



University of Zagreb

AGRONOMSKI FAKULTET

Martina Krbavčić Jambrošić

**FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA TKIVA
PETROVOG UHA *Haliotis tuberculata*
(LINNAEUS, 1758) IZ SJEVERNOG
JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

AGRONOMSKI FAKULTET

Martina Krbavčić Jambrošić

**FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA TKIVA
PETROVOG UHA *Haliotis tuberculata*
(LINNAEUS, 1758) IZ SJEVERNOG
JADRANA**

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Martina Krbavčić Jambrošić

**PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF GREEN ORMER *Haliotis tuberculata*
(LINNAEUS, 1758) TISSUES FROM THE
NORTHERN ADRIATIC**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

AGRONOMSKI FAKULTET

MARTINA KRBAVČIĆ JAMBROŠIĆ

**FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA TKIVA
PETROVOG UHA *Haliotis tuberculata*
(LINNAEUS, 1758) IZ SJEVERNOG
JADRANA**

Mentori:

Prof. dr. sc. Tea Tomljanović, redovita profesorica /
znanstvena savjetnica

Dr. sc. Natalija Topić Popović, znanstvena savjetnica

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Martina Krbavčić Jambrošić

**PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF GREEN ORMER *Haliotis tuberculata*
(LINNAEUS, 1758) TISSUES FROM THE
NORTHERN ADRIATIC**

Supervisors:

Prof. Tea Tomljanović, Professor / Scientific advisor

Natalija Topić Popović, Ph. D, MSc, DVM, Scientific advisor

Zagreb, 2024.

Bibliografski podaci:

- **Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
- **Znanstveno polje:** Poljoprivreda
- **Znanstvena grana:** Ribarstvo
- **Institucija:** Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju
- **Voditelj doktorskog rada:** prof. dr. sc. Tea Tomljanović i dr. sc. Natalija Topić Popović
- **Broj stranica:** 98
- **Broj slika:** 38
- **Broj tablica:** 11
- **Broj literaturnih referenci:** 131
- **Datum obrane doktorskog rada:**
- **Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:**
 1. izv. prof. dr. sc. Daniel Matulić, (predsjednik),
 2. prof. dr. sc. Ana Gavrilović,
 3. dr. sc. Ivančica Strunjak-Perović

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, održanoj 03. svibnja 2022. te odobrena na I. redovitoj sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj 25. listopada 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, **Martina Krbavčić Jambrošić**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod naslovom:

FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA TKIVA PETROVOG UHA *Haliotis tuberculata*
(LINNAEUS, 1758) IZ SJEVERNOG JADRANA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovog doktorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

Zagreb, 20. svibnja 2024.

Potpis doktorandice

Ovu disertaciju je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Daniel Matulić (predsjednik),

prof. dr. sc. Ana Gavrilović,

dr. sc. Ivančica Strunjak-Perović.

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu,

___.___. 2024. pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Daniel Matulić, (predsjednik), _____

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

2. Prof. dr. sc. Ana Gavrilović, _____

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

3. Dr. sc. Ivančica Strunjak-Perović, _____

znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković

Informacije o mentorima:

Prof. dr. sc. Tea Tomljanović

Prof. dr. sc. Tea Tomljanović rođena je u Splitu 1974. godine, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 2000. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2000. godine zaposlena je na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju pri Agronomskom fakultetu, gdje 2004. godine brani magistarski rad pod naslovom „Molekularno-biološka obilježja endemske mekousne pastrve (*Salmothymus obtusirostirs salonitana*)“. Budući da je njen glavni znanstveni interes molekularna genetika u ribarstvu, tema doktorske disertacije koja je obranjena 2010. godine je „Morfološke i genetske analize šaranskih populacija (*Cyprinus carpio* L.) u Republici Hrvatskoj“.

Usavršavala se u inozemstvu na Institutu za ribarstvo i hidrobiologiju u Brnu, Republika Češka; Institutu za hidrobiologiju i ribarstvo, Szarvas, Mađarska; Institutu za istraživanje manjih životinja, Godollo, Mađarska, Sveučilište u Wuhanu, Wuhan, Kina; Sveučilište Karl-Franzens, Grac, Austrija; Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Beč, Austrija; Huazhong Agricultural University, Wuhan, Kina.

Rani interes usmjeren je na primjenu genetskih biljega za poboljšanje gospodarenja ribama u otvorenim vodama i akvakulturi. Posljednjih godina njezina su istraživanja usmjerena na ponašanje, ekologiju i gospodarenje vrstama iz otvorenih voda i mora. Uz ovo svoje primarno područje vrlo aktivno sudjeluje i u svim ostalim znanstvenim aktivnostima, te ima kvalitetne radove i iz drugih područja, naročito iz problematike ekologije riba. Objavila je 38 znanstvenih radova koji se citiraju u Web of Science Core Collection (h-indeks 10). Koautor je znanstvene knjige. Sudjelovala je kao aktivni suradnik 20 međunarodnih i domaćih projekata i programa, od čega je voditeljica 2 projekta.

Nositeljica je preddiplomskih modula Agrarna zoologija i Osnove agrarne zoologije i diplomskog modula Uzgoj Avertebrata, a na doktorskom studiju modula Znanstvena istraživanja ribolova. Također je uključena u nekoliko drugih modula (Hranidba u akvakulturi, Ichthyology, Ihtiologija, Kinologija, Biodiverzitet Jadrana i kopnenih voda, Ribarstvo, Metode istraživanja u akvakulturi). Vodila je 36 diplomskih radova, a tri studentska rada su nagrađena Rektorovom/Dekanovom nagradom. U tim se aktivnostima pokazala kao dobar nastavnik koji je samostalan u radu i svojom inicijativom motivira studente na kvalitetan istraživački rad i osnovne zahtjeve studiranja, o čemu svjedoči nekoliko izvornih znanstvenih radova u koautorstvu sa studentima. Do sada je bila mentor tri doktoranda. Izv. Prof. Tomljanović ima smisao za terenski rad te je sudjelovala u izradi i pisanju 21 tehnička izvješća (nacionalni monitoring otvorenih voda, ihtiološke studije). Također je autorica 10 stručnih članaka u domaćim časopisima.

Glavna je urednica znanstvenog časopisa „Croatian Journal of Fisheries“.

Dr. sc. Natalija Topić Popović, znanstvena savjetnica

Dr. sc. Natalija Topić Popović, dr. med. vet. znanstvena je savjetnica pri Institutu Ruđer Bošković (IRB), Zavodu za kemiju materijala, Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi (LBA). Doktorirala je 2003. na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s temom Induction of Cytochrome P450 Enzymes of Fish by Oxytetracycline and Combination Ormetoprim-Sulfadimethoxine. Disertaciju je izradila na Cornell University, Ithaca, New York, SAD. Dr. sc. Topić Popović bila je Fulbrightova stipendistica (2001. –2002.) pri Cornell University, College of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and Immunology, Aquatic Animal Diseases Laboratory.

Njezin znanstveni opus obuhvaća 64 objavljena članka indeksirana u WoSCC bazi, 3 članka indeksirana u Scopus bazi koji nisu WoSCC, 5 članaka indeksiranih u drugim bibliografskim bazama, 11 članaka objavljenih u zbornicima međunarodnih i domaćih skupova, 62 sažetka objavljena u zbornicima međunarodnih i domaćih skupova i 1 knjigu (<https://www.bib.irb.hr/pregled/profil/28616>).

Aktivno sudjeluje pri izradi i realizaciji projekata i programa: 30 međunarodnih i domaćih projekata i programa, od čega je voditeljica 4 projekta, uključujući 2 istraživanja u međunarodnoj suradnji. Dr. sc. Topić Popović dobitnica je dviju godišnjih nagrada IRB-a za izvrsne znanstvene radove, članica je uredništva dvaju međunarodnih časopisa, suorganizirala je 12 znanstveno-stručnih skupova, jednu međunarodnu radionicu i jedan međunarodni webinar. Na poslijediplomskom specijalističkom studiju Ribarstvo pri Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (2011<) drži nastavu unutar kolegija Anatomija, fiziologija i embriologija akvatičnih organizama i Ihtiohematologija, kao i na sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju Molekularne bioznanosti Sveučilišta u Dubrovniku, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Instituta Ruđer Bošković – unutar modula Biologija mora i kolegija Ribe u biomedicinskim istraživanjima (2005. –2022.).

Kao znanstvenica gostovala je u međunarodno renomiranim institucijama; sudjelovala je u edukaciji mlađih suradnika na zajedničkom znanstvenom radu koji je rezultirao publikacijama te vođenjem diplomskog/magistarskog/doktorskog rada suradnika; aktivna je u uvođenju novih problematika, razvoju novih metoda i tehnika u znanstveni rad na IRB-u. Njezini su glavni znanstveno-istraživački interesi razvoj bioloških markera za detekciju disbalansa ekosustava na različitim razinama biološke organizacije; razvoj dijagnostike bakterijskih patogena riba i beskralježnjaka; razvoj i procjena bioloških indikatora stresa za akvatične vrste te procjena biokemijskog statusa tkiva akvatičnih organizama.

Zahvala

Sažetak

Petrovo uho (*Halotis tuberculata*) je morski puž koji primarno naseljava sjeveroistočnu atlantsku obalu, no nalazi ga se i u Mediteranu, a posebice u sjevernom Jadranu gdje se lovi u komercijalne svrhe. Radi očuvanja petrovog uha na lokalitetu sjeverozapadne Istre te mogućeg razvoja kontroliranog uzgoja, važno je poznavati homeostazu njegovog tkiva te promjene u fiziološkim obilježjima tkiva kao biološkog odgovora na promjene temperature mora. Istraživanje utjecaja sezonskih promjena temperature mora na homeostazu petrovog uha u sjevernom Jadranu ukazuje na značajne promjene u biokemijskim pokazateljima, histološko-morfološkoj građi tkiva, peroksidaciji lipida i antioksidativnom kapacitetu. Petrovo uho pokazuje samoregulirajuće procese za održavanje stabilnosti u različitim sezonskim uvjetima. Najviša masa mekog tkiva i ljuštura zabilježena je u proljeće, dok je masa probavne žlijezde i mišića bila najviša zimi, zbog veće dostupnosti hrane u jesensko-zimskom periodu. Sezonske promjene također su utjecale na reproduktivni ciklus, s aktivnim stadijima u proljeće i ljeto te fazama gametogene zrelosti i djelomičnog mrijesta u jesen. Osnovni kemijski sastav tkiva varirao je po sezonama, bez značajnih razlika između spolova. Koncentracija biokemijskih parametara poput glukoze (GLU), kolesterola (CHOL), triglicerida (TRIG) te elektrolita (Mg, Ca) mijenjala se kroz godišnja doba. Antioksidativna aktivnost tkiva također je varirala, s najvišim vrijednostima za SOD ljeti, a za LDH i TAS u proljeće. Lipidna peroksidacija (TBARS) bila je najviša ljeti, posebno kod ženki. Sastav masnih kiselina pokazao je sezonske i spolne razlike, s višim udjelom određenih kiselina C15:0 (PDA), C17:0 (HA), C18:0 (SA), C18:2c (LA), C20:4n6 (AA), C20:5n3 (EPA) i C22:5n3 (DPA) kod mužjaka nego kod ženki tijekom toplijeg dijela godine, dok su preostale bile više kod ženki. Veća akumulacija lipida tijekom ljeta može sugerirati da petrovo uho nelipidne prehrambene komponente pretvara u lipide, posebno u zasićene masne kiseline. Ovo je istraživanje pokazalo da petrovo uho vjerojatno ne sintetizira dokozaheksaenoičnu kiselinu (DHA). Analize elemenata u tragovima i makroelemenata pokazale su veće koncentracije Ba, Co, Ni, Mn, Pb, Sb i Se zimi, dok je As bio najviši ljeti. Petrovo uho je organizam od interesa za proučavanje zagađenja okoliša onečišćujućim elementima zbog svog visokog potencijala bioakumulacije elemenata iz okoliša.

Ključne riječi: petrovo uho, tkiva, biokemijski pokazatelji, temperaturni stres, masnokiselinska svojstva, kemijski sastav tkiva i ljuštura, sezonalnost

Extended Abstract

Physiological characteristics of green ormer *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) tissues from the Northern Adriatic

Green ormer (*Haliotis tuberculata*) is a marine gastropod that primarily inhabits the eastern Atlantic coast, but also inhabits the Mediterranean, and especially the northern Adriatic. It is collected for commercial purposes, but it is not farmed in Croatia. Knowledge of the physiological status of green ormer through the analysis of biochemical parameters, lipids and tissues, as well as the histological status in the seasons, is important for the conservation of ormers in the area of northwestern Istria and its potential cultivation.

The samples of the green ormer were collected in the northern Adriatic Sea, off the coast of western Istria, Croatia, following institutional, national, and international laws and guidelines. They were collected in the coastal area of western Istria, in fishing zone A4, at a depth of up to 7 meters. Sampling took place seasonally over the course of a year, with a total of 135 specimens collected. Professional divers collected the samples from known abundant sites near the coast, in the intertidal rocky zone. The green ormer were randomly collected at night when they are most active. Onshore, the specimens were sorted, labeled, weighed, and checked for damage. They were transported on ice to the laboratory, where they were immediately stored in a cold chamber at -86°C for chemical and biochemical analyses, or in a buffered solution of 4% formalin for histological analyses. After being transported to the laboratory, ormers were measured and carefully dissected. The determination of the biometric indicators of the ormers was carried out by measuring the length and mass of the soft tissues and the shell. Due to the small size of the specimens, their individual tissues were not separated for analysis, so the results pertain to the entire soft tissue.

The hydrographic parameters of the sea were measured once a month through all the seasons. These parameters included sea temperature, salinity and dissolved oxygen, which are crucial for understanding changes in the green ormers environment.

The research in this study encompasses the basic chemical and fatty acid composition of the total tissue of the green ormer including tissue concentrations of magnesium (Mg), calcium (Ca), glucose (GLU), triglycerides (TRIG), and cholesterol (CHOL), as well as the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), total antioxidant status (TAS), and lipid peroxidation (MDA/TBARS). The fatty acids were analyzed and classified according to their saturation level as saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), polyunsaturated (PUFA), omega-3, and omega-6 fatty acids. The histological structures of the green ormer were also studied to better understand their reproductive cycle, and concentrations of trace elements in the tissues and shells of the green ormer were determined throughout the seasons of the year.

The research results indicate the impact of seasonal sea temperature changes on the homeostasis of the green ormer and shows significant variations in biochemical indicators, histological-morphological tissue structure, lipid peroxidation, and antioxidant capacity indicating that ormers exhibits self-regulatory processes to maintain stability under different seasonal conditions.

The moisture content in the green ormer tissues was highest during the summer months, correlating with lower values for other parameters. Conversely, the highest levels of raw fats were observed in autumn and winter, while raw proteins and ash peaked in spring, indicating distinct metabolic shifts throughout the year. The decline in fat and protein content during summer, particularly in the reproductive season, suggests a potential allocation of resources towards reproduction.

The highest soft tissue and shell mass was recorded in spring, while the mass of digestive glands and muscles peaked in winter due to increased food availability from autumn to winter. Seasonal changes also affected the reproductive cycle, with active stages in spring and summer and gametogenic maturity and partial spawning in autumn. The basic chemical composition of tissues varied seasonally, with no significant differences between sexes.

Biochemical analyses revealed seasonal variations in metabolites, lipids, electrolytes, and antioxidant activities. Electrolyte concentrations peaked in autumn, while other parameters reached their highest values in the summer. Antioxidant activities showed seasonal fluctuations, with superoxide dismutase (SOD) exhibiting higher levels in summer and lactate dehydrogenase (LDH) and total antioxidant status (TAS) peaking in spring. Lipid peroxidation (TBARS) levels were highest during autumn in males and summer in females, possibly linked to reproductive stress.

Fatty acid composition of the tissues showed seasonal and gender differences, with some fatty acids showing higher concentrations in males during warmer months and other fatty acids showing higher concentrations in females. This adaptation is likely related to membrane fluidity adjustments in response to temperature changes.

Furthermore, concentrations of trace elements and macroelements varied seasonally, with higher levels of Ba, Co, Ni, Mn, Pb, Sb, and Se in winter, while As peaked in summer. Due to its high bioaccumulation potential, the European green ormer is valuable for studying environmental contamination.

The study provides valuable insights into the seasonal dynamics and physiological adaptations of the green ormer in the northern Adriatic Sea, essential for their management and potential aquaculture applications. The results show significant seasonal variation in physiological and biochemical parameters and emphasize the importance of further research for understanding the ecology of the species and improving its conservation efforts.

Key words: green ormer, tissues, biochemical indicators, temperature stress, fatty acid properties, chemical composition of tissues and shells, seasonality

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja.....	3
1.1.1. Hipoteze.....	3
1.1.2. Ciljevi	3
2. PREGLED RELEVANTNE LITERATURE	4
2.1. Biološke i ekološke značajke petrovog uha <i>Halotis tuberculata</i> (Linnaeus, 1758) 4	
2.2. Značajke istraživane područja.....	8
2.3. Biokemijski sastav mekih tkiva petrovog uha	10
2.4. Masnokiselinski sastav mekih tkiva petrovog uha	11
2.5. Oksidativni stres i antioksidativni odgovor tkiva petrovog uha	12
2.6. Uzgoj petrovog uha.....	13
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Uzorkovanje petrovog uha	18
3.2. Mjerenje osnovnih hidrografskih parametara mora	19
3.3. Biometrija petrovog uha	20
3.4. Određivanje kemijskog sastava petrovog uha	20
3.4.1. Osnovni kemijski sastav	20
3.4.2. Koncentracija elemenata u tragovima i makroelementa u ljušturi i mekim tkivima.....	21
3.5. Analize biokemijskih pokazatelja tkiva	23
3.5.1. Biokemijske analize mekih tkiva	24
3.5.2. Analize antioksidativnog kapaciteta	24
3.6. Određivanje ukupnih lipida	27
3.7. Određivanje masnokiselinskog sastava petrovog uha.....	27
3.8. Histološki prikaz građe tkiva petrovog uha	28
3.9. Statistička obrada podataka	29

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	30
4.1. Osnovni hidrografski parametri	30
4.2. Biometrijski parametri	31
4.3. Kemijski sastav mekih tkiva i ljuštura	35
4.4. Biokemijski pokazatelji	47
4.5. Masnokiselinski sastav	52
4.6. Histološka građa	68
5. RASPRAVA.....	71
6. ZAKLJUČCI.....	82
7. POPIS LITERATURE	84
8. ŽIVOTOPIS	98

Popis kratica

AA Arahidonska kiselina

Al aluminij

As arsen

Ba barij

Be berilij

BHT butilirani hidroksitoluen

Bi bizmut

Ca kalcij

CaCO₃ kalcijev karbonat

Cd kadmij

CHOL kolesterol

Co kobalt

Cr krom

Cs cezij

Cu bakar

DPA Dokoza-pentaenska kiselina

EPA Eikoza-pentaenska kiselina

F ženka

Fe željezo

g gram

GA Gadoleinska kiselina

GLU glukoza

GPx glutation peroksidaza

H. tuberculata *Halictis tuberculata*

H₃BO₃ borna kiselina

HA Heptadekanska kiselina

HCl klorovodična kiselina

HF fluorovodična kiselina

HNA Henekosanska kiselina

HNO₃ dušična kiselina

Hz herc

IRB Institut Ruđer Bošković

K kalij

KW Kruskal-Wallis test
LA Linolna kiselina
LC-PUFA dugolančana višestruko nezasićena masna kiselina
LDH enzim laktat-dehidrogenaza
Li litij
LP lipidni peroksid
M mužjak
MA Miristinska kiselina
MDA malondialdehid
Mg magnezij
mm milimetar
mM milimol
Mn mangan
Mo molibden
MUFA jednostruko nezasićena masna kiselina
mV milivolt
n-3/6/9 omega-3/6/9
Na natrij
Ni nikal
OA Oleinska kiselina
P fosfor
PA Palmitinska kiselina
Pb olovo
PDA Pentadekanska kiselina
PO Palmitoleinska kiselina
PUFA višestruko nezasićena masna kiselina
Rb rubidij
ROS reaktivni kisikov spoj
S sumpor
SA Stearinska kiselina
Sb antimon
Sc skandij
SD standardna devijacija
Se selen

SFA zasićena masna kiselina

Sn kositar

SOD superoksid dismutaza

Sr stroncij

sur. suradnici

TAS ukupni antioksidativni status

TBARS reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline

TCA triklor-octena kiselina

Ti titan

TRIG trigliceridi

U uran

V vanadij

VA Vakcenska kiselina

Y itrij

Zn cink

μL mikrolitar

ω omega

Popis tablica

Tablica 1. Taksonomski položaj petrovog uha

Tablica 2. Prosječne maksimalne i minimalne vrijednosti temperature sjevernog Jadranskog mora, kod zapadne Istre u blizini mjesta uzorkovanja, zabilježene u rasponu od osam desetljeća. Preuzeto iz Bićanić i Baković (2000)

Tablica 3. Razdioba uzoraka petrovog uha (*H. tuberculata*) prema spolu i godišnjim dobima (n = 135)

Tablica 4. Temperatura, salinitet i otopljeni kisik mora kroz godišnja doba, mjererni u blizini mjesta uzorkovanja *H. tuberculata*. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)

Tablica 5. Biometrija mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba, izmjerena nakon uzorkovanja (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD))

Tablica 6. Kemijski sastav mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)), kao postotak sastava

Tablica 7. Koncentracija elemenata u tragovima (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)) iz mekih tkiva i ljuštire *H. tuberculata* kroz dva temperaturna ekstrema (ljetu i zimu), u mužjaka (M) i ženki (F)

Tablica 8. Koncentracija makroelemenata (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)) iz mekih tkiva i ljuštire *H. tuberculata* kroz dva temperaturna ekstrema (ljetu i zimu), u mužjaka (M) i ženki (F)

Tablica 9. Parametri biokemijskih pokazatelja mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD))

Tablica 10. Parametri antioksidativne obrane mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)).

Tablica 11. Sastav masnih kiselina mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)), kao postotak ukupnih masnih kiselina

Popis slika

Slika 1. Geografska rasprostranjenost petrovog uha (izvor: Mgaya i Mercer, 1994)

Slika 2. Petrovo uho iz Jadranskog mora

Slika 3. a. Dorzalni pogled na puža (*Haliotis*) nakon uklonjene ljušture; b. probavni sustav puža (*Haliotis*) (preuzeto s: <https://www.fao.org/4/v7050e/v7050e.pdf>)

Slika 4. Prikaz masnih kiselina prema stupnju zasićenosti; izvor: people2people (preuzeto s: <https://people2people.hr/kemijska-struktura-masti-i-ulja/>; 12.04.2024.)

Slika 5. Svjetska akvakulturna proizvodnja petrovog uha i glavni proizvođači (izvor: Nguyen i sur., 2022)

Slika 6. Uzgoj petrovog uha korištenjem integriranog uzgojnog sustava s biofilterom (petrovo uho / morske alge). Isprekidane crtice prikazuju recirkulaciju dušika unutar sustava (izvor: Neori i sur., 1998)

Slika 7. Karta istraživanog područja. Tamnoplavom bojom označena je podribolovna zona A4 na području koje su uzorkovani *H. tuberculata* za daljnje analize (Slika izrađena kombinacijom materijala sa sljedećih web stranica: <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/dodatni/412336.pdf> i <https://hr.maps-croatia.com/>)

Slika 8. Sonda i refraktometar za mjerenje hidrografskih parametara mora

Slika 9. Slikovni prikaz Kjeldahlove metode; izvor: Byjus (preuzeto s: <https://byjus.com/chemistry/kjeldahl-method/>; 05.03.2024.)

Slika 10. Instrument za mjerenje koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata; izvor: ThermoFisher Scientific; Element™ Series HR-ICP-MS (preuzeto s: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAAMFABWMAFC>; 12.03.2024.)

Slika 11. a. Kriomlin Freezer/MII*6875; b. uzorci petrovog uha pripremljeni za homogenizaciju u kriomlinu

Slika 12. Analizator za mjerenje biokemijskih pokazatelja tkiva Architect c4000

Slika 13. Višemodalni čitač mikroploča Infinite® 200 PRO

Slika 14. Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC sustav; izvor: Santa Clara, CA, SAD

Slika 15. Priprema histoloških preparata za rezanje na mikrotomu

Slika 16. Mjesečne oscilacije temperature mora (°C) u blizini mjesta uzorkovanja petrovog uha (*H. tuberculata*) u sjevernom Jadranu. Temperatura je mjerena na 5, 7 i 10 m dubine.

Slika 17. *Boxplot* distribucija vrijednosti dužinsko-masениh parametara ljušture i mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu

Slika 18. *Boxplot* distribucija vrijednosti osnovnog kemijskog sastava mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu

Slika 19. Korelogram osnovnog kemijskog sastava i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*

Slika 20. *Boxplot* distribucija vrijednosti elemenata u tragovima i makroelemenata iz ljušture *H. tuberculata* kroz ljeto i zimu, prema spolu. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

Slika 21. *Boxplot* distribucija vrijednosti elemenata u tragovima i makroelemenata iz mekih tkiva *H. tuberculata* kroz ljeto i zimu, prema spolu. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

Slika 22. Korelogram elemenata u tragovima i makroelemenata iz ljušture i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

Slika 23. Korelogram elemenata u tragovima i makroelemenata iz mekih tkiva i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

Slika 24. *Boxplot* distribucija vrijednosti biokemijskih parametara i parametra lipidne peroksidacije mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu. Mjerene vrijednosti izražene su kao U/g proteina za SOD, GPx, LDH, kao mmol/L proteina za TAS, te kao mg/g tkiva za TBARS.

