

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE KOPER
ŠTUDIJSKI PROGRAM BIODIVERZITETA

DANIJELA DOMAZET

Odziv biomarkerjev splošnega stresa v klapavicah (*Mytilus galloprovincialis*)

ZAKLJUČNA NALOGA

Mentor: doc.dr. Andreja Ramšak

September 2012, Koper

I. POVZETEK

Onesnaženost morskih ekosistemov je zaradi prometa, ribolova, turizma, odpadkov itd. v zadnjih desetletjih velik problem. S preučevanjem odziva biomarkerjev na stres zaradi kemikalij v okolju ugotavljamo raven onesnaženosti v morskem ekosistemu. Cilj zaključne naloge je bil ovrednotiti obseg splošnega stresa v klapavicah na različno obremenjenih lokacijah zaradi kemikalij (v Koprskem in Strunjanskem zalivu, v Marini Izola in Marini Portorož). Osredotočila sem se na stabilnost lizosomskih membran, ki sem jo preučevala s testom, ki temelji na barvanju hemocit iz hemolimfe z barvilom nevtralnno rdeče. Merila sem čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v lizosomih hemocit. Prelomni čas je dosežen, ko vsaj 50% lizosomov izpusti barvilo v citosol. Daljši kot je čas zadrževanja barvila, manj je prizadeto delovanje lizosomov v klapavicah. Najdaljši čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče je bil 30 minut (Marina Izola vzorčenje marec 2012), nekoliko krajši čas zadrževanja barvila od 25 do 30 minut je bil izmerjen v osebkih iz marine v Kopru (vzorčenje marca 2012). Najkrajši čas zadrževanja barvila med 10 in 20 minutami sem izmerila v osebkih iz Strunjanskega zaliva (vzorčenih maja 2012). Vzorce iz Strunjanskega zaliva sem testirala dva meseca kasneje, kot tiste iz marin, kar pomeni, da se je med tem časom v okolju zgodilo nekaj obremenjujočega, saj se je čas zadrževanja na referenčni točki skrajšal. Klapavice iz Marine Portorož so bile v največjem stresu, saj se na test niso odzivale. V izpostavljenih klapavicah sem ugotavljala tudi smrtnost; najvišjo smrtnost (50,5% oziroma 68,3%) ter najnižji kondicijski indeks ($0,016 \text{ mg/cm}^3$ in $0,0044 \text{ mg/cm}^3$) sem ugotovila v klapavicah iz Marine Porotrož, kar velja za obe vzorčenji (novembra 2011 in marca 2012). Osebki iz Marine Izola so imeli nižjo smrtnost (25 % in 42,3%) in nekoliko višji kondicijski indeks ($0,01 \text{ mg/cm}^3$ in $0,0061 \text{ mg/cm}^3$) v obeh vzorčenjih (novembra 2011 in marca 2012). Povprečne vrednosti gonadosomatskega indeksa so bile v Marini Portorož od 9,5 do 18,7 in v Marini Izola od 13,6 do 17,6. Najvišje koncentracije metalotioneinov (MT) so bile izmerjene v osebkih iz Koprskega zaliva ($281 \text{ } \mu\text{g/g}$ mokre teže tkiva), izmerjene marca 2012. Na vzorcih iz Marine Izola sem po dveh vzorčenjih (novembra 2011 in marca 2012) izmerila $49 \text{ } \mu\text{g MT/g}$ mokre teže tkiva in $88 \text{ } \mu\text{g MT/g}$ mokre teže tkiva. Na referenčni točki iz Piranskega zaliva je bila koncentracija metalotioneinov $75 \text{ } \mu\text{g MT/g}$ mokre teže tkiva v vzorcih, ki so bili vzorčeni konec oktobra 2011.

II. ABSTRACT

Pollution of marine ecosystems has become a major problem in the last decades due to traffic, fishing, tourism and waste. The level of pollution in the marine ecosystem can be determined by studying the response to stress biomarkers of chemicals in the environment. The aim of the final study was to evaluate the extent of general stress in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) due to chemicals at differently polluted sites (in the Koper and Strunjan Bay, at Marina Izola and Marina Portorož). I had focused on the stability of the lysosomal membrane, which I examined with a test based on the staining of hemocytes from hemolymph with neutral red dye. I have measured the retention time of the neutral red dye in the lysosomes of hemocytes. Breaking time was reached when at least 50% of the lysosomes released dye into the cytosol. The longer is the retention time of the dye, the less affected is the functioning of lysosomes in mussels. The longest retention time of the dye neutral red was 30 minutes (sampled at Marina Izola, March 2012), a slightly shorter retention time -from 25 to 30 minutes- was measured in specimens from the marina in Koper (sampled March 2012). The shortest retention time, measured in specimens from Strunjan Bay (sampled May 2012), was between 10 and 20 minutes. I had tested samples from the Strunjan Bay two months later than those from the marinas, which points that during this period of time something happened in the environment indicated by the shortened retention time at the reference point. Mussels from Marina Portorož proved to be under greatest stress as they did not respond to the test at all. I was also determining highest mortality in these samples under greatest stress. The highest mortality (50.5% and 68.3%) and the lowest condition index (0.016 mg/cm³ and 0.0044 mg/cm³) were found in mussels from Marina Portorož at both samplings (November 2011 and March 2012). Specimens from Marina Izola had lower mortality (25% and 42.3%) and slightly higher condition index (0.01 mg/cm³ and 0.0061 mg/cm³) in both samplings (November 2011 and March 2012). Average gonadosomatic index values in Marina Portorož ranged from 9.5 to 18.7 and in Marina Izola from 13.6 to 17.6. The highest concentrations of metallothioneins (MT) were measured in specimens from the Koper Bay (281 mg / g wet weight tissue) taken in March 2012. After two samplings (November 2011 and March 2012) of the samples from Marina Izola I have measured 49 mg MT /g wet weight of tissue and 88 mg MT / g wet weight tissue. At the reference point of the Piran bay, the concentration of

metallothioneins were 75 mg MT / g wet weight of tissue samples and were sampled at the end of October 2011.

III. ZAHVALE

Mentorici, doc. dr. Andreji Ramšak, se iskreno zahvaljujem, ker me je sprejela pod svoje mentorstvo. Hvala za strokovno pomoč in potrpežljivost.

Zahvaljujem se tudi Morski biološki postaji Piran, kjer mi je bilo omogočeno vse, kar je bilo potrebno za izvedbo raziskovalnega dela za zaključno nalogo.

Zahvala gre staršem in stari mami, ki so me podpirali pri študiju.

Prijatelju in sošolcu Aljažu se zahvaljujem za pomoč pri pripravi strukture zaključne naloge.

KAZALO

I. POVZETEK	2
II. ABSTRACT	3
III. ZAHVALE	5
1. UVOD.....	11
1.1. Obremenjenost Tržaškega zaliva z onesnažili.....	11
1.2. Biomonitoring in biomarkerji.....	12
1.3. Klapavice - tarčni organizem za biomonitoring	13
1.3.1 Anatomija, morfologija in fiziologija klapavic	13
1.3.1. Mehanizem razstrupljanja onesnažil v lizosomih.....	15
1.4. Ugotavljanje stabilnosti lizosomskih membran s testom zadrževanje barvila nevtralnno rdeče v lizosomih.....	17
1.5. Kondicijski indeks in gonadosomatski indeks.....	18
1.6. Metalotioneini.....	20
1.7. Namen dela in hipoteze	21
2.2. Delež smrtnosti.....	23
2.3. Biometrične meritve in izračun kondicijskega in gonadosomatskega indeksa	23
2.4. Test stabilnosti lizosomskih membran	24
2.5. Merjenje koncentracije metalotioneinov	26
3. REZULTATI	32

3.1. Smrtnost in primerjava tkiv iz različnih vzorčnih mest po izpostavitvi	32
3.2. Izračun kondicijskega in gonadosomatskega indeksa po vzorčnih mestih.....	34
3.3 Stabilnost lizosomskih membran.....	37
3.3.1 MARINA IZOLA	38
3.3.2 MARINA V KOPRU:	40
3.3.3 STRUNJANSKI ZALIV:	43
4. DISKUSIJA	47
5. ZAKLJUČEK	50
6. LITERATURA IN VIRI.....	51

KAZALO SLIK

Slika 1. Zunanji izgled klapavice (<i>Mytilus galloprovincialis</i>).	13
Slika 2. Notranji organi klapavice.	14
Slika 3. Odvzem hemolimfe iz mišice pritegovalke.....	18
Slika 4. Slovenska obala z označenimi vzorčnimi mesti.....	22
Slika 5. Klapavice izpostavljene v Marini Portorož.	33
Slika 6. Atrofirani organi v klapavici, ki je bila izpostavljena 134 dni v Marini Portorož.	33
Slika 7. Klapavica izpostavljena v Marini Izola 142 dni.....	33
Slika 8. Primer klapavic iz Marine Izola.	33
Slika 9. Klapavica iz marine v Kopru nabrane dne 29.3.2012.....	34
Slika 10. Klapavice iz marine v Kopru.....	34
Slika 11. Povprečne vrednosti kondicijskih indeksov na različnih vzorčnih mestih in časovnih obdobjih ob slovenski obali.	36
Slika 12. Gonadosomatski indeksi na različnih vzorčnih mestih v različnih časovnih obdobjih ob slovenski obali.	37
Slika 13. Celica, iz katerih še ne uhaja barvilo (nevtralno rdeče).	38
Slika 14. Celica, kjer iz lizosomov uhaja barvilo (nevtralno rdeče).....	38
Slika 15. Hemocita z nerazlitimi lizosomi takoj ob pričetku testa (vzorčno mesto: Marina Izola).....	38
Slika 16. Hemocita po 15-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).....	39
Slika 17. Hemocita po 30-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).....	39

Slika 18. Hemocita po 45-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).....	39
Slika 19. Hemocita po 60-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).....	40
Slika 20. Hemocita po 75-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).....	40
Slika 21. Hemocita po 5-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv).....	41
Slika 22. Hemocita po 20-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv).....	41
Slika 23. Hemocita po 35-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv).....	42
Slika 24. Hemocita po 50-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv).....	42
Slika 25. e) Hemocita po 65-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv).....	42
Slika 26. Hemocita po 0-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv).....	43
Slika 27. Hemocita po 10-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv).....	43
Slika 28. Hemocita po 20-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv).....	44
Slika 29. Hemocita po 30-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv).....	44
Slika 30. Hemocita po 40-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv).....	44
Slika 31. Hemocita po 50-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv).....	45
Slika 32. Izmerjene povprečne koncentracije metaloteinoinov na različnih vzorčnih mestih ob slovenski obali.....	46

KAZALO TABEL

Tabela 1. Kopičenje kemikalij v organih klapavice.	15
Tabela 2. Vzorčna mesta in čas izpostavljanja klapavic.	23
Tabela 3. Vzorčenje klapavic v različnih časovnih obdobjih, za ugotavljanje koncentracij metalotioneinov.	26
Tabela 4. Shema priprave vzorcev in standardov	28
Tabela 5. Izračunana smrtnost v izpostavljenih klapavicah.	32
Tabela 6. Vrednosti kondicijskega in gonadosomatskega indeksa za klapavice iz različnih vzorčnih mest.....	34
Tabela 7. Čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v osebkih iz Marine Izola.	38
Tabela 8. Čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v osebkih iz Koprškega zaliva	40
Tabela 9. Čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v osebkih iz Strunjanskega zaliva	43
Tabela 10. Izmerjene koncentracije metalotioneinov na različnih vzorčnih mestih.	45

