom Wi-Fi vezom prihvata poslate podatke i na svojim izlazima rekonstruiše polazne signale. Uređaj može rekonstruisati do 8 signala. Rekonstrukcioni uređaj se postavlja na stranu centralnog računara, neposredno ispred ADC-a. Izlazni signali uređaja vode se na ulaze ADC-a. Na ovakav način napravljen je prelaz sa žičane na WiFi konekciju između mjerne opreme i centralnog računara, bez ikakvih izmjena u već realizovanim komponentama postojećeg sistema (Slika 6.35).

Osnovni sastavni dijelovi uređaja za odabiranje i rekonstrukciju su *Arduino Uno* razvojna ploča i *Maker Studio WiFi* šild. Osim toga, uređaj za odabiranje sadrži i elektronski interfejs za prihvatanje signala sa izlaza fotopletizmografa i njihovo odabiranje. Rekonstrukcioni uređaj sadrži elektronski interfejs koji doprinosi da se iz primljenih odbiraka rekonstruišu polazni signali. *Maker Studio WiFi* šild je kompatibilan sa *Arduino Uno* razvojnom pločom i omogućuje njeno povezivanje na WiFi mrežu.

Testiranje ovog rješenja je uspješno obavljeno. Pokazalo se da realizovana bežična razmjena podataka ni na koji način ne degradira performanse cjelokupnog sistema.



Slika 6.35. Unapređenje opreme u dijelu prenosa podataka – realizovana WiFi konekcija između mjerne opreme i centralnog računara

7. ZAKLJUČAK

Kontinuirani monitoring stanja životne sredine u realnom vremenu, u *ex situ* uslovima, pomoću automatizovanog sistema za praćenje fizioloških odgovora dagnji je prvi put sproveden kako u Bokokotroskom zalivu, tako i u Jadranskom moru. Takođe, na ovom području su prvi put u realnom vremenu paralelno praćeni fiziološki biomarkeri mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* (HR i VG) u trajanju od jedne godine.

Rezultati praćenja bazalnog srčanog ritma i pokreta ljuštura dagnji u kontrolnim uslovima, bez prisustva stresora, su pokazali kako individualnu, tako i grupnu varijabilnost ovih biomarkera kod jedinki u monitoring sistemu u funkciji vremena. Uočeno je međutim, da sve školjke, bez obzira na individualne varijacije, daju isti trend ponašanja, pa se mogu posmatrati kao grupa. Varijabilnost odgovora nema izražen cirkadijalni ni sezonski karakter. Rezultati multivarijantne analize su pokazali da srčani ritam, kao jedan od dva praćena biomarkera u sistemu, ne zavisi od variranja ekoloških faktora u rangu uobičajenih vrijednosti karakterističnih za odabrani lokalitet.

U cilju povećanja pouzdanosti automatizovanog biomonitoring sistema potrebno je dagnjama periodično skraćivati bisusne niti (svakih 7 – 10 dana), čime se smanjuje mogućnost da školjke prikažu lažnu reakciju/odgovor. Takođe, tokom kontinuiranog monitoringa u *ex situ* uslovima je potrebno čistiti filtere i cijevi u vremenskom periodu od 3 do 6 mjeseci kako bi dotok vode u akvarijume bio konstantan i nesmetan. Svi ovi tehnički problemi vezani za održavanje sistema, zajedno sa povremenim problemima sa napajanjem električnom energijom, doprinijeli su varijabilnosti i nekonzistentnosti odgovora jedinki u testu tokom dugog vremenskog perioda. U cilju unapređenja postojećeg automatizovanog sistema za praćenje HR realizovano je novo rješenje u domenu prenosa podataka sa mjerne opreme na računar. Bežična razmjena podataka ni na koji način ne degradira performanse cjelokupnog sistema.

Ukupno kondiciono stanje jedinki u sistemu za monitoring praćeno je odgovorom na stres. Odabrani biomarkeri – pokreti ljuštura, vrijeme potrebno za oporavak srčanog ritma nakon kratkotrajnog izlaganja medijumu drastično smanjenog saliniteta i varijabilnost srčanog ritma pokazali su se kao dobri indikatori kondicionog statusa jedinki. Rezultati testova saliniteta su pokazali da su pokreti ljuštura robusniji biomarker od srčanog ritma, jer je

odgovor na stres bio konzistentan u svim testovima saliniteta tokom jednogodišnjeg monitoringa. Konstantno produžavanje perioda potrebnog za oporavak srčanog ritma nakon prestanka dejstva stresora već od drugog mjeseca monitoringa, a posebno potpuni izostanak reakcije u smislu promjena srčanog ritma usled djelovanja stresora tokom poslednja četiri mjeseca monitoringa ukazuju da jedinke u monitoring sistemu imaju ograničeni optimalni vijek. Već nakon tri do četiri mjeseca kontinuiranog monitoringa dolazi do “zamora” sistema. Osim toga, od inicijalno postavljenih 16 jedinki, do kraja monitoring perioda je preživjelo samo 12 jedinki. Ovako visok mortalitet ukazuje da sistem ne pruža optimalne uslove za život u dužem periodu. Na osnovu pogoršanja kondicionog stanja jedinki u sistemu tokom vremena i visokog mortaliteta u kasnim fazama monitoringa, nameće se potreba za redovnijom analizom rezultata frekventih mjerenja srčanog ritma i zaključak da optimalno vrijeme korišćenja odabranog bioindikatora iznosi tri mjeseca. Jedinke u sistemu je potrebno zamijeniti na svakih tri mjeseca i na taj način povećati pouzdanost sistema za rano upozorenje.

Primjer primjene fizioloških biomarkera na odabranoj studiji slučaja pokazao je da se metodologija zasnovana na koeficijentu varijacije i vremenu oporavka srčanog ritma nakon kratkotrajnog stresa u principu može koristiti u faznom pasivnom biomonitoringu na lokalitetima u gradijentu zagađenja. Međutim, bilo bi uputno umjesto testa saliniteta odabrati drugi tip stresora kome bi se jedinke sa referentnog i odabranih lokaliteta izložile na sličan način kao smanjenom salinitetu. Da bi rezultati dobijeni praćenjem promjena srčanog ritma nakon izlaganja kratkotrajnom stresu jednoznačno ukazali na problem zagađenja na odabranim lokalitetima, stresor ne bi smio biti iz grupe abiotičkih faktora na koje se različite populacije odabrane vrste lako adaptiraju. Ovim se otvara prostor za dalja istraživanja koja bi imala za cilj odabir adekvatnog ksenobiotika u optimalnoj koncentraciji u cilju veće pouzdanosti i relevantnosti rezultata dobijenih pasivnim biomonitoringom zasnovanom na fiziološkim odgovorima odabranog test organizma na stres.

LITERATURA

- Agata, A. D., Cappello, T., Maisano, M., Parrino, V., Giannetto, A., Brundo, M. V., Ferrante, M., Mauceri, A. 2014. Cellular biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) from Lake Faro (Sicily, Italy). *Italian Journal of Zoology*, **81(1)**: 43-54.
- Akberali, H. B., Trueman, E. R. 1985. Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. *Advances in Marine Biology*, **22**: 101-198.
- Altenburger, R., Ait-Aissa, S., Antyzczak, P., Backhaus, T., Barceló, D. i sar. 2015. Future water quality monitoring – Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Science of the Total Environment*, **512-513**: 540-551.
- Altenburger, R., Brack, W., Burgess, R. M., Busch, W., Escher, B. I. i sar. 2019. Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real world pollutant mixtures. *Environmental Science Europe*, **31(12)**: doi.org/10.1186/s12302-019-0193-1.
- Allaby, M. 1992. The Concise Oxford Dictionary of Zoology. Oxford University Press, 512 pp.
- ALLIANCE Group LLC, 2015. “16 – Channel module for mollusks’ valve gape measurements, Valve Gape Monitor,” Moscow.
- Ameyaw-Akumfi, C., Naylor, E. 1987. Temporal patterns of shell-gape in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **95**: 237-242.
- Anestis, A., Lazou, A., Pörtner H. O., Michaelidis, B. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, **293(2)**: 911-921.
- Anderson, R. V. 1977. Concentration of cadmium, copper, lead, and zinc in six species of freshwater clams. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, **18(4)**: 492-496.
- Andrews, E. B., Jennings, K. H. 1993. The anatomical and ultrastructural basis of primary urine formation in bivalve mollusks. *Journal of Molluscan Studies*, **59**: 223-257.

- Anonymus, 2013. VarPulse software (version 9.2 released on February 15, 2013 or later) USER'S MANUAL.
- Ansell, A. D. 1973. Changes in oxygen consumption, heart rate and ventilation accompanying starvation in the decapod crustacean *Cancer pagurus*. *Netherlands Journal of Sea Research*, **7**: 455-475.
- AOAC, 2005. Paralytic shellfish toxins in shellfish, prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. AOAC International – AOAC Official Method 2005.06.
- APHA, 1995. Standards methods for the examination of water and wastewater. Americans Public Health Association, Washington, USA, 541 pp.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M. 2014. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Marine Environmental Research*, **94**: 65-71.
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risks from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollutants*, **198**: 211-222.
- Ayad, M. A., Fdil, M. A., Mouabad, A. 2011. Effects of cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **60**: 462-470.
- Badman, D. G. 1974. Changes in activity in a freshwater clam in response to oxygen concentration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **47(4)**: 1265-1271.
- Bae, M. J., Park, Y. S. 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review. *Science of the Total Environment*, **466-467**: 635-49.
- Bakhmet, I. N. 2017. Cardiac activity and oxygen consumption of blue mussels (*Mytilus edulis*) from the White Sea in relation to body mass, ambient temperature and food availability. *Polar Biology*, **40**: 1959-1964.

- Bakmet, I. N., Khalaman, V. V. 2006. Heart rate variation patterns in some representatives of Bivalvia. *Biology Bulletin*, **33**: 276-280.
- Bakhmet, I. N., Zdorovenov, P. E. 2010. Variability in cardiac activity of the bivalves *Mytilus edulis* and *Modiolus modiolus*. *Russian Journal of Marine Biology*, **36(3)**: 223-225.
- Bakhmet, I. N., Berger, V. J., Halaman, V. V. 2005. Heart rate in the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia) under salinity change. *Russian Journal of Marine Biology*, **31**: 314-317.
- Bakhmet, I. N., Fokina, N. N., Nefedova, Z. A., Nemova, N. N. 2009. Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, **155**: 581-591.
- Bakhmet, I. N., Kantserova, N. P., Lysenko, L. A., Nemova, N. N. 2012. Effect of copper and cadmium ions on heart function and calpain activity in blue mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **47**: 1528-1535.
- Bakhmet, I. N., Nikolaev, K., Levakin, I. 2017. Effect of infection with Metacercariae of *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae) on cardiac activity and growth rate in blue mussels (*Mytilus edulis*) in situ. *Journal of Sea Research*, **123**: 51-54.
- Bakhmet, I. N., Sazhin, A., Maximovich, N., Ekimov, D. 2019. In situ long-term monitoring of cardiac activity of two bivalve species from the White Sea, the blue mussel *Mytilus edulis* and horse mussel *Modiolus modiolus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **99(4)**: 833-840.
- Balbi, T., Fabbri, R., Montagna, M., Camisassi, G., Canesi, L. 2017. Seasonal variability of different biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) farmed at different sites of the Gulf of La Spezia, Ligurian sea, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, **116(1-2)**: 348-356.
- Balkis, N. 2009. Seasonal variations of microphytoplankton assemblages and environmental variables in the coastal zone of Bozcaada Island in the Aegean Sea (NE Mediterranean Sea). *Aquatic Ecology*, **43**: 249-270.
- Ballesta-Artero, I., Witbaard, R., Carroll, M. L., Meer, J. V. D. 2017. Environmental factors regulating gaping activity of the bivalve *Arctica islandica* in Northern Norway. *Marine Biology*, **164(116)**: doi.org/10.1007/s00227-017-3144-7.