Slika 25. Korelogram biokemijskih parametara antioksidativnog kapaciteta, parametra lipidne peroksidacije i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola i sezone. Mjerene vrijednosti izražene su kao U/g proteina za SOD, GPx, LDH, kao mmol/L proteina za TAS, te kao mg/g tkiva za TBARS.

Slika 26. Prosječne vrijednosti, interakcije i trend kretanja masnokiselinskih vrijednosti mekih tkiva *H. tuberculata*, kroz godišnja doba, prema spolu

Slika 27. *Boxplot* distribucija vrijednosti relativnog udjela masnih kiselina *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu

Slika 28. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola i sezone

Slika 29. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava i dužinsko-masениh parametara ženki *H. tuberculata*, nezavisno od sezone

Slika 30. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava i dužinsko-masениh parametara mužjaka *H. tuberculata*, nezavisno od sezone

Slika 31. Korelogram masnokiselinskog sastava i dužinsko-masenih parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, u proljeće

Slika 32. Korelogram masnokiselinskog sastava i dužinsko-masenih parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, ljeti

Slika 33. Korelogram masnokiselinskog sastava i dužinsko-masenih parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, u jesen

Slika 34. Korelogram masnokiselinskog sastava i dužinsko-masenih parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, zimi

Slika 35. *Boxplot* distribucija svih mjerenih vrijednosti biokemijskih parametara (plavo), osnovnog kemijskog sastava (žuto), masnokiselinskog sastava (sivo) i sadržaja metala, odn. elemenata u tragovima i makroelemenata (crveno) mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema dužinsko-masenim vrijednostima ljuštura i tkiva, nezavisno od spola

Slika 36. Korelogram biokemijskih parametara antioksidativnog kapaciteta, parametra lipidne peroksidacije, osnovnog kemijskog sastava, masnokiselinskog sastava i dužinsko-masenih parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola i sezone, s naznačenim pozitivnim (plavo) i negativnim (crveno) Spearmanovim koeficijentima korelacije koji su izostavljeni ako nisu bili značajni nakon primjene Bonferronijeve prilagodbe p vrijednosti

Slika 37. Prikaz histološko-morfoloških presjeka tkiva gonada i probavne žlijezde *H. tuberculata*. Prvi red (A,B) označava proljeće i ljeto, drugi red (C,D), jesen, i treći red (E,F) zimu

Slika 38. Zrelost gonada i sezonski gametogeni ciklus *H. tuberculata*

1. UVOD

Morski organizmi iz koljena Mekušaca imaju veliku važnost u akvakulturi zbog svog biokemijskog sastava i prehrambene vrijednosti (Linehan i sur., 1999). Petrovo uho *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) član je porodice *Haliotidae*, reda *Archaeogastropoda*. Prodisca *Haliotidae* ima jedan rod (*Haliotis*) sa 70 vrsta, ali petrovo uho (*ormer*) jedina je vrsta iz porodice *Haliotidae* koja se komercijalno uzgaja u Europi (Mgaya i Mercer, 1994.). Također je ekološki i ekonomski važan mekušac (puž) koji hranu nalazi u morskom ekosustavu, no isto tako je i zanimljiva poslastica za ljude (Cook, 2016). Zbog promjena u okolišu kao što su pojava bolesti i globalno zagrijavanje, kao i prekomjerni ribolov, mnoge vrste roda *Haliotis* doživjele su pad populacije diljem svijeta (Travers i sur. 2009). Iako su značajna sredstva uložena u osnivanje i širenje uzgajališta diljem Europe, europsku proizvodnju je tek potrebno definirati. Nažalost, još uvijek postoje određene tehničke prepreke za proizvodnju održivih juvenilnih ili odraslih stadija. Stalni porast proizvodnje akvakulture petrovog uha diljem svijeta stvorio je sve veći interes za primjenu novih tehnologija za njegovu akvakulturu (Mgaya, 1995).

Uz široku funkcionalnu i taksonomsku raznolikost, mekušci u morskom okolišu značajni su kao grabežljivci, filtratori, biljojedi, strvinari i plijen. Svojim djelovanjem osiguravaju i transformiraju staništa i poboljšavaju kvalitetu vode za druge vrste. Njihov ulov i dalje raste, a na njega mogu ozbiljno utjecati pridrena koća i uznemiravanje staništa (Eddy i sur., 2016). U sjevernom Jadranu od ovakvih aktivnosti posebno je ugroženo petrovo uho. Petrovo uho pojavljuje se u količinama koje se mogu komercijalno koristiti samo na britanskim Kanalskim otocima (Mgaya i Mercer, 1994). Zbog jaružanja bentosa u sjevernom Jadranu, njihova populacija suočava se s padom (Starić, 2019).

Dosadašnja istraživanja lipida morskih organizama pokazuju da masnokiselinski sastav ovisi o mnogim biološkim i okolišnim čimbenicima, poput vrste hrane i temperature mora (Linehan i sur., 1999). U ovom istraživanju ukupni lipidi dodatno su razdvajani na pojedine frakcije, te je u njima određivan masnokiselinski sastav kako bi se što preciznije odredio fiziološki status kroz sezone. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o antioksidativnom statusu tkiva petrovog uha na ovom prostoru. Dodatno su određeni i omjeri pojedinih masnih kiselina kao važan čimbenik koji doprinosi kvaliteti potencijalno uzgajanih organizama i omogućava bolje razumijevanje metaboličkih puteva sinteze masnih kiselina, a varijabilnost ovih omjera uvjetovana je promjenama u okolišu. Zadatak je, pored navedenog, bio po prvi put odrediti i aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-reduktaze

(GPx), te koncentraciju lipidnih peroksida (LP) i malondialdehida (MDA) u tkivu petrovog uha, koji pružaju uvid u stupanj oksidativnog stresa kroz sezone u godini. Praćeno je u kojoj mjeri abiotički i biotički čimbenici utječu na promjene u lipidnom i biokemijskom sastavu, te na razinu oksidativnog stresa petrovog uha. Hrana iz mora, uključujući i mekušce, glavni je izvor n-3 PUFA kiselina za ljudsku prehranu. Za ove masne kiseline već je dokazano da imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje i smanjenje rizika od povišenog krvnog tlaka i triglicerola u krvi, te mnogih drugih bolesti (Delaš, 2011). Podaci dobiveni u ovom istraživanju pružit će korisne informacije za akvakulturnu industriju petrovog uha kao i za prehrambene navike potrošača. Za očekivati je da će rezultati ove disertacije doprinijeti boljem razumijevanju utjecaja okolišnih čimbenika na biokemijski sastav i sastav masnih kiselina lipidnih frakcija, te dati uvid u antioksidativni status petrovog uha kroz godišnji ciklus, što je prvi korak u utvrđivanju povezanosti vanjskih utjecaja na kvalitetu mesa i zdravlje ovih organizama. Rezultati ovog istraživanja također prikazuju varijabilnost antioksidativnog statusa tijekom godine na referentnom mjestu bez zagađenja, hranjivu vrijednost školjkaša, razdoblje najpogodnije za njihovu konzumaciju, te pridonose znanju koje može poslužiti u kontroliranoj proizvodnji i optimizaciji uzgoja ove vrste u budućnosti.

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

1.1.1. Hipoteze:

1. Sezona utječe na kemijske i biokemijske pokazatelje u tkivu petrovog uha
2. Sezona utječe na status lipida i masnih kiselina u tkivu petrovog uha
3. Sezona utječe na histološko-morfološke karakteristike tkiva petrovog uha
4. Sezona utječe na zastupljenost elemenata u tragovima u tkivu petrovog uha

1.1.2. Ciljevi:

1. U tkivu petrovog uha oba spola, testirat će se utjecaj sezona na kemijske i biokemijske pokazatelje (osnovni kemijski sastav, koncentracija metabolita, proteina/enzima, elektrolita, antioksidativnog kapaciteta)
2. U tkivu petrovog uha oba spola, testirat će se utjecaj sezona na status lipida i masnih kiselina (zasićene, mononezasićene, višestruko nezasićene, omega-3 i omega-6 masne kiseline)
3. U tkivu petrovog uha oba spola, testirat će se utjecaj sezona na histološko-morfološke karakteristike
4. U tkivu petrovog uha oba spola, testirat će se utjecaj sezona na elemente u tragovima i makroelemente u mekom tkivu i ljušturi

2. PREGLED RELEVANTNE LITERATURE

2.1. Biološke i ekološke značajke petrovog uha *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758)

Petrovo uho (*Haliotis tuberculata*) je sjeveroistočnoatlantska i mediteranska vrsta morskog puža, obalnog morskog gastropodnog mekušaca iz porodice Haliotidae i roda puževa (*Haliotis*) (Tablica 1.).

Tablica 1. Taksonomski položaj petrovog uha

Skupina	Naziv
Koljeno	Mollusca
Razred	Gastropoda
Podrazred	Vetigastropoda
Red	Lepetellida
Porodica	Haliotidae
Rod	<i>Haliotis</i>
Vrsta	<i>Haliotis tuberculata</i> (Linnaeus, 1758)

Petrovo uho je rasprostranjeno u Sredozemnom moru i sjevernoatlantskom području (od Kanarskih otoka do La Manchea) (Coleman i Vacquier, 2002). Gustoće su najveće na najsjevernijem kraju njegovog areala (Clavier, 1992), (Slika 1.). Ribolov petrovog uha ima mnogo manji utjecaj na populacije ove vrste u Europi nego u azijskim zemljama. U Francuskoj i Španjolskoj njihova je populacija bila prekomjerno iskorištavana, što je dovelo do zabrane ribolova 1973. godine (Mgaya i Mercer, 1994.). Mlade i odrasle jedinke obično se nalaze u plićim vodama do 8 m dubine, na stijenama obraslim korovom i kamenim gromadama. Iako su zabilježene migracije od nekoliko stotina metara kroz različite podloge (Werner, 1993), ova vrsta preferira čvrsto dno.



Slika 1. Geografska rasprostranjenost petrovog uha (izvor: Mgaya i Mercer, 1994)

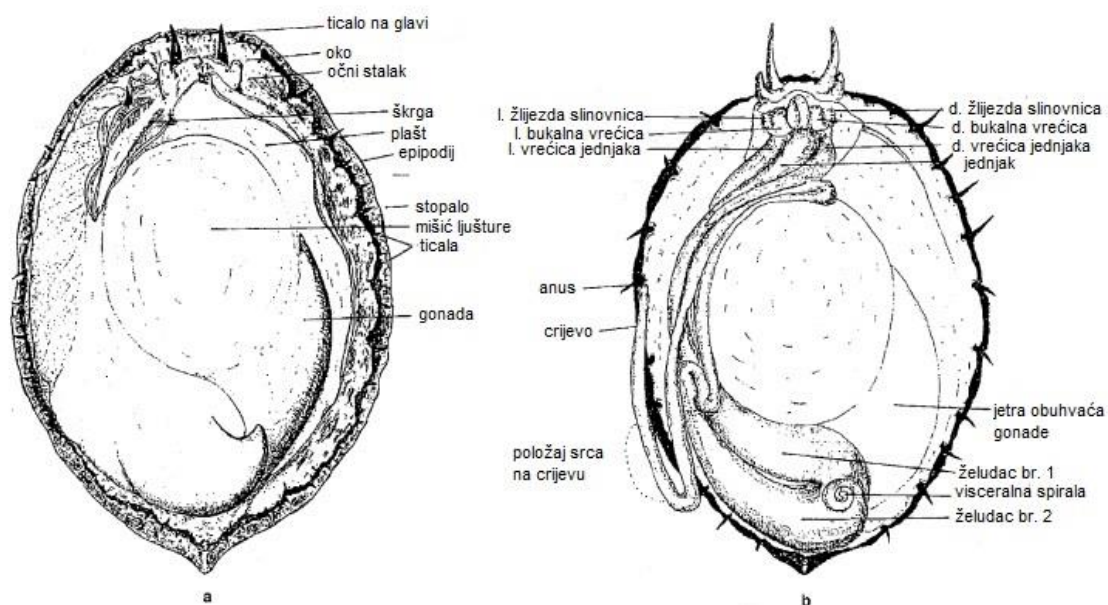
Petrovo uho je ekonomski i ekološki važna morska vrsta jer osigurava izvore hrane za druge vrste i stoga doprinosi ravnoteži ekosustava. Organizmi koji žive na dnu pod jakim su utjecajem mikroklimatskih uvjeta i karakteristika vodene mase (Clark i sur., 2020). Ljetni toplinski valovi smatraju se najvećom prijetnjom mekušcima (Rodrigues i sur., 2015). Za ektotermne životinje kao što je petrovo uho, temperatura je najvažniji parametar koji utječe na distribuciju. Maksimalni rast javlja se na temperaturi od 20 °C. Slabije rastu i hrane se na nižim temperaturama (Peck, 1989) i ugibaju ako su duže vrijeme izloženi temperaturama ispod 4 °C (LaTouche i sur., 1993). Razlike u salinitetu ne utječu značajno na njihovu gustoću naseljenosti. Stoga mogu tolerirati područja slane vode (Fretter i Graham, 1962) do povećanja saliniteta od 24‰ (Peck 1983).

Glavno obilježje petrovog uha je okrugla, spljoštena i izdužena ljuštura u obliku uha koja štiti meko tijelo. Oklop je izbušen s 5-7 rupica (Slika 2.) duljine do 9 cm i širine do 6,5 cm (Avant, 2007). Boja oklopa varira od crvene do sivkaste ovisno o okolišu i vrsti alge kojom se hrani. S vanjske strane mogu se vidjeti valoviti spiralni grebeni odvojeni brazdama koji označavaju linije rasta. Dorzalni dio velikog mišićavog stopala okružen je epipodijem koji je prekriven malim osjetilnim organima i ticalima (Graham, 1988). U ustima se nalazi nazubljena radula za drobljenje hrane. Čunjasti dodatak je spolna žlijezda koja obavlja probavnu žlijezdu i nalazi se

u stražnjoj polovici između ljuske i stopala (Slika 3.). Boja mu varira od zelene do sivkaste, sa zakrivljenim stopalom.



Slika 2. Petrovo uho iz Jadranskog mora



Slika 3. a. Dorzalni pogled na puža (*Haliotis*) nakon uklonjene ljuštore; b. probavni sustav puža (*Haliotis*) (preuzeto s: <https://www.fao.org/4/v7050e/v7050e.pdf>)

Pelagičko-bentoski životni ciklus petrovog uha čini ga vrlo osjetljivim na promjene u okolišu, budući da uključuje stadij planktona ličinke, a zatim kritičnu metamorfozu u bentoski juvenil (Hensey, 1993). Mriješćenje i naseljavanje ličinki događa se tijekom kratkog ljetnog razdoblja oko kolovoza do rujna. Tijekom ove tople sezone temperatura vode je blizu maksimuma i protok vode je smanjen. Prince i suradnici (1987) sugeriraju da odrasle populacije vjerojatno odabiru uvjete slabog kretanja vode za mrijest kako bi smanjile raspršivanje gameta i ličinki. Petrovo uho ima lecitotrofična jaja koja su znatno teža od vode. Aktivno plivajuće mlade jedinke sastavni su dio planktona. Planktonska faza ove vrste uglavnom je kratka i traje samo 4-5 dana (Koike, 1978). Temperatura snažno utječe na naseljavanje ličinki; što je niža, to je dulji prijelaz u bentosku fazu (Forster i sur., 1982). Mlade jedinke žive u područjima zaštićenim od prevladavajućih plimnih struja, no odrasle jedinke se mogu naći i u nezaštićenim područjima (Clavier i Chardy, 1989). Temperatura najviše određuje njihovo ponašanje tijekom mrijesta, budući da se njihov reproduktivni vrhunac događa kratko u kasno ljeto kada temperatura vode dosegne svoj maksimum (Mgaya i Mercer, 1994).

Petrovo uho je dvodomna gonohorična životinja. Razlika među spolovima vidi se po čunjastom dodatku na desnoj strani ljušture. Spolne žlijezde su različito obojene; mužjaci su krem ili prljavobijeli sa zelenkastom nijansom, dok su ženke obično tamnozelenene s različitim nijansama sivo-zelene. Međutim, nakon mriještenja, spolne žlijezde obaju spolova su krem boje, što onemogućuje vizualno razlikovanje spolova (Forster, 1962). Također nema razlika među spolovima u izgledu ljušture. Vrijeme spolne zrelosti u otvorenim vodama varira od mjesta do mjesta, ali općenito mužjaci postaju spolno zreli ranije od ženki (Mgaya i Mercer, 1994). I mužjaci i ženke ispuštaju spolne stanice izravno u morsku vodu. Plodnost je vrlo visoka, a utvrđeno je da postoji linearna veza između duljine ljušture i plodnosti (Sluczanowski, 1986).

Promjer neoplođenog jajašca je oko 180 μm , dok je oplođeno jajašce promjera 210 μm . Vrijeme potrebno da se ličinka izleže iz opne jajeta ovisi o temperaturi vode i iznosi oko 13 sati pri temperaturi od 20 ± 1 °C. Zametak se klasificira kao ličinka trohofora kada se formira stomodeum i kada su resice potpuno razvijene duž prototrohalnog pojasa (Fretter i Graham, 1964), kada apikalna regija postane ravna, a velum potpuno razvijen s dugim resicama. Ličinke trohofora postaju veligeri kada apikalna regija postane ravna, a velum potpuno razvijen s dugim trepetljikama. To se događa unutar 35-41 sata nakon oplodnje. Veligerove ličinke počinju se naseljavati nakon četiri do pet dana, a zatim odmah koriste nazubljenu radulu za čišćenje bentoske biote. Nakon tri godine dostižu veličinu od oko 45 mm, što ukazuje na prilično spor

rast. Petrovo uho živi do petnaest ili više godina i dostiže duljinu do najviše oko 12,3 cm (Peck, 1989).

Petrovo uho je biljojed i pripada skupini organizama koji se nazivaju holobionti. Ima specifičnu mikrobiotu u probavnom sustavu s kataboličkim sposobnostima razgradnje složenih komponenti hrane. Ovo je dobro proučeno kod velikih kopnenih biljojeda, ali ne i kod morskih organizama. Petrovo uho prvenstveno se hrani crvenim, zelenim i smeđim makroalgama, koje sadrže specifičan sastav složenih polisaharida i epifitsku mikrobiotu. Gobet i suradnici (2018) utvrdili su da se probavna mikrobiota uha mijenja s monospecifičnom ishranom algama, pri čemu mikrobiotom dominiraju rodovi *Mycoplasma* i *Vibrio* u probavnoj žlijezdi. Njihova distribucija povezana je s optimalnom opskrbom plutajućim algama nošenim strujama. Količina takvih plutajućih algi određuje veću gustoću petrovih uha na mjestima gdje je stanište prikladno (Clavier i Chardy, 1989).

Hranjenje i kretanje petrovog uha odvija se uglavnom noću i smanjuje se s nižim temperaturama (Mottet, 1978). Kada se hrani, obično je neaktivno, čekajući lebdeće alge. Prehrana mladih organizama je inkrustacija koraljnih algi i povezanih epibiota. Odrasle jedinke preferiraju alge poput vrsta: *Palmaria palmata*, *Delesseria*, *Griffithsia*, *Laminara* spp, *Ulva lactuca*, *Chondrus crispus* i *Enteromorpha intestinalis* (Mercer i sur., 1993). Petrovo uho može konzumirati do 39% svoje težine u morskoj travi dnevno (Mottet, 1978).

Preferirana staništa petrovog uha su ona koja omogućuju optimalno prianjanje stopala kako bi se izbjegli grabežljivci i olakšalo kretanje zbog valova i morskih struja. To su stjenovita sublitoralna područja s brojnim pukotinama i izbočinama u stijenama, a posebno na podlozi velikih stijena na pjeskovitim podlogama (Forster i sur., 1982). U takvim su područjima dobro zaštićena od predatora i izravne svjetlosti.

2.2. Značajke istraživanog područja

Sjeverni Jadran karakterizira niska prosječna dubina (30 m) i slab batimetrijski gradijent. Plitki šelf sjevernog Jadrana ima obilježja kontinentalnog mora s malim dubinama u prosjeku 35 m, intenzivnim kretanjima vodenih masa i jakim klimatskim utjecajem. Najvažniji oceanografski čimbenici koji utječu na staništa beskralješnjaka u Jadranu su sezonski salinitet, koncentracija hranjivih tvari, intenzitet svjetlosti, struje i temperatura. Najrelevantniji riječni priljev potječe iz rijeke Po, koja utječe na obrazac cirkulacije mora (Maicu i sur., 2018). Ta najveća rijeka ovog područja značajan je izvor hranjivih tvari u sjevernojadranskom području (Polimene i sur., 2006). Rasprostranjenost fitoplanktona u sjevernom Jadranu ovisi o

oborinama i otapanju snijega u Alpama, te dotoku hranjivih tvari u rijeku Po. Proljetni maksimum dotoka rezultat je otapanja snijega, dok je jesenski maksimum u korelaciji s godišnjom količinom oborine (Viličić, 2014). Sezonske promjene oceanografskih čimbenika, uključujući temperaturu, alge i kretanje valova, uvelike utječu na rast i fiziologiju petrovog uha (Mgaya, 1995).

U sjevernom Jadranu sezonske varijacije temperature prodiru sve do dna budući da cijeli vodeni stupac pokazuje evidentan sezonski toplinski ciklus. Međutim, tijekom čitave godine prevladavaju uvjeti dobro izmiješanog kisika (Artegiani i sur., 1997). Slojevitost njegovog vodenog stupca uključuje površinski i donji sloj. Dugogodišnja mjerenja pokazuju da su najniže i pridnene i površinske temperature sjevernog Jadrana u veljači. Najvišu površinsku temperaturu more ima u kolovozu, a najvišu pridnenu u listopadu (Bićanić i Baković, 2000). Izrazita termoklina u proljeće i ljeto doseže dubinu od 30 m, ali hlađenje počinje blizu površine u jesen kada temperatura dna dosegne maksimalnu vrijednost. Zimi dolazi do hlađenja čitavog vodenog stupca i termoklina se smanjuje sve do dna (Artegiani i sur., 1997).

Oscilacije sezonskih svojstava morske vode također mogu negativno utjecati na fiziologiju, odgovor na stres i, u konačnici, na opstanak petrovog uha u sjevernom Jadranu (Velez i sur., 2016). Nije zabilježena reakcija tkiva na sezonske varijacije kod petrovog uha u sjevernom Jadranu. Kako njihove biološke reakcije uključuju brzi odgovor na stres (Lau i Wong, 2003), idealni su pokazatelji dugoročnih ekoloških učinaka na beskralježnjake (Babić i sur, 2016).

Na području sjevernog Jadrana provedena su dugotrajna mjerenja temperature morske vode između 1909. i 1990. godine. Višegodišnje oscilacije temperature prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Prosječne maksimalne i minimalne vrijednosti temperature sjevernog Jadranskog mora, kod zapadne Istre u blizini mjesta uzorkovanja, zabilježene u rasponu od osam desetljeća. Preuzeto iz Bićanić i Baković (2000).

Maksimalna. površinska temperatura (°C)	Minimalna površinska temperatura (°C)	Maksimalna pridnena temperatura (°C)	Minimalna. pridnena temperatura (°C)	Apsolutna maksimalna temperatura (°C)	Apsolutna minimalna temperatura (°C)
23,78 kolovoz	8,41 veljača	16,88 listopad	8,91 veljača	26,33 kolovoz	0,77 veljača

2.3. Biokemijski sastav mekih tkiva petrovog uha

Biokemijski sastav mekih tkiva morskih puževa nije stalan, nego se mijenja ovisno o vrsti, hidrografskim prilikama i uvjetima prehrane u sredini u kojoj žive, vremenu sazrijevanja spolnih organa, sezoni mriještenja, starosti i veličini, te zdravstvenom stanju samih jedinki. Najzastupljenije makromolekule unutar suhe tvari (lipidi-masti, glikogen i proteini-bjelančevine) imaju važnu ulogu biokemijskih rezervi u tijeku procesa stvaranja gameta i nestašice hrane. Morski organizmi često su izloženi varijacijama u dostupnosti hrane, posebno oni od umjerenih do hladnih geografskih širina, gdje se tijekom godišnjeg ciklusa javljaju značajne temperaturne oscilacije. Temperatura izravno utječe na dostupnost i sastav hrane unutar trofičke mreže. Stoga su morske životinje u stanju preživjeti duga razdoblja gladovanja, kao i prilagoditi svoj metabolizam i sastav tijela promjenjivoj okolini (Hernández i sur., 2013).