1. UVOD

1.1. Obremenjenost Tržaškega zaliva z onesnažili

Tržaški zaliv je plitev zaliv na skrajnem severnem delu Jadranskega morja, ki je s treh strani omejen s kopnim in je zaradi majhnega volumna (Adamič, 2002) izjemno občutljiv za vsakršno onesnaženje, še posebej, ker je gosto poseljen in industrializiran. Vhod v Tržaški zaliv določa z morske strani črta Savudrija-Gradež in je širok le približno 21 km. V obalnem pasu Tržaškega zaliva živi preko 400 000 prebivalcev (Plut, 2000). Prebivalstvo Koprškega primorja predstavlja 4% vsega slovenskega prebivalstva ter s gostoto poselitve 232 prebivalcev/km², več kot dvakrat presega državno povprečje (povzeto po Turk in Potočnik, 2001). Za Tržaški zaliv so značilna tudi razmeroma hitra nihanja temperature morja ter občasne, hitre, celo velikokrat dramatične spremembe lokalnih ekoloških razmer in tudi razmeroma velika ekološka občutljivost (Štirn 1970). Tržaški zaliv je na slovenski strani razdeljen na več manjših odprtih zalivov (Koprski, Strunjanski in Piranski zaliv). Onesnaženje morja je posledica človekovih dejavnosti (promet, ribolov, turizem, odlaganje odpadkov itd.) in v zadnjih desetletjih celo narašča, lahko pa je tudi posledica naravnih procesov (npr. spiranje težkih kovin, ki so na površju). V devetdesetih letih so bili ocenjeni glavni viri onesnaženja slovenskega morja in vnosi onesnažil s kopnega v morje. Izvori onesnaženja so predvsem komunalne odplake, industrija, kmetijstvo in odpadne vode iz komunalnih čistilnih naprav (Turk in Potočnik, 2001). Različne študije so bile posvečene raziskovanju in razširjanju težkih kovin in organskih onesnažil v Tržaškem zalivu. V notranjem delu Koprškega zaliva so našli razne anionske detergente, PCBje ter organoklorove pesticide (Planinc in sod., 1993). Precej pozornosti je bilo posvečene izvoru in porazdelitvi policikličnih aromatskih ogljivodikov (PAHi). Višje koncentracije PAHov so v sedimentu v okolici Luke Koper (496 ng/g suhega sedimenta) in marine Portorož (1173 ng/g suhega sedimenta). Nekoliko povišane koncentracije so tudi v sedimentu iz Koprškega zaliva (523 ng/g suhega sedimenta) in Piranskega zaliva (414 ng/g suhega sedimenta) (Bajt, 2012). Izmerjene koncentracije so opredelili kot nizke do zmerne (Bajt, 2012, Notar in sod., 2001). Največ podatkov se nanaša na onesnaženost vode, organizmov in sedimenta s težkimi kovinami. Med težkimi kovinami so izmerili najvišje koncentracije živega srebra (0,70 do 0,237 mg/kg tkiva) in svinca, ostale kovine so izmerili v nizkih koncentracijah (Ščančar in sod., 2007). Največ elementarnega živega srebra v Tržaški zaliv prinese reka Soča. Glavni vir

živega srebra je bil rudnik v Idriji, ki je prenehal obratovati leta 1977 (Rajar in sod., 2000). Raziskave so pokazale, da je koncentracija celotnega živega srebra v morski vodi ob dnu v severnem Jadranu desetkrat višja od tiste iz srednjega ali južnega Jadrana (Horvat in sod., 2001). Koprski zaliv je bolj obremenjen s težkimi kovinami kot so nikelj, cink, baker, svinec in živo srebro, kot ostali zalivi (Turk in Potočnik, 2001; Gosar in Muri, 2005).

Glavni vir organskega onesnaževanja v Tržaškem zalivu predstavlja vnos hranil z rekami, iz komunalnih odplak, posledica prevelikega vnosa hranil pa je eutrofikacija (Turk in sod., 2007).

1.2. Biomonitoring in biomarkerji

Zaradi vse večje količine odpadkov in izpustov kemikalij v morsko okolje, so morski organizmi vedno bolj ogroženi. Kemikalije vplivajo na različne organizacijske ravni delovanja organizma in pogosto porušijo ravnovesje v organizmu. S časom se je nakopičilo vedno več spoznanj, kako kemikalije vplivajo na procese v organizmih in o njihovih škodljivih učinkih. Zaradi te problematike, so različne organizacije in institucije začele uvajati uporabo različnih biomarkerjev in se usmerjati v razvoj le-teh. Pomembno orodje, za ugotavljanje učinkov onesnaževanja so tudi kemijske in biokemijske analize (Moore, 1990, Moore, 2002).

Biomarkerji so lahko biokemična, celična, fiziološka ali vedenjska sprememba v tkivih, telesnih tekočinah ali v celotnem organizmu, ki priča o izpostavljenosti kemičnim snovem, ki imajo lahko strupene učinke na organizem (Langston in sod., 2007). Pri tem moramo upoštevati, da je takšen odziv možno izmeriti v organizmih tistih vrst, ki so dovolj občutljivi. Takšnim vrstam pravimo tarčni organizmi.

Pogosto se za take analize uporablja školjke, ribe, alge,... Tarčni organizmi morajo izpolnjevati določene zahteve: biokemična odzivnost, velika številčnost, izpostavljenost kemikalijam, da so primerni organizmi za take raziskave. Školjke so filtratorski organizmi, ki se hranijo s precejanjem vode in kopičijo v tkivih kemikalije, ki so prisotne v okolju (Lowe and Fossato, 2000). Školjke so razmeroma tolerantne do težkih kovin in organskih kemikalij (Livingstone, 1988).

Zaradi vse večjega števila ugotovljenih škodljivih posledic kemikalij na morske organizme so različne države uvedle v 70-ih letih biomonitoring (npr. Mussel Watch). Namen biomonitoringa je raziskati biološke odzive zaradi delovanja kemikalij v vodi (akutne in kronične učinke delovanja) na različnih geografskih območjih in v različnih obdobjih. Na tak način lahko dobimo vpogled v »zdravstveno stanje« organizmov.

1.3. Klapavice - tarčni organizem za biomonitoring

1.3.1 Anatomija, morfologija in fiziologija klapavic

Telo klapavice je sestavljeno iz lupine, ki je zunanje ogrodje in ščiti notranje organe pred plenilci in zunanjimi dejavniki ter daje oporo za pritrnitev organov. Sestavljena je iz kalcijevega karbonata, ki se nalaga na organsko matično podlago, prav tako se v tem delu lahko kopičijo onesnažila. Telo klapavice razdelimo na anteriorno in posteriorno stran, ter ventralno in dorzalno stran. Pretok vode v telo in iz telesa poteka nadzorovano skozi dva sifona: dotekalko in odtekalko. Klapavice so filtratorji in se hranijo z organskimi delci in algami, ki so v okolišni vodi. Koščki hrane (organski delci, mikroorganizmi) se prilepijo na sluz, ki jo izločajo škrge, ki jih nato migetalke usmerjajo do prebavne žleze (hepatopankreas). Klapavice živijo pritrjene na podlago z bisusnimi nitkami in imajo majhno mišičasto nogo (Gosling, 2004).



Slika 1. Zunanji izgled klapavice (*Mytilus galloprovincialis*) (Vir: <http://www.elrincondelmalacologo.com/>)



Slika 2. Notranji organi klapavice. Gonade ležijo pod lističastimi škrkami, dobro so vidne le zrele gonade.

Plašč je pritrjen na lupino in obdaja organe. Sestavljen je iz vezivnega tkiva, in se v njem kopiči veliko založnega glikogena. V plašču se kopičijo težke kovine in organska onesnažila. Škrge so v paru, dolge zavesaste strukture, ki sledijo obliki lupine in predstavljajo površino po kateri prehaja voda s hrano. Trdnost jim daje veliko število ukrivljenih kolagenskih filamentov. Škrge imajo dihalno in prehranjevalno funkcijo. Velika površina omogoča velik dotok hemolimfe in je tako primerna za izmenjavo plinov. Tudi škrge so vključene v bioakumulacijo pesticidov, težkih kovin, ipd. Prebavna žleza je rjave barve in je sestavljena iz slepih cevok, ki so povezane z želodcem in predstavlja glavno mesto znotrajcelične prebave. V kanalih poteka stalna dvosmerna pot: hranila vstopijo v žlezo in v žlezi nato poteka znotrajcelična prebava in absorpcija. Na drugi strani odpadni material zapusti telo skozi črevesje kot feces. Zaradi filtratorskega načina prehranjevanja organizem sprejme velike količine organskih onesnažil in težkih kovin. Prebavna žleza je glavno mesto prebave, zato v njej poteka razgradnja organskih onesnažil (Gosling, 2004).

Reprodukcijski sistem v vseh školjkah je zelo preprost. Pri samicah opazimo jajčeca, ki so obarvana z oranžno barvo, pri samcih pa so spolne celice svetlejšje rumene barve. Spolne celice dajejo tipično barvo gonadam (Gosling, 2004).

Školjke imajo odprt krvožilni sistem po katerem se pretaka hemolimfa. Hemolimfa je pomembna pri izmenjavi plinov, osmoregulaciji, razširjanju hranil, izločanju odpadnih snovi, v njej so celice imunskega sistema. Hemolimfa vsebuje krvne celice imenovane hemocite, ki se pretakajo po brezbarvni plazmi. V hemolimfi so prisotne različne vrste hemocit: granulocite so v premeru velike 10-20 μm , agranulocite pa 4-6 μm . Granulocite fagocitirajo razne parazite, bakterije, alge,.. Agranulocite imajo bistveno manjšo zrnatost in manjšo sposobnost fagocitoze. Hemocit ne najdemo samo v hemolimfi, ampak tudi v drugih delih telesa kot npr. plašču, vezivnem tkivu, mišici (Gosling, 2004).

Tabela 1. Kopičenje kemikalij v organih klapavice.

Organ	Kemikalije
lupina	Težke kovine
plašč	Težke kovine, organska onesnažila
prebavna žleza	PAH, težke kovine
izločala	Težke kovine, PAHi
hemocite	Težke kovine, organska onesnažila

1.3.1. Mehanizem razstrupljanja onesnažil v lizosomih

Raziskovalci so ugotovili, da onesnaževanje najprej poškoduje lizosomalni sistem, ker je to eno glavnih mest razgradnje kemikalij v celici. Poškodbe lizosomov delimo na tri glavne skupine: spremembe v vsebini lizosomov, spremembe v pretoku in spremembe v prepustnosti membran lizosomov (Hawkins, 1980; Moore, 1988, 1990). Dokazano je, da so spremembe v lizosomih evolucijsko ohranjen odziv na okoljski stres (Bursch, 2001).

Lizosomi so celični organeli, ki omogočajo celici odstranjevanje odpadnih snovi in njihovo reciklažo s fagocitozo. Opravljajo tudi pomembno vlogo pri znotrajcelični presnovi. Lizosomi vsebujejo topne hidrolitične encime, ki kontrolirajo prebavo makromolekul. Ti encimi so proteaze, nukleaze, lipaze, fosfolipaze, sulfataze, fosfataze in glikozidaze. Njihovo optimalno okolje znotraj lizosomov za opravljanje funkcij je kislo (pH= 4,5 do 5). Lizosome obdaja membrana, ki ohranja kisel pH, saj je v citosolu pH višji. Membrana lizosomov vsebuje proteine, ki so glikolizirani in tako zaščiteni pred razgradnjo zaradi prisotnosti proteaz v

lizosomih. Transportni proteini v lizosomskih membranah prenašajo končne produkte prebave makromolekul v citosol, kjer jih celica lahko uporabi ali izloči. Protonska črpalka (H^+ ATPaza) v membrani lizosomov porabi ATP za črpanje protonov (H^+) v lizosom in s tem ohranja kisel pH v notrajnosti lizosoma (Alberts in sod., 2008).

V lizosomih se kopičijo težke kovine in organska onesnažila. Poleg tega imajo visoko sposobnost razstrupljanja, vendar če pride do prevelike obremenitve z onesnažili, se le-ta izrazi s celičnimi poškodbami, okvarami tkiv in na koncu poslabšanjem zdravstvenem stanju organizma. Obstaja več različnih testov, za ugotavljanje stabilnosti lizosomskih membran (More in Lowe, 2004). Lizosomi so posredno ali neposredno vključeni v številne normalne in patološke procese (Holtzman, 1989). Lizosomalni sistem školjk je vključen v vnos in shranjevanje različnih kemikalij, kot so težke kovine, naftni ogljikovodiki, radionuklidi (Moore, 1980; Nott in Moore, 1987; Mariógomez in sod., 1990; Chassard-Bouchaud in sod., 1992). Osnovna funkcija lizosomov je razgradnja s hidrolitičnimi encimi, ki se nahajajo v lizosomih. Zaradi delovanja kemikalij je njihova funkcija spremenjena, kar vodi v zavrtlo delovanje celic in tkiv. Spremembe v zgradbi lizosomov so naslednje: predvsem spremembe v velikosti lizosomov, ki se povečajo in sočasno se zmanjša njihovo število (Lowe in sod., 1981; Cajaraville in sod., 1989; Mariogómez in sod., 1989; Etxeberria in sod., 1994), zmanjšana stabilnost lizosomskih membran in pojavljanje nenormalno povečanih lizosomov (Lowe in sod., 1981; Moore in Clarke, 1982; Lowe in Clarke, 1989), vse to so spremembe splošnega stresa v školjkah. Moore (1988) je ugotovil, da se stabilnost lizosomskih membran poveča pri izpostavljenosti organizmov v zmesi z nizko koncentracijo bakra in aromatskih ogljikovodikov.