- Bamber, S. D., Depledge, M. H. 1997. Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments. *Marine Biology*, **129(4)**: 667-672.
- Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F. 2009. Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* spp.) exposed to organic contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **149(3)**: 414-418.
- Baričević, A. 2015. Karakterizacija gena iz porodice p53 u dagnji *Mytilus galloprovincialis*. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 108 pp.
- Bayne, B. L. 1971. Ventilation, the heart beat and oxygen uptake by *Mytilus edulis* L. in declining oxygen tension. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **40(4)**: 1065-1085.
- Bayne, B. L. 1973. The responses of three species of bivalve mollusc to declining oxygen tension at reduced salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **45**: 393-406.
- Belanger, R. M., Lahman, S. E., Moore, P. A. 2017. Crayfish: An experimental model for examining exposure to environmental contamination. pp. 124-156. In: Larramendy, M. L. (Eds): *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*. Royal Society of Chemistry, 538 pp.
- Bellafiore, D., Guarnieri, A., Grilli, F., Penna, P., Bortoluzzi, G., Giglio, F., Pinardi, N. 2011. Study of the hydrodynamical processes in the Boka Kotorska Bay with a finite element model. *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, **52**: 298-321.
- Bellas, J., Albentosa, M., Vidal-Liñán, L., Besada, V., Franco, M. Á., Fumega, J., González-Quijano, A., Viñas, L., Beiras, R. 2014. Combined use of chemical, biochemical and physiological variables in mussels for the assessment of marine pollution along the N-NW Spanish coast. *Marine Environmental Research*, **96**: 105-117.
- Beninger, P. G., Dufour, S. C. 1996. Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudollamelibranch gill of *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Marine Ecology Progress Series*, **137**: 133-138.

- Beninger, P. G., Dufour, S. C., Bourque, J. 1997. Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Marine Ecology Progress Series*, **150**: 157-169.
- Beyer, J., Aarab, N., Tandberg, A. H., Ingvarsdottir, A., Bamber, S., Børseth, J. F., Camus, L., Velvin, R., 2013. Environmental harm assessment of a wastewater discharge from Hammerfest LNG: A study with biomarkers in mussels (*Mytilus* sp.) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Marine Pollution Bulletin*, **69**: 28-37.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., Schøyen, M. 2017. Blue mussels (*Mytilus edulis*) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research*, **130**: 338-365.
- Bhaby, S. 2015. *Mytilus galloprovincialis*: Reproductive cycle of fields mussels close to a lagoon (North Atlantic, Moulay Bouselham, Morocco). *Journal of Marine Biology and Oceanography*, **4(1)**: doi.org/10.4172/2324-8661.1000140.
- Bini, G., Castellano, E., Udisti, R., Santini, G., Chelazzi, G., 2008. Intra-specific variation in cardiac activity of the Mediterranean limpet *Patella caerulea* along a contamination gradient. *Ethology Ecology & Evolution*, **20(3)**: 271-281.
- Bini, G., Santini, G., Chelazzi, G. 2015. Pre-exposure to cadmium or zinc alters the heart rate response of the crayfish *Procambarus clarkii* towards copper. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **95(1)**: 12-17.
- Booth, C. E., Mangum, C. 1978. Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc, *Modiolus demissus*. *Physiological Zoology*, **51(1)**: 17-32.
- Borcherding, J. 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia*, **556**: 417-426.
- Borcherding, J., Volpers, M. 1994. The “Dreissena-Monitor” – First results on the application of this biological early warning system in the continuous monitoring of water quality. *Water Science & Technology*, **29(3)**: 199-201.
- Bortoluzzi, G., Giglio, F., Ligi, M., Del Bianco, F., Ferrante, V., Gasperini, L., Ravaioli, M. 2016. Morphobathymetry of Boka Kotorska Bay. pp. 69-88. In: Joksimović, A.,

- Durović, M., Semenov, A.V., Zonn, I. S., Kostianoy A. G. (Eds): *The Boka Kotorska Bay Environment*. Springer International Publishing, 606 pp.
- Bosak, S., Šilović, T., Ljubešić, Z., Kušpilić, G., Pestorić, B., Krivokapić, S., Viličić, D. 2012. Phytoplankton size structure and species composition as an indicator of trophic status in transitional ecosystems: The case of a Mediterranean fjord-like karstic bay. *Oceanologia*, **54(2)**: 255-286.
- Bošković, B. 2018. Indikatorski taksoni zajednice akvatičnih makrobeskičmenjaka u proceni kvaliteta vode barskih ekosistema. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, 32 pp.
- Braby, C. E., Somero, G. N. 2006. Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *Journal of Experimental Biology*, **209**: 2554-2566.
- Brack, W., Altenburger, R., Schüürmann, G., Krauss, M., López Herréez, D. i sar. 2015. The SOLUTIONS project: Challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Science of the Total Environment*, **503-504**: 22-31.
- Brack, W., Ait Aissa, S., Backhaus, T., Dulio, V. Escher, B. I. i sar. 2019. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods in order to diagnose and monitor water quality. Policy Brief. *Environmental Science Europe*, **31(10)**: doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2.
- Brand, A. R., Roberts, D. 1973. The cardiac responses of the scallop *Pecten maximus* (L.) to respiratory stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **13(1)**: 29-43.
- Brozović, G. 2007. Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 150 pp.
- Brown, J. R., Gallowaya, T. S., Lowe, D., Browne, M. A., Dissanayake, A., Jones, M. B., Depledge, M. H. 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **66**: 267-278.

- Burić, Z., Cetinić, I., Viličić, D., Caput Mihalić, K., Carić, M., Olujić, G. 2007. Spatial and temporal distribution in a highly stratified estuary (Zrmanja, Adriatic Sea). *Marine Ecology*, **28**: 169-177.
- Calisi, A., Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. A., Schettino, T. 2008. Morphometric alterations in *Mytilus galloprovincialis* granulocytes: A new biomarker. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27(6)**: 1435-1441.
- Capillo, G., Silvestro, S., Sanfilippo, M., Fiorino, E., Giangrosso, G., Ferrantelli, V., Vazzana, I., Faggio, C. 2018. Assessment of electrolytes and metals profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and its impact on *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry & Biodiversity*, **15(5)**: doi.org/10.1002/cbdv.201800044.
- Capolupo, M., Valbonesi, P., Kiwana, A., Buratti, S., Franzellitti, S., Fabbri, E. 2016. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, **563-564**: 538-548.
- Cândido, L. T. S., Romero, S. M. B. 2006. Heart rate and burrowing behavior in the mussel *Anodontites trapesialis* (Bivalvia: Mycetopodidae) from lotic and lentic sites. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, **145(1)**: 131-136.
- Chandurvelan, R., Marsden, I. D., Glover, C. N., Gaw, S. 2015. Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: Relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. *Science of the Total Environment*, **511**: 633-675.
- Chen, W-Y., Jou, L-J., Chen, S-H., Liao, C-M. 2012. A real-time biomonitoring system to detect arsenic toxicity by valve movement in freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology*, **21**: 1177-1187.
- Cheng, M. C. F., Sarà, G., Williams, G. A. 2018. Combined effects of thermal conditions and food availability on thermal tolerance of the marine bivalve, *Perna viridis*. *Journal of Thermal Biology*, **78**: 270-276.
- Coleman, N. 1972. Some responses of *Mytilus edulis* L. and *Modiolus modiolus* L. to aerial exposure. Ph.D. thesis, University of Manchester.

- Coleman, N. 1974. The heart rate and activity of bivalve molluscs in their natural habitats. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, **12**: 301-313.
- Coleman, T. G., 1974. Cardiac output by dye dilution in the conscious rat. *Journal of Applied Physiology*, **37(3)**: 452-455.
- Collins, C. L., Burnett, N. P., Ramsey, M. J., Wagner, K., Zippay, M. L. 2019. Physiological responses to heat stress in an invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* depend on tidal habitat. *Marine Environmental Research*, **154**: 104849.
- Comeau, L. A., Babarro, J. M. F., Longa, A., Padin, X. A. 2018. Valve-gaping behavior of raft-cultivated mussels in the Ría de Arousa, Spain. *Aquaculture Reports*, **9**: 68-73.
- Comeau, L. A., Babarro, J. M. F., Riobó, P., Scarratt, M., Starr, M., Trenblay, R. 2019. PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium minutum* induces valve microclosures in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, **500**: 407-413.
- Company, R., Serafim, A., Lopes, B., Cravo, A., Kalman, J., Riba, I., Del Valls, T. A., Blasco, J., Delgado, J., Sarmiento, A. M., Nieto, J. M., Shepherd, T. J., Nowell, G., Bebianno, M. J. 2011. Source and impact of lead contamination on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in several marine bivalve species along the Gulf of Cadiz. *Aquatic Toxicology*, **101(1)**: 146-154.
- Compton, T. J., Kentie, R., Storey, A. W., Veltheim, I., Pearson, G. B., Piersma, T. 2008. Carbon isotope signatures reveal that diet is related to the relative sizes of the gills and palps in bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **361(2)**: 104-110.
- Connor, K. M., Gracey, A. Y., 2012. High-resolution analysis of metabolic cycles in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **302**: 103-111.
- Counihan, K. L. 2018. The physiological effects of oil, dispersant and dispersed oil on the bay mussel, *Mytilus trossulus*, in Arctic/Subarctic conditions. *Aquatic Toxicology*, **199**: 220-231.
- Cupp, E. E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America. University of California, Cambridge University Press, 238 pp.

- Curtis, T. M., Williamson, R., Depledge, M. H. 2000. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper. *Marine Biology*, **136**: 837-846.
- Çelik, M. Y., Karayücel, S., Karayücel, I., Öztürk, R., Eyüboğlu, B. 2012. Meat yield, condition index, and biochemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) in Sinop, South of the Black Sea. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **21(3)**: 198-205.
- Dagnino, A., Allen, J. I., Moore, M. N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, **12(2)**: 155-172.
- Dailianis, S. 2011. Environmental impact of anthropogenic activities: The use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. pp. 43-72. In: Mcgevin, L. E. (Eds): *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact*. New York: Nova Sciences Publishers, 542 pp.
- Dallarés, S., Carrasco, N., Álvarez-Muñoz, D., Rambla-Alegre, M., Solé, M. 2018. Multibiomarker biomonitoring approach using three bivalve species in the Ebro Delta (Catalonia, Spain). *Environmental Science and Pollution Research International*, **25(36)**: 36745-36758.
- Dauberschmidt, C., Dietrich, D. R., Schlatter, C. 1997. Investigations on the biotransformation capacity of organophosphates in the mollusc *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, **37(4)**: 283-294.
- Davenport, J., Carrion-Cotrina, M. 1981. Responses of the mussel *Mytilus edulis* L. to simulated subarctic tide pool conditions. *Journal of Thermal Biology*, **6(4)**: 257-265.
- Davenport, J., Chen, X. 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Journal of Molluscan Studies*, **53**: 293-297.
- Davenport, J., Smith, R. J. J. W., Packer, M. 2000. Mussels *Mytilus edulis*: Significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **198**: 131-137.

- Davies, I., Vethaak, D. 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects, 1451 ICES Cooperative Research. International Council for the Exploration of the Sea, 277 pp.
- Davis, G. E. 1989. Design of a long-term ecological monitoring program for Channel Islands National Park, California. *Natural Areas Journal*, **9(2)**: 80-89.
- Deaton, L. E., Mangum, C. P. 1978. The cardiac response of the ponderous ark clam, *Noetia ponderosa*, to reduced oxygen levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **59(3)**: 229-230.
- Depledge, M. H. 1984a. Photoplethysmography – a non-invasive technique for monitoring heart beat and ventilation in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **77(2)**: 369-371.
- Depledge M. H. 1984b. Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carurus maenas* (L.)) exposed to heavy metal pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, **78(2)**: 445-459.
- Depledge, M. H., 1985. The influence of nutritional state on the circulatory and respiratory physiology of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **65(1)**: 69-78.
- Depledge, M. H., Andersen, B. B. 1990. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **96(4)**: 473-477.
- Depledge, M. H., Aagaard, A., Györkös, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, **31(1-3)**: 19-27.
- Depledge, M. H., Aagaard, A., Gyorkos, P. 1996. Automated interpulse-duration assessment (AIDA): A new technique for detecting disturbances in cardiac activity in selected macroinvertebrates, *Marine Biology*, **126**: 313-319.
- Despotović, S. G. 2013. Parametri antioksidacionog zaštitnog sistema i koncentracija teških metala u visceralnoj masi odabranih vrsta puževa i školjki Dunava, Tise i Velike Morave. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 137 pp.