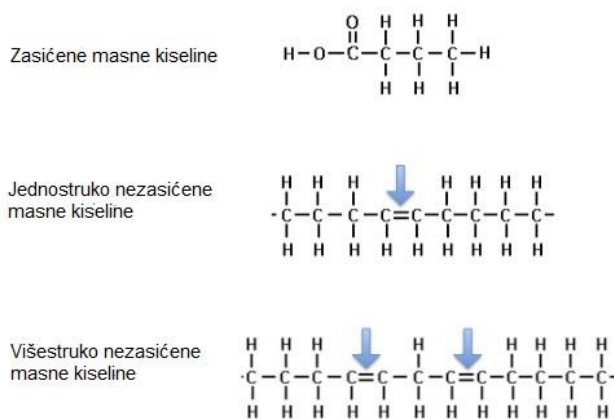
Promjene u biokemijskom sastavu mekih tkiva mogu biti pokazatelji energetskog metabolizma potrebnog za životni ciklus mekušaca, posebice za preživljavanje, rast i razmnožavanje (Lodeiros i sur., 2001; Sifi i Soltani, 2018). Glavni biokemijski pokazatelji u tkivima su glukoza (GLU), trigliceridi (TRIG) i kolesterol (CHOL). Koncentracije GLU u tkivima pohranjene su u obliku glikogena te zajedno s proteinima sudjeluju u stvaranju reproduktivnih organa i proliferaciji gameta. Prije gametogenze, energija u obliku glikogena, proteina i lipida (u obliku triglicerida) pohranjuje se u probavilu (Martínez-Pita i sur., 2012). Kolesterol je glavni sterol u gonadi, probavilu i mišiću mekušaca (Palacios i sur., 2007).

Utvrđena je otpornost petrovog uha na nedostatak hrane i zaključeno da metabolizam mladog petrovog uha nakon dugog razdoblja gladovanja može sačuvati lipide kako bi zaštitio svoje membrane, koristeći umjesto toga bjelančevine i ugljikohidrate (Carefoot i sur., 1993). Mecer i suradnici (1993) procjenjivali su učinke različitih razina lipida u prehrani na preživljavanje, rast i sastav tkiva petrovog uha. Utvrđeno je da je sadržaj lipida mekog tkiva u pozitivnoj korelaciji s razinama lipida u prehrani. Obrnuto, koncentracije proteina mekog tkiva smanjuju se s povećanjem lipida u prehrani. Lipidi su osobito važne energetske rezerve morskih organizama (Arts i sur., 2001). Oni su glavni izvor energije za metabolizam, važan materijal za izgradnju staničnih membrana, sudjeluju u mnogim biokemijskim procesima, fiziologiji i reproduktivnom ciklusu mekušaca, te odražavaju specifične sezonske biotičke i abiotičke promjene u okolišu u kojem organizmi žive (Pázos i sur., 1997).

2.4. Masnokiselinski sastav mekih tkiva petrovog uha

Masne kiseline čine strukturne dijelove različitih vrsta lipida (Barišić, 2015), djeluju kao prekursori bioaktivnih molekula te utječu na osmoregulaciju, reprodukciju i odgovor na stres (Topić Popović i sur., 2012). Prva istraživanja masnih kiselina mekušaca, uglavnom školjkaša i puževa, provedena su sedamdesetih godina 20. stoljeća (Sajjadi i Eghtesadi-Araghi, 2011). Njihov masnokiselinski sastav ovisi o mnogim biološkom i okolišnim čimbenicima, poput vrste hrane i temperature mora (Linehan i sur., 1999).

Masne kiseline dijele se prema stupnju zasićenosti na zasićene masne kiseline - SFA, jednostruko nezasićene masne kiseline - MUFA i višestruko nezasićene masne kiseline - PUFA (Slika 4.), a većina pojedinačnih masnih kiselina pokazuje sezonske promjene, kako je ustanovljeno u tkivima drugih vrsta morskih puževa (Mateos i sur., 2010.). Prilikom mobilizacije lipida u gladovanju, petrovo uho može poštediti dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline (LC-PUFA) barem tijekom 90-dnevnog razdoblja gladovanja. Pojedine jedinke su uspjele povećati sadržaj polarnih lipida u 20:4n6, 20:5n3 i 22:5n3 u mišićnom tkivu, što ukazuje na njihovu sintezu unutar organizma (Durazo-Beltrán i sur., 2003). Većina studija o zahtjevima petrovog uha za masnim kiselinama provedena je korištenjem prirodne hrane; stoga je te rezultate teško protumačiti. Međutim, korištenjem formuliranih dijeta, Toledo-Agüero i suradnici (2009) sugeriraju niske potrebe za LC-PUFA, dok Xu i suradnici (2004) predlažu 1,5% ribljeg ulja za optimizaciju rasta, a Durazo-Beltrán i suradnici (2003) nisu pronašli razlike kada je riblje ulje zamijenjeno različitim biljnim uljima.



Slika 4. Prikaz masnih kiselina prema stupnju zasićenosti; izvor: People2people (preuzeto s: <https://people2people.hr/kemijska-struktura-masti-i-ulja/>; 12.04.2024.)

2.5. Oksidativni stres i antioksidativni odgovor tkiva petrovog uha

More je vrlo složen okoliš s višestrukim međudjelovanjem biotičkih i abiotičkih pokretača koji mogu značajno utjecati na homeostazu puževa, no na organizme koji žive na dnu uvelike utječu mikroklimatski uvjeti i svojstva vodene mase (Clark i sur., 2020). Ljetni toplinski valovi trenutno se smatraju najvećom prijetnjom za mekušce (Rodrigues i sur., 2015). Kako globalno zagrijavanje i eutrofikacija obalnih voda napreduju, hipoksija može natjerati mekušce da razviju toleranciju na stres iz okoliša i na nestašicu hrane (Marshall i McQuaid, 2020). Petrovo uho posebno je osjetljivo jer ima ograničene mogućnosti kretanja i rijetko se udaljava više od nekoliko stotina metara od svog mjesta naseljavanja (Clavier i Chardy, 1989).

Temperatura je najvažniji čimbenik za većinu metaboličkih procesa petrovog uha. Izvan svog optimalnog raspona temperature, ono prilagođava osnovne fiziološke funkcije za održavanje metabolizma (Morash i Alter, 2015). Pri povišenim metaboličkim zahtjevima može pokazivati znakove oksidativnog stresa, proizvoditi reaktivne kisikove spojeve (ROS) i aktivirati antioksidativne enzime (Sokolova i Pörtner, 2003). Ključne varijable koje određuju njihove reakcije na okoliš su temperatura i kisik (Topić Popović i sur., 2021).

Procjena njihovog antioksidativnog kapaciteta i peroksidacije lipida, kao što su ukupni antioksidativni status (TAS) i stvaranje reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS), vrijedni su alati za biomonitoring (Deschaseaux i sur., 2011). Osim toga, promjene u aktivnostima superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx) u mekušaca biomarkeri su antioksidativnih odgovora povezanih s oksidativnim stresom uzrokovanim prekomjernom proizvodnjom ROS-a tijekom njihovog staničnog metabolizma (Vosloo i sur., 2013). Tijekom njihovog životnog ciklusa također se očekuju promjene u biokemijskom sastavu, uglavnom povezane sa specifičnim zahtjevima stvaranja gameta, mriještenja i dostupnosti hrane povezane sa sezonskim fluktuacijama (Arranz i sur., 2021).

U procjeni stresa i drugih patofizioloških promjena, analiza biokemijskih svojstava tkiva i histopatološka analiza tkiva važni su čimbenici koji mogu pružiti informacije o stupnju stresa te metaboličkim, funkcionalnim i morfološkim poremećajima tkiva (Fazio i sur., 2013). Dobro je poznato da su čak i elementi u tragovima (metali) u tkivima mekušaca podložni sezonskim varijacijama. To može biti povezano s prehranom, promjenama u kvaliteti morskih struja ili dotoka rijeka, reproduktivnim ciklusom ili promjenama u veličini jedinki (Frías-Espericueta i sur., 1999), a isto je moguće i kod morskih puževa. Iako svi organizmi zahtijevaju male količine esencijalnih elemenata za svoje fiziološke aktivnosti, metali kao što su arsen, kadmij, živa ili olovo nisu ključni za metabolizam, i mogli bi biti toksični za morske organizme te predstavljati potencijalni rizik za ljudsko zdravlje (Torres i sur., 2020).

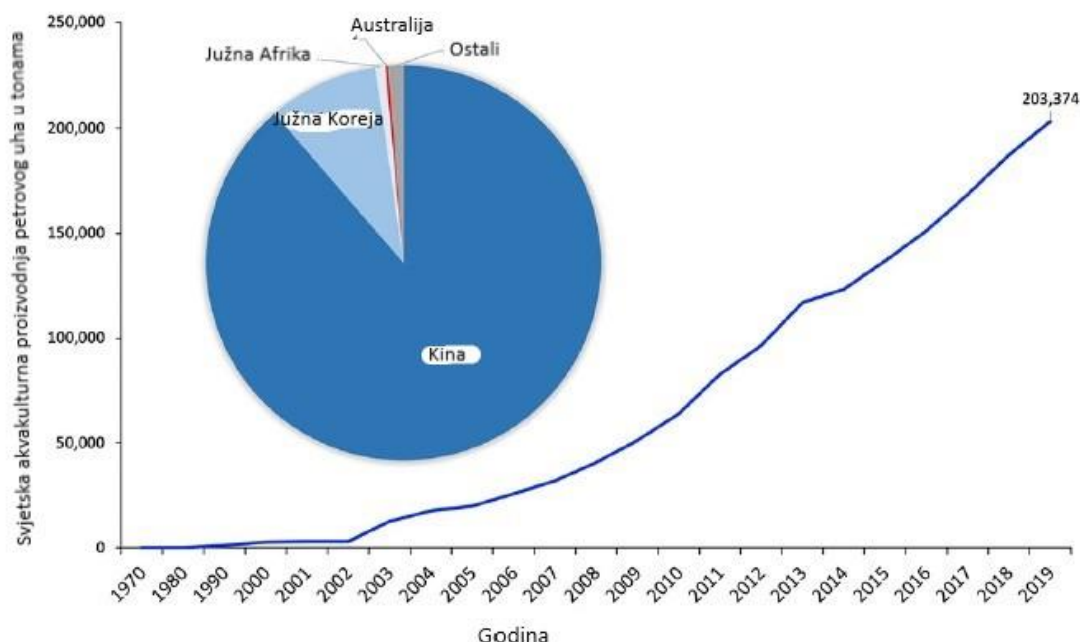
Petrovo uho koristi kalcijev karbonat (CaCO_3) za izradu svojih ljuštura i među beskralježnjacima najviše je ugroženo zakiseljavanjem mora. Zakiseljavanje mora i povezane promjene u kemiji karbonata u morskoj vodi prijeti opstanku organizama koji provode kalcifikaciju. Morski organizmi, kao što je petrovo uho, posebno su osjetljivi na promjene pH vrijednosti u svojim ranim fazama razvoja. To je posebno vidljivo u stopi preživljavanja ličinki, koja je bila značajno niža u zakiseljenim uvjetima u pokusu Wessela i sur. (2018). Zakiseljavanje dovodi do promijenjene biomineralne arhitekture, što rezultira lomljivijom ljušturicom. Zaključeno je da se metabolizam petrovog uha održava na nižem pH nauštrb rasta i cjelovitosti ljuske, što može predstavljati problem za akvakulturu (Avignon i sur., 2020).

2.6. Uzgoj petrovog uha

S obzirom na to da brojni pripadnici porodice Halitidae narastu do 25 cm, pogotovo oni koje se nalazi u hladnim obalnim vodama Novog Zelanda, južne Afrike, Australije, Japana te zapadne Sjeverne Amerike, oni su postali kulinarska delicija, a traženi su i radi velike dekorativne ljušture. Takvih velikih petrovih uha ima više od 100 vrsta, od kojih se njih 15 uzgaja, a čak 95% svjetske ponude petrovih uha dolazi iz akvakulture (Venter i sur., 2018). Za dostizanje tržišne veličine potrebno im je tri do četiri godine uzgoja. Najznačajnije velike vrste u akvakulturi su *H. midae*, *H. diversicolor supertexta* i *H. discus hannai* iz južne Afrike i Kine (Wu i Zhang, 2016).

Iako se proizvodnja povećava u mnogim zemljama, još uvijek postoje brojni problemi koje treba prevladati, kao što su bolesti petrovog uha poput virusnog ganglioneuritisa, spor rast, visoki troškovi proizvodnje, posebno za mlađ (Wu i Zhang, 2016). Sitnije petrovo uho cijenjeno je kao gastronomska delicija i u Europi, a uzgaja se u Portugalu i Francuskoj od ranih 2000-ih (Hannon i sur., 2013; Lachambre i sur., 2017; Roussel i sur., 2019a).

Tržišna potražnja za petrovim uhom postala je sve izraženija, pa su devedesetih godina prošlog stoljeća započela intenzivna istraživanja njihova uzgoja (Mgaya i Mercer, 1994.). Proizvodnja je u 2019. iznosila je 203.374 mt (FAO, 2021), a Kina je bila najveći proizvođač sa 180.267 mt u 2019. godini. Ostali važni proizvođači uključuju Republiku Koreju, Južnu Afriku (*H. midae*) i Australiju (*H. rubra*, *H. laevigata* i hibrid ovih dviju vrsta) (Nguyen i sur., 2022) (Slika 5.).



Slika 5. Svjetska akvakulturna proizvodnja petrovog uha i glavni proizvođači (izvor: Nguyen i sur., 2022)

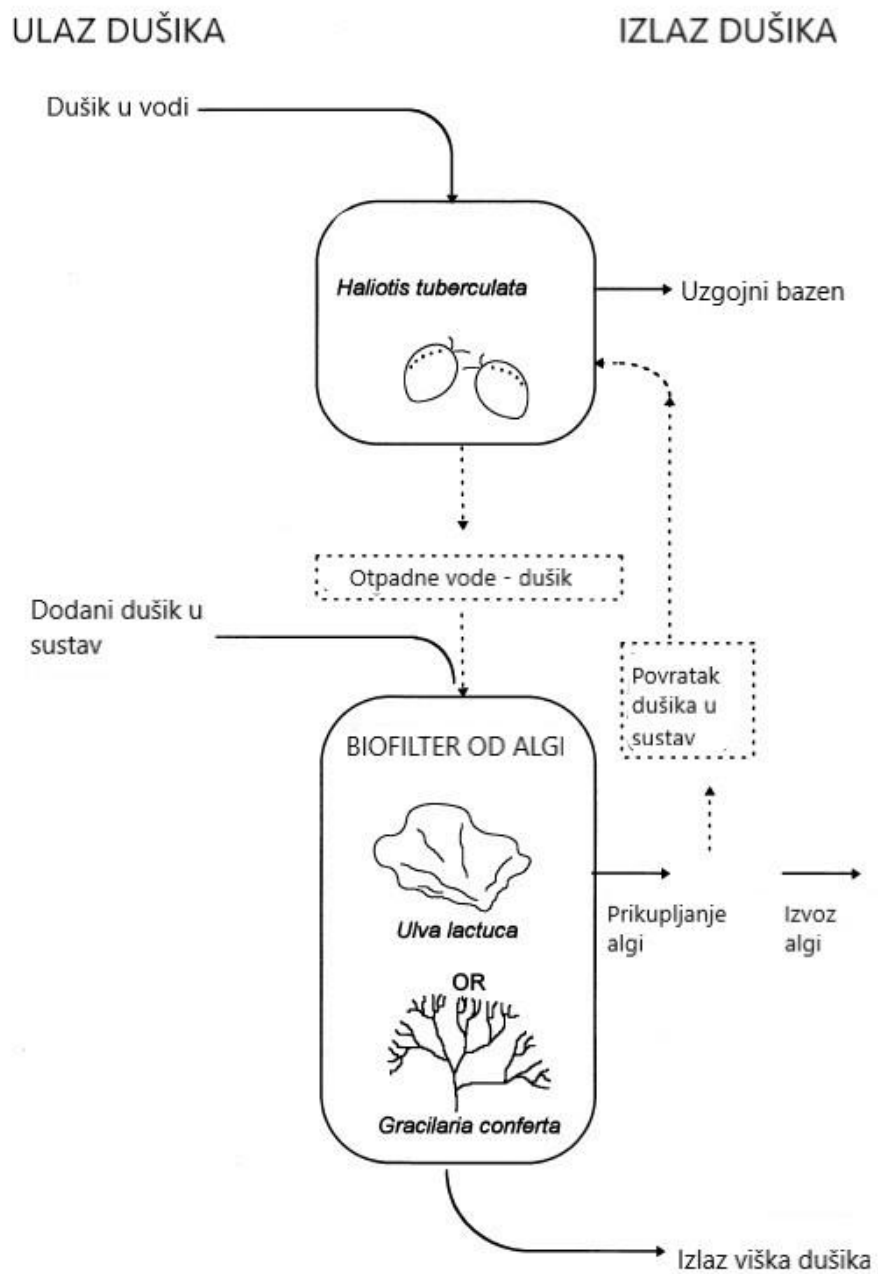
Kako je potražnja za petrovim uhom kao hranom u stalnom porastu, a ponuda iz ribarstva upitna, tema uzgoja ove vrste postaje sve važnija. Glavne prednosti ekološkog i profitabilnog poslovanja akvakulture petrovog uha su smanjenje otpadnih voda i korištenje lokalnog i jeftinog održivog resursa kao hrane za životinje (Troell i sur., 2006). Uzgoj ove vrste započeo je još šezdesetih godina prošlog stoljeća (WFA, 1968), a Koike (1978) je obavio laboratorijski uzgoj oplođenih jaja do valenja. Hayashi (1982) je uspio uzgojiti mlađ do jedne godine starosti. Program uzgoja u moru (Flassch i Aveline, 1984) odvijao se na eksperimentalnoj farmi u Francuskoj. U Irskoj je nekoliko laboratorija pokušavalo uzgojiti petrovo uho. U Galwayu, prva i druga generacija petrovog uha uspješno su uzgojene u mrijestilištu (Moylan i Mercer, 1993). Postoji i program za njihov morski uzgoj u kavezima (Hensey, 1993). Prije početka mrijesta odrasle jedinke moraju biti izložene povišenoj temperaturi vode. Jedinke su spremne za mrijest nakon 89 dana na 18 °C dana (Flassch i Aveline, 1984).

Razvijane su razne tehnike za poticanje mrijesta, kao što je toplinski šok (Flassch i Aveline (1984), obrada morske vode ultraljubičastim svjetlom (Hayashi, 1982), izlaganje zrele mlađi otopini vodikovog peroksida (Morse i sur., 1977). Za kvalitetnu oplodnju potrebna je

koncentracija spermija od oko 200.000 mL⁻¹, što se postiže dodavanjem spermija poznatoj koncentraciji jaja u bazenu za mrijest (Flassch i Aveline, 1984).

Nakon oplodnje jajašaca, ličinke se prenose u spremnik koji sadrži valovite PVC ploče obložene tankim slojem bentoskih dijatomeja (Moylan i Mercer, 1993.). Koike (1978.) je otkrio da je bičaš, *Tetraselmis suecica*, vrlo učinkovit kao dodatna hrana za mrijest. Međutim, Moylan i Mercer (1993) izvijestili su da *T. suecica* nije uvijek prikladna jer nije bentoska mikroalga. U ovoj fazi uzgoja ipak ih se preporuča se hraniti sitno nasjeckanom mješavinom algi (Koike i sur., 1979; Mercer i sur., 1993).

Daljnji uzgoj do tržišne veličine može se postići na tri načina: uzgojem u spremniku (na kopnu), u morskim kavezima iznad tla i u morskim kavezima na tlu. Prikladno mjesto za uzgoj u moru je vrlo važno utvrditi (LaTouche i sur., 1993). U oba načina važno je imati povoljnu kvalitetu vode, brze vodene tokove, visokokvalitetnu hranu i dobru zaštitu od loših vremenskih uvjeta. Prema strategijama uzgoja i dostupnosti morskih algi u prirodnom okruženju, moglo bi biti zanimljivo hraniti petrovo uho određenim vrstama algi (Slika 6.). Mješovita prehrana omogućuje dobar razvoj mišićne mase i rezultate rasta te bi joj se vjerojatno trebala dati prednost pred monospecifičnom prehranom kako bi se izbjegao nedostatak esencijalnih hranjivih tvari i veliki pritisak na jedan izvor algi (Roussel i sur., 2019b). Petrovo uho treba održavati na optimalnoj gustoći kada se intenzivno uzgaja jer je gustoća uzgoja obrnuto proporcionalna brzini rasta (Mgaya i Mercer ,1993).



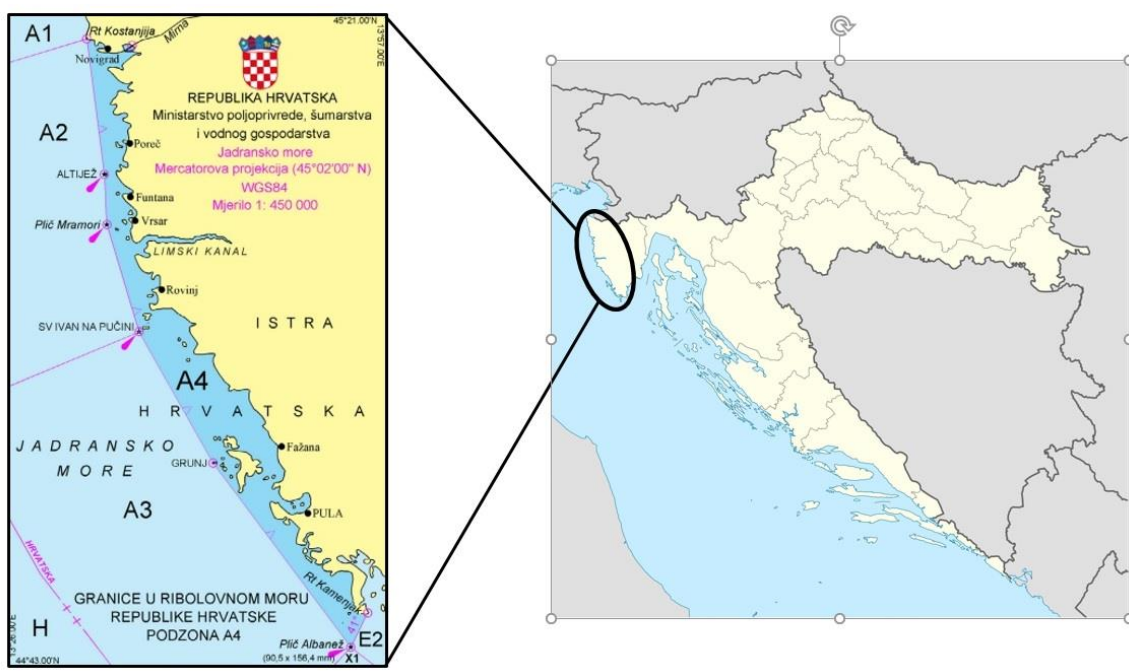
Slika 6. Uzgoj petrovog uha korištenjem integriranog uzgojnog sustava s biofilterom (petrovo uho / morske alge). Isprekidane crtice prikazuju recirkulaciju dušika unutar sustava (izvor: Neori i sur., 1998)

Kako je ova vrsta postajala ekonomski sve važnija za europsku akvakulturu, nedavno je u Europi pokrenut komercijalni uzgoj petrovog uha (Roussel i sur., 2019b), proširena su mrijestilišta i pokrenuti poboljšani programi uzgoja. Roussel i sur. (2010.) primjećuju da bi se izvorni geni atlantskih populacija mogli koristiti u selekcijskim programima, primjerice, za otpornost na bolesti. Europsko sredozemno morsko uho, međutim, ne koristi se za selekciju zbog svoje male veličine. Osim razlike u morfologiji mediteranske i atlantske populacije, otkriveno je da one pripadaju i drugom genetskom klasteru. Stoga se potencijalni uzgoj petrovog uha u Jadranu tek treba definirati. Ova disertacija služi kao jedan od prvih koraka za takva nastojanja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje petrovog uha

Uzorci petrovog uha prikupljeni su s područja u sjevernom Jadranu, odobalno od zapadne Istre (Hrvatska), u skladu s institucionalnim, nacionalnim i međunarodnim zakonima i smjernicama. Prikupljani su u priobalnom dijelu zapadne Istre u podribolovnoj zoni A4 (Slika 7.), na dubinama od maksimalno 7 m. Uzorkovanje petrovog uha odvijalo se sezonski tijekom jedne godine. Ukupno je prikupljeno 135 primjeraka: proljeće (27), ljeto (36), jesen (34), zima (38).



Slika 7. Karta istraživanog područja. Tamnoplavom bojom označena je podribolovna zona A4 u kojoj su uzorkovani *H. tuberculata* za daljnje analize (Slika izrađena kombinacijom materijala sa sljedećih web stranica: <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/dodatni/412336.pdf> i <https://hr.maps-croatia.com/>)

Uzorke su prikupljali profesionalni ronionci na mjestima za koja su tijekom višegodišnjih zarona ustanovili da njima obiluju. Lokaliteti su bili nedaleko od obale, u zoni plime i oseke, kamenitog dna. Prikupljali su se nasumično, noću, kada je petrovo uho najaktivnije. Nakon preuzimanja na kopnu, puževi su sortirani, označeni, vagani i pregledani radi eventualnih

oštećenja. Do laboratorija su prevezeni na ledu, gdje su odmah pohranjeni u hladnu komoru na -86 °C do kemijskih i biokemijskih analiza, odn. u puferiranu otopinu 4 % formalina za histološke analize. Zbog male veličine uzorkovanih jedinki, njihova pojedinačna tkiva nisu bila odvajana za analize, pa se stoga rezultati analiza odnose na meka tkiva u cijelosti.