Spremembe na lizosomih lahko povzročijo tudi nekemični stres kot npr. hipoksija, hipertermija, osmotski šok (Moore, 1985).

Spremembe v lizosomih nam lahko dajo smer, za iskanje povzročitelja poškodbe v organizmu. Vzorci lizosomskih sprememb so pomembni za ugotavljanje in razlikovanje učinkov, ki jih lahko povzročijo kemikalije, težke kovine ali nekemijski stresni dejavniki. Največji odziv na stres v mehkužcih je povečana avtofagija lizosomov, to je skrajni učinek. Spremembe v avtofagiji se izražajo kot povečanje lizosomskega prostora oz. otekanje lizosomov in povečane količine hidrolaz (Köhler in sod., 1992; Lowe, 1988; Lowe and

Fossato, 2000). To se najbolj izrazi v epitelijskih celicah prebavne žleze (More in sod., 1987). Epitel je glavni vmesnik med organizmom in zunanjim okoljem in v njem poteka poglobitni del znotrajcelične prebave (More, 1990). Ob prisotnosti kemijskih onesnažil začnejo lizosomi otekati, lizosomska membrana postane manj stabilna, v lizosomu se začne kopičiti prekomerna količina nenasičenih maščob in lipofuscin ter atrofija prebavnega epitela. Obstajajo tudi dokazi o izbrisu celic (podobno kot apoptoza pri sesalcih) (Lowe, 1988; Pipe and Moore, 1988). Študije so pokazale, da lahko navedene spremembe povzročajo tudi baker in policiklični aromatski ogljikovodiki (Nott in sod., 1985; Viarengo in sod., 1985).

1.4. Ugotavljanje stabilnosti lizosomskih membran s testom zadrževanje barvila nevtralnno rdeče v lizosomih

Za izvedbo testa potrebujemo sveže, žive klapavice. Klapavice morajo biti previdno odrezane od podlage (bisusne niti previdno odrežemo), saj bi jim puljenje iz podlage lahko povzročilo poškodbe notranjih organov. Za test uporabimo hemolimfo, ki jo odvezamo iz sinusa v mišici zapiralke. Odvzem hemolimfe klapavicam ne škodi in jih nato lahko vrnemo nazaj v morje. Klapavice moramo z mesta odvzema transportirati pri enaki temperaturi, kot je temperatura morske vode na mestu odvzema (More in Lowe, 2004).

Test temelji na treh poglobitnih korakih. Prvi je odvzem hemolimfe iz mišice zapiralke. Pomembno je, da klapavico previdno razpremo in počasi z iglo in brizgo odvezamo hemolimfo. Pri odvzemu moramo v brizgo dodati še primerno količino fiziološke raztopine za klapavice, da odvzetim celicam zagotovimo izotonično okolje (More in Lowe, 2004).



Slika 3. Odvzem hemolimfe iz mišice pritegovalke (vir:www.nature.com).

Nato resuspendirane celice nanesimo na objektno stekelce in po približno desetih minutah, ko se celice pritrdijo na objektno stekelce, celice obarvamo z raztopino barvila nevtralnno rdeče. Počakamo deset minut, da celice sprejmejo barvilo v lizosome in po desetih minutah začnemo spremljati spremembe v celicah. Pomembno je, da delamo v čim bolj temnem prostoru. Celice opazujemo pod svetlobnim mikroskopom. Število celic pri vsakem preparatu nekoliko varira. Pri zdravih celicah se na začetku zelo lepo vidi zrnatost. To so lizosomi, ki so sprejeli barvilo. S časom začnejo lizosomi spuščati barvilo v citosol in zrnatost ni več tako izrazita. Vsakih deset minut beležimo spremembe. Kritična točka je dosežena, ko 50% ali več opazovanih celic kažejo spuščanje barvila iz lizosomov ali pa postanejo vidne druge nepravilnosti celic kot npr. nabrekanje/povečanje celic. Času, v katerem pride do prelomne točke pravimo čas zadrževanja (ang. retention time). Rezultate lahko spremljamo sproti in si zapisujemo, kakšne so spremembe vsakih deset minut. Drugi način za spremljanje sprememb je fotografiranje celic. Vsakih deset minut fotografiramo preparat in nato opazujemo spremembe na mikroskopskih fotografijah in določimo kritično točko (More in Lowe, 2004).

Dlje časa kot lizosomi zadržujejo barvilo, manjši je stres zaradi kemikalij. Test prekinemo najkasneje po 180 minutah, saj postane barvilo strupeno za celice (More in Lowe, 2004). Test opravimo na desetih osebkih (More in Lowe, 2004).

1.5. Kondicijski indeks in gonadosomatski indeks

Kondicijski indeks (CI) in gonadosomatski indeks (GSI) sta spremljajoča parametra, ki ju opravimo v biomonitoringu (ICES SGIMC REPORT, 2011). Kondicijski indeks odraža

splošno kondicijo organizma, medtem ko je gonadosomatski indeks zelo povezan s ciklom razmnoževanja. Ko so gonade zrele, bo to razmerje med gonadami in telesom veliko, medtem ko je po drsti to razmerje nizko. Kondicijski indeks je pomemben parameter pri kemijskih meritvah onesnažil v klapavicah in ga je potrebno upoštevati pri izračunu koncentracij težkih kovin. Model za izračun vsebuje namreč tudi podatek o kondicijskem indeksu (Morgaud in sod., 2002).

Pri poskusu iz leta 1988 so skušali raziskati kako spol, starost, kondicijski indeks, suha teža tkiva in razmerje med višino in širino lupine vplivajo na koncentracijo in kopičenje 24-ih kemijskih elementov v školjki *Mytilus edulis*. Spremembe v masi tkiva zelo vplivajo na kopičenje kemikalij v telesu klapavic. Zaradi povečane mase tkiva (npr. hitra rast, dozorevanje gonad) pride do učinka razredčenja, zato je za natančno in pravilno izračunavanje koncentracij kemikalij potrebno upoštevati tudi kondicijski indeks. Poleg tega ima pomemben vpliv na kopičenje nekaterih kovin še spol (Lobel in sod., 1991).

Ne glede na vrsto elementa, ki so ga merili, je imel kondicijski indeks vedno najpomembnejšo vlogo. Naknadno so lahko izračunali kondicijski indeks po naslednji formuli, ki je tudi najbolj natančna:

CI= suha teža tkiva (g) / notranji volumen lupine (produkt višine, širine in dolžine) (Formula 1) (Lobel in sod., 1991).

Pri izračunu kondicijskega indeksa je pomembno upoštevati tudi obdobje, v katerem so bile opravljene meritve. V obdobju pred drstitvijo je CI velik, medtem ko je po drstitvi vrednost CI nižja. Po priporočilih za biomonitoring je potrebno podati tudi vrednosti CI za tarčne organizme (ICES SGIMC REPORT, 2011).

Kondicijski indeks varira tudi glede na velikost organizma (Lutz *in sod.*, 1980), saj večji kot je organizem, večji je volumen znotraj lupine in posledično tudi razmerje med suho maso tkiva in volumnom. Velik vpliv imajo tudi različne parazitske okužbe (Kent, 1979, Thiessen, 1987).

Zmožnost razmnoževanja je v organizmih lahko zmanjšana zaradi škodljivih učinkov kemikalij. Poleg CI je pomemben spremljevalni parameter tudi gonadosomatski indeks, ki je razmerje med težo gonad in težo telesa. Gonadosomatski indeks je izmerjen kot odstotek teže gonad na celotno težo tkiva (ICES SGIMC REPORT, 2011)

$GSI = \text{teža gonade (g)} / (\text{teža celotnega tkiva} - \text{teža gonade (g)}) * 100$ (Formula 2)

1.6. Metalotioneini

Klapavice in drugi mehkužci lahko kopičijo velike količine težkih kovin v različnih tkivih. Prav tako lahko sintetizirajo velike količine metalotioneinov (MT), na katere se vežejo težke kovine in tako ostajajo neaktivne, ali pa služijo kot rezervoar za esencialne kovine. Nekatere kovine so močni indikatorji sinteze metalotioneinov (kadmij, nikelj, baker), medtem ko so druge slabši indikatorji in se vežejo na že obstoječe metalotioneine tako, da izrinejo druge ione kovin (Kägi, 1991). Metalotioneini so proteini z majhno molekulsko maso z zelo velikim deležem cisteinov. Poleg kovin njihovo sintezo sprožijo tudi drugi metaboliti (npr.: glukokortikoidi, progesteron, estrogen). Povečana vsebnost metalotioneinov v klapavicah je indikator izpostavljenosti organizmov na onesnaženje s težkimi kovinami, predvsem kadmiju, živemu srebru, srebru, kobaltu, niklju, bizmutu, bakru in različnim kovinskim zmesem (Kägi, 1991, Bebianno in Serafim, 1998; Mourgaud in sod., 2002). Zaradi povišane količine živega srebra v Tržaškem zalivu, so koncentracije metalotioneinov kot biomarker uvedli v biomonitoring že pred 10 leti (Ramšak in sod., 2012). Živo srebro se veže na že obstoječe metalotioneine, ker je slab induktor sinteze metalotioneinov (Mourgaud in sod., 2002).

Poleg kovin lahko tudi okoljski dejavniki kot npr. temperatura, slanost in količina kisika vplivajo na povečano koncentracijo metalotioneinov v celicah in ne le izpostavljenost težkim kovinam. Vendar okoljski dejavniki ne preglasijo indukcije MT, ki se zgodi ob akutnem onesnaženju. Določevanje metalotioneinov s spektrofotometrično metodo je enostavno, natančno, poceni in omogoča kvantifikacijo metalotioneinov v tkivih morskih organizmov (Viarengo in sod., 1988). Prebavna žleza je najprimernejši organ za analizo, ker nanjo najmanj vplivajo okoljski dejavniki (Viarengo in sod., 1997).

1.7. Namen dela in hipoteze

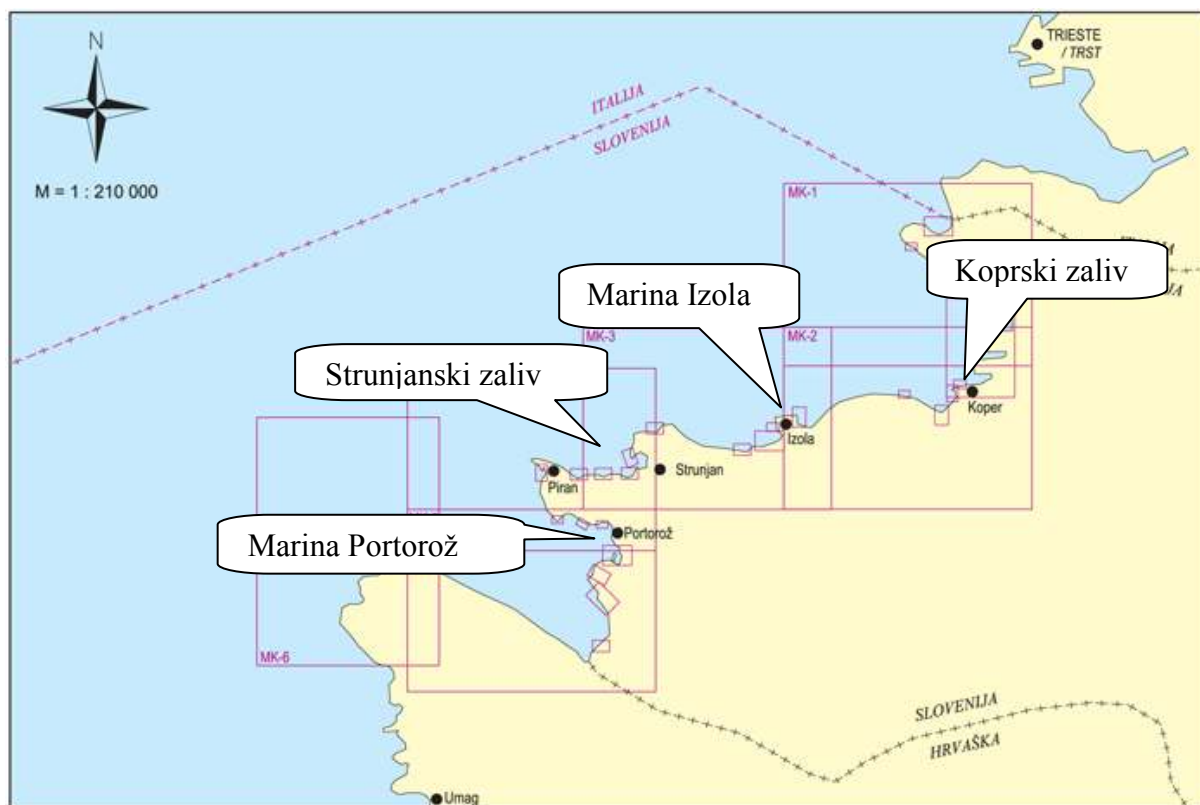
V nalogi smo ugotavljali biološke učinke onesnaženja na delovanje lizosomov. Merili smo kolikšen je čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v lizosomih klapavic nabranih v okoljih z različno obremenitvijo.