- Dietz, T. H., Tomkins, R. U. 1980. The effect of temperature on heart rate of the freshwater mussel, *Ligumia subrostrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **67(2)**: 269-271.
- Dodge, D. J. 1985. Atlas of Dinoflagellates. Farrand Press, London, 119 pp.
- Dolmer, P. 2000. Algal concentration profiles above mussel beds. *Journal of Sea Research*, **43(2)**: 113-119.
- Dong, Y., Williams, G. A., 2011. Variations in cardiac performance and heat shock protein expression to thermal stress in two differently zoned limpets on a tropical rocky shore. *Marine Biology*, **158(6)**: 1223-1231.
- Dorgham, M., Abdel-Aziz, N. E., El-Deeb, K., Okbah, M. A. 2004. Eutrophication problem in the western harbour of Alexandria, Egypt. *Oceanologia*, **46(1)**: 25-44.
- Drakulović, D. 2012. Značaj fitoplanktona kao indikatora eutrofikacije u akvatorijumu Bokotorskog zaliva. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 227 pp.
- Drakulović, D., Vuksanović, N., Joksimović, D. 2011. Dynamics of phytoplankton in Boka Kotorska Bay. *Studia Marina*, **25(1)**: 1-20.
- Drakulović, D., Pestorić, B., Cvijan, M., Krivokapić, S., Vuksanović, N. 2012. Distribution of phytoplankton community in Kotor Bay (south-eastern Adriatic Sea). *Central European Journal of Biology*, **7(3)**: 470-486.
- Drakulović, D., Mandić, M., Joksimović, D., Petović, S. 2013. Distribution of phytoplankton on mussel farms in Boka Kotorska Bay. *Studia Marina*, **26(1)**: 65-82.
- Drakulović, D., Pestorić, B., Joksimović, D., Marković, S., Mandić, M. 2015. Composition and distribution of diatoms on mussel farms in Boka Kotorska Bay. *Studia Marina*, **28(1)**: 51-60.
- Drakulović, D., Gvozdrenović, S., Joksimović, D., Mandić, M., Pestorić, B. 2017. Toxic and potentially toxic phytoplankton in the mussel and fish farms in the transitional area of Montenegrin coast (south-eastern Adriatic Sea). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **17(5)**: 885-900.
- Dufour, S. C., Beninger, P. G. 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Marine Biology*, **138**: 295-309.

- Durrieu, G., Pham, Q. K., Foltête, A. S., Maxime, V., Grama, I., Le Tilly, V., Duval, H., Tricot, J. M., Naceur, C. B., Sire, O. 2016. Dynamic extreme values modeling and monitoring by means of sea shores water quality biomarkers and valvometry. *Environmental Monitoring and Assessment*, **188(7)**: 401.
- Dyrynda, E. A., Law, R. J., Dyrinda, P. E. J., Kelly, C. A., Pipe, R. K., Ratcliffe, N. A. 2000. Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('Sea Empress', Wales, UK). *Marine Ecology Progress Series*, **206**: 155-170.
- de Vooy, C. G. N. 1991. Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* in the Mediterranean IV: Role of amino acids in adaptation to low salinities during anaerobiosis and aerobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **100A**: 423-432.
- de Zwart, D., Kramer, K. J. M., Jenner, H. A. 2006. Practical experiences with the biological early warning system mosselmonitor. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **10**: 237-247.
- de Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E. 1999. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and humans. *Free Radical Biology and Medicine*, **26(1-2)**: 202-226.
- De Fur, P. L., Mangum, C. P. 1979. The effects of environmental variables on the heart rates of invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **62(2)**: 283-294.
- De Kock, W. C, Kramer, K. J. M. 1994. Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In: Kramer, K. J. M. (Eds): *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 327 pp.
- di Castri, F., Vernhes, J. R., Younés, T. 1992. Inventoring and monitoring biodiversity: A proposal for an international network. *Biology International*, **27**: 1-27.
- Earll, R. 1975. Temporal variation in the heart activity of *Scrobicularia plana* (da Costa) in constant and tidal conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **19(3)**: 257-274.

- Eggermont, M., Cornillie, P., Dierick, M., Adriaens, D., Nevejan, N., Bossier, P., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P., Defoirdt, T., Declercq, A. M. 2020. The blue mussel inside: 3D visualization and description of the vascular-related anatomy of *Mytilus edulis* to unravel hemolymph extraction. *Scientific Reports*, **10**: 6773.
- EPA, 2016. Environmental impact assessment for soil remediation Shipyard Bijela on environment. Environmental Protection Agency of Montenegro, Podgorica, 78 pp.
- Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S. 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of the Total Environment*, **636**: 220-229.
- FAO, 2011. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en
- Faria, M., Ochoab, V., Blázquez, M., San Juan, M. F., Lazzarad, R., Lacorted, S., Soares, A. M. V. M., Baratada, C. 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology*, **152**: 82-95.
- Fdil, M. A., Mouabad, A., Abdelfattah, M., Outzourhit, A., Benhra, A., Maarouf, A., Pihan, J. C. 2006. Valve movement response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to metals (Cu, Hg, Cd and Zn) and phosphate industry effluents from Moroccan Atlantic coast. *Ecotoxicology*, **15(5)**: 477-486.
- Feder, M. E., Bennett, A. F., Burggren, W. W., Huey, R. B. 1987. New directions in ecological physiology. Cambridge University Press, 378 pp.
- Fedotov, V. P., Kholodkevich, S. V., Strochilo, A. G. 2000. Study of contractile activity of the crayfish heart with the aid of a new non-invasive technique. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **36**: 219-222.
- Fedotov V. P., Zhuravlev V. L., Khalatov A. N., Kholodkevich S. V. 2009. Comparative analysis of heart activity of the crayfish *Pontastacus leptodactylus* by methods of plethysmography and electrocardiography. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **45(4)**: 434-436.
- Frank, D. M., Hamilton, J. F., Ward, J. E., Shumway, S. E. 2007. A fiber optic sensor for high resolution measurement and continuous monitoring of valve gape in bivalve molluscs. *Journal of Shellfish Research*, **26(2)**: 575-580.

- Frazier, J. M. 1975. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. I. Seasonal effects. *Chesapeake Science*, **16**: 162-171.
- Frazier, J. M. 1976. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. II. Environmental effects. *Chesapeake Science*, **17**: 188-197.
- Gainey, L. F., Shumway, S. E. 1988. Physiological effects of protogony *Ulax tamarensis* on cardiac activity in bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **91C(1)**: 159-164.
- Gallo, F., Fossi, C., Weber, R., Santillo, D., Sousa, J., Ingram, I., Nadal, A., Romano, D. 2018. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemical components: the need for urgent preventive measures. *Environmental Sciences Europe*, **30(1)**: 1-14.
- Galloway, T. S., Sanger, R. C., Smith, K. L., Fillmann, G., Readman, J. W., Ford, T. E., Depledge, M. H. 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science and Technology*, **36(10)**: 2219-2226.
- García-March, J. R., Sanchís Solsona, M. Á., García-Carrascosa, A. M. 2008. Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: Circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology*, **153(4)**: 689-698.
- García-March, J. R., Jiménez, S., Sanchis, M. A., Monleon, S., Lees, J., Surge, D., Tena-Medialdea, J. 2016. In situ biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Marine Biology*, **163(29)**: doi.org/10.1007/s00227-016-2812-3.
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M. P., Marigómez, I. 2011. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *Journal of Environmental Monitoring*, **13(4)**: 915-932.
- Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Marinović Bonacić, A., Conides, A., Bonacić, K., Ljubičić, A., Van Gorder, S. 2011. The influence of environmental parameters on the growth and meat quality of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia). *AAFL Bioflux*, **4(5)**: 573-583.

- Gerhardt, A. 2002. Bioindicator species and their use in biomonitoring. Environmental Monitoring I. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO Eolss Publishers, Oxford.
- Gibbs, J. P., Snell, H. L., Gaston, C. E. 1999. Effective monitoring for adaptive wildlife management: Lessons from the Galàpagos Islands. *The Journal of Wildlife Management*, **63(4)**: 1055-1065.
- Ginetsinskiy, A. G. 1963. Physiological mechanisms of water – Salt equilibrium. Leningrad, Moscow, 427 pp.
- Gnyubkin, V. F. 2009. An early warning system for aquatic environment state monitoring based on an analysis of mussel valve movement. *Russian Journal of Marine Biology*, **35(5)**: 431-436.
- Gnyubkin, V. F. 2010. The circadian rhythms of valve movements in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Russian Journal of Marine Biology*, **36**: 419-428.
- Goldberg, E. D. 1975. The mussel watch: A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, **6**: 111-114.
- Goldberg, E. D. 1986. TBT: An environmental dilemma. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, **28(8)**: 17-44.
- Goldberg, E. D., Bertine, K. K. 2000. Beyond the mussel watch – new directions for monitoring marine pollution. *Science of the Total Environment*, **247(2)**: 165-174.
- Goldberg, E. D., Bowen, V. T., Farrington, J. W., Harvey, G., Martin, J. H., Parker, P. L., Riseborough, R. W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E. 1978. The mussel watch. *Environmental Conservation*, **5**: 101-126.
- Gomes, T., Chora, S., Pereira, C. G., Cardoso, C., Bebianno, M. J. 2014. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO, NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology*, **155**: 327-336.
- Gosling, E. M. 1992. The mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 589 pp.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs. Biology, ecology and culture. Fishing News Books, Oxford, UK, 456 pp.
- Gosling, E. 2015. Marine Bivalve Molluscs. Second Edition. Fishing News Books, 536 pp.