Istraživanje se provodilo u laboratorijima Instituta Ruđer Bošković (IRB): Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi (Zavod za kemiju materijala) i Laboratoriju za anorgansku geokemiju okoliša i kemodinamiku nanočestica (Zavod za istraživanje mora i okoliša), kao i na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Klinici za unutarnje bolesti. Prije analiza, uzorcima je determiniran spol te je ustanovljena prisutnost mužjaka, ženki i hermafrodita (Tablica 3.). Hermafroditi nisu uzimani u razmatranje za statističku analizu, iako su sve analize provedene na svim uzorcima.

Tablica 3. Razdioba uzoraka petrovog uha (*H. tuberculata*) prema spolu i godišnjim dobima ($n = 135$)

Spol	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
Mužjaci	13	20	12	17
Ženke	14	15	19	11
Hermafroditi	0	1	3	10

Spol petrovog uha nije značajno povezan s godišnjim dobima; nije bilo statističke pristranosti u vezi sa spolom, testirano Fisherovim testom ($p = 0,21$); Chi-kvadrat = 4,628, $df = 3$.

3.2. Mjerenje osnovnih hidrografskih parametara mora

Na mjestima uzorkovanja, na površini i na dubini od 7m mjerila se temperatura mora, salinitet i koncentracija otopljenog kisika u zahvaćenom volumenu morske vode pomoću ProSolo sonde (YSI, USA) i refraktometra (Atago, Japan) (Slika 8.). Osnovni hidrografski parametri mora mjereni su jednom mjesečno te su uspoređivani s dostupnim podacima Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.



Slika 8. Sonda i refraktometar za mjerenje hidrografskih parametara mora

3.3. Biometrija petrovog uha

Određivanje biometrijskih pokazatelja petrovog uha obavljalo se izmjerom duljine i mase mekih tkiva i ljušture. Nakon transporta u laboratorij, puževi su izmjereni, te pažljivo secirani.

Masa organizma (g) mjerena je kao cjelovita masa puža, kao masa ljušture, kao masa gonade (gdje ju je bilo moguće anatomske diferencirati s obzirom na fazu mriješta i aktivnost gonada), te kao združena masa mekih tkiva označena kao masa probavne žlijezde i mišića. Naime, masa mekih tkiva označena je prema maseno najzastupljenijim tkivima (probavnoj žlijezi i mišiću) iako je podrazumijevala sva meka tkiva poput škrga, omotača, stopala, mišića ljušture, bukalne vrećice, jednjaka, probavne žlijezde s jetrom, želuca, srca i probavila. Masa je izražena kao ukupna masa i kao masa za svaki spol, prema sezonama. Dimenzija ljušture (mm) mjerena je kao dužina, širina i visina, a izražena je kao ukupna dimenzija mjerenih jedinki i dimenzija za svaki spol, prema sezonama.

3.4. Određivanje kemijskog sastava petrovog uha

3.4.1. Osnovni kemijski sastav

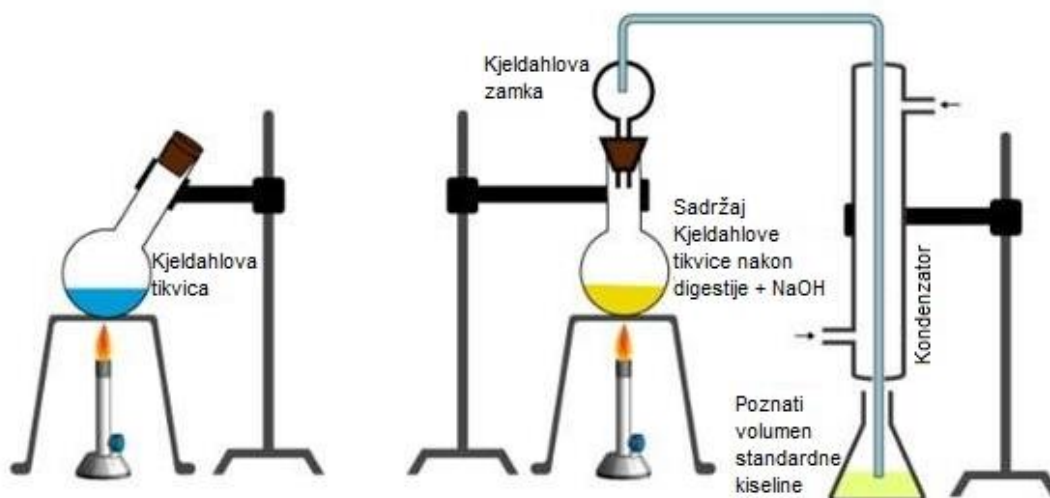
Analiza sadržaja vlage, sirove masti, sirovih proteina i pepela u mekim tkivima petrovog uha provedena je prema referentnim metodama.

Sadržaj vlage (voda) određen je gravimetrijski nakon sušenja do konstantne težine na 103 ± 2 °C, kako je preporučeno u Službenim metodama (AOAC, 1995).

Mineralni sadržaj (pepeo) određen je sagorijevanjem 5 g uzorka na 550 °C i mjerenjem pepela nakon hlađenja (AOAC, 1995).

Sirovi proteini analizirani su Kjeldahlovom metodom (Slika 9.) i izračunati iz sadržaja dušika koristeći faktor konverzije $N \times 6,25$ (AOAC, 1995).

Sadržaj sirove masti određen je dvostupanjskom ekstrakcijom s mješavinama cikloheksana i propan-2-ola kao otapala (Smedes, 1999). Nakon ekstrakcije, otapala su isparavana pod vakuumom, a ekstrahirane su masti sušene 3 sata na 103 ± 2 °C i potom izvagane.



Slika 9. Slikovni prikaz Kjeldahlove metode; izvor: Byjus (preuzeto s: <https://byjus.com/chemistry/kjeldahl-method/>; 05.03.2024.)

3.4.2. Koncentracija elemenata u tragovima i makroelementa u ljušturi i mekim tkivima

Određivanje koncentracije elemenata u tragovima i koncentracije makroelemenata provelo se na jedinkama iz najtoplijeg i najhladnijeg razdoblja u godini.

Za određivanje koncentracije elemenata u mekim tkivima, uzorci su liofilizirani i usitnjeni na vibracijskom kriomlinu (Freezer/MI*6875, SPEX SamplePrep, SAD) sa spremnikom tekućeg dušika na -196 °C, potom podvrgnuti digestiji i pripremljeni za analizu spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu na instrumentu Element 2 HR-ICP-MS (Thermo, Bremen, Njemačka) u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se obavlja spektrometrijom masa (Slika 10.).



Slika 10. Instrument za mjerenje koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata; izvor: ThermoFisher Scientific; Element™ Series HR-ICP-MS (preuzeto s: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAEGAAMFABWMAFC>; 12.03.2024.)

Prije analize, poduzorci (0,05 g) mekih tkiva bili su podvrgnuti potpunoj digestiji u mikrovalnoj pećnici (Multiwave ECO, Anton Paar, Graz, Austrija) u jednostavnom postupku koji se sastojao od digestije s mješavinom od 6 mL dušične kiseline (HNO_3) i 0,1 mL fluorovodične kiseline (HF).

Za određivanje koncentracije elemenata u ljušturama, uzorci su sušeni na zraku i homogenizirani u ahatnom mlinu. Prije analize, poduzorci (0,05 g) ljuštura bili su podvrgnuti potpunoj digestiji u mikrovalnoj pećnici (Multiwave ECO, Anton Paar, Graz, Austrija) u dvostupanjskom postupku koji se sastojao od digestije s mješavinom od 4 mL dušične kiseline (HNO_3) – 1 mL klorovodične kiseline (HCl) – 1 mL fluorovodične kiseline (HF) i dodatkom 6 mL borske kiseline (H_3BO_3) u drugom koraku.

U svim je uzorcima određivana ukupna koncentracija 27 elemenata u tragovima: aluminij (Al), arsen (As), barij (Ba), berilij (Be), bizmut (Bi), kadmij (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), cezij (Cs), bakar (Cu), željezo (Fe), litij (Li), mangan (Mn), molibden (Mo), nikal (Ni), olovo (Pb), rubidij (Rb), antimon (Sb), skandij (Sc), selen (Se), kositar (Sn), stroncij (Sr), titan (Ti), uran (U), vanadij (V), itrij (Y), cink (Zn), i 6 makroelemenata: kalcij (Ca), kalij (K), magnezij (Mg), natrij (Na), fosfor (P) i sumpor (S). Magnezij, kalcij i kalij nisu mjereni u ljušturama jer u njima, kao glavne faze, čine dominantne elemente.

Kontrola kvalitete analitičkog postupka korištenog za analizu elemenata izvršena je simultanom analizom praznog uzorka i certificiranog referentnog materijala Mussels (NCS ZC

78005, također poznatog kao GBW-08571, Nacionalni analitički centar za željezo i čelik, Peking, Kina).

3.5. Analize biokemijskih pokazatelja tkiva

Biokemijski pokazatelji određivani su u homogenatima mekih tkiva petrovog uha. Tkiva su vagana na preciznoj vagi (Kern, ABJ-NM/ABS-N, Njemačka) i homogenizirana na vibracijskom kriomlinu (Freezer/Mll*6875, SPEX SamplePrep, SAD) (Slika 11.) sa spremnikom tekućeg dušika na -196°C . Dobiveni homogenati centrifugirani su kroz 20 min. na 4°C i 12.000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Njemačka). Supernatant je korišten za biokemijske analize tkiva i analizu antioksidativnog kapaciteta, a do analize je pohranjen na -86°C . Biokemijske analize mekih tkiva petrovog uha provedene su za uzorke iz svih godišnjih doba.



a.



b.

Slika 11. a. Kriomlin Freezer/Mll*6875; b. uzorci petrovog uha pripremljeni za homogenizaciju u kriomlinu

3.5.1. Biokemijske analize mekih tkiva

Na biokemijskom analizatoru (Abbott, Njemačka) (Slika 12.), prema uputama proizvođača, iz supernatanta homogenata tkiva komercijalnim reagensima izmjerene su koncentracije elektrolita: Mg i Ca, metabolita: glukoze (GLU), te lipida: triglicerida (TRIG) i kolesterola (CHOL).



Slika 12. Analizator za mjerenje biokemijskih pokazatelja tkiva Architect c4000

Koncentracija Mg mjerena je u 3,2 μL supernatanta enzimatskom metodom izocitrat dehidrogenaze, dok je koncentracija Ca mjerena u 2,6 μL supernatanta uporabom arsenazo-III metode. Koncentracija GLU određena je u 2,0 μL supernatanta enzimskom metodom na bazi heksokinaze/glukoza-6-fosfata katalitičkom reakcijom dehidrogenaze. Koncentracije TRIG i CHOL određene su u 2,4 μL supernatanta korištenjem enzimskih metoda s glicerol-fosfat oksidazom i kolesterol-esterazom/kolesterol-oksidazom. Koncentracije GLU, TRIG, CHOL, Mg i Ca izmjerene su kao mmol/L tkiva i potom preračunate u mg/g tkiva.

3.5.2. Analize antioksidativnog kapaciteta

Mjerenja antioksidativnog kapaciteta obuhvaćala su određivanje ukupnog antioksidativnog statusa (TAS), aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx) kao biomarkera oksidativnog stresa, te određivanje malondialdehida (MDA) kao pokazatelja lipidne peroksidacije.

3.5.2.1. Koncentracija malondialdehida (MDA) i tiobarbituratskih reaktivnih spojeva (TBARS)

Lipidna peroksidacija mjerena je prema nastanku reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS), kao rezultat reakcije malondialdehida (MDA) i tiobarbiturne kiseline (TBA) (Babić i sur., 2016). Reakcija stvara crveni pigment koji je mjerljiv spektrofotometrijski.

Nakon vaganja, homogeniziranja i centrifugiranja, 250 μ L supernatanta dodano je u 500 μ L smjese reagensa triklor-octene kiseline (TCA) i butiliranog hidroksitoluena (BHT) kao 10% TCA i 0,01% BHT (Kemika, Hrvatska). Nakon 15 s vrtloženja, uzorci su ohlađeni kroz 15 min na 4 °C i centrifugirani 10 min na 12.000 g. Supernatant (750 μ L) pomiješan je s 500 μ L TBA i zagrijavan na 99 °C tijekom 30 min. Uzorci su vrtloženi i stavljeni u grijaći blok (ThermoMixerC, Eppendorf, Njemačka) (30 min, 99 °C). Reakcija je zaustavljena na 4 °C, a apsorbancija supernatanta očitana je na 535 nm na čitaču ploča Infinite® 200 PRO (Tecan, Švicarska) u triplicatu (Slika 13.). Količina kompleksa MDA-TBA određena je pomoću standardne krivulje MDA i izražena kao ng/g MDA/g tkiva, odn. koncentracija TBARS-a u supernatantu izražena je kao apsorbancija u mg/g tkiva.



Slika 13. Višemodalni čitač mikroploča Infinite® 200 PRO

3.5.2.2. Ukupni antioksidativni status (TAS)

Ukupni antioksidativni status (TAS) mjereno je komercijalnim kitovima Randox (Dublin, Irska) na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c4000 (Abbott, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Koncentracija TAS-a mjerena je u 4,0 µL supernatanta suzbijanjem proizvodnje radikala, što je vizualizirano sa specifičnim kromogenom. TAS je, kao procjena nekvantitativne antioksidativne funkcije, mjereno kolorimetrijski, s rasponom mjerenja od 0,21 - 2,94 mmol/L, a izražen je kao mmol/g proteina.

3.5.2.3. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) mjerena je komercijalnim kitovima Randox (Dublin, Irska) na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c4000 (Abbott, Njemačka) prema uputama proizvođača. Enzim SOD, koji katalizira dismutaciju superoksida u kisik i vodikov peroksid, mjereno je kolorimetrijskom metodom, odn. stupnjem inhibicije stvaranja superoksidnog radikala, u 5,0 µL supernatanta. Aktivnost SOD-a izražena je kao U/g proteina.

3.5.2.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GPx)

Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GPx) mjerena je komercijalnim kitovima Randox (Dublin, Irska) na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c4000 (Abbott, Njemačka) prema uputama proizvođača. Enzim GPx, koji uklanja antioksidanse čišćenjem slobodnih radikala, mjereno je enzimskom metodom, s osjetljivošću od 75U/L. Određivanje aktivnosti GPx temelji se na oksidaciji glutationa hidroperoksidom i njegovoj aktivnosti u 4,0 µL supernatanta. Aktivnost GPx-a izražena je kao U/g proteina.

3.5.2.5. Aktivnost laktat-dehidrogenaze (LDH)

Aktivnost enzima laktat-dehidrogenaze (LDH) mjerena je komercijalnim kitovima Randox (Dublin, Irska) na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c4000 (Abbott, Njemačka) prema uputama proizvođača. Enzim LDH katalizira interkonverziju mliječne kiseline i piruvične kiseline. Enzim je sastavljen od 4 peptidna lanca i postoji u 5 izomernih oblika. Najviše koncentracije LDH očekuju se u probavilu i mišićnom tkivu. Aktivnost LDH izražena je kao U/g proteina.

3.6. Određivanje ukupnih lipida

Lipidi za određivanje sastava masnih kiselina ekstrahirani su prema Smedesu (1999) i ISO 5509:2000 metodi. Kako bi se sačuvale nezasićene masne kiseline od oksidacije, završni korak Smedes metode, tj. sušenje na 103 °C, isključen je iz protokola. Metilni esteri masnih kiselina pripravljeni su transesterifikacijom s metanolom prema metodi ISO 5509:2000. Ukratko, 60 mg ekstrahiranih lipida otopljeno je u 4 mL izooktana i dodano je 200 µL kalijevog hidroksida u metanolu (2 mol/L). Smjesa je vrtložena 30 s i ostavljena nekoliko minuta na sobnoj temperaturi da reagira. Nakon toga joj je dodan 1 g natrijevog hidrogensulfata monohidrata, promiješan, a bistri supernatant koji je sadržavao metilne estere prebačen je u bočicu.

3.7. Određivanje masnokiselinskog sastava petrovog uha

Za analizu plinskom kromatografijom, 1 µL pripremljenih metilnih estera ubrizgan je u Agilent Technologies 6890N Network GC sustav (Santa Clara, CA, SAD) opremljen plamenoionizacijskim detektorom (Slika 14.). Metilni esteri masnih kiselina (FAME) odvojeni su na DB-23 kapilarnoj koloni (60 m×0,25 mm × 0,25 µm (Agilent Technologies)). Kao plin nosač korišten je helij s konstantnim protokom od 1,5 mL/min. Temperatura injektora postavljena je na 250 °C, a detektora na 280 °C. Temperatura peći programirana je da raste za 7 °C/min od početnih 60 °C do konačne temperature od 220 °C gdje je održavana 17 minuta. Omjer podjele bio je 30:1.

Masne kiseline identificirane su usporedbom njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima mješavine 37 komponenti FAME (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Metodom površinske normalizacije određen je kvantitativni sastav masnih kiselina izražen kao relativni maseni udio (%) ukupnih masnih kiselina. Masne kiseline su se grupirale i prikazale u skladu sa svojim stupnjem zasićenosti kao SFA, MUFA, PUFA, n-3, n-6 masne kiseline, odnosno kao zasićene, jednostruko nezasićene, višestruko nezasićene, omega-3 i omega-6 masne kiseline.

U ovom su radu analizirane slijedeće masne kiseline: C14:0 (Miristinska kiselina, MA), C15:0 (Pentadekanska kiselina, PDA), C16:0 (Palmitinska kiselina, PA), C16:1 (Palmitoleinska kiselina, PO), C17:0 (Heptadekanska kiselina, HA), C18:0 (Stearinska kiselina, SA), C18:1n9 (Oleinska kiselina, OA), C18:1n7 (Vakcinska kiselina, VA), C18:2c (Linolna kiselina, LA), C20:1 (Gadoleinska kiselina, GA), C21:0 (Henekosanska kiselina, HNA), C20:4n6 (Arahidonska

kiselina, AA), C20:5n3 (Eikosapentaenska kiselina, EPA), C22:5n3 (Dokosapentaenska kiselina, DPA).



Slika 14. Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC sustav; izvor: Santa Clara, CA, SAD

3.8. Histološki prikaz građe tkiva petrovog uha

Građa histoloških struktura petrovog uha prikazana je histološko-morfološkom analizom radi razumijevanja njegove reproduktivne funkcije i morfoloških odstupanja na mikroskopskoj razini. Tkiva fiksirana u puferiranoj otopini 4 % formalina dehidrirala su se u serijskim razrjeđenjima otapala u histokinetu, uklopljena su u parafinske blokove, te rezana mikrotomom na 3-5 μm (Slika 15.).



Slika 15. Priprema histoloških preparata za rezanje na mikrotomu

Proces dehidracije odvijao se kroz seriju rastućih koncentracija etanola (od 70 % do 100 %) i ksilena. Nakon dehidracije, tkiva su stavljena u plastične histološke kazetice te u parafinsku kupku (60 min) na način da su kazetice ubačene u spremište zagrijanog dispenzora parafina (Leica, Njemačka) te ostavljene preko noći. Potom su tkiva iz kazeta toplom pincetom izvađena i postavljena u kalup tako da se izbjegne stvaranje mjehurića. Kazete su stavljene na vrh kalupa te je iz dispenzora nadolijevan vrući parafin. Kada se parafin ohladio, parafinski blok je izvađen iz kalupa i pripremljen za rezanje.

Mikrotomom (RM2255, Leica, Njemačka) tkiva u parafinskim blokovima izrezana su na 3-5 μm debljine kao sagitalni i transverzalni presjeci. Preparati su preneseni na predmetna stakalca, obojeni su smjesom hematoksilin-eozina (HE) i pregledani binokularnim mikroskopom (Olympus® BX51, Njemačka). Potom su odabrani preparati fotografirani i preneseni na AnalySIS Soft Imaging Sustav (Olympus) radi kvalitativne procjene.

3.9. Statistička obrada podataka

Za izradu grafikona hidrografskih parametara te obradu podataka korišten je program Microsoft Office Excel.

Sve eksplorativne analize i statistički testovi provedeni su pomoću R v4.2.1. programa (R: A language and environment for statistical computing. URL: <https://www.R-project.org/>), Chambers, 2008).

Razlike u omjeru spolova između sezona analizirane su Chi-kvadrat testom. Rezultati istraživanja analizirani su kao zavisne varijable od interesa te su testirani na povezanost s godišnjim dobom i spolom petrovog uha kao neovisnim, eksplanatornim varijablama.

Parametrijska jednosmjerna ANOVA i linearna regresija korištene su za podatke koji su u skladu s pretpostavkama normalnosti ostatka i homoscedastičnosti varijance. Podaci koji ne udovoljavaju tim pretpostavkama analizirani su korištenjem neparametarskog Kruskal-Wallis testa. *Post hoc* Tukeyjev, odn. Dunnov test za parne usporedbe sezona korišteni su za parametarske, odn. neparametarske testove. Za ispitivanja normalne distribucije podataka korišten je Shapiro-Wilkov test, a korelacije između mjerenih parametara analizirane su korištenjem Spearmanovog koeficijenta korelacije. Za korelacijske testove korištena je Bonferronijeva prilagodba p vrijednosti. Razina značajnosti za sve testove postavljena je na manje od 0,05 ($p < 0,05$).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

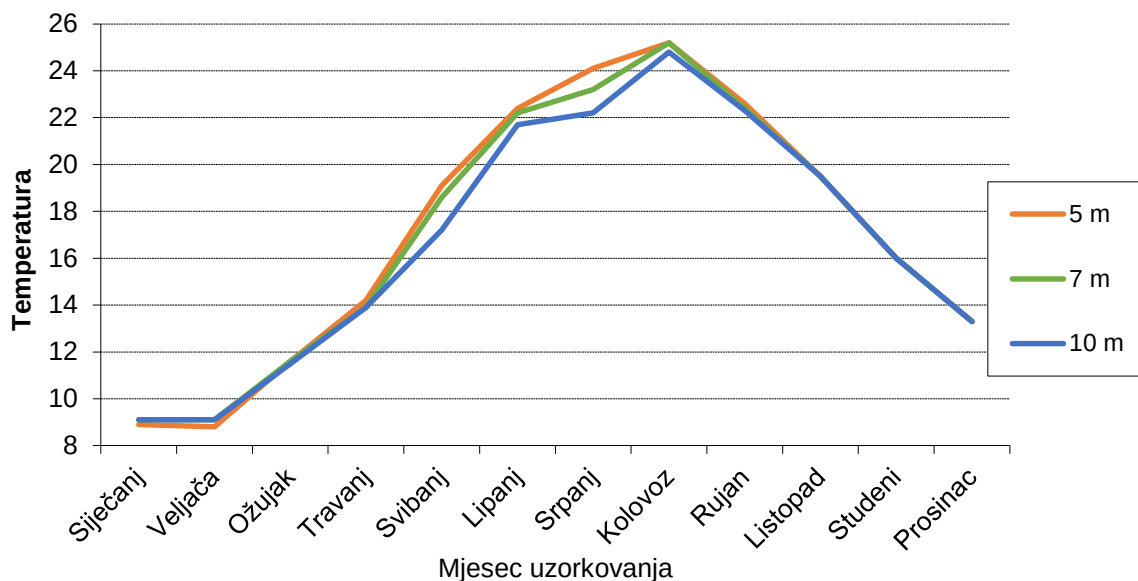
4.1. Osnovni hidrografski parametri

Na temelju prijašnjih opservacija profesionalnih ronioca locirano je netaknuto područje bogato petrovim uhom. Područje uzorkovanja bilo je blizu obale, u zoni plime i oseke i kamenitog morskog dna plićeg mora, na oko 7 m dubine. Temperatura mora, salinitet i otopljeni kisik lokacije bilježeni su mjesečno tijekom godine (Tablica 4.) i na različitim dubinama (Slika 16.). Temperatura mora bila je najniža u siječnju i veljači, a najviša u kolovozu. Značajne razlike razine temperature zabilježene su između ljeta i zime, odn. najtoplijih i najhladnijih mjeseci. Salinitet je bio ujednačen tijekom svih godišnjih doba, ali viši u zimskim mjesecima. Koncentracija topljenog kisika u ljeto i jesen bila je značajno niža od koncentracija u zimi.

Tablica 4. Temperatura, salinitet i otopljeni kisik mora kroz godišnja doba, mjereni u blizini mjesta uzorkovanja *H. tuberculata*. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD).

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
Temperatura (°C)	14,70 (3,57) ^{ab}	23,34 (2,30) ^c	19,90 (2,88) ^{bc}	11,20 (2,97) ^a
Salinitet (psu*, ‰)	37,23 (1,44) ^a	36,48 (1,81) ^a	37,53 (0,91) ^a	38,30 (0,42) ^a
Otopljeni kisik (mg/L)	5,65 (0,34) ^{ab}	5,32 (0,28) ^a	5,30 (0,37) ^a	6,05 (0,29) ^b

Značajne razlike između godišnjih doba testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati u istom retku s različitim slovima u eksponentu (a,b,c) značajno se razlikuju. Razina značajnosti: $p < 0,05$. *Practical Salinity Unit (psu)



Slika 16. Mjesečne oscilacije temperature mora (°C) u blizini mjesta uzorkovanja petrovog uha (*H. tuberculata*) u sjevernom Jadranu. Temperatura je mjerena na 5, 7 i 10 m dubine.