Predpostavili smo, da je čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče krajši v lizosomih klapavic, ki so živele v bolj onesnaženem okolju kot v klapavicah iz manj onesnaženega okolja.

2. MATERIAL IN METODE

2.1. Vzorčna mesta

V nalogi sem analizirala klapavice z različnih vzorčnih mest ob slovenski obali: marina v Izoli, marina v Portorožu in školjčišče v Strunjanskem zalivu. V obeh marinah (Izola in Portorož) sem klapavice izpostavila v mrežicah in sicer od začetka septembra 2011 do novembra 2011 in še enkrat od konca oktobra do marca 2012 (glej Tabela 2). Klapavice, ki sem jih izpostavila so bile iz ribogojnice Fonda, gojene v Piranskem zalivu.



Slika 4. Slovenska obala z označenimi vzorčnimi mesti (Vir: Direktorat za pomorstvo ministrstva za infrastrukturo in promet)

V Strunjanski zaliv smo postavili vzorce 21. 12. 2012. Osebkji so bili na vzorčnem mestu od decembra 2011 do maja 2012. Tudi ti vzorci so bili iz ribogojnice Fonda, iz Piranskega zaliva. Vse klapavice, ki sem jih postavila na vzorčna mesta, so bile približno enake velikosti. Merile

so od 5,5 cm do 6,5 cm v dolžino. 29. 3. 2012 sem nabrala nekaj klapavic iz Koprskega zaliva, pri privezih za čolne.

Tabela 2. Vzorčna mesta in čas izpostavljanja klapavic.

Vzorčno mesto	Začetek izpostavljanja	Konec izpostavljanja	Število izpostavljenih klapavic
Marina Portorož	6. 9. 2011	11. 11. 2011	200
Marina Izola	14. 9. 2011	3. 11. 2011	240
Marina Portorož	25. 10. 2011	7. 3. 2012	300
Marina Izola	25. 10. 2011	14. 3. 2012	300
Strunjanski zaliv	21. 12. 2011	15. 5. 2012	300

2.2. Delež smrtnosti

Kjer je bilo možno, sem preštela žive osebkke in določila odstotek smrtnosti po določenem času izpostavljenosti na vzorčnem mestu.

2.3. Biometrične meritve in izračun kondicijskega in gonadosomatskega indeksa

Vsem vzorcem, razen klapavicam, ki so bile nabrane v Koprskem zalivu, sem izmerila kondicijski in gonadosomatski indeks.

Klapavicam sem izmerila dolžino lupine (od anteriorne do posteriorne strani), širino lupine (od dorzalne do ventralne strani), in razdaljo med največjo širino med obema lupinama. Za vsak izračun, sem iz vzorca vzela 20 osebkov. Vse meritve sem opravila s kljunastim merilom na milimeter natančno. Klapavicam sem izrezala organe in posebej stehtala mokro težo gonad ter preostale organe za vsak osebek posebej. Tehtala sem v plastičnih lončkih s pokrovčkom (lončki in pokrovčki so bili predhodno stehtani). Mokra stehtana tkiva sem nato zamrznila in posušila v liofilizatorju, na približno -50°C in pri tlaku 0,120 kPa. V liofilizatorju voda sublimira iz tkiv, zato je potrebno tkiva predhodno zamrzniti. Po približno 24-ih urah so se tkiva popolnoma posušila (med sušenjem je tkiva potrebno večkrat stehtati in ko se teže ne spreminjajo več so suha) in takrat sem stehtala še suho težo tkiv. Kondicijski indeks (CI) sem izračunala iz suhe teže tkiv in volumna lupine (Formula 1.), medtem ko sem gonadosomatski indeks (GSI) izračunala iz suhe teže gonad in suhe teže ostalega tkiva (Formula 2.). CI in GSI

sem izračunala za vsak osebek posebej, nato pa še aritmetično sredino vseh vrednosti CI in GSI za vsako vzorčno mesto. Nekatere podatke sem morala zavreči zaradi tehničnih težav pri tehtanju.

2.4. Test stabilnosti lizosomskih membran

Po določenem času izpostavljenosti (Tabela 2) sem izpostavljenim klapavicam odvzela hemolimfo in nato v hemocitah opazovala spremembe v stabilnosti lizosomskih membran. Za ovrednotenje stabilnosti lizosomskih membran sem uporabila protokol, ki je opisan v *Techniques in Marine Environmental Sciences, Biological effects of contaminants: Measurements of lysosomal membrane stability* (Moore in Lowe, 2004). Test temelji na opazovanju obarvanih hemocit z nevtralnno rdečim barvilom. Merila sem čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v lizosomih hemocit izoliranih iz klapavic. Ker sem na začetku imela nekaj težav pri izvedbi testa, sem po posvetu s strokovnjakom (dr. John Bignell (CEFAS)) protokol optimizirala. Končni test sem delala po naslednjih korakih:

1. ODVZEM HEMOLIMFE

Pri odvzemu hemolimfe iz mišice moramo školjko previdno odpreti in paziti, da ne poškodujemo lupine. Lupina mora biti dovolj razprta, da lahko z iglo zabodemo v mišico zapiralko. V brizgo vzamemo 0,1 ml fiziološke raztopine ter zabodemo v mišico. V mišico ne smemo zabosti pregloboko, saj v takem primeru odvzem ne bi bil uspešen. Počasi odvzamemo približno 0,1 ml hemolimfe iz mišice. Snamemo iglo iz brizge in počasi prenesemo vsebino v silikonizirano epico z Sigmacote (Sigma). Epico rahlo pretresemo in odpipetiramo 40 μ l suspenzije ter kanemo na objektno stekelce. Počakamo približno 10 minut in nato dodamo še 40 μ l 0,2 mM raztopine nevtralnno rdečega za barvanje celic. Nato celice prenesemo na objektno stekelca premazana s polilizinom (Thermo Scientific), kar omogoči boljšo adsorbcijo celic. Pokrijemo s krovnim stekelcem.

Material in reagenti:

- injekcijske igle (Becton Dickinson; 25G , 0,5 X 25 mm)
- brizga (Becton Dickinson) tuberkulinka, REF:300013/Luer (1 ml)

- Sigmacote (Sigma, kataloška številka: SL2-100ML)
- objektna stekelca-polilizinska (Thermo Scientific, J2800AMNZ; 25X75X1 mm)
- pokrovna stekelca (Brand , 4700 60, 24X24 mm)

2. OPAZOVANJE CELIC POD SVETLOBNIM MIKROSKOPOM:

Obarvane celice najprej opazujemo pod 400 kratno povečavo in nato pod 800 kratno povečavo. Pomembno je, da ločimo zrnatost celic in nato razlitje barvila iz lizosomov. V začetnem stanju, ko celice privzamejo barvilo, vidimo zrnatost. To so obarvani lizosomi, ki s časom izpustijo barvilo v citosol. Takrat zrnatost ni tako izrazita kot na začetku. Pazljivo opazujemo celico in merimo koliko časa potrebujejo lizosomi, da izpustijo barvilo. Čas varira glede na stres, ki so mu bile izpostavljene školjke. Preparat opazujemo v časovnem intervalu 10 minut in največ 180 minut, po tem času postane barvilo strupeno za lizosome in povzroči poškodbe.

Vsakič, ko sem delala test, sem preparat slikala in naknadno opazovala spremembe na mikroskopskih fotografijah. Vse celice sem na slikah preštela (za vsak časovni interval posebej) in nato ocenila, katere celice imajo razlito barvilo iz lizosomov in preštela celice z razlitimi lizosomi in nerazlitimi lizosomi.

Uporabljala sem mikroskop Olympus BX51, kamero Olympus DP70 in program Olympus DP-SOFT Version 3.2.

3. PRIPRAVA RAZTOPIN ZA EKSPERIMENT:

a) Fiziološka raztopina klapavic:

- 4,77g HEPES (Sigma, kataloška številka: 54457-50G-F)
- 25,48g NaCl (Sigma, kataloška številka: 53014-500G)
- 13,06g MgSO₄ (Sigma, kataloška številka: 63140)
- 0,75g KCl (Sigma, kataloška številka: P951 500 G)

- 1,47g CaCl₂ (Fluka, kataloška številka: 21101250G-F)

pH raztopine sem uravnala na 7,36 z 1M raztopino NaOH in dolila vode do 1000 ml.

b) 100 mM raztopina nevtralnno rdeče:

V 1 ml DMSO sem raztopila 28,8 mg barvila v trdnem stanju (prah) in dobila 100mM založno raztopino. Raztopina je lahko shranjena v zamrzovalniku 2-3 tedne.

DMSO (Sigma, kataloška številka: 154938-500ML)

Nevtralnno rdeče (Sigma, kataloška številka: N4638-1G)

c) Delovna raztopina nevtralnno rdečega za barvanje celic:

V 5 ml fiziološke raztopine za klapavice sem zamešala 10 µl raztopine nevtralnno rdeče in dobila 0,2 mM raztopino nevtralnno rdečega.

2.5. Merjenje koncentracije metalotioneinov

Koncentracije metalotioneinov sem izmerila v prebavni žlezi klapavic, ki so bile izpostavljene na različnih vzorčnih mestih in različnih časovnih obdobjih (glej Tabela 3):

Tabela 3. Vzorčenje klapavic v različnih časovnih obdobjih, za ugotavljanje koncentracij metalotioneinov.

Št. vzorca	Mesto vzorčenja	Čas izpostavitve oz. vzorčenja	Število vzorcev	Število hepatopankreasov v vzorcih
1	Marina Izola	14.9.2011 - 3.11.2011	7	7
2	Piranski zaliv	25.10.2011	8	10
3	Marina Izola	25.10.2011 - 14.3.2012	3	10
4	Koprski zaliv	29.3.2012	5	10

Vzorke iz Piranskega zaliva sem dobila iz ribogojnice Fonda. Ta vzorec sem primerjala z vzorcem iz Marine Izola po določenem času izpostavitve in skušala ugotoviti, če so kakšne razlike v koncentracijah metalotioneinov.

Organizmi, ki so bili izpostavljeni v Marini Portorož so imeli zelo poškodovana tkiva in merjenje metalotioneinov v tem vzorcu ni bilo možno.

Za merjenje koncentracij metalotioneinov sem uporabljala protokol, ki ga je opisal Viarengo s sodelavci (1999) in temelji na spektrofotometričnem določanju metalotioneinov v klapavici:

1. HOMOGENIZACIJA TKIVA

Predhodno sem dodala homogenizacijskemu pufri inhibitorje proteaz. Ocenila sem, koliko pufra bom uporabila (glede na količino vzorcev, ki sem jih imela) ter na vsak mililiter homogenizacijskega pufra, dodala naslednje količine inhibitorjev:

-3 μ l leupeptina (2mM založna raztopina)

-1,5 μ l PMFS (58 mg/ml v 96% etanolu; založna raztopina)

-0,1 μ l β -merkaptoetanol

En vzorec ima predvidoma 10 hepatopankreasov. Tkiva sem odvzela in nato s skalpelom razrezala in zatehtala. Tkivu sem dodala trikratni volumen homogenizacijskega pufra (z inhibitorji proteaz) ter s Potterjevim homogenizatorjem homogenizirala tkivo.

Homogenate sem centrifugirala na 11000 rpm za 40 minut pri 4°C in v supernatantu dobila frakcijo, ki vsebuje metalotioneine.

2. ETANOLNA PRECIPITACIJA (Vse delamo na ledu!)

Odvzela sem 1 ml supernatanta in dodala 1,05 ml ledenomrzlega 96% etanola in 80 μ l kloroforma.

-Pomešala sem na vorteksu nekaj sekund.

-Centrifugirala na 6000 rpm za 10 minut pri 4°C.

-Zbrala sem ves supernatant in volumen izmerila s pipeto.

-Dodala sem 40 μ l 37% HCl in 96% etanol (tri kratni volumen supernatanta). Pustila na -20°C za 60 minut (lahko tudi čez noč). V tem času precipitira 95 % metalotioneinov.

-Centrifugirala sem na 6000 rpm za 10 minut.

V kivete sem dala 1 ml slepega vzorca ali standarda ali vzorca in izmerila absorbcijo pri 412 nm. Ker sem imela duplikate za vsak vzorec, sem na koncu izračunala povprečje obeh.