- Grace, A. L., Gainey, L. F. 1987. The effects of copper on the heart rate and filtration rate of *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, **18(2)**: 87-91.
- Gracey, A. Y., Connor, K., 2016. Transcriptional and metabolomic characterization of spontaneous metabolic cycles in *Mytilus californianus* under subtidal conditions. *Marine Genomics*, **30**: 35-41.
- Grundy, M. M., Moore, M. N., Howell, S. M., Ratcliffe, N. A. 1996. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **34(4)**: 273-290.
- Gudimov, A. V. 2003. Elementary behavioral acts of valve movements in mussels (*Mytilus edulis* L.). *Doklady Biological Sciences*, **391(1-6)**: 346-348.
- Gudimov, A. V. 2006. Behavior of Blue mussels (*Mytilus edulis* L.) under the fluctuating environmental conditions. *Doklady Biological Sciences*, **409**: 314-316.
- Gudimov, A. V. 2008. Marine mussels of the Karadag (Black Sea): Population decay, ecology and physiological adaptations. *Doklady Biological Sciences*, **422**: 330-332.
- Gvozdenović, S. 2020. Integralni multi-trofički uzgoj dagnje (*Mytilus galloprovincialis* L.) i kamenice (*Ostrea edulis* L.) sa ribom u Bokokotorskom zalivu. Doktorska disertacija. Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, 191 pp.
- Gvozdenović, S., Mandić, M., Pešić, V., Nikolić, M., Pešić, A., Ikica, Z. 2017. Comparison between IMTA and monoculture farming of mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) in the Boka Kotorska Bay. *Acta Adriatica*, **58(2)**: 271-284.
- Haberkorn, H., Tran, D., Massabuau, J-C., Ciret, P., Savar, V., Soudant, P., 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Marine Pollution Bulletin*, **62(6)**: 1191-1197.
- Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B., Galloway, T. S. 2010. The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology*, **19(5)**: 953-962.
- Halldórsson, H. P., De Pirro, M., Romano, C., Svavarsson, J., Sarà, G. 2007. Immediate biomarker responses to benzo[a]pyrene in polluted and unpolluted populations of the

- blue mussel (*Mytilus edulis* L.) at high-latitudes. *Environment International*, **34(4)**: 483-489.
- Hartmann, J. T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B., Geist, J. 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, **170**: 279-288.
- Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L. 1992. Physiological interrelations, and the regulation of production. pp. 171-222. In: Gosling, E. (Eds): *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 589 pp.
- Helm, M. M., Trueman, E. R. 1967. The effect of exposure on the heart rate of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **21(1)**: 171-177.
- Helmuth, B., Broitman, B. R., Yamane, L., Gilman, S. E., Mach, K., Mislán, K. A. S., Denny, M. W. 2010. Organismal climatology: analyzing environmental variability at scales relevant to physiological stress. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 995-1003.
- Herricks, E., Schaeffer, D. J. 1985. Can we optimize biomonitoring? *Environmental Management* **9**: 487-492.
- Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., Bebianno, M. J. 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **143(2)**: 196-203.
- Höher, N., Turja, R., Köhler, A., Lehtonen, K. K., Broeg, K. 2015. Immunological responses in the mussel *Mytilus trossulus* transplanted at the coastline of the northern Baltic Sea. *Marine Environmental Research*, **112A**: 113-121.
- Hrs-Brenko, M. 1973. The relationship between reproductive cycle and indeks of condition of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the northern Adriatic Sea. *Stud. Rev. GFCM*, **52**: 47-52.
- Hustedt, F. 1930. Kryptogamen-Flora: Die Kieselalgen Deuchelands, Österreich, und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. Teil 1. Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig, Denmark, 920 pp.

- Ilić, N. 2017. Identifikacija i filogenetska analiza norovirusa poreklom iz dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) sa aspekta bezbednosti hrane. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarskih nauka, 109 pp.
- Irisarri, J., Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U., Cranford, P. J., Robinson, S. M. C. 2014. Availability and utilization of waste fish feed by mussels *Mytilus edulis* in a commercial integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) system: A multi-indicator assessment approach. *Ecological Indicators*, **48**: 673-686.
- Iversen, P. E., Lind, M. J., Ersvik, M., Ronning, I., Skaare, B. B., Green, A. M. V., Bakke, T., Lichtenthaler, R., Klungsoyr, J., Hylland, K., 2015. Guidelines - Environmental monitoring of petroleum activities on the Norwegian continental shelf. Norwegian Environment Agency, Oslo, Norway, 65 pp.
- Ivošević, D. 2013. Histološka i morfometrijska analiza probavila dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) u Malostonskom zaljevu. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, 54 pp.
- Jasprica, N. 2003. Prva hrana svijeta. *Biseri Jadrana*, **4**: 66-72.
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. 1997. Phytoplankton pigments in Oceanography. UNESCO Publishing, 661 pp.
- Joksimović, D., Pestorić, B. 2012. The quality of sea water on the farms in the Boka Kotor Bay, Montenegro. International Conference on water, climate and environment, 28th May – 2nd June 2012, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Joksimović, D., Stanković, S. 2012. Accumulation of trace metals in marine organisms of the southeastern Adriatic coast, Montenegro. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **77(1)**: 105-117.
- Joksimović, D., Kljajić, Z., Filipović, S. 2001. Neki mikroelementi u vodama Bokokotorskog zaliva. 30th Conference about actual water protect problems “Water Protection 2001”, Aranđelovac, Serbia.
- Joksimović, D., Castelli, A., Mitrić, M., Martinović, R., Perošević, A., Stanković, S. 2016. Marine chemistry of the Boka Kotorska Bay. pp. 89-115. In: Joksimović, A., Đurović, M., Semenov, A. V., Zonn, I. S., Kostianoy A. G. (Eds): *The Boka Kotorska Bay Environment*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 606 pp.

- Jones, S. J., Lima, F. P., Wetthey, D. S. 2010. Rising environmental temperatures and biogeography: poleward rangecontraction of the blue mussel, *Mytilus edulis* L., in the western Atlantic. *Journal of Biogeography*, **37(12)**: 2243-2259.
- Jørgensen, C. B. 1966. Biology of suspension feeding. Pergamon Press, London, 357 pp.
- Jørgensen, C. B. 1990. Bivalve filter feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen Ltd., Fredensborg, Denmark, 140 pp.
- Kahlon, S. K., Sharma, G., Julka, J. M., Kumar, A., Sharma, S., Stadler, F. J. 2018. Impact of heavy metals and nanoparticles on aquatic biota. *Environmental Chemistry Letters*, **16(3)**: 919-946.
- Kamenos, N. A., Calosi, P., Moore, P. G. 2006. Substratum-mediated heart rate responses of an invertebrate to predation threat. *Animal Behaviour*, **71(4)**: 809-813.
- Katalay, S., Yavasoglu, A., Yigitturk, G., Oltulu, F., Sari, G., Yavasoglu, N. U. K. 2016. Histological effects of pollution on gill and hepatopancreas tissues of black mussels (*M. galloprovincialis* L.) from Izmir Bay of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, **25(5)**: 1461-1467.
- Kern, P., Cramp, R. L., Franklin, C. E. 2015. Physiological responses of ectotherms to daily temperature variation. *Journal of Experimental Biology*, **218**: 3068-3076.
- Khalaman, V. V., Aharov, A. N., Kholodkevich, S. V., Komendatov, A. Y., Kuznetsova, T. V. 2017. Influence of the White Sea sponge *Halichondria panicea* (Pallas, 1766) on physiological state of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), as evaluated by heart rate characteristics. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **53**: 225-232.
- Kholodkevich, S. V., Ivanov, A. V., Kurakin, A. S., Kornienko, E. L., Fedotov, V. P. 2008. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations. *Environmental Bioindicators*, **3(1)**: 23-34.
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Trusevich, V. V., Kurakin, A. S., Ivanov, A. S. 2009a. Peculiarities of valve movement and of cardiac activity of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* at various stress actions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **45(4)**: 524-526.

- Kholodkevich, S. V., Ivanov, A. V., Kuznetsova, T. V., Kurakin, A. S., Kornienko, E. L., Pan'kov, S.L., Khalatov, A. N. 2009b. Ultradian rhythms in cardiac activity of Bivalvia. *Doklady Biological Sciences*, **426**: 216-218.
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Lehtonen, K. K., Kurakin, A. S. 2011. Experiences on ecological status assessment of the Gulf of Bothnia different sites based on cardiac activity biomarkers of caged mussels (*Mytilus edulis*). ICES Annual Science Conference, 19th – 23rd September, Gdansk, Poland.
- Kholodkevich, S. V., Ivanov, A. V., Kornienko, E. L., Kurakin A. S. 2013. Method of biological environment monitoring (versions) and a system for realization thereof. 05.14.2013. US Patent No. 8442809.
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Sharov, A. N., Kurakin, A. S., Lips, U., Kolesova, N., Lehtonen, K. K. 2016. Applicability of a bioelectronic cardiac monitoring system for the detection of biological effects of pollution in bioindicator species in the Gulf of Finland. *Journal of Marine Systems*, **171**: 151-158.
- Kholodkevich, S. V., Kuznetsova, T. V., Kurakin, A. S., Soldatov, A. A., Gostyukhina, O. L., Golovina, I. V., Andreenko, T., Kirin, M. P. 2018. New methodological approach to express assessment of ecological state for the coastal sea waters. *Известия ТИИРО*, **194**: 215-238.
- Kholodkevich, S. V., Sharov, A. N., Chuikoc, G. M., Kuznetsova, T. V., Gapeeva, M. V., Lozhkina, R. A. 2019a. Quality assessment of freshwater ecosystems by the functional state of bivalved Mollusks. *Water Resources*, **46(2)**: 249-257.
- Kholodkevich, S., Sharov, A., Kuznetsova, T., Kurakin, A., Joksimović, D., Nikolić, M. 2019b. Physiological testing of *Mytilus galloprovincialis* for the environmental assessing of coastal marine areas: a case study in Boka Kotorska Bay (the Adriatic Sea). *Chemistry and Ecology*, **35(7)**: 631-643.
- Kiyohito, N., Tsuneo, H., Jyoji, G., Hiroyasu, Y., Seok, O. J. 2006. Detection of the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a hall element sensor. *Aquaculture*, **255(1-4)**: 395-401.
- Kramer, K. J. M., Jenner, H. A., de Zwart, D. 1989. The valve movement response of mussels: A tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, **188**: 433-443.

- Kramer, K. J. M., Foekema, E. M. 2001. The “Musselmonitor” as biological early warning system. pp. 59-87. In: Butterworth, F. M., Gunatilaka, A., Gensebatt, M. E. (Eds): *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2: A handbook*. New York: Springer, 508 pp.
- Kriesel, W. 1984. Representation of the environmental quality profile of a metropolitan area. *Environmental Monitoring and Assessment*, **4**: 15-33.
- Krishnakumar, P. K., Qurban, M. A., Sasikumar, G. 2018. Biomonitoring of trace metals in the coastal waters using bivalve molluscs. pp. 153-176. In: Saleh, H. E-D., El-Adham, E. (Eds): *Trace elements – Human health and environment*. IntechOpen, 186 pp.
- Krivokapić, S. 2005. Dinamika biomase fitoplanktona i nutrijenata kao indikatora stepena trofičnosti u unutrašnjem dijelu Bokokotorskog zaliva. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, 144 pp.
- Krivokapić, S., Stanković, Ž., Vuksanović, N. 2009. Seasonal variation of phytoplankton biomass and environmental conditions in the inner Boka Kotorska Bay (eastern Adriatic Sea). *Acta Botanica Croatica*, **68(1)**: 45-55.
- Krivokapić, S., Pestorić, B., Bosak, S., Kušpilić, G., Wexels Riser, C. 2011. Trophic state of Boka Kotorska Bay (South-Eastern Adriatic Sea). *Fresenius Environmental Bulletin*, **20(8)**: 1960-1969.
- Kuklina, I., Kouba, A., Kozák, P. 2013. Real-time monitoring of water quality using fish and crayfish as bio-indicators: A review. *Environmental Monitoring Assessment*, **185(6)**: 5043-5053.
- Kuznetsova, T. V. 2013. Change of salinity of medium as a functional loading in estimating physiological state of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **49(5)**: 498-502.
- Kuznetsova, T. V., Kholodkevich, S. V. 2015. Comparative assessment of surface water quality through evaluation of physiological state of bioindicator species: Searching a new biomarkers. 4th Mediterranean Conference on Embedded Computing, 15th – 19th, Budva, Montenegro.