4.2. Biometrijski parametri

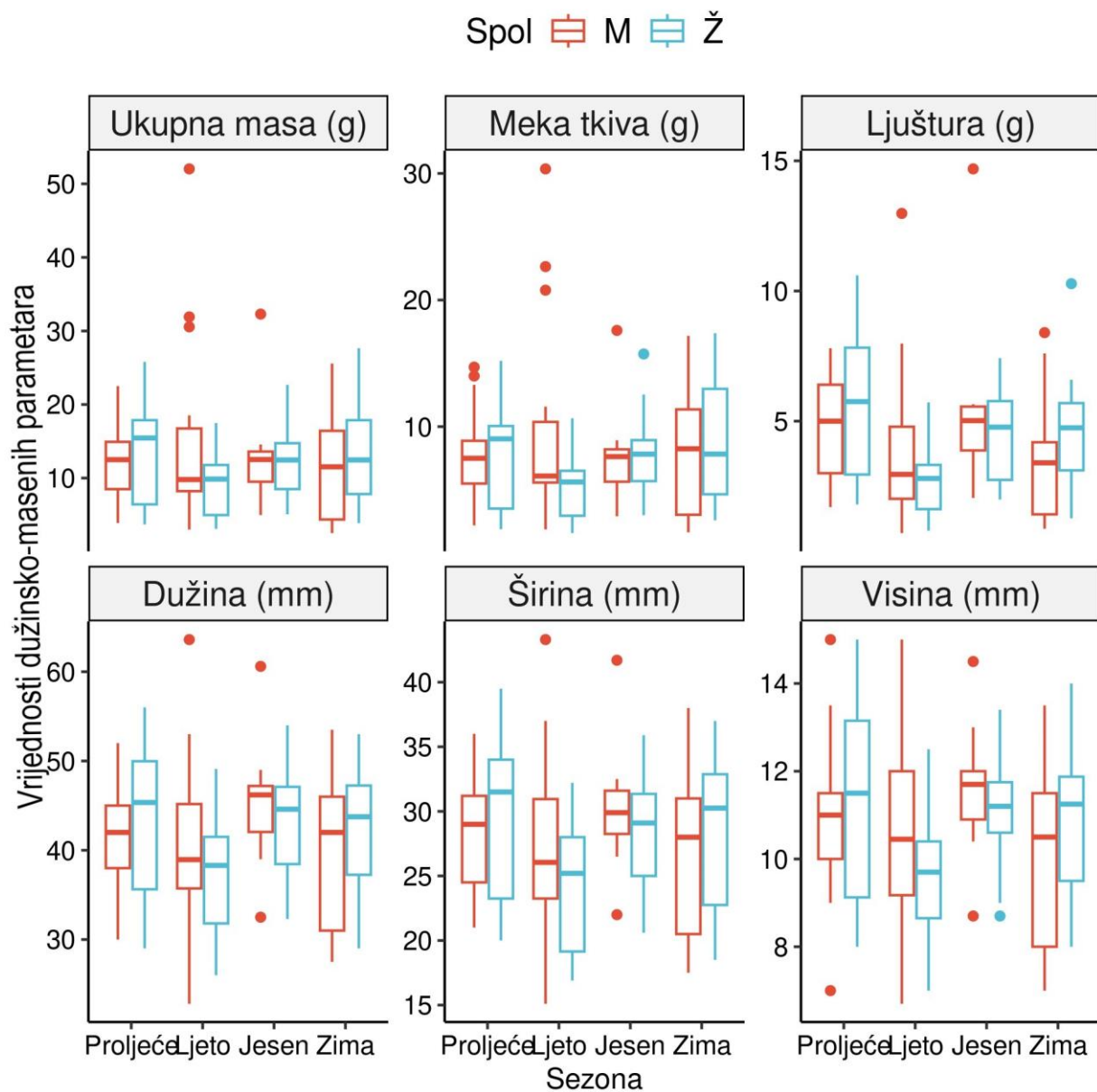
Ukupno 135 primjeraka petrovog uha oba spola izvađeno je tijekom godišnjih sezona kako bi se omogućila analiza jedinki u različitim fiziološkim stanjima. Cjelovita masa ukupnog petrovog uha (svih spolova) bila je najviša u proljeće, dok je masa najzastupljenijih mekih tkiva (probavne žlijezde i mišića) bila najviša zimi (Slika 17.). Masa pripadajućih ljuštura bila je najviša u proljeće, te značajno različita od mase ljuštura ljeti i zimi. Od biometrijskih parametara čitavog puža, značajne razlike zabilježene su samo u ljušturama (Tablica 5.). Vrijednosti za ukupne jedinke odnose se na mužjake, ženke i hermafrodite, kako u ovoj tablici, tako i u svim slijedećim tablicama gdje se spominje razdioba na: ukupno, M, F.

Tablica 5. Biometrija mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba, izmjerena nakon uzorkovanja (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)).

		Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Proljeće (n = 27)	Ljeto (n = 36)	Jesen (n = 34)	Zima (n = 38)
Masa (g)					
Cjelovita	Ukupno	13,27 (6,27)	12,27 (9,59)	12,59 (5,67)	12,59 (6,7)
	M	12,81 (5,76)	14,45 (11,76)	13,17 (6,94)	11,61 (7,02)
	F	13,69 (6,89)	8,85 (4,34)	12,22 (5,01)	13,55 (7,36)
Probavna žlijezda i mišić	Ukupno	7,9 (4)	7,58 (5,97)	7,72 (3,46)	8,6 (4,56)
	M	7,9 (3,94)	9,19 (7,31)	7,74 (3,7)	8,13 (4,86)
	F	7,9 (4,21)	5,28 (2,58)	7,68 (3,37)	8,84 (5,01)
Gonade	Ukupno	1,01 (0,58)	-	0,92 (0,42)	1,16 (0,55)
	M	0,9 (0,44)	-	1,01 (0,53)	1,08 (0,57)
	F	1,11 (0,69)	-	0,86 (0,36)	1,13 (0,52)
Ljuštura	Ukupno	5,36 (2,49) ^a	3,43 (2,44) ^c	4,88 (2,38) ^{ab}	3,99 (2,28) ^{bc}
	M	4,92 (1,94)	3,89 (2,94)	5,43 (3,28)	3,48 (2,21)
	F	5,78 (2,93)	2,72 (1,44)	4,54 (1,79)	4,71 (2,58)
Dimenzija ljušture (mm)					
Dužina	Ukupno	42,98 (7,53)	39,15 (8,65)	43,93 (6,29)	41,63 (7,55)
	M	42,5 (6,89)	40,62 (9,39)	45,18 (6,96)	40,41 (8,55)
	F	43,43 (8,31)	36,65 (7,27)	43,24 (6,09)	42,65 (7,52)
Širina	Ukupno	29,01 (5,38) ^a	25,99 (6,25) ^b	29,09 (4,34) ^a	27,53 (5,53) ^{ab}
	M	28,48 (4,52)	27,2 (6,76)	30,18 (4,82)	26,71 (6,03)
	F	29,5 (6,2)	24 (5,18)	28,46 (4,22)	28,25 (6,15)
Visina	Ukupno	11,03 (2,16)	10,15 (1,98)	11,25 (1,35)	10,41 (1,85)
	M	10,82 (2,07)	10,49 (2,13)	11,55 (1,47)	10,09 (1,99)
	F	11,23 (2,31)	9,63 (1,75)	11,11 (1,29)	10,9 (2,01)

Značajne razlike između godišnjih doba testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b,c) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa, no značajnih razlika između spolova nije bilo. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$. Gonade ljeti nije bilo moguće izdvojiti od ostatka mekih tkiva.

Na Slici 17. prikazan je kutijasti dijagram (engl. *boxplot* distribucija) vrijednosti dužinsko-masениh parametara petrovog uha, ljuštуре i mekih tkiva kroz godišnja doba, prema spolu. Na osi x naznačena su godišnja doba (Sezona). Na osi y (Rezultati) označene su mjerene vrijednosti, koje se za ukupnu masu organizma, masu mekih tkiva i ljuštуре odnose na grame (g), a za dužinu, širinu i visinu ljuštуре na milimetre (mm). Masno otisnuta poprečna linija označava medijan, dok prostori iznad i ispod medijana označavaju prvi i treći kvartil. Linije koje izlaze izvan okvira su najviša ili najniža vrijednost koja nije veća od 1,5 puta interkvartilnog raspona prvog ili trećeg kvartila. Vrijednosti izvan tih linija su točke koje su prikazane zasebno. Vrijednosti za mužjake (M) označene su crvenom, a za ženke (Ž) plavom bojom. U kategoriji ukupne mase organizama uočljivo je da su, osim u proljeće, medijani svih jedinki bili slično pozicionirani u svakom godišnjem dobu, no uz različitu distribuciju podataka prema spolovima. Interkvartilni raspon bio je najveći kod ženki u proljeće i kod mužjaka zimi. U kategoriji mekih tkiva najveći je broj točaka izvan kvartilnog raspona bio ljeti kod mužjaka, a najveća disperzija podataka u oba spola zimi.



Slika 17. *Boxplot* distribucija vrijednosti dužinsko-masениh parametara ljuštura i mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu

4.3. Kemijski sastav mekih tkiva i ljuštura

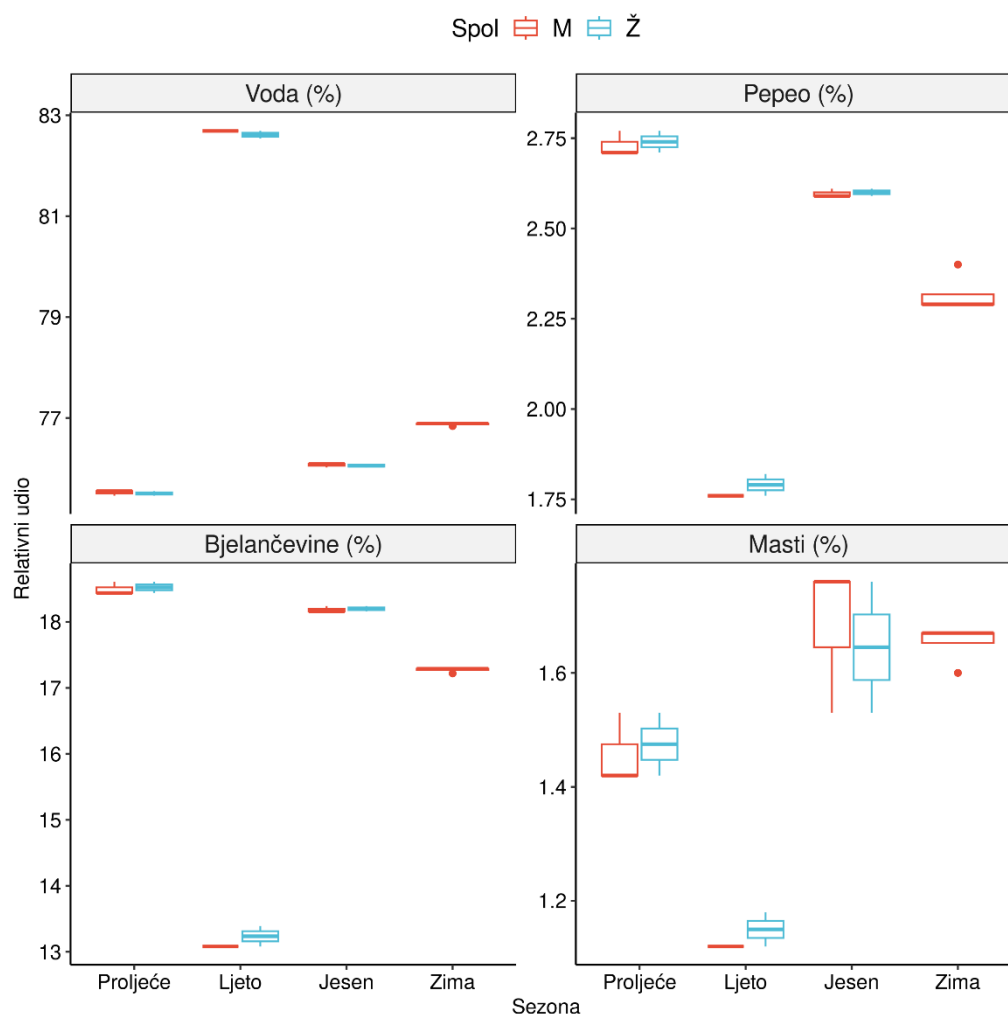
Kako je vidljivo u Tablici 6., sadržaj vlage u mekim tkivima bio je najviši ljeti, a ukupne vrijednosti vlage bile su značajno različite u sezonama. Udio sirove masti bio je najviši u jesen i zimu, dok je udio sirovih bjelančevina i pepela bio najviši u proljeće, a vrijednosti su bile značajno različite po sezonama. Značajno najniži ($p < 0,05$) sadržaj sirove masti i bjelančevina zabilježeni su u ljetnom razdoblju. Svi parametri osnovnog kemijskog sastava mekih tkiva pokazali su značajnu povezanost s godišnjim dobom, ali ne i sa spolom.

Tablica 6. Kemijski sastav mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)), kao postotak sastava

Kemijski sastav (%)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
Vlaga	Ukupno	75,51 (0,05) ^a	82,63 (0,08) ^d	76,06 (0,04) ^b	76,87 (0,03) ^c
	M	75,52 (0,05)	82,69 (0)	76,07 (0,04)	76,88 (0,02)
	F	75,5 (0,06)	82,62 (0,11)	76,06 (0,05)	-
Pepeo	Ukupno	2,73 (0,03) ^d	1,78 (0,03) ^a	2,6 (0,01) ^c	2,33 (0,06) ^b
	M	2,73 (0,03)	1,76 (0)	2,6 (0,01)	2,32 (0,05)
	F	2,74 (0,04)	1,79 (0,04)	2,6 (0,01)	-
Bjelančevine	Ukupno	18,51 (0,09) ^a	13,2 (0,17) ^c	18,19 (0,04) ^{ab}	17,26 (0,04) ^{bc}
	M	18,5 (0,1)	13,08 (0)	18,19 (0,05)	17,27 (0,04)
	F	18,52 (0,12)	13,23 (0,22)	18,2 (0,06)	-
Masti	Ukupno	1,46 (0,06) ^b	1,14 (0,03) ^a	1,67 (0,13) ^c	1,64 (0,04) ^c
	M	1,46 (0,06)	1,12 (0)	1,68 (0,13)	1,65 (0,03)
	F	1,48 (0,08)	1,15 (0,04)	1,65 (0,16)	-

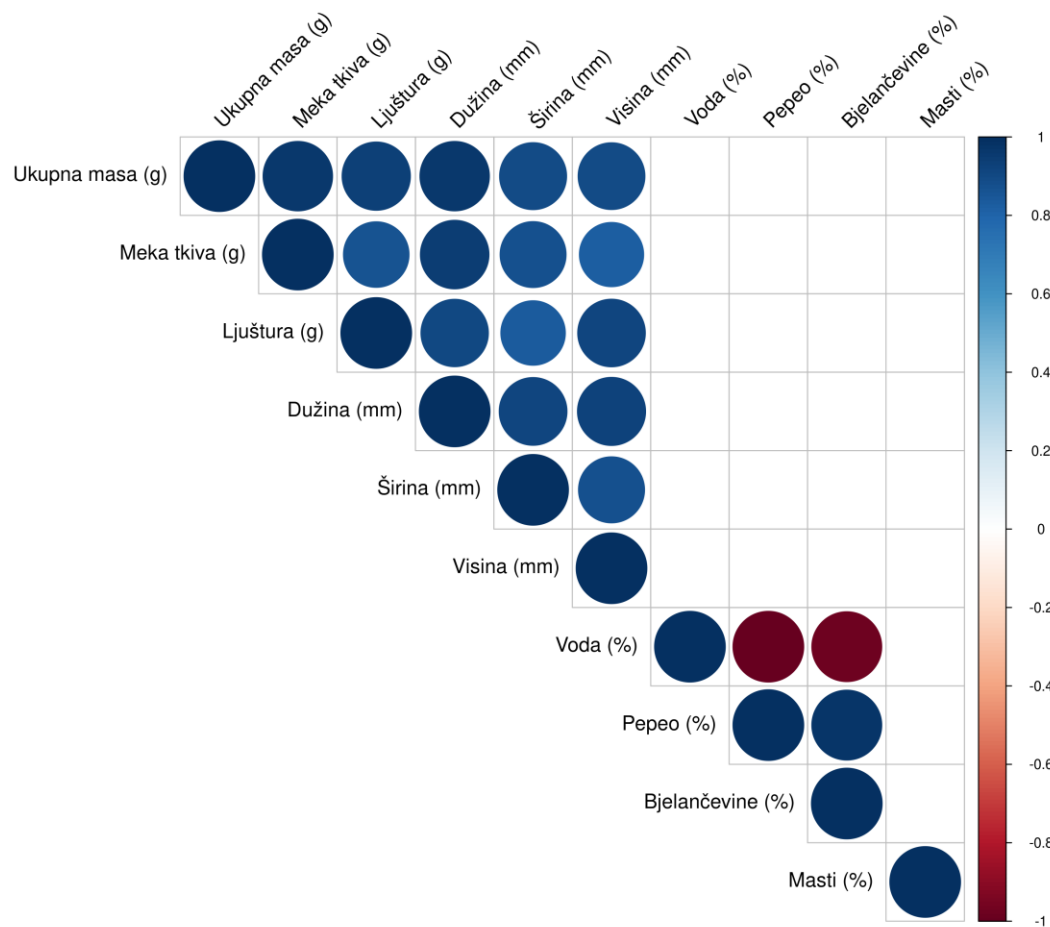
Značajne razlike između godišnjih doba testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b,c,d) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa, no značajnih razlika između spolova nije bilo. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$.

Zimi za osnovnu kemijsku analizu nije bilo ženki, što se vidi i na Slici 18., gdje je prikazan je kutijasti dijagram (engl. *boxplot* distribucija) vrijednosti osnovnog kemijskog sastava mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu. Na osi x naznačena su godišnja doba (Sezona). Na osi y označen je relativni udio (%) pojedinih kemijskih parametara. Masno otisnuta poprečna linija označava medijan, dok prostori iznad i ispod medijana označavaju prvi i treći kvartil. Linije koje izlaze izvan okvira su najviša ili najniža vrijednost koja nije veća od 1,5 puta interkvartilnog raspona prvog ili trećeg kvartila. Vrijednosti izvan tih linija su točke koje su prikazane zasebno. Vrijednosti za mušjake (M) označene su crvenom, a za ženke (Ž) plavom bojom. Distribucija svih vrijednosti bila je male disperzije, osim kod sirovih masti u jesen, za oba spola.



Slika 18. *Boxplot* distribucija vrijednosti osnovnog kemijskog sastava mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu

Korelogram osnovnog kemijskog sastava i dužinsko-masениh parametara petrovog uha prikazan je na Slici 19., nezavisno od spola i sezone s naznačenim pozitivnim (plavo) i negativnim (crveno) Spearmanovim koeficijentima korelacije koji su izostavljeni ako nisu bili značajni nakon primjene Bonferronijeve prilagodbe p vrijednosti. Mjerene dužinsko-masene vrijednosti se za ukupnu masu organizma, masu mekih tkiva i ljuštore odnose na grame (g), a za dužinu, širinu i visinu ljuštore na milimetre (mm). Osnovni kemijski sastav podrazumijeva relativni udio (%) pojedinih kemijskih parametara (vlagu (vodu), pepeo, bjelančevine i masti). Sve su korelacije prikazanih parametara uglavnom bile snažno do umjereno pozitivne, osim za korelaciju vlage sa pepelom i bjelančevinama, gdje su izraženi negativni korelacijski koeficijenti.



Slika 19. Korelogram osnovnog kemijskog sastava i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*

Sezonske fluktuacije (godišnji ekstremi ljeta i zima) bile su vidljive kod elemenata u tragovima i makroelementima u mekim tkivima i ljušturama petrovog uha. Naime, od 27 elemenata u tragovima i 6 makroelemenata mjenjenih u ukupnim mekim tkivima školjke (Tablice 7. i 8.), značajno veća koncentracija Ba, Co, Ni, Mn, Pb, Sb i Se primijećena je u zimskim uzorcima u usporedbi s ljetnim, dok je značajno veća koncentracija As primijećena tijekom ljetnog razdoblja. Elementi u tragovima i makroelementi mjenjeni u ljušturama u dva

temperaturna ekstrema imali su značajno niže koncentracije za Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Rb, S, U, V i Y tijekom zime, dok su više koncentracije bile za Be i Cd u odnosu na ljeto. Međutim, značajne razlike u elementa u tragovima i makroelementima između spolova nisu primijećene niti u tkivima niti u ljušturama.

Općenito, samo 17 % analiziranih elemenata iz ljuštura bilo je više zimi nego ljeti, dok je 67 % analiziranih elemenata iz tkiva bilo više zimi. Najveće razlike u mekim tkivima primijećene su za Ba, Co, Mn, Ti, Y i Mg između mužjaka i ženki (zima), te za As i Ba između mužjaka i ženki (ljeto). Najveće razlike u ljušturama primijećene su za Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn i Sr između mužjaka i ženki (zima), te za Al, As i Se između mužjaka i ženki (ljeto). Od elemenata u tragovima zimi je u mekim tkivima prevladavalo Fe, slijedom koncentracija $Fe > Al > Zn > Ni > Cu > Sr > As > Ti > Mn > Ba > V > Rb > Pb > Cd > Mo > Co, Cr > Cr > Se > Li > Y > Sn > U > Bi > Sb > Be, Sc > Cs$. Od makroelemenata zimi je redoslijed koncentracija bio $S > Na > K > Ca > P > Mg$.