7. IZRAČUN KONCENTRACIJE METALOTIONEINOV

Količina metalotioneinov je izražena v mikrogramih metalotioneinov v enem gramu prebavne žleze (mokre teže). Koncentracijo MT sem izračunala iz: absorbcije vzorca ($A_{412\text{nm}}$), ekstinkcijskega koeficienta glutationa (ϵ_{GSH}), števila cisteinov v MT in molekulske teže MT. Metalotioneini v klapavicah imajo 21 cisteinskih ostankov, molekulska teža je 8600 Da (Mackay in sod., 1993). Najprej izračunamo ϵ_{GSH} standarda GSH iz znane količine dodanega standarda v kontrolah (20 μl = 14,4 nmol/ml, 40 μl = 28,8 nmol/ml, 60 μl =43,2 nmol/ml, 80 μl = 57,8 nmol/ml). Formulo 3 sem vnesla v tabelo v Excellu in izračunala koncentracijo MT.

Formula za izračun koncentracije metalotioneinov

$$[(A_{412\text{nm}}/\epsilon_{\text{GSH}})/21]*8,600*4,2*4 \text{ (Formula 3)}$$

Iz dobljenih rezultatov sem podatkom izračunala še standardno deviacijo (SD), mediano in koeficient variabilnosti (CV).

8. PRIPRAVA RAZTOPIN

0,25 M NaCl

Zatehtala sem 1,461 g $\text{NaCl}_{(s)}$ ter dodala dvojno destilirano vodo do volumna 100 ml.

1 M TRIS-Cl

Zatehtala sem 60,55g Tris base in dodala dvojno destilirano vodo do volumna 400 ml. Izmerila sem pH, ki je bil bazičen. pH sem uravnala s 37 % HCl (koncentrirano klorovodikova kislina) na vrednost 8,6. Raztopino sem med pripravo stalno mešala. 37 % HCl sem dodajala postopoma po kapljicah.

0,5 M EDTA

Zatehtala sem 93,05 g EDTA in dodala dvojno destilirano vodo do volumna 500 ml. Nato sem uravnala pH na vrednost 8 z dodatkom NaOH v trdnem stanju (približno 10g). Raztopino sem med pripravo stalno mešala.

1M HCl

V 100 ml dvojno destilirane vode sem dodala 8,62 ml 37% HCl.

1M HCl/ 4 mM EDTA

Zmešala sem 80 μ l 0,5 M EDTA in 9,92 ml 1 M HCl.

Na-fosfatni pufer z 0,2 M NaCl (pH=8)

Predhodno sem pripravila:

-0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Zatehtala sem 28,4 g Na_2HPO_4 (s) in dodala dvojno destilirano vodo do volumna 1L (pH=8).

-0,2 M $\text{H}_2\text{NaPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Zatehtala sem 24 g H_2NaPO_4 (s) in dodala dvojno destilirano vodo do volumna 1L (pH=4)

-0,2 M NaCl

Zatehtala sem 116,88 g NaCl (s) in dodala dvojno destilirano vodo do volumna 1L.

Končna priprava Na-fosfatnega pufra nasičenega z NaCl:

V razmerju 1:1 sem zamešala 0,2 M NaCl in 0,2 M Na_2HPO_4 . Raztopini sem znižala pH na vrednost 8,0 z 0,2 M H_2NaPO_4 .

Homogenizacijski pufer:

Zatehtala sem 42,78 g saharoze in dodala dvojno destilirano vodo do volumna 100 ml. Dodala sem 5 ml 1 M TRIS-Cl in nato še dvojno destilirano vodo do 250 ml volumna.

3.REZULTATI

3.1. Smrtnost in primerjava tkiv iz različnih vzorčnih mest po izpostavitvi

Odstotek smrtnosti se je na vzorčnih mestih in različnih časovnih obdobjih izpostavitve razlikoval:

-Marina Izola (čas izpostavitve 14.9.2011-3.11.2011) : 25% smrtnost

-Marina Portorož (čas izpostavitve 6.9.2011-11.11.2011) : 50,5 % smrtnost

-Marina Izola (čas izpostavitve 25.10.2011-14.3.2012) : 42,3 % smrtnost

-Marina Portorož (čas izpostavitve 25.10.2011-7.3.2012): 68,3 % smrtnost

V obeh primerih je smrtnost med osebki izpostavljenimi v Marini Portorož večja. Očitno je tudi, da daljše kot je časovno obdobje izpostavitve, večja je smrtnost.

Ker je bila smrtnost na vzorčnih mestih različna, sem pregledala tkiva in ugotovila, da so organizmi, ki so bili izpostavljeni v Marini Portorož v precej slabšem stanju, kot tisti iz Marine Izola. Na fotografijah je to zelo dobro razvidno.

Tabela 5. Izračunana smrtnost v izpostavljenih klapavicah.

Vzorčno mesto	Trajanje izpostavljanja (število dni)	Število izpostavljenih klapavic	Smrtnost (%)
Marina Izola	51	240	25
Marina Portorož	64	200	50,5
Marina Izola	142	300	42,3
Marina Portorož	135	300	68,3

KLAPAVICE IZ MARINE PORTOROŽ:



Slika 5. Atrofirani organi v klapavici, ki je bila izpostavljena 134 dni v Marini Portorož.

Slika 6. Klapavice izpostavljene v Marini Portorož.

KLAPAVICE IZ MARINE IZOLA



Slika 7. Klapavica izpostavljena v Marini Izola 142 dni.

Slika 8. Primer klapavic iz Marine Izola.

KLAPAVICE IZ MARINE KOPER:



Slika 9. Klapavica iz marine v Kopru nabrane dne 29.3.2012

Slika 10. Klapavice iz marine v Kopru.

3.2. Izračun kondicijskega in gonadosomatskega indeksa po vzorčnih mestih

Iz vrednosti posameznih kondicijskih in gonadosomatskih indeksov, sem za vsako vzorčno mesto izračunala povprečne vrednosti, standardno deviacijo ter izpisala najvišjo in najnižjo vrednost. Podatke sem združila v tabele in nato še v skupni graf. Povprečje je izračunano iz podatkov 20-ih organizmov.

Tabela 6. Vrednosti kondicijskega in gonadosomatskega indeksa za klapavice iz različnih vzorčnih mest

a) PIRANSKI ZALIV (september, 2011)

	KONDIICIJSKI INDEKS (mg/cm^3) \pm SD	GONADOSOMATSKI INDEKS \pm SD
POVPREČJE	1,8 \pm 0,3	33,8 \pm 9,7
Minimum – maksimum vrednost	1,3 - 2,2	15,6 - 51,3

Podatke za kondicijski indeks klapavic iz Piranskega zaliva, sem uporabila iz raziskovalne naloge Lorette Hamacher (2011) zaradi tehničnih težav pri tehtanju svojih vzorcev.

b) MARINA IZOLA (datum izpostavljenja: 14.9.2011 - 3.11.2011)

	KONDIČIJSKI INDEKS (mg/cm ³)±SD	GONADOSOMATSKI INDEKS±SD
POVPREČJE	0,01 ± 0,0021	17,6± 8,5
Minimum- maksimum vrednost	0,0065-0,0158	3,9-38,04

c) MARINA PORTOROŽ (datum izpostavljenja: 6.9.2011 - 11.11.2011)

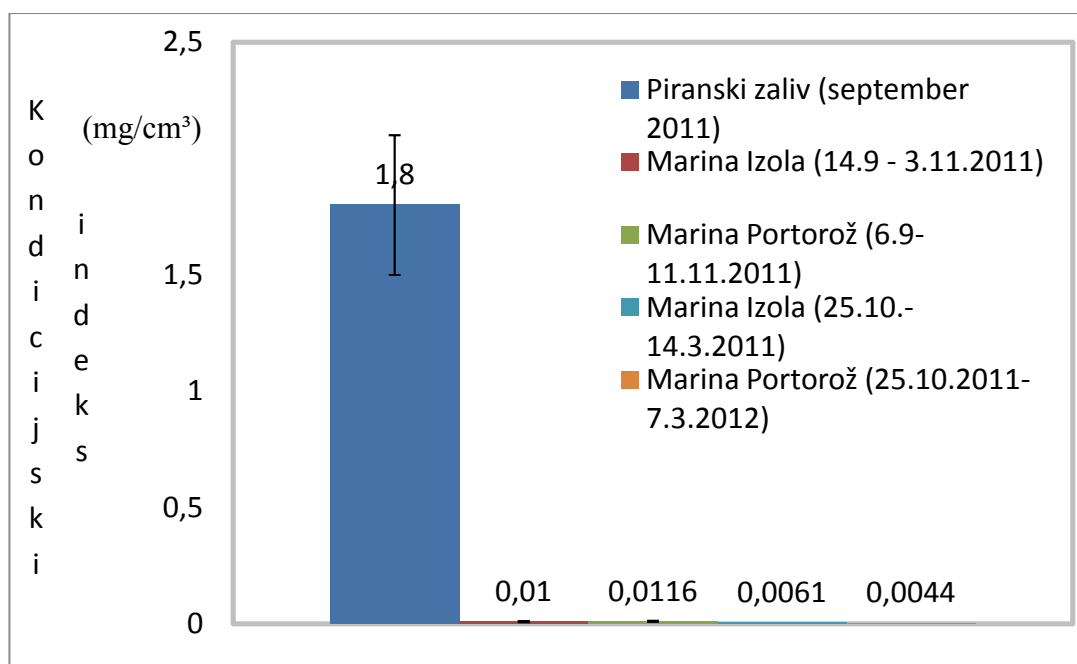
	KONDIČIJSKI INDEKS(mg/cm ³)±SD	GONADOSOMATSKI INDEKS±SD
POVPREČJE	0,0116±0,0023	18,7±8,2
Minimum- maksimum vrednost	0,0059-0,0154	5,7-39,5

d) MARINA IZOLA (čas izpostavitve: 25.10.2011 - 14.3.2012)

	KONDIČIJSKI INDEKS(mg/cm ³)±SD	GONADOSOMATSKI INDEKS±SD
POVPREČJE	0,0061±0,0019	9,5 ±3,4
Minimum- maksimum vrednost	0,0015-0,0090	5,7-19,3

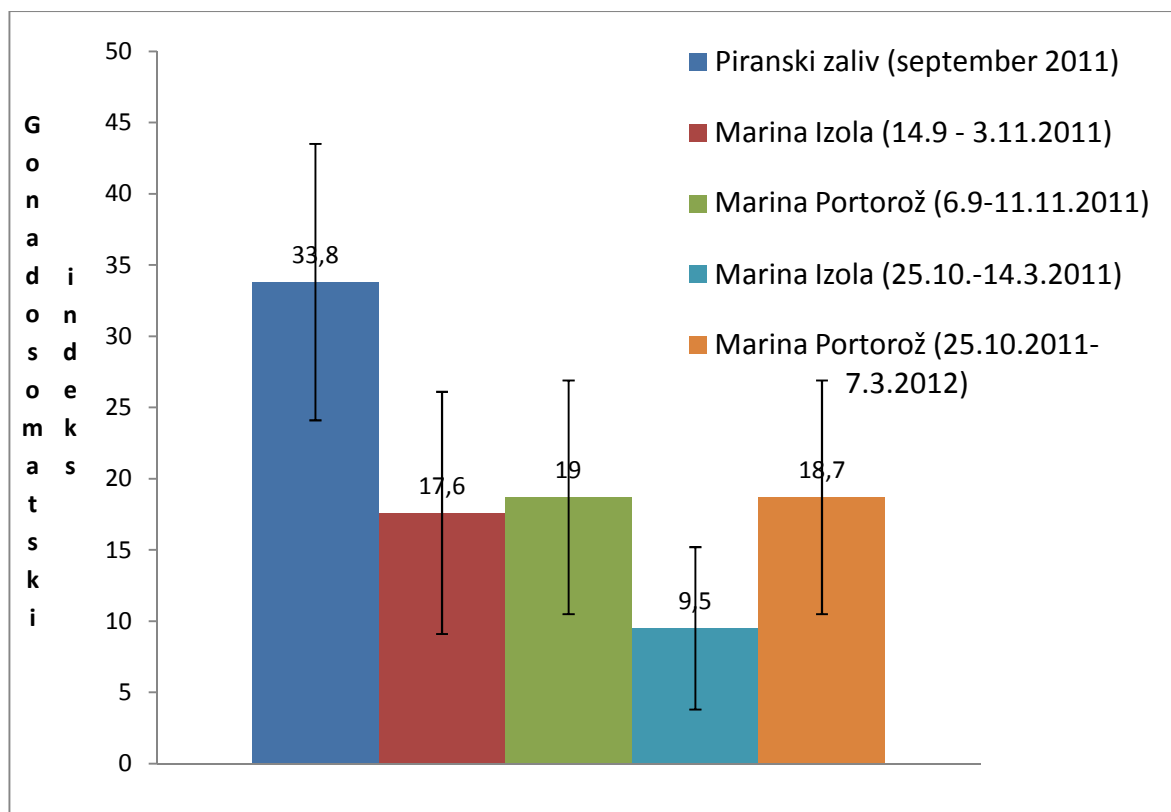
e) MARINA PORTOROŽ (čas izpostavitve : 25.10.2011 - 7.3.2012)

	KONDIČIJSKI INDEKS(mg/cm ³)±SD	GONADOSOMATSKI INDEKS±SD
POVPREČJE	0,0044±0,0012	18,7±8,2
Minimum- maksimum vrednost	0,0028-0,0075	5,7-29,5



Slika 11. Povprečne vrednosti kondicijskih indeksov na različnih vzorčnih mestih in časovnih obdobjih ob slovenski obali.