- Kuznetsova, T. V., Sladkova, G. V., Kholodkevich, S. V. 2010. Evaluation of functional state of crayfish *Pontastacus leptodactylus* in normal and toxic environment by characteristics of their cardiac activity and hemolymph biochemical parameters. *Comparative and Otogenic Physiology*, **46(3)**: 241-250.
- Kuznetsova, T. V., Kholodkevich, S. V., Kurakin, A. S. 2018. Experience on ecological status assessment based on adaptive potential diagnostics in selected invertebrates of the Baltic Sea subregions. *Fundamentalnaya i Prikladnaya Gidrofizika*, **11(2)**: 75-85.
- Kuznetsova, T. V., Trusevich, V. V., Kurin, M. P., Kholodkevich, S. V. 2016. *Mytilus galloprovincialis* Lam.: The experience of investigation using non-invasive methods of cardiac activity and valve movement monitoring. Dostupno na sajtu: https://www.researchgate.net/publication/316456085_Fiziologiceskie_adaptacii_chno_morskoj_midiiMytilus_galloprovincialis_opyt_izucenia_s_pomосу_neinvazivnogo_monitoringa_kardioaktivnosti_i_dvizhenia_stvorok_Morskie_biologiceskie_issledovania_dostizhenia#fullTextFileContent.
- Lacroix, C., Richard, G., Segueineau, C., Guyomarch, J., Moraga, D., Auffret, M. 2015. Active and passive biomonitoring suggest metabolic adaptation in blue mussels (*Mytilus* spp.) chronically exposed to a moderate contamination in Brest harbour (France). *Aquatic Toxicology*, **62**: 126-137.
- Lam, P. K. S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal Management*, **52**: 348-354.
- Lannig, G., Cherkasov, A. S., Portner, H. O., Bock, C., Sokolova, I. M. 2008. Cadmium-dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **294(4)**: 1338-1346.
- Lehtonen, K. K., d'Errico, G., Korpinen, S., Regoli, F., Ahkola, H., Kinnunen, T., Lastumäki, A. 2019. Mussel caging and the weight of evidence approach in the assessment of chemical contamination in coastal waters of Finland (Baltic Sea). *Frontiers in Marine Science*, **6(688)**: doi.org/10.3389/fmars.2019.00688.
- Lepetić, V. 1965. Sastav i sezonska dinamika ihtiofentosa i jestivih avvertebrata u Bokokotorskom zalivu i mogućnost njihove eksploatacije. *Studia Marina*, **1**: 3-127.

- Lesser, M. P., Bailey, M. A., Merselis, D. G., Morrison, J. R. 2010. Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **156(4)**: 541-551.
- Liu, H., Chen, X., Kang, I. J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Yang, J. 2015. The valve movement response of three freshwater mussels *Corbicula fluminea* Muller 1774, *Hyriopsis cumingii* Lea 1852, and *Anodonta woodiana* Lea 1834 exposed to copper. *Hydrobiologia*, **770(1)**: doi.org/10.1007/s10750-015-2560-2.
- Lockwood, B. L., Somero, G. N. 2011. Invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) on the California coast: the role of physiology in a biological invasion. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **400(1-2)**: 167-174.
- Loo, L. 1992. Filtration, assimilation, respiration and growth of *Mytilus edulis* L. at low temperatures. *Ophelia*, **35(2)**: 123-131.
- Lopes, B., Ferreira, A. M., Bebianno, M. J., 2012. Responses of CYP450 dependent system to aliphatic and aromatic hydrocarbons body burden in transplanted mussels from South coast of Portugal. *Ecotoxicology*, **21(3)**: 730-749.
- Lowe, G. A., Trueman, E. R. 1972. The heart and water flow rates of *Mya arenaria* (Bivalvia: Mollusca) at different metabolic levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **41(3)**: 487-494.
- Magaš, D. 2002. Natural-geographic characteristics of the Boka Kotorska area as the basis of development. *Geoadria*, **7**: 51-81.
- Mainwaring, K., Tillin, H., Tyler-Walters, H. 2014. Assessing the sensitivity of blue mussels (*Mytilus edulis*) to pressures associated with human activities. Peterborough, Joint Nature Conservation Committee, JNCC Report No. 506, 96 pp.
- Mandić, M., Huter, A., Joksimović, D., Drakulović, D., Mandić, S. 2012. Water quality analysis on mussel farms (*Mytilus galloprovincialis*) in the Boka Kotorska Bay, Montenegro. *Agriculture & Forestry*, **54(1-4)**: 75-94.
- Mandić, S., Radović, I., Radović, D. 2016. Physical and geographical description of the Boka Kotorska Bay. pp. 43-67. In: Joksimović, A., Đurović, M., Semenov, A. V., Zonn, I.

- S., Kostianoy, A. G. (Eds): *The Boka Kotorska Bay Environment*. Springer International Publishing Cham, Switzerland, 606 pp.
- Marceau, F. 1909. Recherches sur la morphologie, et l'histologie, et la physiologie compares des muscles adducteurs des mollusques acphales. *Archives de Zoologie expérimentale et générale*, **2**: 295-469.
- Marchand, M., Vas, D., Duursma, E. K. 1976. Levels of PCBs and DDTs in mussels from the N.W. Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, **7(4)**: 65-69.
- Marchán, S., Davies, M. S., Fleming, S., Jones, H. D. 1999. Effects of copper and zinc on the heart rate of the limpet *Patella vulgata* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **123(1)**: 89-93.
- Martella, T., 1974. Some factors influencing byssus thread production in *Mytilus edulis* (mollusca: Bivalvia) Linnaeus, 1758. *Water, Air and Soil Pollution*, **3**: 171-177.
- Martin, M. H., Coughtrey, P. J. 1982. Biological monitoring of heavy metal pollution. Applied Science Publishers, 475 pp.
- Martinović, R., Kurakin, A. S., Kholodkevich, S. V., Gačić, Z., Kljajić, Z. 2013a. Preliminary results of sea water quality assessment based on physiological biomarkers in part of the Boka Kotorska Bay. *Water Research and Management*, **3(1)**: 31-34.
- Martinović, R., Gačić, Z., Kljajić, Z. 2013b. Heart rate changes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) induced by cadmium. *Studia Marina*, **26(1)**: 111-118.
- Martinović, R., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Marković, S., Gačić, Z., Kljajić, Z., Vuković-Gačić, B. 2015. Genotoxic potential and heart rate disorders in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to superdispersant-25 and dispersed diesel oil. *Marine Environmental Research*, **108**: 83-90.
- Martinović, R., Kolarević, S., Kracun-Kolarević, M., Kostić, J., Jokanović, S., Gačić, Z., Joksimović, D., Đurović, M., Kljajić, Z., Vuković-Gačić, B. 2016. Comparative assessment of cardiac activity and DNA damage in haemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in exposure to tributyltin chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **47**: 165-174.

- Martinčić, D., Kwokal, Z., Peharec, Z., Marguš, D., Branica, M., 1992. Distribution of Zn, Pb, Cd and Cu between seawater and transplanted mussels (*Mytilus-galloprovincialis*). *Science of the Total Environment*, **119**: 211-230.
- Marshall, D. J., McQuaid, C. D. 1993. Differential physiological and behavioral responses of the intertidal mussels, *Choromytilus meridonalis* (Kr.) and *Perna perna* L. to exposure to hypoxia and air: a basis for spatial separation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **171(2)**: 225-237.
- Mat, A. M., Massabuau, J. C., Ciret, P., Tran, D. 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiology International*, **29(7)**: 857-867.
- Matoničkin, I., Habdija, I., Primc-Habdija, B. 1998. Beskralješnjaci – Biologija nižih avvertebrata, III. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Školska knjiga, Zagreb, 691 pp.
- Matozzo, V., Marin, M. G., Masiero, L., Tremonti, M., Biamonte, S., Viale, S., Finos, L., Lovato, G., Pastore, P., Bogialli, S. 2018. Effects of aminomethylphosphonic acid, the main breakdown product of glyphosate, on cellular and biochemical parameters of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **83**: 321-329.
- Marinković, A. 2010. Utjecaj ekoloških čimbenika na sezonske promjene indeksa kondicije uzgojnih populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) u Malostonskom zaljevu. Diplomski rad, Sveučilište u Dubrovniku, Odjel za Akvakulturu, 48 pp.
- Marguš, D., Teskeredžić, E. 1984. Mussels condition index in the estuary of the river Krka, near Šibenik (*Mytilus galloprovincialis* L.). *Morsko ribarstvo*, **1**: 17-20.
- Mejdoub, Z., Fahde, A., Loutfi, M., Kabine, M. 2017. Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca. *Ocean & Coastal Management*, **136**: 95-103.
- MEST EN ISO, 9308-1, 2011. Kvalitet vode – Određivanje broja *Echerichia coli* i koliformnih bakterija – Dio 1: Metoda membranske filtracije za vode sa malim brojem praćenih bakterija. Institut za standardizaciju Crne Gore.
- MEST EN ISO, 7899-2, 2011. Kvalitet vode – Detekcija i određivanje broja crijevnih enterokoka – Dio 2: Metoda membranske filtracije. Institut za standardizaciju Crne Gore.

- MEST EN ISO, 9308-1, 2015. Kvalitet vode – Određivanje broja *Echerichia coli* i koliformnih bakterija – Dio 1: Metoda membranske filtracije za vode sa malim brojem praćenih bakterija. Institut za standardizaciju Crne Gore.
- Miletić, M. 2016. Proizvodni pokazatelji mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819.) uzgojene u uvjetima integriranog uzgoja s ribom. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 36 pp.
- Milojević, Ž. B. 1953. Boka Kotorska. *Zbornik radova Geografskog instituta "Jovan Cvijić"*, *SANU*, **5**: 120-145.
- Mitrić, M., Castelli, A., Ramšak, A., Kljajić, Z. 2012. Biomarkeri kao indikatori zagađenja u vodama Bokokotorskog zaliva. 41 Konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda, 5-7 Jun, Divčibare, Srbija.
- Mitrić, M., Castelli, A., Jokanović, S., Martinović, R., Joksimović, D. 2016. Procena opšteg stanja jedinki *Mytilus galloprovincialis* u Bokokotorskom zalivu na osnovu enzimske aktivnosti acetilholinesteraze. 45 Konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda, 15-17 Jun, Zlatibor, Srbija.
- Mladineo, I., Peharda, M., Orhanović, S., Bolotin, J., Pavela-Vrančić, M., Treursić, B. 2007. The reproductive cycle, condition index and biochemical composition of the horsebearded mussel *Modiolus barbatus*. *Helgoland Marine Research*, **61(3)**: 183-192.
- Moschino, V., Da Ros, L. 2015. Biochemical and lysosomal biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, **23(13)**: 12770-12776.
- Motley, H. L. 1934. Physiological studies concerning the regulation of heartbeat in freshwater mussels. *Physiological Zoology*, **7**: 62-84.
- Moyen, N. E., Somero, G. N., Denny, M. W. 2019. Impact of heating rate on cardiac thermal tolerance in the California mussel, *Mytilus californianus*. *Journal of Experimental Biology*, **222**: doi.org/10.1242/jeb.203166.
- Nicolaus, E. E. M., Barry, J. 2015. Imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*): 22-year monitoring around England and Wales. *Environmental Monitoring Assessment*, **187(12)**: 736.

- Nicholson, S. 2002. Ecophysiological aspects of cardiac activity in the subtropical mussel *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **267(2)**: 207-222.
- Nicholson, S. 2003. Tachycardia in the mussel, *Perna viridis* (Mytilidae) on exposure to tributyltin antifouling paint. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, **9(2)**: 137-140.
- Nikinmaa, M. 2014. Bioindicators and Biomarkers. pp. 147-155. In: Nikinmaa, M. (Eds): *An introduction to aquatic toxicology*. Academic Press, 252 pp.
- Nikolić, M., Kuznetsova, T., Kholodkevich, S., Gvozdrenović, S., Mandić, M., Joksimović, D., Teodorović, I. 2019. Cardiac activity in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) as a biomarker for assessing sea water quality in Boka Kotorska Bay, South Adriatic Sea. *Mediterranean Marine Science*, **20(4)**: 680-687.
- Newton, T. J., Cope, W. G. 2006. Biomarker responses of Unionid mussels to environmental contaminants. pp. 257-284. In: Farris, J. L., Van Hassel, J. H. (Eds): *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. CRC Press, 401 pp.
- Noss, R. F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: A hierarchical approach. *Conservation Biology* **4(4)**: 355-264.
- Office for Official Publications of the European Communities, 2003a. Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC). Guidance document No 7, 225 pp (In Serbian language).
- Office for Official Publications of the European Communities, 2003b. Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC). Guidance document No 13, 47 pp.
- Oliveira, P., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., Freitas, R. 2017. Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. *Water Research*, **117**: 102-114.
- Oliveira, F., Diez-Quijada, L., Turkina, M. V., Morais, J., Felpeto, A. B., Azevedo, J., Jos, A., Camean, A. M., Vasconcelos, V., Martins, J. C., Campos, A. 2020. Physiological and

- metabolic responses of marine mussels exposed to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Chrysoosporum ovalisporum*. *Toxins*, **12(3)**: 196.
- Ogunola, O. S. 2017. Physiological, immunological, genotoxic and histopathological biomarker responses of Molluscs to heavy metal and water-quality parameter exposures: A critical review. *Journal of Oceanography and Marine Research*, **5(1)**: doi.org/10.4172/2572-3103.1000158.
- Ortmann, C., Grieshaber, M. K. 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Experimental Biology*, **206**: 4167-4178.
- Ozkan, D., Dagdeviren, M., Katalay, S., Guner, A., Yavaşoğlu, N. Ü. K. 2016. Multi-biomarker responses after exposure to pollution in the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) in the Aegean Coast of Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **98(1)**: 46-52.
- Park, H., Ahn, I. Y., Kim, H., Lee, J., Shin, S. C. 2009. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **150(4)**: 528-536.
- Peakall, D. W. 1994. Biomarkers: The way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News*, **1**: 55-60.
- Pearson, H. B. C., Dallas, L. J., Comber, S. D. W., Braungardt, C. B., Worsfold, P. J., Jha, A. N. 2018. Mixtures of tritiated water, zinc and dissolved organic carbon: assessing interactive bioaccumulation and genotoxic effects in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Environmental Radioactivity*, **187**: 133-143.
- Peragallo, H., Peragallo, M. 1965. Diatomees de France et des districts maritimes voisins. A. Asher et Co. (Reimpression), Amsterdam, Netherland, 539 pp.
- Perić, L., Burić, P. 2019. The effect of copper and chlorpyrifos co-exposure on biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, **225**: 126-134.
- Perošević, A., Joksimović, D., Đurović, D., Milašević, I., Radomirović, M., Stanković, S. 2018. Human exposure to trace elements via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Boka Kotorska Bay, Montenegro. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **50**: 554-559.