Tablica 7. Koncentracija elemenata u tragovima (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)) iz mekih tkiva i ljuštura *H. tuberculata* kroz dva temperaturna ekstrema (ljeto i zima), u mužjaka (M) i ženki (F)

Elementi u tragovima ($\mu\text{g/g}$)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Meka tkiva		Ljuštura	
		Ljeto	Zima	Ljeto	Zima
Al	Ukupno	137.76 (73.18)	189.97 (147.03)	173.89 (56.69)	151.79 (67.77)
	M	141.68 (63.14)	178.18 (174.08)	161.29 (57.48)	183.64 (64.31)
	F	124.02 (135.8)	209.62 (118.86)	218 (29.7)	98.7 (32.26)
As	Ukupno	28,48 (8,54) ^a	17,64 (1,8) ^b	3,96 (0,8) ^a	3,76 (1,07) ^a
	M	30,83 (8,11)	17,54 (1,54)	3,84 (0,86)	3,76 (1,26)
	F	20,28 (3,89)	17,81 (2,55)	4,38 (0,5)	3,75 (0,92)
Ba	Ukupno	3,79 (1,85) ^a	6,62 (3,01) ^b	5,02 (1,36) ^a	9,94 (14,77) ^a
	M	4,16 (1,85)	7,93 (3,16)	5,06 (1,57)	5,54 (2,3)
	F	2,52 (1,64)	4,44 (0,58)	4,88 (0,13)	17,27 (24,97)
Be	Ukupno	0,03 (0,01) ^a	0,04 (0,02) ^a	0,15 (0,09) ^a	0,23 (0,06) ^b
	M	0,03 (0,01)	0,03 (0,01)	0,12 (0,09)	0,22 (0,07)
	F	0,04 (0,02)	0,05 (0,02)	0,23 (0,01)	0,27 (0,03)
Bi	Ukupno	0,17 (0,06)	0,13 (0,04)	0,04 (0,02)	0,03 (0,02)
	M	0,18 (0,06)	0,14 (0,03)	0,04 (0,02)	0,04 (0,02)
	F	0,14 (0,04)	0,11 (0,05)	0,03 (0,01)	0,03 (0)
Cd	Ukupno	3,18 (0,93) ^a	2,61 (1,05) ^a	0,06 (0,04) ^a	0,1 (0,05) ^b
	M	3,3 (1,04)	2,62 (0,83)	0,06 (0,04)	0,09 (0,05)
	F	2,78 (0,23)	2,6 (1,59)	0,06 (0,05)	0,13 (0,04)
Co	Ukupno	0,77 (0,24) ^a	1,33 (0,73) ^b	0,41 (0,14) ^b	0,26 (0,11) ^a

Elementi u tragovima (µg/g)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) ± standardna devijacija (SD)			
		Meka tkiva		Ljuštura	
		Ljeto	Zima	Ljeto	Zima
Cr	M	0,8 (0,15)	1,54 (0,87)	0,4 (0,16)	0,26 (0,13)
	F	0,66 (0,54)	0,97 (0,22)	0,44 (0,04)	0,26 (0,1)
	Ukupno	3,9 (0,82) ^a	4,45 (1,11) ^a	7,26 (3,02) ^b	3,52 (3,27) ^a
	M	4,06 (0,87)	4,69 (1,38)	7,74 (2,65)	4,56 (3,88)
	F	3,33 (0,18)	4,04 (0,35)	5,58 (4,83)	1,78 (0,22)
Cs	Ukupno	0,03 (0,01)	0,03 (0,02)	0,01 (0)	0,01 (0,01)
	M	0,03 (0,01)	0,03 (0,02)	0,01 (0)	0,01 (0,01)
	F	0,02 (0,02)	0,03 (0,01)	0,02 (0)	0,01 (0)
Cu	Ukupno	41,29 (9,61) ^a	43,77 (11,8) ^a	7,67 (2,79) ^b	4,17 (2,89) ^a
	M	38,01 (7,05)	44,64 (10,4)	8,16 (2,45)	5,07 (3,44)
	F	52,78 (10,03)	42,33 (16,32)	5,98 (4,33)	2,66 (0,36)
Fe	Ukupno	757,64 (286,39)	826,16 (152,67)	165,87 (99,82)	117,22 (100,83)
	M	811,89 (191,55)	864,31 (159,6)	165,4 (111,51)	87,06 (39,23)
	F	567,78 (585,94)	762,58 (144,67)	167,5 (71,42)	167,5 (162,59)
Li	Ukupno	0,5 (0,14)	0,51 (0,17)	0,83 (0,08)	0,8 (0,08)
	M	0,53 (0,11)	0,53 (0,19)	0,82 (0,09)	0,78 (0,09)
	F	0,4 (0,24)	0,47 (0,15)	0,88 (0,01)	0,83 (0,07)
Mn	Ukupno	3,07 (0,89) ^a	17,04 (24,28) ^b	20,48 (9,28) ^a	12,06 (5,3) ^b
	M	3,23 (0,74)	21,65 (30,74)	20,03 (10,66)	11,59 (5,53)
	F	2,54 (1,51)	9,34 (5,62)	22,05 (1,34)	12,85 (5,97)
Mo	Ukupno	2,5 (0,56)	2,54 (1,38)	0,26 (0,09)	0,16 (0,11)
	M	2,71 (0,36)	2,98 (1,62)	0,28 (0,09)	0,17 (0,13)
	F	1,77 (0,56)	1,8 (0,33)	0,2 (0,13)	0,15 (0,11)
Ni	Ukupno	47,32 (14,03) ^a	70,04 (15,15) ^b	8,42 (2,57) ^a	6,67 (2,12) ^a
	M	48,63 (15,22)	67,52 (16,84)	8,11 (1,79)	6,85 (2,52)
	F	42,73 (11,46)	74,23 (13,94)	9,5 (5,52)	6,38 (1,69)
Pb	Ukupno	1,33 (0,38) ^a	2,8 (1,38) ^b	1,63 (0,66) ^b	0,51 (0,24) ^a
	M	1,4 (0,42)	3,05 (1,64)	1,71 (0,74)	0,46 (0,22)
	F	1,11 (0,01)	2,39 (0,91)	1,34 (0,03)	0,6 (0,29)
Rb	Ukupno	4,31 (0,66) ^a	3,91 (0,42) ^a	0,31 (0,07) ^b	0,21 (0,09) ^a
	M	4,55 (0,52)	4,01 (0,3)	0,3 (0,07)	0,24 (0,11)
	F	3,5 (0,45)	3,75 (0,61)	0,36 (0,09)	0,17 (0,04)
Sb	Ukupno	0,04 (0,01) ^a	0,05 (0,01) ^b	0,08 (0,02) ^a	0,08 (0,01) ^a
	M	0,04 (0,01)	0,06 (0,01)	0,09 (0,02)	0,08 (0,01)
	F	0,03 (0,01)	0,05 (0)	0,08 (0,01)	0,07 (0,01)
Sc	Ukupno	0,07 (0,03)	0,04 (0,03)	0,04 (0,01)	0,06 (0,03)
	M	0,07 (0,03)	0,04 (0,03)	0,04 (0,01)	0,05 (0,04)
	F	0,06 (0,01)	0,05 (0,02)	0,06 (0)	0,06 (0)
Se	Ukupno	0,83 (0,29) ^a	1,25 (0,46) ^b	48,1 (36,82) ^a	32,98 (43,99) ^a
	M	0,82 (0,32)	1,32 (0,58)	58,56 (35,11)	36,45 (49,18)
	F	0,85 (0,26)	1,12 (0,17)	11,5 (1,56)	27,19 (43,06)
Sn	Ukupno	0,15 (0,04)	0,2 (0,08)	0,2 (0,08)	0,16 (0,05)
	M	0,16 (0,04)	0,18 (0,03)	0,21 (0,09)	0,16 (0,05)
	F	0,12 (0,02)	0,24 (0,13)	0,17 (0,04)	0,17 (0,05)
Sr	Ukupno	42,22 (17,1)	40,44 (14,76)	1540,33 (209,35)	1515 (100,56)

Elementi u tragovima (µg/g)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) ± standardna devijacija (SD)			
		Meka tkiva		Ljuštura	
		Ljeto	Zima	Ljeto	Zima
Ti	M	43,37 (16,66)	38,1 (17,77)	1544,14 (239,78)	1531,4 (117,34)
	F	38,17 (25,14)	44,34 (9,74)	1527 (72,12)	1487,67 (77,86)
	Ukupno	9,3 (4,61)	17,63 (11,55)	15,32 (4,86)	10,35 (5,37)
	M	9,56 (3,85)	16,98 (10,95)	14,72 (4,58)	12,42 (5,84)
	F	8,39 (8,9)	18,73 (14,99)	17,4 (7,21)	6,89 (2,06)
U	Ukupno	0,22 (0,08) ^a	0,15 (0,06) ^a	0,13 (0,07) ^a	0,05 (0,02) ^b
	M	0,23 (0,09)	0,16 (0,06)	0,14 (0,07)	0,05 (0,02)
	F	0,21 (0,02)	0,13 (0,04)	0,1 (0,04)	0,06 (0,02)
V	Ukupno	3,45 (1,32) ^a	4,69 (3,08) ^a	0,84 (0,29) ^b	0,48 (0,16) ^a
	M	3,69 (1,42)	5,35 (3,7)	0,8 (0,28)	0,52 (0,18)
	F	2,61 (0,26)	3,59 (1,69)	0,98 (0,4)	0,42 (0,14)
Y	Ukupno	0,71 (0,75) ^a	0,42 (0,44) ^a	0,21 (0,1) ^a	0,09 (0,04) ^b
	M	0,73 (0,84)	0,51 (0,55)	0,21 (0,11)	0,1 (0,05)
	F	0,63 (0,59)	0,27 (0,13)	0,18 (0,08)	0,08 (0,01)
Zn	Ukupno	105,78 (16,13)	121,16 (36,7)	13,22 (5,75)	11 (8,03)
	M	108,01 (11,82)	133,43 (41,67)	13,64 (6,57)	8 (2,87)
	F	98 (32,98)	100,7 (15,44)	11,75 (0,49)	15,99 (12,23)

Značajne razlike između godišnjih doba, za rezultate u mekim tkivima i u ljušturama, testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa, no značajnih razlika između spolova nije bilo. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$.

Tablica 8. Koncentracija makroelemenata (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)) iz mekih tkiva i ljuštura *H. tuberculata* kroz dva temperaturna ekstrema (ljetno i zima), u mužjaka (M) i ženki (F)

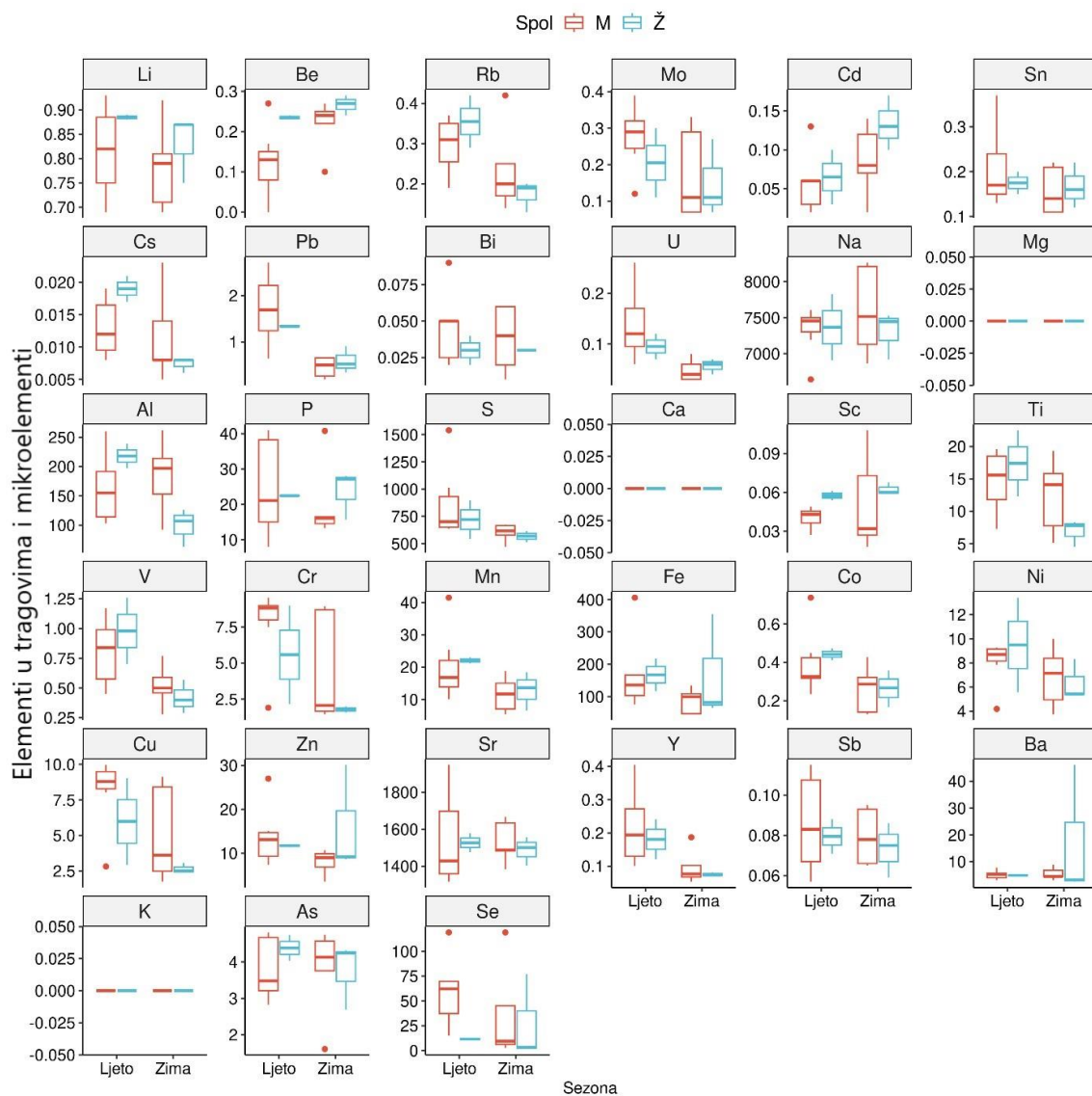
Makro- elementi (mg/g)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Meka tkiva		Ljuštura	
		Ljeto	Zima	Ljeto	Zima
Ca	Ukupno	4,96 (2,51)	5,27 (2,40)	<LD	<LD
	M	5,18 (2,48)	4,30 (2,49)	<LD	<LD
	F	4,19 (3,43)	6,89 (1,25)	<LD	<LD
K	Ukupno	10,02 (1,52)	10,06 (1,11)	<LD	<LD
	M	10,56 (1,23)	10,51 (0,50)	<LD	<LD
	F	8,12 (0,31)	9,32 (1,56)	<LD	<LD
Mg	Ukupno	3,49 (0,7)	3,17 (0,22)	<LD	<LD
	M	3,69 (0,63)	3,21 (0,27)	<LD	<LD
	F	2,82 (0,63)	3,11 (0,12)	<LD	<LD
Na	Ukupno	18,52 (3,45)	16,62 (2,27)	7,34 (0,37)	7,48 (0,53)
	M	19,53 (3,1)	17,77 (2,05)	7,33 (0,33)	7,60 (0,63)
	F	14,98 (2,28)	14,71 (0,94)	7,37 (0,65)	7,30 (0,33)
P	Ukupno	3,98 (0,94)	4,29 (0,36)	0,025 (0,01)	0,022 (0,009)
	M	4,10 (0,93)	4,29 (0,28)	0,025 (0,01)	0,02 (0,01)
	F	3,54 (1,21)	4,30 (0,55)	0,022 (0,001)	0,024 (0,007)
S	Ukupno	20,01 (1,71) ^a	21,62(1,87) ^a	0,83 (0,31) ^a	0,59 (0,07) ^b
	M	20,67 (1,44)	22,23 (0,91)	0,86 (0,33)	0,60 (0,08)
	F	18,00 (0,009)	20,60 (2,85)	0,72 (0,25)	0,56 (0,05)

Značajne razlike između godišnjih doba, za rezultate u mekim tkivima i u ljušturama, testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa no značajnih razlika između spolova nije bilo. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$. Oznaka <LD znači da je dobiveni rezultat ispod limita detekcije (LD) instrumenta.

Kutijasti dijagrami (engl. *boxplot* distribucija) prikazuju vrijednosti elemenata u tragovima (Slika 20.) i makroelemenata (Slika 21.) iz ljuštura i iz mekih tkiva *H. tuberculata* kroz ljetno i zimu, prema spolu. Na osi x naznačena su godišnja doba (Sezona). Na osi y (Rezultati u ljušturi) označena je ukupna koncentracija elemenata i mikroelemenata ($\mu\text{g/g}$). Masno otisnuta poprečna linija označava medijan, dok prostori iznad i ispod medijana označavaju prvi i treći kvartil. Linije koje izlaze izvan okvira su najviša ili najniža vrijednost koja nije veća od 1,5 puta interkvartilnog raspona prvog ili trećeg kvartila. Vrijednosti izvan tih linija su točke koje su prikazane zasebno. Vrijednosti za mužjake (M) označene su crvenom, a za ženke (Ž) plavom bojom. Na obe se slike vidi velika fluktuacija vrijednosti mjerenih parametara između toplog i

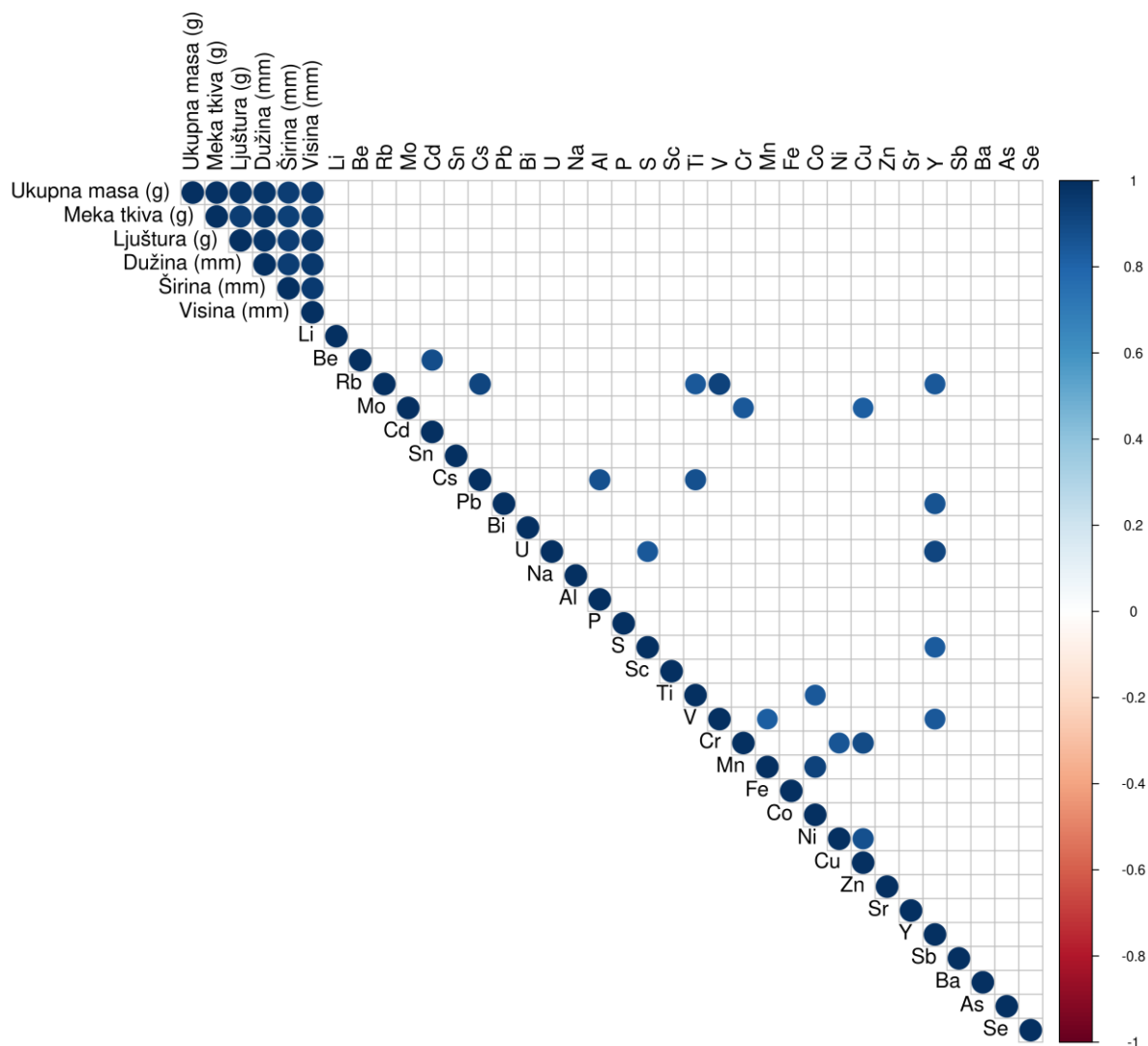
hladnog godišnjeg razdoblja, kao i razlike u distribuciji podataka prema spolovima i sezonama, za ljuštire i za meka tkiva.

Slika 20. Boxplot distribucija vrijednosti elemenata u tragovima i makroelemenata iz ljuštura *H. tuberculata* kroz ljeto i zimu, prema spolu. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

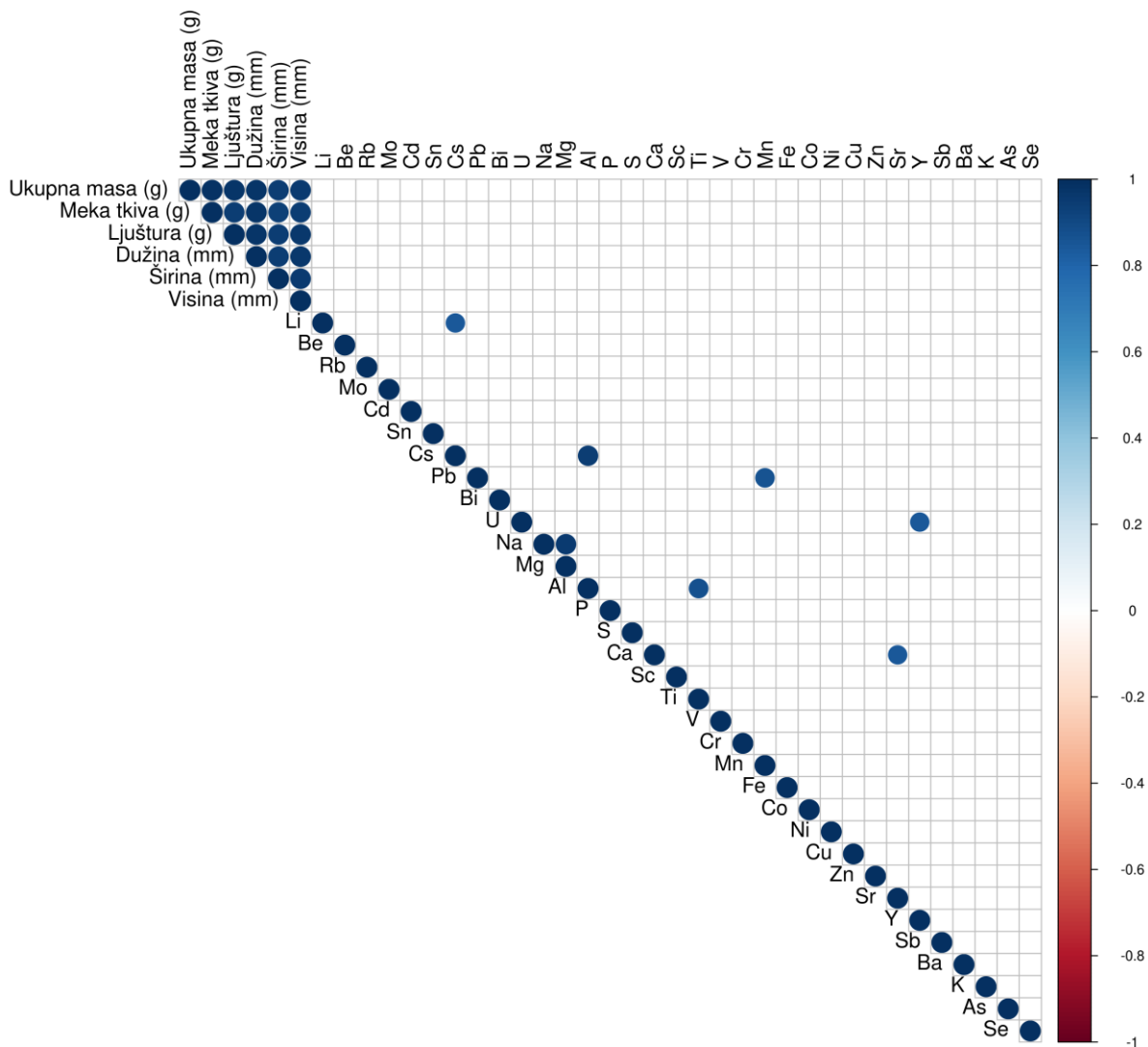


Slika 21. Boxplot distribucija vrijednosti elemenata u tragovima i makroelemenata iz mekih tkiva *H. tuberculata* kroz ljeto i zimu, prema spolu. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

Korelacija mjerenih elemenata u tragovima i makroelemenata iz ljuštura (Slika 22.) i mekih tkiva (Slika 23.) s dužinsko-masenim parametrima petrovog uha, prikazana je nezavisno od spola i sezone, s naznačenim pozitivnim (plavo) i negativnim (crveno) Spearmanovim koeficijentima korelacije koji su izostavljeni ako nisu bili značajni nakon primjene Bonferronijeve prilagodbe p vrijednosti. Mjerene dužinsko-masene vrijednosti se za ukupnu masu organizama, masu mekih tkiva i ljuštura odnose na grame (g), a za dužinu, širinu i visinu ljušture na milimetre (mm). Ukupna koncentracija elemenata i mikroelemenata mjerena je u $\mu\text{g/g}$. Vrlo srodne pozitivne korelacije elemenata i biometrijskih parametara možemo uočiti i kod mekih tkiva i kod ljušture petrovog uha.



Slika 22. Korelogram elemenata u tragovima i makroelemenata iz ljuštura i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.



Slika 23. Korelogram elemenata u tragovima i makroelemenata iz mekih tkiva i dužinsko-masениh parametara *H. Tuberculata*. Mjerene vrijednosti izražene su kao $\mu\text{g/g}$ za elemente u tragovima te kao mg/g za makroelemente.

4.4. Biokemijski pokazatelji

Koncentracija osnovnih biokemijskih parametara (Tablica 9.) metabolita (GLU) i lipida (CHOL, TRIG) bila je naviša ljeti, kako za ukupne jedinke (uključujući i mužjake i ženke i hermafrodite), tako i za jedinke pojedinačnih spolova, osim za GLU kod ženki, koja je bila najviša u jesen. Najviše vrijednosti po spolu izmjerene su ljeti kod mužjaka za GLU i TRIG, te kod ženki za CHOL. Elektroliti (Mg i Ca) najviše vrijednosti imali su u jesen, a u oba elektrolita vrijednosti su bile više u mužjaka nego u ženki, iako ne značajno. Vrijednosti Mg, TRIG i CHOL u ukupnim su uzorcima bile značajno različite u ljeto u odnosu na druge sezone. Vrijednosti Ca u ukupnim su uzorcima bile značajno različite u ljeto u odnosu u proljeće i jesen. Mužjaci i ženke nisu pokazivali značajne razlike niti za jedan parametar kroz istraživane sezone.