Kondicijski indeksi iz marin so bistveno nižji od tistega iz Piranskega zaliva, ki je kontrolni podatek. Po izpostavitvi je klapavicam v obeh marinah kondicijski indeks močno upadel, zato lahko sklepam, da so bile v večjem stresu kot na kontrolni točki v Piranskem zalivu.



Slika 12. Gonadosomatski indeksi na različnih vzorčnih mestih v različnih časovnih obdobjih ob slovenski obali.

Gonadosomatski indeksi iz marin so nižji od tistega iz Piranskega zaliva, ki je kontrolni podatek. Po izpostavitvi je klapavicam v obeh marinah kondicijski indeks upadel, zato lahko sklepam, da so bile v večjem stresu kot na kontrolni točki v Piranskem zalivu.

3.3 Stabilnost lizosomskih membran

Po izvedbi testa sem podatke o prešteti celicah uredila v zbirno tabelo. Na vsaki sliki sem štela celice z razlitimi in nerazlitimi lizosomi.

Odčitavanje rezultatov

Ločiti moramo med celicami v katerih iz lizosomov še ne uhaja barvilo nevtralnno rdeče (Slika 13) in med celicami v katerih iz lizosomov uhaja barvilo (Slika 14).



Slika 13. Celica, kjer iz lizosomov uhaja barvilo (nevtralno rdeče)

Slika 14. Celica, iz katerih še ne uhaja barvilo (nevtralno rdeče).

3.3.1 MARINA IZOLA

Tabela 7. Čas zadrževanja barvila nevtralno rdeče v osebkih iz Marine Izola.

čas (min)	število celic	število celic z razlitimi lizosomi	delež celic z razlitimi lizosomi (v %)	število celic z nerazlitimi lizosomi	Delež celic z nerazlitimi lizosomi (v %)
0 min	30	2	6,7	6,7	93,3
15 min	59	18	30,5	30,5	69,5
30 min	103	49	47,6	47,6	52,4
45 min	111	93	83,8	83,8	16,2
60 min	101	95	94,1	94,1	5,9
75 min	88	88	100	100	0

Z mastnim tiskom je označen čas, ko je več kot 50% celic z razlitimi lizosomi

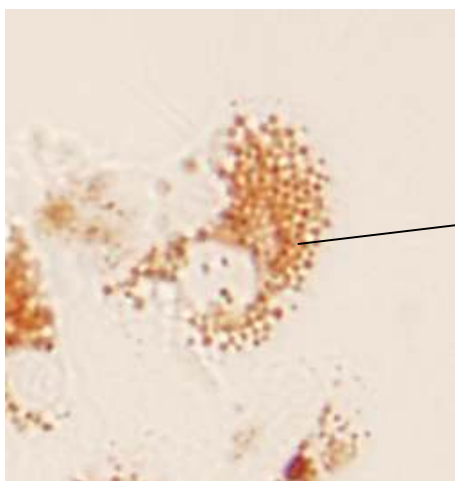
Celice sem štela iz fotografij. Na spodnji sliki je prikazano, kako izgledajo celice v različnih časovnih intervalih. Test je bil narejen na enem organizmu.



Slika 15. Hemocita z nerazlitimi lizosomi takoj ob pričetku testa (vzorčno mesto: Marina Izola)

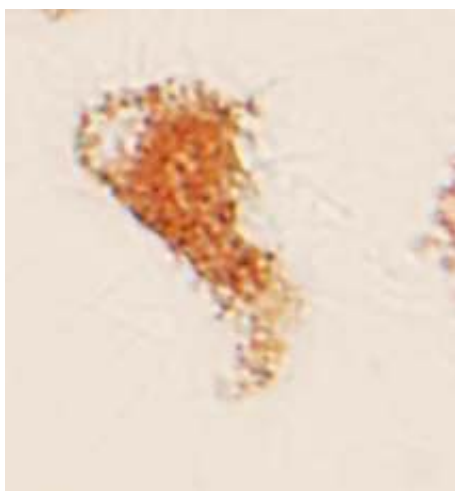


Slika 16. Hemocita po 15-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola)



→ razlito barvilo nevtrarno rdeče iz
lizosomov

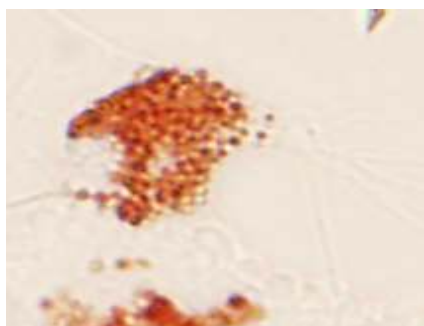
Slika 17. Hemocita po 30-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola)



Slika 18. Hemocita po 45-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).



Slika 19. Hemocita po 60-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola).



Slika 20. Hemocita po 75-ih minutah (vzorčno mesto: Marina Izola)

3.3.2 MARINA V KOPRU:

Tabela 8. Čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v osebkih iz Koprškega zaliva

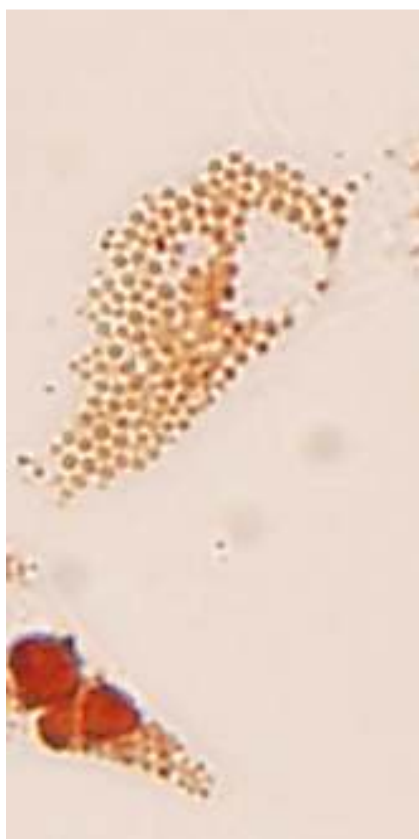
čas (min)	št.celic	št. celic z razlitimi lizosomi	%	št. celic z nerazlitimi lizosomi	%
5 min	18	1	5,6	17	94,4
20 min	37	10	29	27	71
35 min	105	69	64,7	36	35,3
50 min	82	81	98,8	1	1,2
65 min	81	81	100	0	0

Z mastnim tiskom je označen čas, ko je več kot 50% hemocit z razlitimi lizosomi

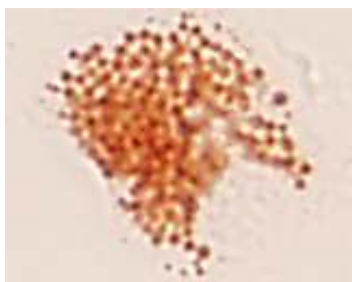
Celice sem štela iz fotografij. Na spodnji sliki je nakazano, kako izgledajo celice iz različnih časovnih intervalov. Test je bil narejen na enem organizmu.



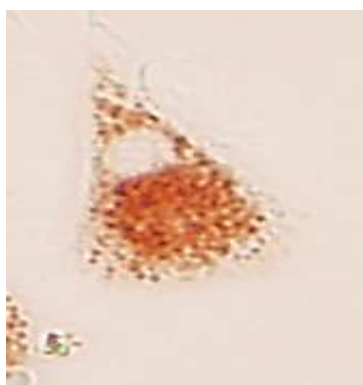
Slika 21. Hemocita po 5-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv)



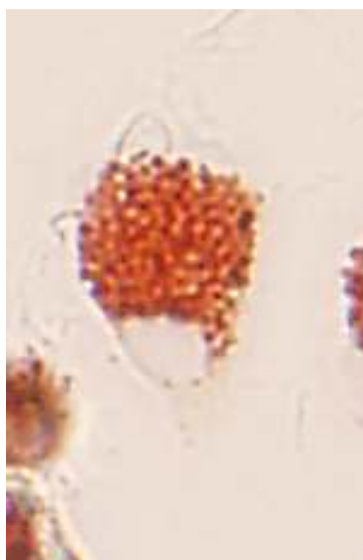
Slika 22. Hemocita po 20-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv)



Slika 23. Hemocita po 35-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv)



Slika 24. Hemocita po 50-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv)



Slika 25. e) Hemocita po 65-ih minutah (vzorčno mesto: Koprski zaliv)

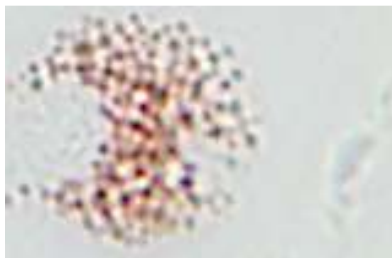
3.3.3 STRUNJANSKI ZALIV:

Tabela 9. Čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v osebkih iz Strunjanskega zaliva

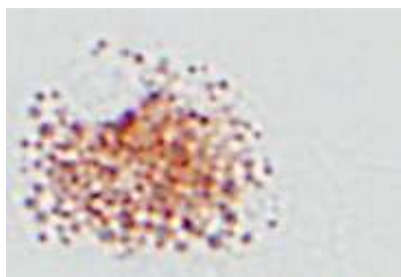
Čas	št.celic	št. Celic z razlitimi lizosomi	%	št. Celic z nerazlitimi lizosomi	%
0	231	44	19,04762	187	80,95238
10	313	108	34,50479	215	68,6901
20	363	262	72,17631	101	27,82369
30	275	213	77,45455	66	24
40	361	306	84,76454	55	15,23546
50	192	172	89,58333	20	10,41667

Z mastnim tiskom je označen čas, ko je več kot 50% hemocit z razlitimi lizosomi.

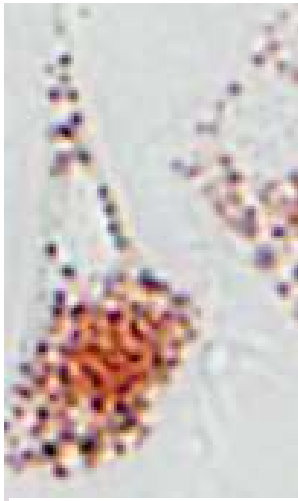
Celice sem štela iz fotografij. Na spodnji sliki je nakazano, kako izgledajo celice iz različnih časovnih intervalov. Test je bil narejen na sedmih organizmih.