- Pestorić, B. 2013. Dinamika zajednica zooplanktona Bokokotorskog zaliva. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 208 pp.
- Pestorić, B., Lučić, D., Joksimović, D. 2011. Cladocerans spatial and temporal distribution in the coastal south Adriatic waters (Montenegro). *Studia Marina*, **25(1)**: 101-120.
- Pestorić, B., Miloslavić, M., Drakulović, D., Lučić, D. 2014. Chaetognaths in the Boka Kotorska Bay. *Studia Marina*, **27(1)**: 109-130.
- Pestorić, B., Drakulović, D., Gvozdrenović, S. 2019. Composition of microbiology, phytoplankton and bio-toxins in water and mussel on fish and shellfish farms in Boka Kotorska Bay (SE Adriatic Sea). *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, **2(1)**: 207-217.
- Pickens, P. E. 1965. Heart rate of mussels as a function of latitude, intertidal height, and acclimation temperature. *Physiological Zoology*. **38**: 390-405.
- Pirie, B. J. S., George, S. G. 1979. Ultrastructure of the heart and excretory system of *Mytilus edulis* (L.). *Journal of Biological Association of United Kingdom*, **59**: 819-829.
- Piscopo, M., Ricciardiello, M., Palumbo, G., Troisi, J. 2016. Selectivity of metal bioaccumulation and its relationship with glutathione S-transferase levels in gonadal and gill tissues of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Ni (II), Cu (II) and Cd (II). *Rendiconti Lincei*, **27(4)**: 737-748.
- Porter, E. T., Breitburg, D. L. 2016. Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, valve gape behaviour under diel-cycling hypoxia. *Marine Biology*, **163(10)**: 218.
- Powell, J. A., Ragg, N. L. C., Dunphy, B. J. 2017. Phenotypic biomarkers in selectively-bred families of the Greenshell mussel (*Perna canaliculus*): Anaerobic enzyme and shell gape behaviour as biomarkers of prolonged emersion tolerance. *Aquaculture*, **479**: 601-608.
- Prato, E., Danieli, A., Maffia, M., Biandolino, F. 2010. Lipid and fatty acid compositions of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the Mar Grande of Taranto (southern Italy): Feeding strategies and trophic relationships. *Zoological Studies*, **49(2)**: 211-219.
- Prinz, N., Korez, S. 2020. Understanding how microplastics affect marine biota on the cellular level is important for assessing ecosystem function: A review. pp. 101-120. In:

- Jungblut, S., Liebich, V., Bode-Dalby, M. (Eds): *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future*. Springer International Publishing, 370 pp.
- Quilliam, M. A., Xie, M., Hardstaff, W. R. 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *Journal of AOAC International*, **78(2)**: 543-554.
- Rađa, B., Šantić, M., Kuprešanin, M. 2012. Monitoring DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* from the Kaštela Bay in Croatia. *Russian Journal of Ecology*, **43(1)**: 77-81.
- Raković, M. J. 2015. Diverzitet mekušaca Dunava (1260 - 863,5 rkm) i taksonomska analiza rodova *Planorbarius*, *Radix*, *Physella* i *Ferrissia* (Pulmonata: Basommatophora). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 147 pp.
- Ravlić, S. 2014. Identifikacija i karakterizacija citokroma P450 obitelji 4 u dagnji, *Mytilus galloprovincialis*. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Geološki odsjek, 115 pp.
- Redmond, K. J., Berry, M., Pampanin, D. M., Andersen, O. K. 2017. Valve gape behaviour of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to dispersed crude oil as an environmental monitoring endpoint. *Marine Pollution Bulletin*, **117(1-2)**: 330-339.
- Redžić, A. 2016. Raspodjela i aktivnost prokariotskih mikroorganizama u crnogorskom dijelu južnog Jadrana. Doktorska disertacija. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora; Sveučilište u Dubrovniku; Institut za oceanografiju i ribarstvo, 149 pp.
- Reguera P., Couceiro L., Fernández, N. 2018. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **148**: 593-600.
- Renault, T. 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish and Shellfish Immunology*, **46(1)**: 88-93.
- Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Châtel, A., Mouneyrac, C. 2019. Tissue-specific biomarker responses in the Blue mussel *Mytilus* spp. exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations. *Frontiers in Marine Science*, **7(33)**: doi.org/10.3389/fenvs.2019.00033.

- Riisgård, H. U., Larsen, P. S. 2015. Physiologically regulated valve-closure makes mussels long-term starvation survivors: Test of hypothesis. *Journal of Molluscan Studies*, **81(2)**: 303-307.
- Riisgård, H. U., Lassen, J., Kittner, C. 2006. Valve-gape response times in mussels (*Mytilus edulis*). Effects of laboratory preceding-feeding conditions and in situ tidally induced variation in phytoplankton biomass. *Journal of Shellfish Research*, **25(3)**: 901-911.
- Robson, A. A., Wilson, R., de Leaniz, C. G., 2007. Mussels flexing their muscles: A new method for quantifying bivalve behaviour. *Marine Biology*, **151(3)**: 1195-1204.
- Robson, A. A., de Leaniz, C. G., Wilson, R. P., Halsey, L. G. 2010. Behavioural adaptations of mussels to varying levels of food availability and predation risk. *Journal of Molluscan Studies*, **76(4)**: 348-353.
- Rocha, T. L., Gomes, T., Mestra, N. C., Cardoso, C., Bebianno, M. J. 2015. Tissue specific responses to cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, **169**: 10-18.
- Rubino, F., Sracino, O. D., Moscatello, S., Belmonte, G. 2009. An integrated water/sediment approach to study plankton (a case study in the southern Adriatic Sea). *Journal of Marine Systems*, **78**: 536-546.
- Sabourin, T. D., Tullis, R. E. 1981. Effect of three aromatic hydrocarbons on respiration and heart rates of the mussel, *Mytilus californianus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**: 729-736.
- Salánki, J. 1964. Contributions to the problem of daily rhythm in the activity of the fresh water mussel *Anadonta cygnea* L. *Annales Instituti Biologici (Tihany)*, **31**: 109-116.
- Salánki, J., Balogh, K. V. 1989. Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. *Hydrobiologia*, **188/189**: 445-454.
- Santini, G., De Pirro, M., Chelazzi, G. 1999. In situ and laboratory assessment of heart rate in a Mediterranean limpet using a noninvasive technique. *Physiological and Biochemical Zoology*, **72(2)**: 198-204.
- Salazar, M. H., Salazar S. M. 1996. Mussels as bioindicators: Effects of TBT on survival, bioaccumulation and growth under natural conditions. pp. 305-330. In: Champ, M. A.,

- Seligman, P. F. (Eds): *Organotin: Environmental Fate and Effects*. Chapman & Hall, 624 pp.
- Savorelli, F., Manfra, L., Croppo, M., Tornambè, A., Palazzi, D., Canepa, S., Trentini, P. L., Cicero, A. M., Faggio, C., 2017. Fitness evaluation of *Ruditapes philippinarum* exposed to Ni. *Biological Trace Element Research*, **177(2)**: 384-393.
- Schlieper, C. 1955. Die regulation der herzsclages der miesmuschel *Mytilus edulis* L. bei geöffneten und bei geschlossenen Schalen. *Kieler Meeresforsch*, **11**: 139-148.
- Schiller, J. 1933. Dinoflagellatae. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Teil 1, 617 pp.
- Schiller, J. 1937. Dinoflagellatae. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Teil 2, 589 pp.
- Seo, E., Ohishi, K., Maruyama, T., Imaizumi-Ohashi, Y., Murakami, M., Seo, Y. 2014. Magnetic resonance imaging analysis of water flow in the mantle cavity of live *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Biology*, **217**: 2277-2287.
- Serafim, A., Lopes, B., Company, R., Cravo, A., Gomes, T., Sousa, V., Bebianno, M. J. 2011. A multi-biomarker approach in cross-transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*, **20(8)**: 1959-1974.
- Schøyen, M., Allen, I., Ruus, A., Havardstun, J., Beyer, J. 2017. Comparison of caged and native blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) in environmental monitoring of trace metal, PCB and PAH pollutants. *Marine Environmental Research*, **130**: 221-232.
- Shumway, S. E., Selvin, R., Schlck, D. F. 1987. Food resources related to habitat in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791): A qualitative study. *Journal of Shellfish Research*, **6(2)**: 89-95.
- Službeni list Crne Gore 02/07, 2007. Uredba o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda. Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore, Podgorica, Crna Gora.
- Službeni list Crne Gore 55/15, 2015. Pravilnik o dozvoljenim količinama teških metala, mikotoksina i drugih supstanci u hrani. Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore, Podgorica, Crna Gora.

- Službeni list Crne Gore 65/15, 2015. Naredba o zabrani lova i stavljanja u promet riblje mladi, nedoraslih riba i drugih morskih organizama. Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore, Podgorica, Crna Gora.
- Smolders, R., Bervoets, L., Wepener, V., Blust, R. 2003. A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, **9(3)**: 741-760.
- Solan, M., Whiteley, N. M. 2016. Stressors in the marine environment: Physiological and ecological responses, Societal implications. Oxford University Press, 356 pp.
- Sommerville, B. A. 1975. Factors affecting the heart activity and blood pressure of the swan mussel *Anodonta cygnea*. *Journal of Experimental Biology* **62**: 341-355.
- Sournia, A. 1989. Atlas du phytoplancton marine. Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées, Raphidophycées. Vol. 1. Editions du CNRS, 219 pp.
- Stabili, L., Aquaviva, I. M., Cavallo, R. A. 2005. *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (northern Ionian Sea, Italy). *Water Research*, **39(2-3)**: 469-477.
- Stanković, S., Jović, M., Milanov, R., Joksimović, D. 2011. Trace elements concentrations (Zn, Cu, Pb, Cd, As and Hg) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and evaluation of mussel quality and possible human health risk from cultivated and wild locations of the southeastern Adriatic Sea, Montenegro. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76(12)**: 1725-1737.
- Stanković, S., Jović, M., Stanković, A. R., Katsikas, L. 2012. Heavy metals in seafood mussels. Risk for human health. pp. 311-373. In: Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Didier, R. (Eds): *Environmental chemistry for a sustainable world. Volume 1: Nanotechnology and Health Risk*. Springer Netherlands, 410 pp.
- Stjepčević, J., 1974. Ekologija dagnje *Mytilus galloprovincialis* L. i kamenice *Ostrea edulis* L. u gajilištima Bokokotorskog zaliva. *Studia Marina*, **7**: 3-164.
- Stojanoski, L., Vukadin, I. 1996. Concentration of oxygen and nutrient salts. *Acta Adriatica*, **37(1/2)**: 109-113.
- Strickland, J. D. H., Parsons, T. R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd edition. Supply and Services Canada Ottawa, 310 pp.