Tablica 9. Parametri biokemijskih pokazatelja mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD))

Parametri Jedinke		Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
GLU (mg/g)	Ukupno	0,5 (0,33)	2,32 (3,08)	0,62 (0,48)	0,26 (0,25)
	M	0,32 (0,13)	4,52 (3,03)	0,4 (0,29)	0,42 (0,17)
	F	0,76 (0,41)	0,12 (0,11)	1,26 (0,14)	0,03 (0,02)
CHOL (mg/g)	Ukupno	0,02 (0,01) ^a	0,27 (0,23) ^b	0,04 (0,04) ^a	0,03 (0,01) ^a
	M	0,01 (0)	0,26 (0,19)	0,04 (0,03)	0,03 (0,01)
	F	0,02 (0)	0,28 (0,31)	0,03 (0)	0,02 (0,01)
TRIG (mg/g)	Ukupno	0,01 (0) ^a	0,63 (0,5) ^b	0,05 (0,08) ^a	0,01 (0,01) ^a
	M	0,01 (0)	0,8 (0,55)	0,04 (0,05)	0,02 (0)
	F	0,01 (0)	0,47 (0,49)	0,01 (0)	0,01 (0)
Ca (mg/g)	Ukupno	0,76 (0,19) ^a	0,2 (0,15) ^b	2,44 (2,84) ^a	0,61 (0,14) ^{ab}
	M	0,82 (0,23)	0,23 (0,19)	2,28 (2,84)	0,57 (0,16)
	F	0,66 (0,04)	0,17 (0,14)	1,02 (0,11)	0,68 (0,11)
Mg (mg/g)	Ukupno	4,35 (1,15) ^a	0,32 (0,2) ^b	13,89 (15,82) ^a	3,63 (0,68) ^a
	M	4,46 (1,56)	0,31 (0,22)	11,25 (12,66)	3,6 (0,95)
	F	4,18 (0,6)	0,34 (0,24)	6,6 (0,88)	3,69 (0,19)

Značajne razlike između godišnjih doba testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa no značajnih razlika između spolova nije bilo. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$.

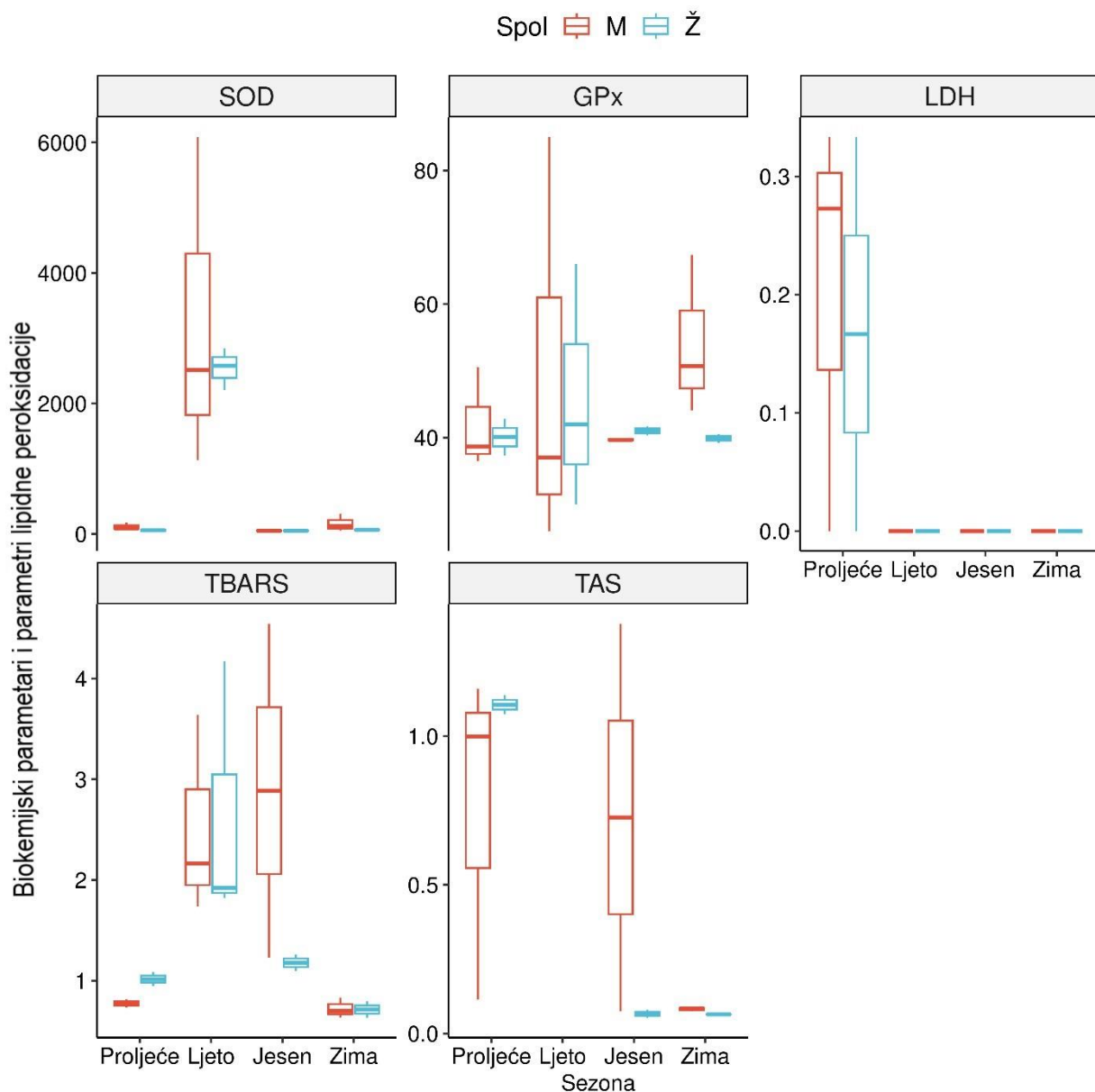
Parametri antioksidativne obrane tkiva (Tablica 10.) u ovom istraživanju varirali su prema godišnjim dobima, ali ne toliko između spolova. Vrijednosti TBARS-a razlikovale su se više između godišnjih doba (uzorci ljeta i jeseni imali su značajno više vrijednosti u usporedbi s uzorcima proljeća i zime) nego između spolova u odgovarajućim godišnjim dobima, pri čemu su najviše vrijednosti zabilježene tijekom jeseni kod mužjaka i ljeta kod ženki. Nisu zabilježene značajne razlike između godišnjih doba i spolova tijekom zime i proljeća. Utjecaj godišnjih doba na enzimске aktivnosti u ovom istraživanju nije bio jednoličan, pokazujući značajno više vrijednosti za SOD ljeti i za LDH i TAS u proljeće, dok su jedine značajne razlike između spolova primijećene u slučaju LDH-a, koji je bio značajno veći kod mužjaka, a samo u proljeće je davao rezultate koji su bili različiti od nule. TAS nije bio mjerljiv u ljeto.

Tablica 10. Parametri antioksidativne obrane mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)).

Parametri Jedinke		Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
SOD (U/g)	Ukupno	88,31 (51,35) ^a	2892 (1672,63) ^b	43,94 (11,42) ^a	121,38 (108,55) ^a
	M	110,26 (57,6)	3242,33 (2554,05)	46,55 (4,88)	159,06 (134,77)
	F	55,38 (17,25)	2541,67 (320,63)	50,95 (3,79)	64,88 (12,9)
GPx (U/g)	Ukupno	41,16 (5,8)	47,67 (23,05)	39,01 (3,12)	48,38 (11,5)
	M	41,89 (7,59)	49,33 (31,37)	39,67 (0,23)	54,05 (11,99)
	F	40,06 (3,9)	46 (18,33)	41,04 (0,98)	39,88 (0,94)
LDH (U/g)	Ukupno	0,19 (0,17)	<LD	<LD	<LD
	M	0,2 (0,18)	<LD	<LD	<LD
	F	0,17 (0,24)	<LD	<LD	<LD
TBARS (ng/g)	Ukupno	0,87 (0,14) ^b	2,58 (1,05) ^a	3,45 (3,49) ^a	0,72 (0,09) ^b
	M	0,77 (0,04)	2,51 (1)	2,89 (2,34)	0,72 (0,1)
	F	1,02 (0,1)	2,64 (1,33)	1,18 (0,12)	0,71 (0,12)
TAS (mmol/g)	Ukupno	0,9 (0,44) ^b	-	0,33 (0,59) ^{ab}	0,08 (0,01) ^a
	M	0,76 (0,56)	-	0,73 (0,92)	0,08 (0,01)
	F	1,11 (0,05)	-	0,07 (0,02)	0,06 (0)

Značajne razlike između godišnjih doba testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa no značajnih razlika između spolova nije bilo. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$. Oznaka <LD znači da je dobiveni rezultat ispod limita detekcije (LD) instrumenta.

Na Slici 24. prikazan je kutijasti dijagram (engl. *boxplot* distribucija) vrijednosti biokemijskih parametara i parametra lipidne peroksidacije mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu. Na osi x naznačena su godišnja doba (Sezona). Na osi y (Rezultati) označene su mjerene vrijednosti za pojedine parametre: SOD (U/g), GPx (U/g), LDH (U/g), TBARS (ng MDA/g), TAS (mmol/g). Masno otisnuta poprečna linija označava medijan, dok prostori iznad i ispod medijana označavaju prvi i treći kvartil. Linije koje izlaze izvan okvira su najviša ili najniža vrijednost koja nije veća od 1,5 puta interkvartilnog raspona prvog ili trećeg kvartila. Vrijednosti za mužjake (M) označene su crvenom, a za ženke (Ž) plavom bojom. LDH je samo u proljeće davao rezultate koji su bili različiti od nule. TAS nije bio mjerljiv u ljeto. Distribucija vrijednosti mjerenih parametara bila je različita između spolova, te je za većinu parametara interkvartilni raspon pokazivao veću disperziju podataka kod mužjaka, dok su lokacije medijana između spolova bile podudarne samo za SOD ljeti i za GPx u proljeće.

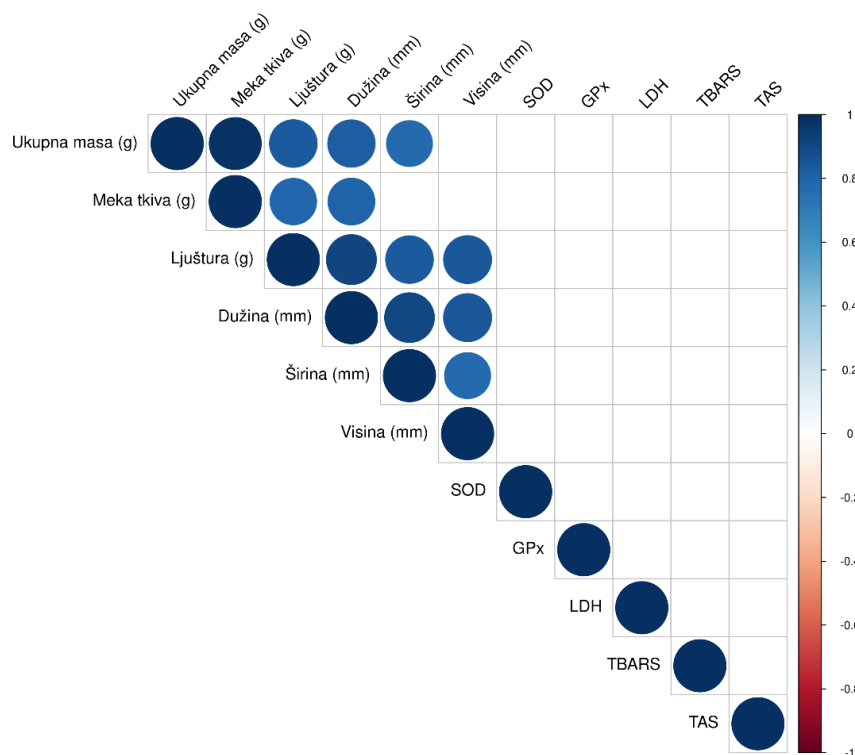


Slika 24. Boxplot distribucija vrijednosti biokemijskih parametara i parametara lipidne peroksidacije mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu. Mjerene vrijednosti izražene su kao U/g proteina za SOD, GPx, LDH, kao mmol/L proteina za TAS, te kao mg/g tkiva za TBARS.

Korelacija mjerenih biokemijskih parametara antioksidativnog kapaciteta, parametara lipidne peroksidacije i dužinsko-masениh parametara petrovog uha, nezavisno od spola i sezone, prikazana je na Slici 25. Korelogram je s naznačenim pozitivnim (plavo) i negativnim

(crveno) Spearmanovim koeficijentima korelacije koji su izostavljeni ako nisu bili značajni nakon primjene Bonferronijeve prilagodbe p vrijednosti. Mjerene dužinsko-masene vrijednosti se za ukupnu masu organizma, masu mekih tkiva i ljušturu odnose na grame (g), a za dužinu, širinu i visinu ljušture na milimetre (mm). Mjerene vrijednosti za pojedine parametre izražene su kako slijedi: SOD (U/g), GPx (U/g), LDH (U/g), TBARS (ng MDA/g), TAS (mmol/g). LDH je samo u proljeće davao rezultate koji su bili različiti od nule. TAS nije bio mjerljiv u ljeto.

Biokemijski parametri antioksidativnog kapaciteta nisu imali nikakve korelacije sa biometrijskim parametrima puža, te se na korelogramu uočava samo međusobno pozitivna korelacija dužinsko-masениh parametara.



Slika 25. Korelogram biokemijskih parametara antioksidativnog kapaciteta, parametra lipidne peroksidacije i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola i sezone. Mjerene vrijednosti izražene su kao U/g proteina za SOD, GPx, LDH, kao mmol/L proteina za TAS, te kao mg/g tkiva za TBARS.

4.5. Masnokiselinski sastav

Sastav masnih kiselina mekih tkiva (Tablica 11.) varirao je u različitim godišnjim dobima, kao i između spolova. Udjeli ukupnih zasićenih masnih kiselina (SFA) bili su slični u proljeće i jesen, najviši ljeti, a najmanji zimi. Primjetne spolne razlike u proporcijama SFA bile su u proljetnim i ljetnim uzorcima. Tako je zastupljenost SFA u petrovog uha bila najviša u razdoblju visokih temperatura mora, pogotovo kod ženki, što je osobito vidljivo kod C16:0 (PA). Udio ukupnih jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) povećao se u jesen, sa značajnim razlikama između mužjaka i ženki u proljeće i ljeto. Udjeli ukupnih višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) bili su najviši zimi, uz značajne razlike između mužjaka i ženki u proljeće i ljeto. Konkretno, petrovo uho imalo je izrazito divergentan rodni sastav C14:00 (proljeće), C15:00 (ljeto), C16:00 (ljeto), C17:00 (ljeto), C16:1 (ljeto), C18:1n9 (proljeće i ljeto), C18:1n7 (proljeće), C18:2 (ljeto), C20:5n3 (proljeće i ljeto), C22:5n3 (ljeti), a omjer neidentificiranih masnih kiselina ljeti. Značajne varijacije visokih i niskih udjela tijekom godišnjih doba pronađene su za C16:00, C18:1n9 i C20:5n3.

Općenito uzevši, ustanovljena je značajna varijacija između godišnjih doba za sve masne kiseline osim C22:5n3, i između spolova za sve osim C21:0. Modeliranje je pokazalo obrazac za sve masne kiseline da su značajno povezane s godišnjim dobom, no ne i sa spolom, te je naznačilo da glavni uzrok razlika između spolova proizlazi iz interakcijskog učinka između godišnjeg doba i spola. Drugim riječima, koncentracije masnih kiselina nisu različite između spolova tijekom zime i jeseni, već samo tijekom proljeća i ljeta gdje su neke više kod ženki, dok su druge više kod mužjaka. Posebno su koncentracije C15:0, C17:0, C18:0, C18:2c, C20:4n6, C20:5n3 i C22:5n3 bile više kod mužjaka nego kod ženki tijekom toplijeg dijela godine, dok su ostale bile više kod ženki nego kod mužjaka.

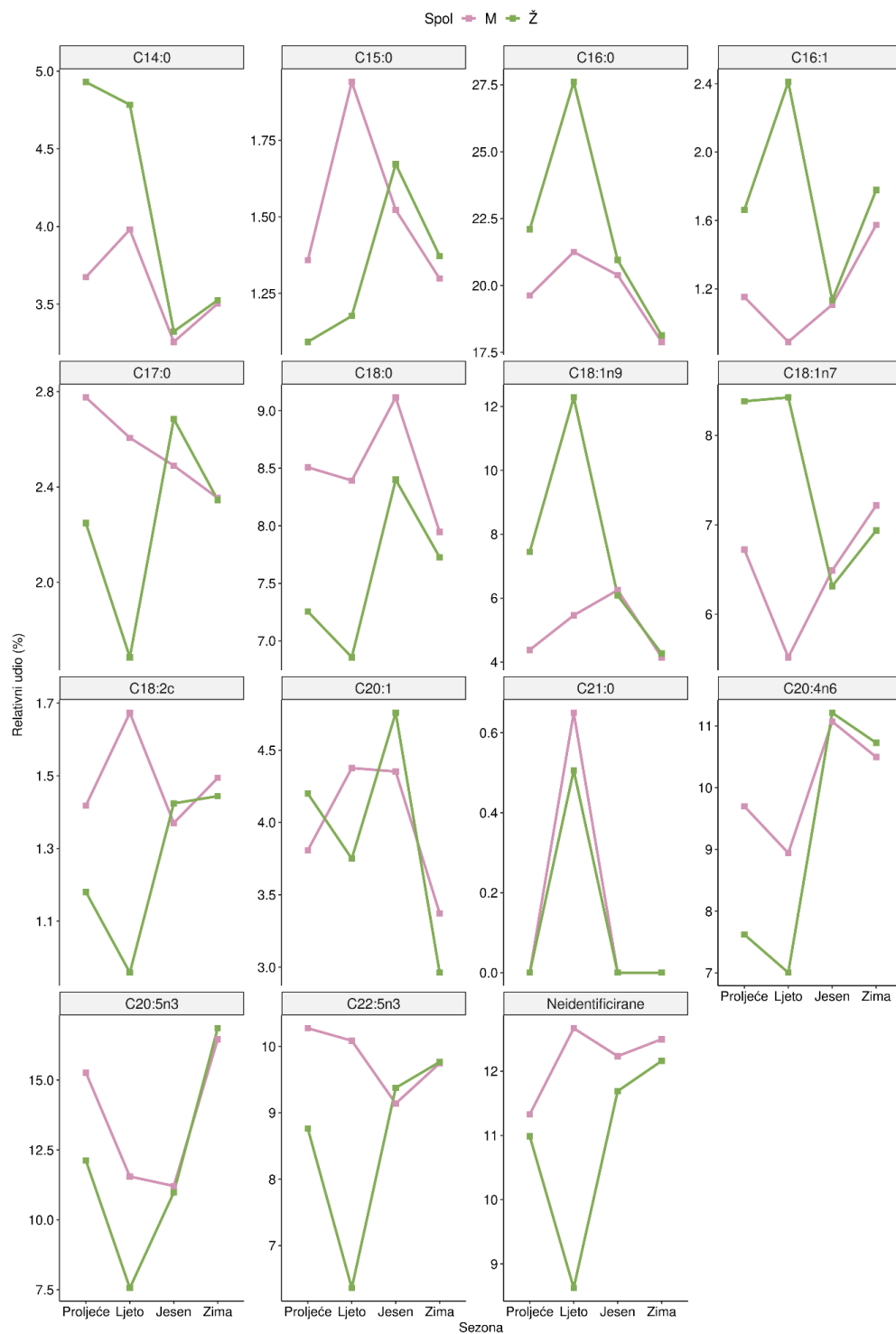
Tablica 11. Sastav masnih kiselina mekih tkiva mužjaka (M) i ženki (F) petrovog uha (*H. tuberculata*) tijekom godišnjih doba (aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)), kao postotak ukupnih masnih kiselina

Masna kiselina (%)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
C14:0	Ukupno	4,4 (0,8) ^b	4,44 (0,42) ^b	3,3 (0,07) ^a	3,52 (0,09) ^c
	M	3,67 (0,16) [*]	4,01 (0,08) [*]	3,27 (0,09)	3,5 (0,04)
	F	4,99 (0,56) [†]	4,78 (0,12) [†]	3,32 (0,06)	3,53 (0,13)
C15:0	Ukupno	1,2 (0,17) ^b	1,51 (0,41) ^{ab}	1,6 (0,08) ^a	1,33 (0,07) ^b
	M	1,36 (0,02) [*]	1,94 (0,02) [*]	1,53 (0,06) [*]	1,3 (0,02)
	F	1,08 (0,12) [†]	1,18 (0,09) [†]	1,67 (0) [†]	1,37 (0,09)
C16:0	Ukupno	21,14 (1,58) ^{ab}	24,89 (3,5) ^b	20,67 (0,39) ^a	18,02 (0,27) ^c
	M	19,62 (0,24) [*]	21,49 (0,74) [*]	20,38 (0,06) [*]	17,89 (0,35) [*]
	F	22,22 (1,11) [†]	27,61 (1,83) [†]	20,95 (0,38) [†]	18,14 (0,08) [*]
C16:1	Ukupno	1,46 (0,32) ^b	1,76 (0,82) ^b	1,12 (0,05) ^a	1,68 (0,11) ^b
	M	1,15 (0,07) [*]	0,95 (0,2) [*]	1,11 (0,01)	1,57 (0,04) [*]
	F	1,68 (0,22) [†]	2,41 (0,35) [†]	1,13 (0,08)	1,78 (0,03) [†]
C17:0	Ukupno	2,46 (0,34) ^b	2,09 (0,49) ^a	2,58 (0,14) ^b	2,35 (0,03) ^{ab}
	M	2,78 (0,02) [*]	2,6 (0,07) [*]	2,48 (0,04) [*]	2,35 (0,03)
	F	2,23 (0,25) [†]	1,69 (0,14) [†]	2,69 (0,12) [†]	2,35 (0,03)
C18:0	Ukupno	7,74 (0,82) ^a	7,56 (0,92) ^a	8,72 (0,43) ^b	7,84 (0,15) ^a
	M	8,51 (0,03) [*]	8,43 (0,1) [*]	9,05 (0,38) [*]	7,95 (0,15) [*]
	F	7,18 (0,61) [†]	6,86 (0,56) [†]	8,4 (0,01) [†]	7,73 (0,03) [†]
C18:1n-9	Ukupno	6,25 (1,97) ^a	9,31 (3,66) ^a	6,16 (0,59) ^a	4,21 (0,24) ^b
	M	4,38 (0,09) [*]	5,59 (0,44) [*]	6,23 (0,13)	4,15 (0,31)
	F	7,58 (1,47) [†]	12,29 (1,33) [†]	6,08 (0,87)	4,27 (0,17)
C18:1n-7	Ukupno	7,74 (1,09) ^b	7,11 (1,59) ^{ab}	6,4 (0,13) ^a	7,08 (0,15) ^{ab}
	M	6,72 (0,12) [*]	5,46 (0,23) [*]	6,48 (0,05) [*]	7,22 (0,04) [*]
	F	8,46 (0,83) [†]	8,42 (0,39) [†]	6,31 (0,14) [†]	6,94 (0,02) [†]
C18:2c	Ukupno	1,27 (0,16) ^a	1,3 (0,42) ^{ab}	1,4 (0,11) ^{ab}	1,47 (0,04) ^b
	M	1,42 (0,06) [*]	1,72 (0,15) [*]	1,38 (0,03)	1,49 (0,03) [*]
	F	1,17 (0,13) [†]	0,96 (0,14) [†]	1,42 (0,16)	1,44 (0,04) [†]

Masna kiselina (%)	Jedinke	Aritmetička sredina ($\bar{X}$) $\pm$ standardna devijacija (SD)			
		Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima
C20:1	Ukupno	4,05 (0,26) ^b	4,01 (0,37) ^b	4,56 (0,35) ^c	3,17 (0,26) ^a
	M	3,81 (0,02) [*]	4,35 (0,15) [*]	4,36 (0,02) [*]	3,37 (0,23) [*]
	F	4,22 (0,19) [†]	3,75 (0,23) [†]	4,76 (0,41) [†]	2,96 (0,03) [†]
C21:0	Ukupno	0 (0)	0,5 (0,4)	0 (0)	0 (0)
	M	0 (0)	0,49 (0,56)	0 (0)	0 (0)
	F	0 (0)	0,51 (0,29)	0 (0)	0 (0)
C20:4n6	Ukupno	8,43 (1,33) ^a	7,92 (1,16) ^a	11,15 (0,08) ^b	10,61 (0,23) ^b
	M	9,7 (0,04) [*]	9,06 (0,34) [*]	11,08 (0,04) [*]	10,5 (0,27)
	F	7,52 (0,98) [†]	7,01 (0,5) [†]	11,21 (0,02) [†]	10,73 (0,09)
C20:5n3	Ukupno	13,36 (2,02) ^b	9,35 (2,2) ^a	11,11 (0,21) ^a	16,66 (0,51) ^c
	M	15,27 (0,1) [*]	11,59 (0,1) [*]	11,25 (0,2)	16,46 (0,54)
	F	12 (1,5) [†]	7,56 (0,83) [†]	10,98 (0,13)	16,85 (0,44)
C22:5n3	Ukupno	9,35 (0,97)	8 (1,97)	9,23 (0,31)	9,76 (0,13)
	M	10,27 (0,25) [*]	10,05 (0,17) [*]	9,07 (0,36)	9,75 (0,1)
	F	8,69 (0,67) [†]	6,36 (0,46) [†]	9,38 (0,15)	9,77 (0,17)
Neidentificirane masne kiseline	Ukupno	11,11 (0,24) ^b	10,25 (2,11) ^b	12,01 (0,71) ^a	12,33 (0,41) ^a
	M	11,33 (0,09) [*]	12,28 (0,99) [*]	12,34 (0,58)	12,5 (0,43)
	F	10,96 (0,17) [†]	8,63 (0,87) [†]	11,69 (0,73)	12,16 (0,34)

Značajne razlike između godišnjih doba testirane su korištenjem ANOVA-e ili Kruskal-Wallisovog testa, ovisno o normalnosti testiranoj pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Rezultati su prikazani u retku "Ukupno", a godišnja doba s različitim slovima u eksponentu (a,b,c) se značajno razlikuju. Razlike između spolova unutar svakog godišnjeg doba testirane su korištenjem dvosmjernog neovisnog Studentovog t-testa ili Mann-Whitneyevog testa i označavaju se pomoću simbola u eksponentu (*,†) na isti način. Svi testovi za razinu značajnosti koriste $p < 0,05$. Vrijednosti (0) za C21:00 označavaju niske vrijednosti koje ne prelaze 0,4% po uzorku.