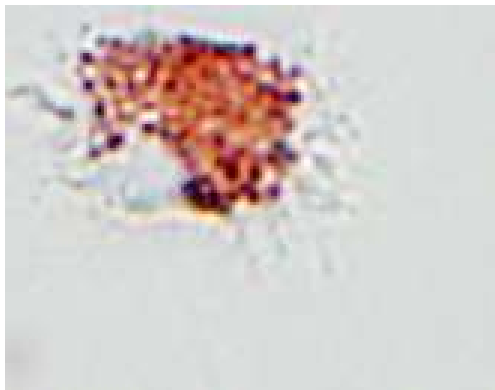
Slika 26. Hemocita po 0-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv)



Slika 27. Hemocita po 10-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv)



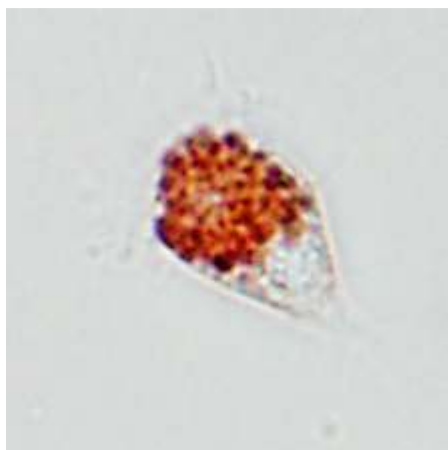
Slika 28. Hemocita po 20-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv)



Slika 29. Hemocita po 30-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv)



Slika 30. Hemocita po 40-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv)



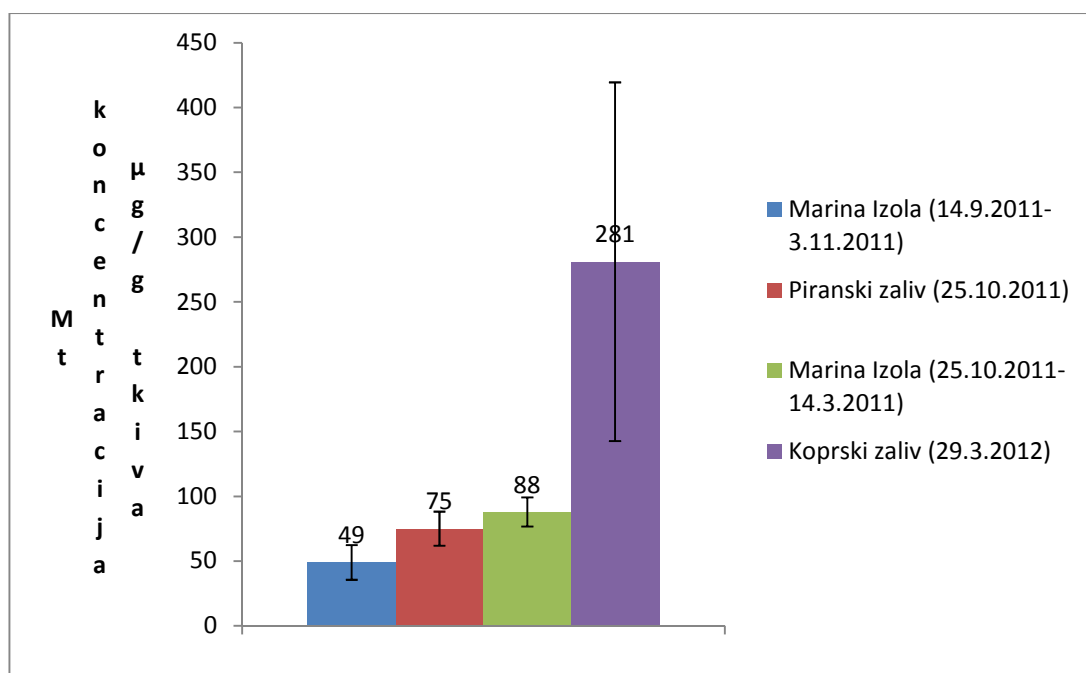
Slika 31. Hemocita po 50-ih minutah (vzorčno mesto: Strunjanski zaliv)

3.4 METALOTIONEINI

Metalotioneine sem izmerila v prebavnih žlezah klapavic, ki sem jih nabrala na različnih vzorčnih mestih (Tabela 3). Uporabila sem spektrofotometrično metodo (Viarengo in sod., 1999). Izmerjenim koncentracijam sem izračunala povprečne vrednosti, standardno deviacijo, mediano in koeficient variabilnosti. Podatke sem združila v skupno tabelo in podatkov naredila stolpični graf.

Tabela 10. Izmerjene koncentracije metalotioneinov na različnih vzorčnih mestih.

VZORČNO MESTO	MT POVPREČNA KONCENTRACIJA (μg MT/g mokre teže tkiva)	SD	MEDIANA	CV
Marina Izola (14.9.2011- 3.11.2011)	49	13,4	47,3	27,2
Piranski zaliv (25.10.2011)	75	13,2	81,3	17,6
Marina Izola (25.10.2011- 14.3.2012)	88	11,2	83,2	12,7
Koprski zaliv (29.3.2012)	281	138,4	289,3	49,2



Slika 32. Izmerjene povprečne koncentracije metaloteinoinov na različnih vzorčnih mestih ob slovenski obali.

Iz grafa lahko že na prvi pogled razberemo, da so koncentracije metalotioneinov v vzorcu iz Koprskega zaliva bistveno višje od ostalih. Vzorec iz Piranskega zaliva je kontrolni rezultat za klapavice, ki so bile izpostavljene v Marini Izola.

4. DISKUSIJA

Slovenska obala je relativno majhna, zato težko pričakujemo bistvene razlike v onesnaženosti na različnih točkah. V slovenskem morju so glavni vir onesnaževanja s kemikalijami industrija, transport in turizem. Tržaški zaliv je najbolj obremenjen s težkimi kovinami (predvsem živo srebro) (Horvat in sod. 2001), kot tudi pesticidi in anionskimi detergenti (Planinc in sod., 1993), policiklični aromatski ogljikovodiki (Notar in sod., 2001). S testi, ki sem jih izvajala, sem skušala ugotoviti, če so različna mesta na slovenski obali drugače obremenjena in v kakšni meri. Za ocenjevanje splošnega stresa sem uporabila test, s katerim lahko ugotovimo stabilnost lizosomskih membran ter izmerila koncentracije metalotioneinov v prebavnih žlezah (hepatopankreasih) klapavic (izpostavljene v Marini Izola in Marini Portorož). Kondicijski in gonadosomatski indeks sem uporabila kot spremljevalni parameter.

Uporaba citokemijskih testov ima veliko prednosti. Omogočajo nam oceniti, kakšen vpliv imajo onesnažila na molekularnem nivoju (More, 1990). Za izvedbo takih testov je potrebna majhna količina tkiva (More, 1988). Ker se zavest o okoljskih problemih v morskem okolju povečuje, so ti testi pomembni, saj nam dajo občutljive, natančne in hitre rezultate, ki nas lahko vodijo do povzročitelja poškodb. Taki rezultati nam povedo, kakšna je povezava med morskimi ekosistemi in vplivom kemikalij, kot tudi kakšne poškodbe te kemikalije povzročijo. S pomočjo takih testov, lahko tudi v naprej napovemo, kakšne so posledice delovanja kemikalij na različnih organizacijskih nivojih v organizmu in v populaciji (More in Lowe, 2004). Na osnovi tega lahko tudi načrtujemo primerne ukrepe za izboljšanje.

Rezultati, ki so me najbolj presenetili, so bili pri testu stabilnosti lizosomskih membran. Marca sem najprej naredila test na organizmih iz Marine Izola in marine v Kopru. Čas zadrževanja na vzorcu iz Marine Izola je bil malo čez 30 minut, pri vzorcu iz marine v Kopru pa med 25 in 30 minut. Na molekularnem nivoju so torej vzorci iz obeh marin bili približno v enakem stresu. Kratek čas zadrževanja me ni presenetil, saj so organizmi bili v marinah, torej v nekoliko bolj obremenjenem območju. Pričakovala sem, da bo čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče pri vzorcu iz Strunjanskega zaliva daljši, ker je to vzorčno mesto opredeljeno kot referenčna postaja. Izkazalo se je ravno obratno. Čas zadrževanja barvila je bil med 10 in 20 minutami. Test na vzorcu iz Strunjanskega zaliva sem opravila približno dva meseca kasneje (maja 2012). V istem obdobju (maju 2012) sem nabrala klapavice v marini v Kopru,

vendar testa nisem mogla izvesti, ker odvzem hemolimfe ni bil mogoč. Po več kot desetih poskusih odvzema hemolimfe, sem prišla do zaključka, da je število hemocit v hemolimfi izjemno malo in se organizmi niso odzivali na test. Ob prejšnjem vzorčenju (marec 2012) so se klapavice na test odzivale normalno. Skleпам, da so bile klapavice ob času neuspelega vzorčenja (maju 2012) izpostavljene večjemu stresu kot dva meseca prej. Zunanji izgled klapavic ni dajal slutiti, da so organizmi v stresu. Prvi znaki stresa se pokažejo na molekularnem nivoju. Ker vzroka za stres ne vemo, je to mogoče bil le slučajna in hitra sprememba v okolju, ni pa nujno, da je bilo to zaradi onesnažil. V marini v Kopru sem opazila, da je bila voda bistveno bolj zamaščena in umazana, kot je bila pred dvema mesecema (maj 2012). Najverjetneje je tudi to vplivalo na dobljene rezultate. Menim, da bi bilo v takem primeru potrebno test ponoviti zaporedoma več mesecev, v krajših časovnih razmikih in opazovati spremembe. Le na tak način bi prišli do bolj natančnih ugotovitev.

Na podlagi vseh testov in rezultatov skleпам, da so v največjem stresu bili organizmi iz Marine Portorož. Pri obeh vzorčenjih, tako novembra 2011 kot marca 2012, je bila smrtnost skoraj dvakrat večja v vzorcih iz Marine Portorož, kot pri tistih iz Marine Izola. Klapavice iz Marine Portorož so imele tkiva v zelo slabem stanju, kar smo ugotovili takoj ob vzorčenju (glej sliko 5). Vidna je bila atrofikacija tkiv (škrge, plašča in hepatopankreasa). Zaradi tega, nisem izolirala hepatopankreasov iz vzorca, da bi naknadno izmerila koncentracijo metalotioneinov. Na slikah je razvidno, da so tudi ostali organi prizadeti, vključno s škrgami. Ko sem poskušala odvzeti hemolimfo iz mišice, to ni bilo možno niti po več poskusih, podobno kot pri klapavicah iz marine v Kopru, vročenih maja 2012. Opazovala sem območje vzorčnega mesta in videla, da je bilo v Marini Portorož veliko mulja na dnu, ki se z vplutjem in izplutjem plovil premeša v vodnem stolpcu. Ker klapavice filtrirajo morsko vodo, se je v njihovem telesu kopičila velika količina mulja in s tem zavirala izmenjavo plinov na škrgah. To je najverjetneje eden od razlogov, za bistveno večjo stopnjo smrtnosti, nižji indeks kondicije, atrofijo tkiv. Organizmi iz Marine Portorož imajo tudi najnižji kondicijski indeks. Gonadosomatski indeks je bil malo višji pri prvem vzorčenju novembra, v primerjavi z vzorcem iz Marine Izola. Kondicijski indeksi so se znižali vsem osebkom, ki so bili izpostavljeni v marinah. Na začetku je bil kondicijski indeks iz Piranskega zaliva višji, po času izpostavljenosti v marinah pa bistveno nižji. Skleпам, da če bi klapavice pustila v Marini Portorož še kakšen mesec, bi najverjetneje vse umrle. Pri takih primerih je pomembno, da

ocenimo optimalen čas izpostavljanja, da lahko izvajamo teste in dobimo primerljive rezultate.

Organizmi iz Marine Izola, so bili v bistveno boljši kondiciji. Opazila sem tudi, da je bila obrast pri teh organizmih bolj raznolika in večja. Iz tega sklepam, da je biodiverziteteta v Marini Izola bolj pestra, saj je tam okolje manj obremenjeno. Smrtnost ni presegla 50% tudi po daljšem izpostavljanju. Na fotografijah je razvidno, da so tkiva v bistveno boljšem stanju, kot tista iz Marine Portorož. Posledično, so tudi kondicijski indeksi v obeh primerih višji. Ker so bila tkiva še dokaj zdrava, sem izolirala hepatopankrease in naknadno izmerila koncentracijo metalotioneinov. Ker to ni bilo mogoče narediti z vzorcem iz Marine Portorož, sem nabrala še nekaj organizmov, ki so živeli v Koprskem zalivu pri privezih za čolne. Na prvi pogled, so organizmi iz Koprskega zaliva bili v najboljši kondiciji. Na slikah se vidi bistveno razliko v tkivih, zato sem pričakovala, da bodo rezultati za test stabilnosti lizosomskih membran ter koncentracije metalotioneinov pri organizmih iz Koprskega zaliva najboljši. Izkazalo pa se je, da je koncentracija metalotioneinov pri organizmih iz Koprskega zaliva bila skoraj tri krat višja od tistih iz izolske marine. Vzorec iz Piranskega zaliva ima nekoliko nižje koncentracije metalotioneinov, kot tisti iz druge izpostavitve v Marini Izola. Tak rezultat sem tudi pričakovala, saj so bili vzorci iz Piranskega zaliva preneseni v Marino Izola. V Piranskem zalivu, pa so bili organizmi na odprtem morju, ki je manj onesnaženo in obremenjeno kot marina Portorož. Koncentracije metalotioneinov izmerjene v Koprskem zalivu so primerljive s koncentracijami izmerjenimi v zadnjih letih (Ramšak in sod., 2012).