- Strogyloudi, E., Angelidis, M. O., Christides, A., Papathanassiou, E. 2012. Metal concentrations and metallothionein levels in *Mytilus galloprovincialis* from Elefsis bay (Saronikos gulf, Greece). *Environmental Monitoring Assessment*, **184(12)**: 7189-7205.
- Sui, Y., Liu, Y., Zhao, X., Dupont, S., Hu, M., Wu, F., Huang, X., Li, J., Lu, W., Wang, Y. 2017. Defense responses to short-term hypoxia and seawater acidification in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Frontiers in Physiology*, **8(145)**: doi.org/10.3389/fphys.2017.00145.
- Sukhotin, A. A., Lajus, D. L., Lesin, P. A. 2003. Influence of age and size on pumping activity and stress resistance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **284**: 129-144.
- Šolić, M., Krstulović, N., Jozić, S., Curać, D. 1999. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environment International*, **25(8)**: 991-1000.
- Tagliarolo, M., McQuaid, C. D. 2015. Sub-lethal and sub-specific temperature effects are better predictors of mussel distribution than thermal tolerance. *Marine Ecology Progress Series*, **535**: 145-159.
- Tankersley, A., Dimock, R. V. Jr. 1993. The effect of larval brooding on the respiratory physiology of the freshwater unionid mussel *Pyganodon cataracta*. *The American Midland Naturalist*, **130(1)**: 146-163.
- Taylor, A. C., Brand, A. R. 1975. A comparative study of the bivalves *Arctica islandica* (L.) and *Mytilus edulis* L. to declining oxygen tension. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **190**: 443-456.
- Teodorović, I., Kaišarević, S. 2015. Ekotoksikologija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, 400 pp.
- Thorin, S. 2000. Seasonal variations in siphonal activity of *Mya arenaria* (Mollusca). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80(6)**: 1135-1136.
- Tomanek, L. 2014. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *Journal of Proteomics*, **105**: 92-106.
- Torre, A., Trischitta, F., Corsaro, C., Mallamace, D., Faggio, C. 2013. Digestive cells from *Mytilus galloprovincialis* show a partial regulatory volume decrease following acute

- hypotonic stress through mechanisms involving inorganic ions. *Cell Biochemistry and Function*, **31(6)**: 489-495.
- Touahri, H. G., Boutiba, Z., Benguedda, W., Shaposhnikov, S. 2016. Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. *Marine Pollution Bulletin*, **110(1)**: 52-64.
- Trisciani, A., Perra, G., Caruso, T., Focardi, S., Corsi, I. 2012. Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. *Marine Environmental Research*, **79**: 29-36.
- Trueman, E. R. 1966. The fluid dynamics of the bivalve molluscs *Mya* and *Margaritifera*. *Journal of Experimental Biology*, **45**: 369-382.
- Trueman, E. R. 1967. Activity and heart rate of bivalve Molluscs in their natural habitat. *Nature*, **214**: 832-833.
- Trueman, E. R., Lowe, G. A. 1971. The effect of temperature and littoral exposure on the heart rate of a bivalve mollusc, *Isognomum alatus*, in tropical conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **38(3)**: 555-564.
- Trueman, E. R., Blatchford, J. G., Jones, H. D., Lowe, G. A., 1973. Recordings of the heart rate and activity of molluscs in their natural habitat. *Malacologia*, **14**: 377-383.
- Turja, R., Honer, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičiene, L., Kuznetsova, T., Kholodkevich, S. V., Devier, M. H., Budzinski, H., Lehtonen, K. K. 2014. A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). *Science of the Total Environment*, **473-474**: 398-409.
- Ujević, I., Ninčević-Gladan, Ž., Roje, R., Skejić, S., Arapov, J., Marasović, I. 2010. Domoic acid - A new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile. *Molecules*, **15(10)**: 6835-6849.
- Utermöhl, H. 1958. For the supplement of quantitative phytoplankton methodology. *Limnology*, **9**: 1-38.

- Veldhoen, N., Ikonomidou, M. G., Helbing, C. C., 2012. Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **76**: 23-38.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **146(3)**: 281-300.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Soriano, J. A., Concha-Graña, E., Muniategui, S., Beiras, R. 2016. Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Environmental Pollution*, **214**: 885-891.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13(2)**: 57-149.
- WFD, 2000/60/EC. Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy.
- WHO, International Programme on Chemical Safety – IPCS, 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2010. Safe management of shellfish and harvest waters. Published on behalf of the World Health Organization by IWA Publishing, Alliance House, 12 Caxton Street, London SW1H 0QS, UK.
- Widdows, J. 1973. Effect of temperature and food on the heart beat, ventilation rate and oxygen uptake of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **20**: 269-276.
- Wilbrink, M., Groot, E. J., Jansen, R., De Vries, Y., Vermeulen, N. P. E. 1991. Occurrence of a cytochrome P-450-containing mixedfunction oxidase system in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Xenobiotica*, **21(2)**: 223-233.

- Williams, B. G., Pilditch, C. A. 1997. The entrainment of persistent tidal rhythmicity in a filter-feeding bivalve using cycles of food availability. *Journal of Biological Rhythms*, **12(2)**: 173-181.
- Wilson, R., Reuter, P., Wahl, M. 2005. Muscling in on mussels: New insights into bivalve behaviour using vertebrate remote-sensing technology. *Marine Biology*, **147(5)**: 1165-1172.
- Winkler, L. W. 1888. Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **21**: 2843-2855.
- Woodley, S. 1993. Monitoring and Measuring Ecosystem Integrity in Canadian National Parks. pp. 155-176. In: Woodley, S., Kay, J., Francis, G. (Eds): *Ecological Integrity and the Management of Ecosystems*. St-Lucie Press, 232 pp.
- UNEP/RAMOGGE 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP, Athens, 92 pp.
- Xing, Q., Zhang, L., Li, Y., Zhu, X., Li, Y., Guo, H., Bao, Z., Wang, S. 2019. Development of novel cardiac indices and assessment of factors affecting cardiac activity in a bivalve mollusc *Chlamys farreri*. *Frontiers in Physiology*, **10(293)**: doi.org/10.3389/fphys.2019.00293.
- Xu, Q., Yang, H. 2007. Food sources of three bivalves living in two habitats of Jiaozhou Bay (Qingdao, China): Indicated by lipid biomarkers and stable isotope analysis. *Journal of Shellfish Research*, **26(2)**: 561-567.
- Xu, K., Tang, Z., Liu, S., Liao, Z., Xia, H., Liu, L., Wang, Z., Qi, P. 2018. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish and Shellfish Immunology*, **82**: 77-83.
- Zelić, I. 2015. Uzgoj školjkaša. Završni rad. Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno–matematički fakultet, Odjel za biologiju, 29 pp.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, **606(2)**: 135-150.

- Zhang, S., Han, G., Dong, Y. 2014. Temporal patterns of cardiac performance and genes encoding heat shock proteins and metabolic sensors of an intertidal limpet *Cellana toreuma* during sublethal heat stress. *Journal of Thermal Biology*, **41**: 31-37.
- Zhang, J., He, Y., Yan, X., Qu, C., Li, J., Zhao, S., Wang, X., Guo, B., Liu, H., Qi, P. 2019. Two novel CYP3A isoforms in marine mussel *Mytilus coruscus*: Identification and response to cadmium and benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*, **214**: 105239.
- Župan, I., Šarić, T. 2014. Prirast i indeks kondicije – dva važna čimbenika u uzgoju dagnji. *Meso*, **16**: 275-278.
- Župan, I., Peharda, M., Dolenc, T., Dolenc, M., Rožić, P. Ž., Lojen, S., Egzeta-Balić, D., Arapov, J. 2014. Aquaculture assessment of Noah's Ark (*Arca noae* Linnaeus, 1758) in the Central Adriatic sea (Croatia). *Journal of Shellfish Research*, **33(2)**: 433-441.
- <https://www.google.com>
- <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/filibranchia/24484>
- <https://www.xlstat.com>
- <https://slideum.com/doc/1629388/classis-bivalvia>

Biografija



Marko Nikolić je rođen 14.06.1981. godine u Nikšiću. Osnovnu i srednju školu je završio u Nikšiću. Prirodno-matematički fakultet u Podgorici, studijska grupa biologija, je upisao školske 1999/2000. godine. Diplomirao je školske 2009/2010. godine. Školske 2014/2015. je upisao doktorske studije na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

U Institutu za biologiju mora, Univerziteta Crne Gore je obavio stručno osposobljavanje tokom 2013. godine. Takođe u Institutu za biologiju mora u Kotoru, u periodu od 2013 – 2015. godine je bio angažovan kao saradnik u istraživanju u oblastima ekologije morskog ekosistema i ekofiziologije morskih organizama. U periodu od 2015 – 2019. godine je radio u Institutu za biologiju mora u okviru projekta „Centar izvrsnosti u bioinformatici“ kao istraživač u oblastima ekologije morskog ekosistema i ekofiziologije morskih organizama.

Učestvovao je na nekoliko nacionalnih i internacionalnih projekata: Monitoring of sea water sanitary quality on public baths along Montenegrin coast, Impact of anthropogenic factor on the life in coastal aquatorium of the Montenegrin coast, Monitoring and biomonitoring of water quality for mariculture, MEDITS project and Survey of the Future Protected Area of Platamuni, Derelict fishing gear management system in the Adriatic Sea.

Autor je i koautor tri rada objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja, sa SCI liste, kao i 15 prezentacija na međunarodnim kongresima.

Ima položene kurseve za upotrebu biomonitoring sistema za praćenje srčanog ritma vodenih beskičmenjaka i pokreta ljuštura školjki.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Marko Nikolić
Mentor: MN	dr Ivana Teodorović, redovni profesor
Naslov rada: NR	Kontinuirani monitoring stanja životne sredine: Optimizacija sistema zasnovanog na fiziološkim odgovorima dagnje (<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819)
Jezik publikacija: JP	srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje:	Vojvodina

UGP	
Godina: GO	2020
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja (8), strana (206), broj lit. citata (370), tabela (24), slika (52), grafika (-)
Naučna oblast: NO	Ekološke nauke
Naučna disciplina: ND	Zaštita životne sredine
Predmetna oredica, ključne reči: PO	Kontinuirani monitoring, fiziološki biomarkeri, srčani ritam, pokreti ljuštura, pasivni biomonitoring
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	nema
Izvod	
<p>U okviru ove disertacije optimizovan je sistem za kontinuirano praćenje statusa voda obalnog mora zasnovan na fiziološkim biomarkerima mediteranske dagnje – srčanog ritma i pokreta ljuštura. Ispitana je pouzdanost sistema za rano upozorenje, varijabilnost</p>	

fizioloških biomarkera kod dagnje, optimalno vrijeme korišćenja odabranog bioindikatora u procesu kontinuiranog biomonitoringa, kao i nedostaci postojećeg biomonitoring sistema u cilju njegovog daljeg usavršavanja i implementacije, uključujući i unapređenja postojećeg automatizovanog sistema za praćenje srčane aktivnosti u dijelu vezanom za transfer i obradu signala. Rezultati praćenja bazalnog srčanog ritma i pokreta ljuštura dagnji u kontrolnim uslovima, bez prisustva stresora, su pokazali kako individualnu, tako i grupnu varijabilnost ovih biomarkera kod jedinki u monitoring sistemu u funkciji vremena. Međutim, bez obzira na individualne varijacije, eksponirane jedinke su pokazale isti trend ponašanja, pa se mogu posmatrati kao grupa. Nije pokazan izražen cirkadijalni ni sezonski karakter odabranih fizioloških biomarkera. Ispitana je osjetljivost odabrane vrste i automatizovanog *ex situ* sistema na prirodna variranja ekoloških faktora praćenih mjesečnom dinamikom. Pokazalo se da srčani ritam ne zavisi od variranja ekoloških faktora u rangu uobičajenih vrijednosti karakterističnih za odabrani lokalitet. Ukupna kondicija jedinki, a time i performanse monitoring sistema provjerene su periodičnim izlaganjem sistema kratkotrajnom ekstremnom stresu – naglom smanjenju saliniteta. Zbirni odgovor grupe jedinki u monitoring sistemu na stres praćen je mjesečnom dinamikom. Odabrani biomarkeri – pokreti ljuštura, varijabilnost srčanog ritma i vrijeme potrebno za oporavak srčanog ritma nakon kratkotrajnog izlaganja stresu su se pokazali kao dobri indikatori kondicionog statusa jedinki. Rezultati testova saliniteta su pokazali da su pokreti ljuštura robusniji biomarker od srčanog ritma, jer je konzistentan odgovor grupe bilježen u svim testovima saliniteta tokom jednogodišnjeg monitoringa. Konstantno produžavanje perioda potrebnog za oporavak srčanog ritma nakon prestanka dejstva stresora već od drugog mjeseca monitoringa, kao i potpuni izostanak reakcije u smislu promjena srčanog ritma usled djelovanja stresora tokom poslednja četiri mjeseca monitoringa su pokazali da jedinke u monitoring sistemu imaju ograničeni optimalni vijek. Utvrđeno je da već nakon tri do četiri mjeseca kontinuiranog monitoringa dolazi do “zamora” sistema. Optimalno vrijeme korišćenja odabranog bioindikatora iznosi tri mjeseca. Jedinke u sistemu je potrebno zamijeniti na svakih tri mjeseca, kako bi se povećala pouzdanost sistema za rano upozorenje. U cilju unapređenja postojećeg automatizovanog sistema za praćenje srčanog ritma realizovano je novo rješenje u domenu prenosa podataka sa mjerne opreme na

računar. Bežična razmjena podataka ne degradira performanse cjelokupnog sistema. Primjenjivost odabranih fizioloških biomarkera u pasivnom biomonitoringu na nativnim jedinkama mediteranske dagnje sa odabranih lokaliteta u gradijentu zagađenja ispitana je na odabranoj studiji slučaja u Bokokotorskom zalivu. Rezultati su pokazali da se metodologija zasnovana na koeficijentu varijacije i vremenu oporavka srčanog ritma nakon kratkotrajnog stresa u principu može koristiti u faznom pasivnom biomonitoringu na lokalitetima u gradijentu zagađenja. Da bi rezultati dobijeni praćenjem promjena srčanog ritma nakon izlaganja kratkotrajnom stresu jednoznačno ukazali na problem zagađenja na odabranim lokalitetima, stresor ne bi smio biti iz grupe abiotičkih faktora na koje se različite populacije odabrane vrste lako adaptiraju.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	23.01.2020.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>predsednik: dr Silvana Andrić, redovni profesor, uža naučna oblast Fiziologija životinja, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Sonja Kaišarević, vanredni profesor, uža naučna oblast Fiziologija životinja, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Aleksandar Ostojić, redovni profesor, uža naučna oblast Ekologija, biogeografija i zaštita životne sredine, Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu</p>

	<p>član/mentor: dr Ivana Teodorović, redovni profesor, uža naučna oblast Zaštita životne sredine, Departman za biologiju i ekologiju, Prorodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>
--	---

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES

WORDS DOCUMENTATIONS

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph type
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Marko Nikolić
Mentor: MN	Dr. Ivana Teodorović, Full Professor
Title: TI	Continuous monitoring of the environment: Optimization of the system based on the physiological responses of mussels (<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819)
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication:	Vojvodina

LP	
Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Autor's reprint
Publication place: PP	Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Physical description: PD	chapters (8), pages (206), references (370), tables (24), figures (52), graphs (-)
Scientific field: SF	Ecology
Scientific discipline: SD	Environmental sciences
Subject, Key words: SKW	Continuous monitoring, physiological biomarkers, heart rate, valve gape, passive biomonitoring
Holding data: HD Note	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	No
<p>Abstract</p> <p>The focus of this thesis was the optimization of <i>ex situ</i> costal waters biomonitoring system based on two physiological biomarkers of Mediterranean mussel, namely heart rate and valve gape. Experimental set-up provided not only insight into reliability of the early warning system and variability of physiological biomarkers over a year-long continuous operation, but enabled defining the optimal shelf life of bioindicator organism in the continuous biomonitoring. Some shortcomings of the existing automated system for</p>	

monitoring cardiac activity as well as steps for further improvement and implementation were identified, including improvements related to signal transfer and processing. Basal heart rate and valve gape dynamics in control conditions, with no significant stress, demonstrated considerable time – dependant individual and group variability. Still, the responses of all tested specimens, regardless of their individual variability, followed a similar behavioural trend, which implies that the test individuals can be clearly regarded as a group. The responses of selected physiological biomarkers did not follow circadian or seasonal pattern. The sensitivity of automated *ex situ* system and selected species to natural variation of a number of environmental variables has also been investigated. The results indicate that the mussels' heart rate does not depend on key environmental factors provided they remain within the usual variation range typical for the selected site. The overall physiological condition of test individuals and performances of monitoring system have been tested on monthly basis by group response to short-term exposure to extreme stress conditions (a sharp salinity decrease). Selected biomarkers, valve gape, coefficient of variation and recovery time of heart rate after the exposure to stress, proved to be good indicators of condition of individuals in monitoring system. Valve gape turned out as a more robust biomarker compared to the heart rate, as consistent group response was recorded in all salinity tests throughout the experiment. Successive increase of the heart rate recovery time was recorded since the second month of monitoring till the end of the monitoring, while the complete absence of an expected reaction to stress – change of the heart rhythm – was apparent during the last four months of monitoring. These results indicate that the individuals in the monitoring system have limited optimal shelf life and that after three to four months of continuous monitoring, the system is subject to "fatigue". It can be concluded that the optimal shelf life of the individual mussels in biomonitoring system is three months. To maintain the reliability of the early warning system it is advisable to replace individuals in the system every three months. In order to improve the existing automated system for heart rate monitoring, a new solution for data transfer from the sensor to the computer was implemented. Wireless data exchange did not degrade the performance of the entire system. A case study in Boka Kotorska Bay was used to assess the applicability of selected physiological biomarkers in passive biomonitoring using

native Mediterranean mussel specimens from selected locations in pollution gradient. The results showed that the methodology based on the coefficient of variation and heart rate recovery time after short-term exposure to extreme stress can, in general, be used in periodical passive biomonitoring of sites in the pollution gradient. However, to diminish the impact of confounding factors, to increase the credibility of the environmental assessment of selected polluted sites based on heart rate changes after exposure to short-term stress, the stressor should not be chosen from the group of abiotic factors to which different populations of the selected species easily adapt.

Accepted on Scientific Board on: AS	23.01.2020.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Dr. Silvana Andrić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Sonja Kaišarević, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Aleksandar Ostojić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac</p> <p>Member/Mentor: Dr. Ivana Teodorović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Континуирани мониторинг стања животне средине: Оптимизација система заснованог на физиолошким одговорима дагње (<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Институт за биологију мора, Универзитет Црне Горе б) Научно-истраживачки центар за еколошку безбједност, Руска академија наука, Санкт Петербург, Русија в) Електротехнички факултет, Универзитет Црне Горе
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије екологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Новом Саду. Истраживања су реализована у оквиру пројекта “Центар изврности у биоинформатици (БИО-ИСТ)“, уговор бр. 01-1001. Почетак: 01.01.2014. године; Крај: 31.12.2018. године.
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u>
1.2 Врсте података а квантитативни

ⓑ квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

ⓓ узорци ткива: узорци ткива дагњи за квантитативну и квалитативну анализу биотоксина и метала у ткиву дагњи, као и анализу кондиционог стања јединки

ⓕ снимци, фотографије: снимци срчане активности и покрета љуштура експонираних јединки и фотографије система током процеса мониторинга

ⓔ текст: преглед литературе

ж) мапа, навести врсту _____

ⓖ остало: континуирани *ex situ* мониторинг, пасивни мониторинг нативних јединки са одабраних локалитета у градијенту загађења, анализа стандардних параметара квалитета воде

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

ⓐ Excel фајл, датотека .xlsx

б) SPSS фајл, датотека _____

ⓒ PDF фајл, датотека .pdf

ⓓ Текст фајл, датотека .docx

ⓔ JPG фајл, датотека .jpg, .png, .wmf

ⓕ Остало, датотека .bin, .txt, .bmp, .exe, ini, .grd, .byt

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 20

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је 10 секунди, један и три мјесеца.

б) варијабле које се више пута мере односе се на срчану активност и покрете љуштура експонираних јединки, физичко-хемијске и биолошке параметре морске воде, присуство биотоксина и метала у ткиву дагњи, кондициони индекс дагњи.

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као и претходне верзије са додатком временске одреднице која означава када је поновљено мјерење.

Напомене: Аутоматизовани систем за праћење срчане активности и покрета љуштура шкољки снима податке сваких десет секунди. Физичко-хемијски и биолошки параметри морске воде, присуство биотоксина и кондициони индекс дагњи су мјерени мјесечном динамиком, док је акумулација 11 метала у ткиву дагњи праћена сезонски.

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити Софтверски програм VarPulse складишти податке на рачунару у формату бинарних датотека (.bin) и у формату текстуалних датотека (*.txt). Подаци везани за покрете љуштура шкољки се складиште на рачунарском диску у формату кодних бинарних датотека (*.byt) и/или у формату текстуалних датотека (*.dat/*.txt). Из тог разлога је неопходно да корисник посједује софтверске програме VarPulse и Biomonitor.*

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: континуирани мониторинг у *ex situ* систему, пасивни мониторинг нативних јединки са одабраних локалитета у градијенту загађења, мониторинг квалитета воде

б) корелационо истраживање, навести тип: мултиваријациона анализа података

ц) анализа текста, навести тип: _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Аутоматизовани систем за праћење срчане активности дагњи, аутоматизовани систем за праћење покрета љуштура шкољки, спектрофотометар, инвертни микроскоп, течна хроматографија високих перформанси (HPLC) са DAD и флуоресцентним детектором, индуковани купловани плазма-оптички емисиони спектрометар (ICP-OES), инструменти за анализу стандардних параметара квалитета воде

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

—

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Коришћени софтвери контролишу сигнале који стижу из *ex situ* система за праћење срчане активности и покрета љуштурса шкољки. Физичко-хемијски и биолошки параметри су контролисани стандардним поступком акредитоване методе.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Софтверски програм врши контролу уноса података у матрицу. Контрола уноса стандардних параметара квалитета је извршена унутарлабораторијском провјером.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

Да

Да, али после ембарга који ће трајати до _____

Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација ће бити депонована у репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду. Подаци добијени помоћу аутоматизованог система за праћење срчаног ритма и покрета љуштурса шкољки ће бити чувани на јединици спољне

меморије рачунара због правних ограничења и уговорне обавезе. Наведени подаци представљају власништво пројекта “Центар изврсноности у биоинформатици (БИО-ИСТ)“, уговор бр. 01-1001, а такође је за обраду и коришћење добијених података потребно посједовати софтверске програме VarPulse и Biomonitor.

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

—

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

—

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

—

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

–

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-

–

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Уз претходну комуникацију и писмено одобрење власника података.

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

По захтјеву ће заинтересованим истраживачима материјал бити послат електронским путем.

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Марко Николић, е-mail: markornikolic@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Марко Николић, е-mail: markornikolic@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Марко Николић, е-mail: markornikolic@gmail.com