Podobno raziskavo so v devetdesetih letih delali na Hrvaškem. Vzorčna mesta so imeli v Istri in Kvarnerju. Uporabili so tudi kontrolne organizme iz odprtega in bistveno manj onesnaženega morja. Rezultati testa zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v hemocitah so pokazali, da so organizmi, ki so bili na območjih blizu urbanega in močno naseljenega območja, imeli bistveno nižji čas zadrževanja barvila. Organizmi, ki so bili izpostavljeni blizu pristanišča v Reki, so pri testu pokazali 70% slabše rezultate, kot tisti iz odprtega morja. Čas zadrževanja pri organizmih iz pristanišča v Reki je bil od 2,8 minut do 8,7 minut. Organizmi z območja Limskega kanala, otoka Svetega Ivana, Fažane in Brestove so imeli čas zadrževanja barvila med 23 in 32 minut (Petrović in sod., 2001).

5. ZAKLJUČEK

S svojo zaključno nalogo sem želela ugotoviti, če so kakšne razlike v obremenjenosti okolja med slovenskimi marinami (Marino Izola in Marino Portorož) in referenčnimi točkami na odprtem morju (v Strunjanskem zalivu). Uporabila sem klapavice, kot tarčni organizem in jih za daljše obdobje izpostavila v Marino Izola, Marino Portorož ter Strunjanski zaliv. Nekaj prostoživečih klapavic sem nabrala v marini v Kopru, za lažjo interpretacijo rezultatov. Po določenem času izpostavitve (približno dveh in petih mesecih), sem na teh organizmih analizirala biomarkerje splošnega stresa. Osredotočila sem se na test zadrževanja nevtralne rdečega barvila v lizosomih. S tem dobimo informacije o poškodbah na molekularnem nivoju v organizmu. Poleg tega, sem opravila še biometrične meritve in kot spremljajoči parameter izračunala kondicijski, gonadosomatski indeks in smrtnost. V vsakem vzorcu sem izmerila koncentracijo metalotioneinov s spektrofotometrično metodo. Preden sem začela z raziskavami, sem postavila hipotezo, da bodo organizmi izpostavljeni v marinah v večjem stresu kot tisti v Strunjanskem zalivu. Ta hipoteza drži za naslednje biomarkerje: kondicijski indeks, gonadosomatski indeks in metalotioneine, razen za test zadrževanja nevtralne rdeče. Čas zadrževanja barvila v klapavicah iz Strunjanskega zaliva je krajši (manj kot 20 minut), kot pri tistih iz marin, vendar je ta test bil izveden dva meseca kasneje (maja 2012), kot na organizmih iz marin. V tem času so se zgodile spremembe, ki so povzročile krajši čas zadrževanja barvila v lizosomih. V istem obdobju (maja 2012) se klapavice iz marine v Kopru niso odzvale na test. Kondicijski in gonadosomatski indeks se je po določenem času izpostavitve bistveno znižal (za sto krat). Smrtnost se je povečevala glede na čas izpostavitve. Koncentracije metalotioneinov po izpostavljanju v Marini Izola so bile 88 $\mu\text{g MT/g}$ tkiva, pred izpostavljanjem so bile izmerjene vrednosti 75 $\mu\text{g MT/g}$ tkiva. Višje vrednosti MT so bile izmerjene v marini v Kopru 281 $\mu\text{g MT/g}$ tkiva. Na podlagi rezultatov biomarkerskih testov (smrtnost, kondicijski in gonadosomatski indeks, metalotioneinskega testa) lahko zaključim, da je okolje v marinah bolj obremenjujoče kot pa izven območij marin. Menim, da je pomembno pri izvajanju biomarkerskih testov, sočasno izvajanje za natančno primerjavo rezultatov med vzorčnimi mesti. Pomembno je tudi, da se biomarkerske teste delamo v zimskem in poletnem obdobju in tako lahko dobimo natančen vpogled v sezonski odziv biomarkerjev.

6. LITERATURA IN VIRI

Adamič Orožen, M., 2002. Geomorfološke značilnosti Tržaškega zaliva in obrobja. Dela. 18, 143-155.

Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. Molecular biology of the cell. 5th edition, Garland Science, Taylor&Francis Group, New York, ZDA

Bajt, O., 2012. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Slovenian costal area (Gulf of Trieste, northern Adriatic). Environmental monitoring and assessment. DOI 10.1007/s10661-011-2511-y

Bebianno, M.J., Serafim, M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytillus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Sci. Total Environ., 214, 123-131.

Bursch, W., 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death and Differentiation, 8: 569–581.

Cajaraville, M.P., Mariogómez, J.A., Angulo, E. 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. Comp. Biochem. Physiol. 93 (C):231-237

Chassard-Bouchaud C., Escaig F., Boumati P., Galle P., 1992. Microanalysis and image processing of stable and radioactive elements in ecotoxicology. Current developments using SIMS microscope and electron microprobe. Biol. Cell. 74:59-74

Exteberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., Mariogómez, I., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and ZN) in mussels collected from a Zn-polluted site. Arch. Environ. Contam.Toxicol., 7:91-103.

Gosar, L., Muri, G., 2005. National Action Plan (NAP) for Slovenia for the Protection of the Mediterranean Sea against pollution from Land-based sources. University of Ljubljana, Faculty of Civil and Geodetic Engineering, National Institute of Biology, Ljubljana, 68 pp.

Gosling E., 2004. Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books, Blackwell Publishing, Oxford, UK. ISBN 0-85238-234-0.

Hawkins, H.K., 1980. Reactions of lysosomes to cell injury. *In Pathology of Cell Membranes*, Vol. 2, pp. 252–285. Ed. by B.F. Trump and A.V. Arstila. Academic Press, New York, San Francisco, London.

Holtzman, E., 1989. Lysosomes. Plenum Press, New York and London, 439 p.

Horvat, M., Covelli, S., Faganeli, J., Logar, M., Mandić, V., Rajar, R., Širca, A., Žagar, D., 1999. Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. *Sci. Total Environ.*, 237/238: 43-56.

Horvat, M., Kotnik, J., Fajon, V., Logar, M., Zvonaric, T., Pirrone, N., 2001. Speciation of mercury in waters of the Mediterranean Sea. *RMZ-Mater Geoenviron*, 48:241-252.

ICES. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N.Moore, D. Lowe, and A. Köhler. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 36. 31 pp.

ICES. 2011. Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. *ICES CM 2011/ACOM:30*. 265 pp.

Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. In: *Metallothionein and related molecules. Part B Metallobiochemistry*, Riorda, J.F. and Valle, B.L. (Editors). Academic Press, 205, 613-626.

Kent, R.M.L., 1979. The influence of heavy infestations of *Polydora ciliate* on the flesh content of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. UK*. 59: 289–297.

Kiceniuk, J.W., Khan, R.A., 1987. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic expo-sure. *Canadian Journal of Zoology* 65:490–494

Köhler, A., Deisemann, H., and Lauritzen, B. 1992. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. Marine Ecology Progress Series, 91: 141–153.

Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., 2007. Review of biomarkers, bioassays and their potential use in monitoring the Fal and Helford SAC. Project Report. Marine Biological Association, Plymouth, UK.

Livingstone, D.R., 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. Marine Ecology Progress Series, 46: 37–43.

Lobel P.B., Bajdik C.D., Belkhode S.P., Jackson S.E., Longerich H.P., 1991. Improved Protocol for Collecting Mussel Watch Specimens Taking into Account Sex, Size, Shell Shape, and Chronological Age. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 21, 409-414

Lowe, D.M., 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. Marine Ecology Progress Series, 46: 91–100.

Lowe, D.M., Clarke, K.R., 1989. Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. 15:345

Lowe, D.M., Fossato, V.U., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. Aquatic Toxicology, 48: 75–85.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.R. 1981. Effects of oil in the digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat. Toxicol. 1:213-225

Lutz, R.A. 1980. Mussel Culture and Harvest: A North American Perspective, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 305 str.

Mariogómez, J.A., Cajaraville M.P., Angulo, E., 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Litorina littorea* L., determined by x-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94:191-199

Mariogómez, J.A., Vega, M.M., Cajaraville, M.P., Angulo, E. 1989. Quantitative responses of the lysosomal vacuolar system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cell. Mol. Biol.* 35:555-562

Moore, M.N., 1980. Cytochemical determination of cellular responses to environmental stressors in marine organisms. *Rapp.-v. Reun. Cons.Int.Explor. Mer.* 179:7-15.-358

Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 134–139.

Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 81–89.

Moore, M.N., 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemistry Journal*, 22: 187–191

Moore, M.N., 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 59: 1–15.

Moore, M.N., Clarke, K.R., 1982. Use of microsterology and quantitative cytochemistry to determine the effects of crude oil derived aromatic hydrocarbons on lysosomal structure and function in a marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 14:713-718

Moore, M.N., Livingstone, D.R., Widdows, J., Lowe, D.M., and Pipe, R.K. 1987. Molecular, cellular, and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 316: 603–623.

Mourgaud, Y., Martinrez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.Y., Amiard, J.C., 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7: 479-490.

Notar, M., Leskovšek, H., Faganelli J., 2001. Composition, Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 42:36-44

Nott, J.A., Moore, M.N., 1987. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmic reticulum. *Histochem. J.* 19:357-368

Nott, J.A., Moore, M.N., Mavin, L.J., and Ryan, K.P. 1985. The fine structure of lysosomal membranes and endoplasmic reticulum in the digestive gland of *Mytilus edulis* exposed to anthracene and phenanthrene. *Marine Environmental Research*, 17: 226–229.

Petrović, S., Orzetić, B., Krajnović-Orzetić, M., Bobinac, D. 2001. Lysosomal Membrane Stability and Metallothioneins in Digestive Gland of Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as Biomarkers in a Field Study. *Marine Pollution Bulletin*, 42,12, 1373-1378

Pipe, R.K., and Moore, M.N. 1988. Arylsulphatase activity associated with phenanthrene induced digestive cell deletion in the marine mussel *Mytilus edulis*. *The Histochemical Journal*, 18: 557–564.

Planinc, R., Bajt, O., Horvat, M., Faganelli, J., Gorenc, B., 1993. An outline of chemical pollution in the coastal waters of the south eastern (Slovenian) part of the Gulf of Trieste. *Acta Chimica Slovenica*, 40(4):349- 368.

Plut, D., 2000. *Geografija vodnih virov*. Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo, Ljubljana, 281 str.

Radinja, D., 1990. Dimenzije Tržaškega zaliva in slovenskega morja ter njihov regionalni pomen. *Primorje*. V: Zbornik 15. zborovanja slovenskih geografov, Portorož, 13-20.

Rajar, R., Žagar, D., Širca, A., Horvat, M., 2000. Three-dimensional modelling of mercury cycling in the Gulf of Trieste. *Sci. Total Environ.*, 260 (1-3): 109-123.

Ramšak, A., Ščančar J., Horvat M., 2012. Evaluation of Metallothioneins in Blue Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as a Biomarker of Mercury and Cadmium Exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): A Long-term Field Study. *Acta Adriatica.*, 53(1): 71 – 86

Ščančar, J., Zuliani, T., Turk, T., Milačič, R., 2007. Organotin compounds and selected metals in the marine environment of Northern Adriatic Sea. *Environ. Monit. Assess.*, 127:271-282.

Štirn, J., 1970. Onesnaženje morja. V: Zelena knjiga o ogroženosti okolja v Sloveniji, str. 43-48, Ljubljana.

Turk, V., P. Mozetič, P., Malej, A., 2007. Overview of eutrophication-related events and other irregular episodes in Slovenian Sea (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Annales*, 17(2): 197-215.

Turk, V., Potočnik B., 2001. Pollution hot spots and sensitive areas along the Slovenian coast. *Annales*, 2(25): 239-252.

Viarengo A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences*, 1, 295-317

Viarengo, A., Mancinelli, G., Martino, G., Petrica, M., Canesi, M., Muzzucotelli, A., 1988. Integrated cellular stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 65-70

Viarengo, A., Moore, M.N., Petrica, M., Mancinelli, G., Zanicchi, G., and Pipe, R.K. 1985. Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussel: the role of lysosomes and thioneins. *Science of the Total Environment*, 44: 135–145.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84

Thiessen, B.F.R., 1987. Infestation of *Mytilus edulis* by *Mytilicola intestinalis*. *Ophelia* 27: 77–86.

Internetni viri:

<http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20marinos%20no%20gasteropodos/Fotos%20coleccion/Mytilidae/Mytilus%20galloprovincialis%203.jpg> (9.9.2012)

<http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n6/carousel/nprot.2012.043-F3.jpg> (9.9.2012)

http://www.hidrografija.si/images/p3/STR_72_Slika24.png (9.9.2012)