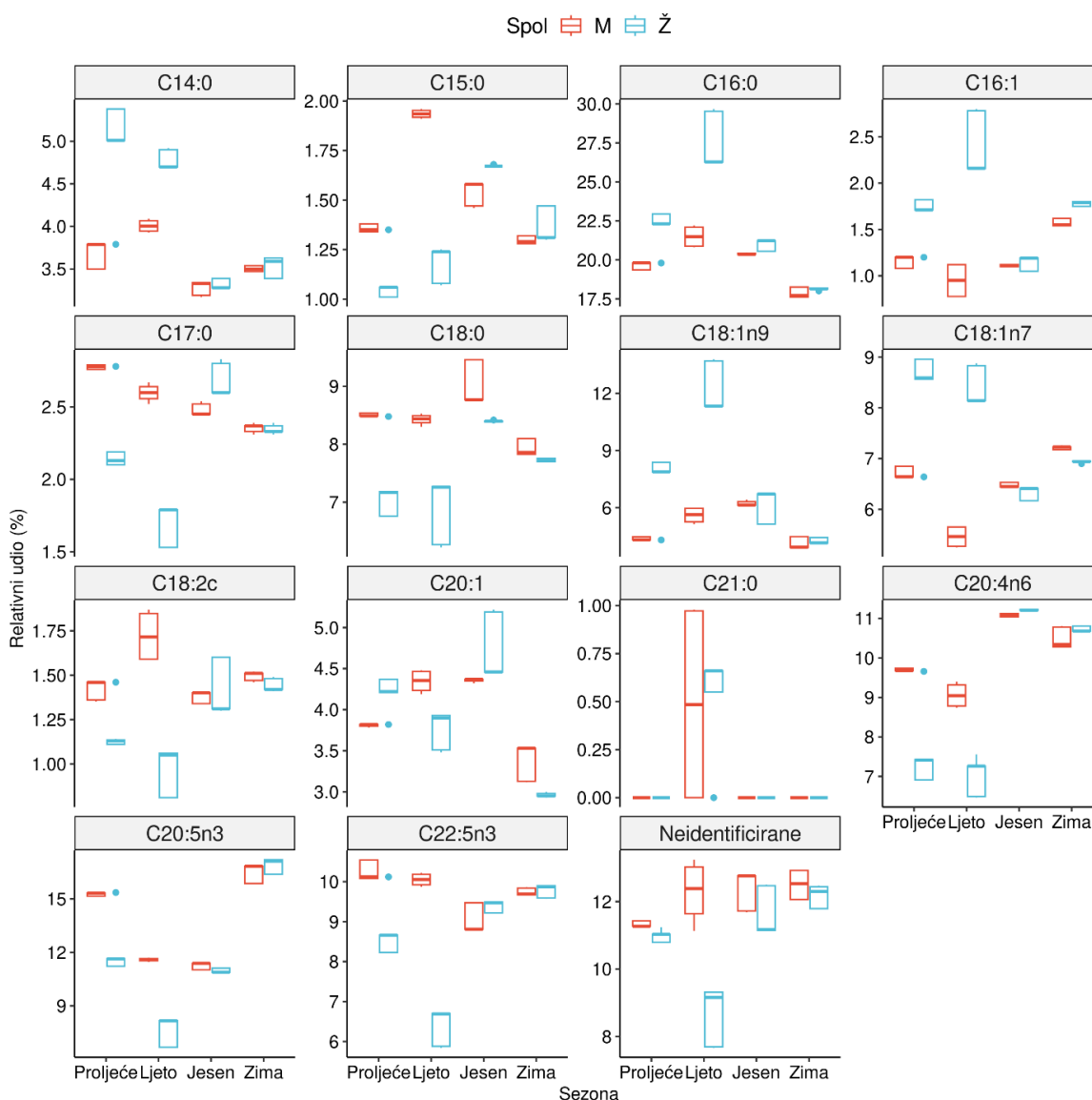
Na Slici 26. prikazane su prosječne vrijednosti, interakcije i trend kretanja masnokiselinskih vrijednosti mekih tkiva petrovog uha, kroz godišnja doba, prema spolu. Na osi x naznačena su godišnja doba (Sezona). Na osi y označen je relativni udio (%) pojedinih masnih kiselina (C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1n9, C18:1n7, C18:2c, C20:1, C21:0, C20:4n6, C20:5n3, C22:5n3, i masnih kiselina koje nije bilo moguće identificirati). Vrijednosti za mušjake (M) označene su rozom, a za ženke (Ž) zelenom bojom. Trend kretanja masnih kiselina podudarao se po spolovima (iako sa značajno različitim vrijednostima), za većinu masnih kiselina. Trendovi su bili različiti za C16:1, C17:0, C18:2c, C20:1, te za neidentificirane masne kiseline.



Slika 26. Prosječne vrijednosti, interakcije i trend kretanja masnokiselinskih vrijednosti (%) mekih tkiva *H. tuberculata*, kroz godišnja doba, prema spolu.

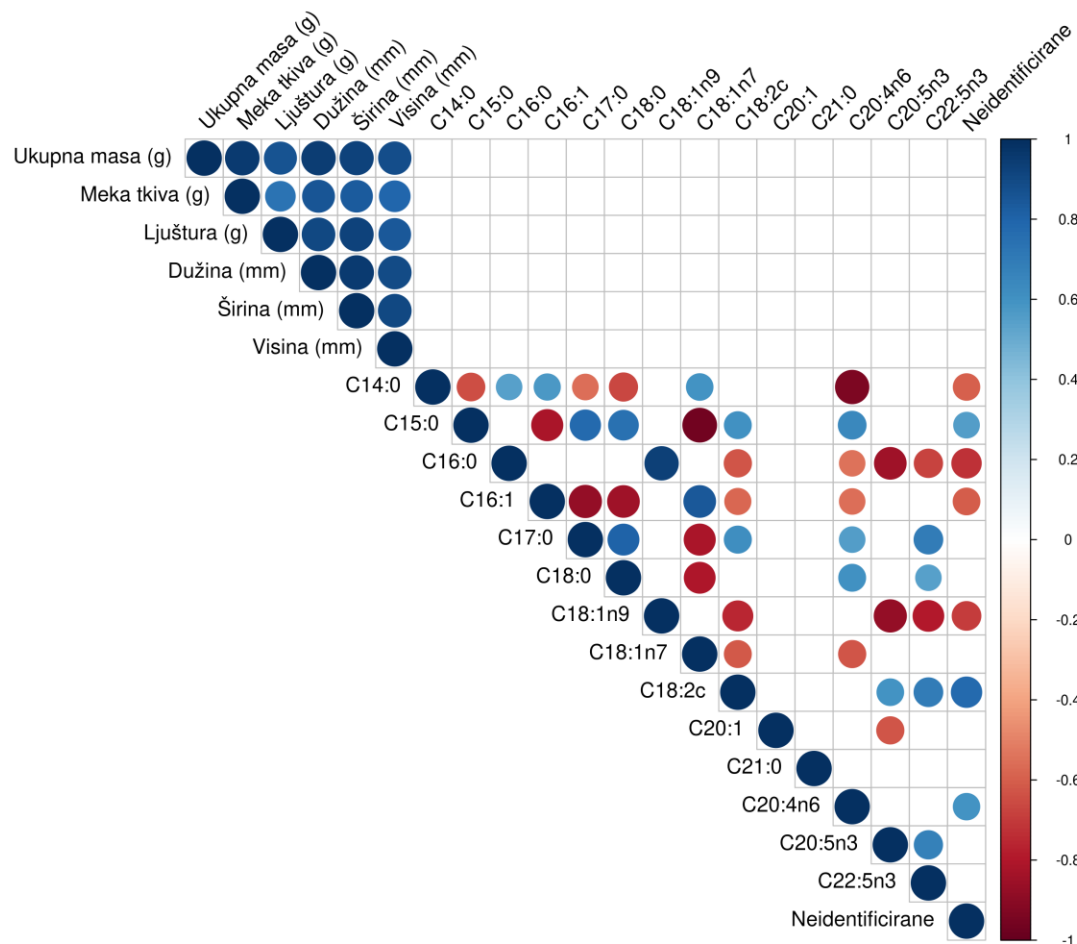
Na Slici 27. prikazan je kutijasti dijagram (engl. *boxplot* distribucija) vrijednosti relativnog udjela masnih kiselina petrovog uha kroz godišnja doba, prema spolu. Na osi x naznačena su

godišnja doba (Sezona). Na osi y (Rezultati) označene su mjerene vrijednosti kao relativni udio (%). Masno otisnuta poprečna linija označava medijan, dok prostori iznad i ispod medijana označavaju prvi i treći kvartil. Linije koje izlaze izvan okvira su najviša ili najniža vrijednost koja nije veća od 1,5 puta interkvartilnog raspona prvog ili trećeg kvartila. Vrijednosti izvan tih linija su točke koje su prikazane zasebno. Vrijednosti za mušjake (M) označene su crvenom, a za ženke (Ž) plavom bojom. Zamjetna je varijacija sastava masnih kiselina mekih tkiva u različitim godišnjim dobima, kao i između spolova. Interkvartilni rasponi ukazuju na znatnu disperziju vrijednosti i unutar kategorije godišnjih doba i unutar kategorije spola, za većinu masnih kiselina.

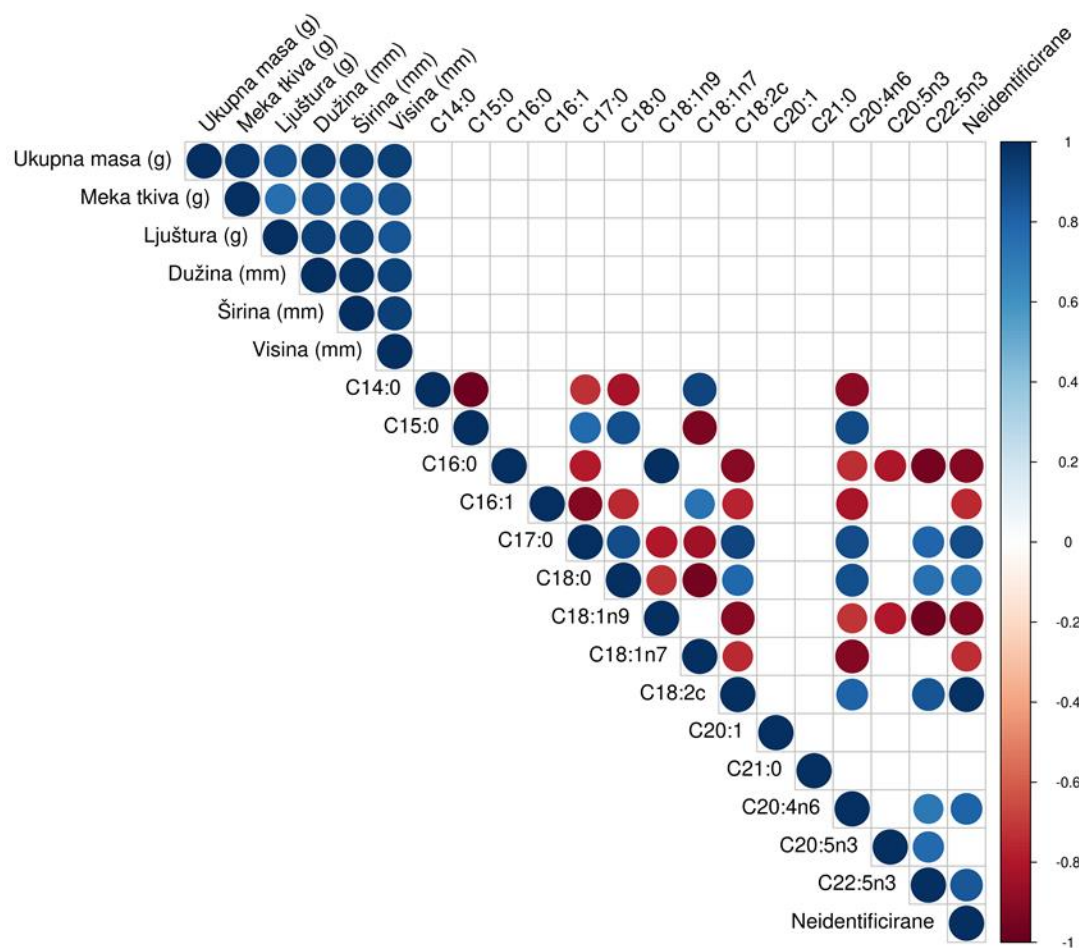


Slika 27. Boxplot distribucija vrijednosti relativnog udjela (%) masnih kiselina *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema spolu.

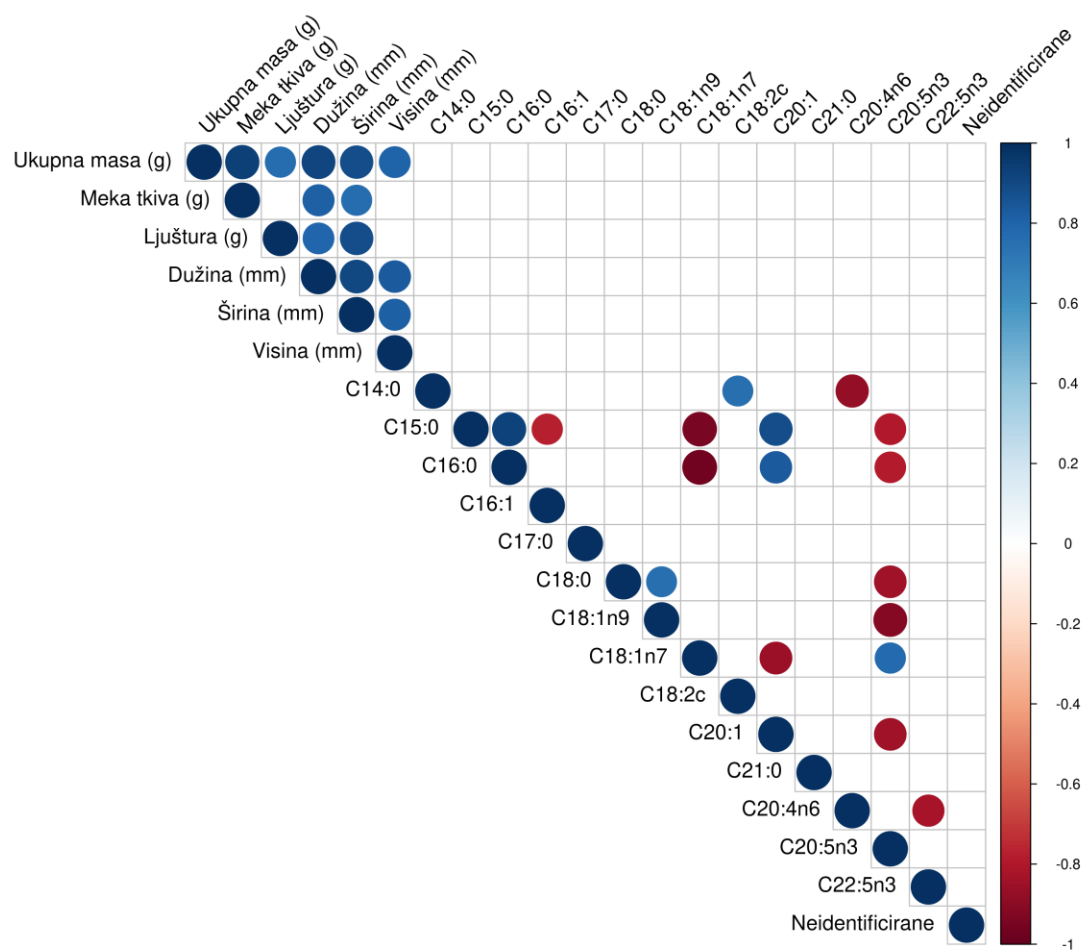
Korelacije sadržaja masnih kiselina, kao i ostalih ispitanih parametara prema godišnjim dobima i spolovima, vezanih uz masne kiseline petrovog uha, prikazane su na Slikama 28.-34. Korelacije s naznačenim pozitivnim (plavo) i negativnim (crveno) Spearmanovim koeficijentima korelacije su izostavljeni ako nisu bili značajni nakon primjene Bonferronijeve prilagodbe p vrijednosti. Mjerene dužinsko-masene vrijednosti se za ukupnu masu organizma, masu mekih tkiva i ljuštore odnose na grame (g), a za dužinu, širinu i visinu ljuštore na milimetre (mm). Ukupan masnokiselinski sastav podrazumijeva relativni udio (%) pojedinih masnih kiselina (C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1n9, C18:1n7, C18:2c, C20:1, C21:0, C20:4n6, C20:5n3, C22:5n3, i masnih kiselina koje nije bilo moguće identificirati). Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava i dužinsko-masениh parametara, nezavisno od spola i sezone, prikazan je na Slici 28. Masnokiselinski sastav nije imao nikakvih korelacija s biometrijskim parametrima, dok su masne kiseline pokazivale veći broj negativnih i pozitivnih međusobnih korelacija, s visokim korelacijskim koeficijentima u oba slučaja, osim C21:0 i C20:4n6. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava parametara ženki, nezavisno od sezone, prikazan je na Slici 29. Veći broj korelacija pokazao se sa negativnim korelacijskim koeficijentom. Kod mužjaka (Slika 30.), korelogram pokazuje manji broj korelacija nego kod ženki, i to većinom negativnih korelacija. Korelogrami masnokiselinskog sastava *H. tuberculata*, nezavisno od spola, prikazani su kroz razdiobu prema godišnjim dobima na Slikama 31.-34. Korelacija mjerenih parametara u proljeće (Slika 31.) bila je za većinu masnih kiselina izrazito visokih pozitivnih ili negativnih korelacijskih koeficijenata. Ljeti su odnosi bili drugačiji, gdje je većina korelacija bila snažno pozitivnih korelacijskih koeficijenata (Slika 32.). U jesen (Slika 33.) je zamijećeno tek pet korelacija, i one su uglavnom bile sa po jednom masnom kiselinom, uglavnom negativne. Slično je bilo i zimi (Slika 34.), no tu su korelacije uglavnom bile pozitivne, sa visokim korelacijskim koeficijentom.



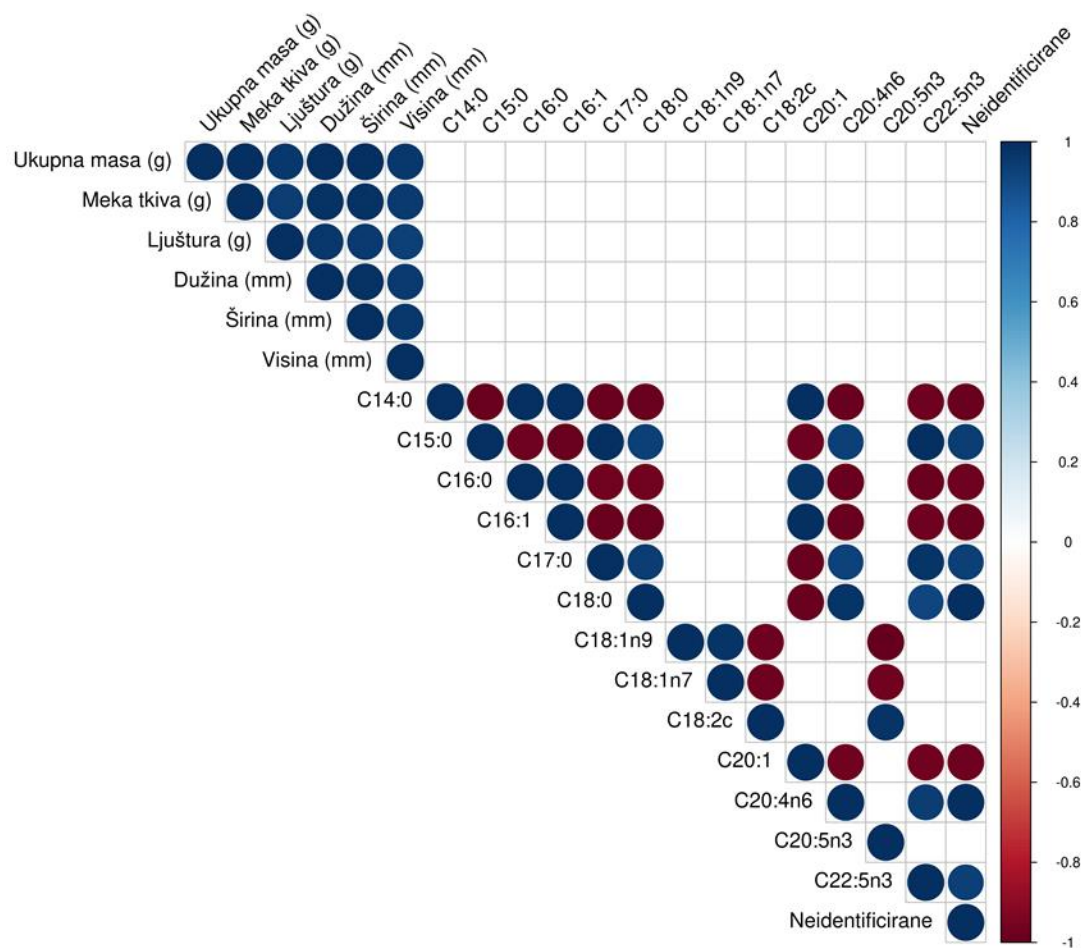
Slika 28. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola i sezone



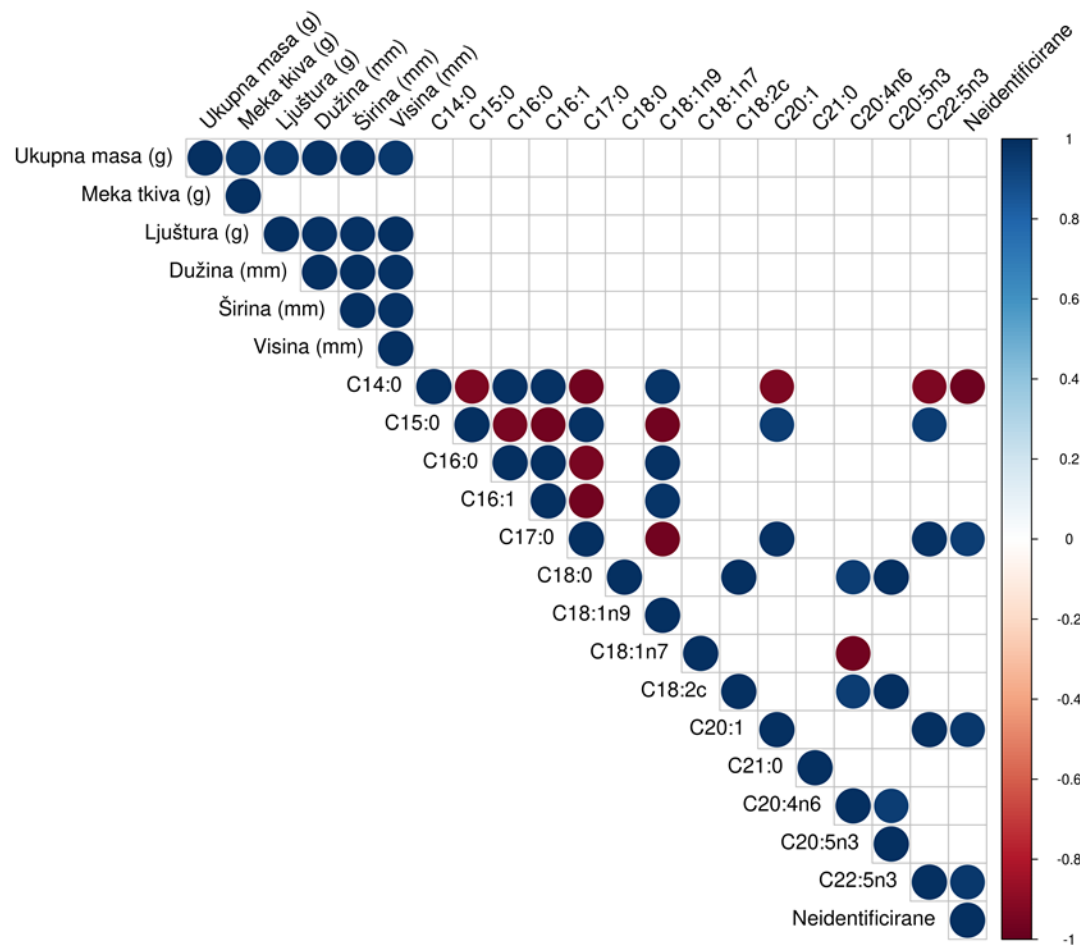
Slika 29. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara ženki *H. tuberculata*, nezavisno od sezone



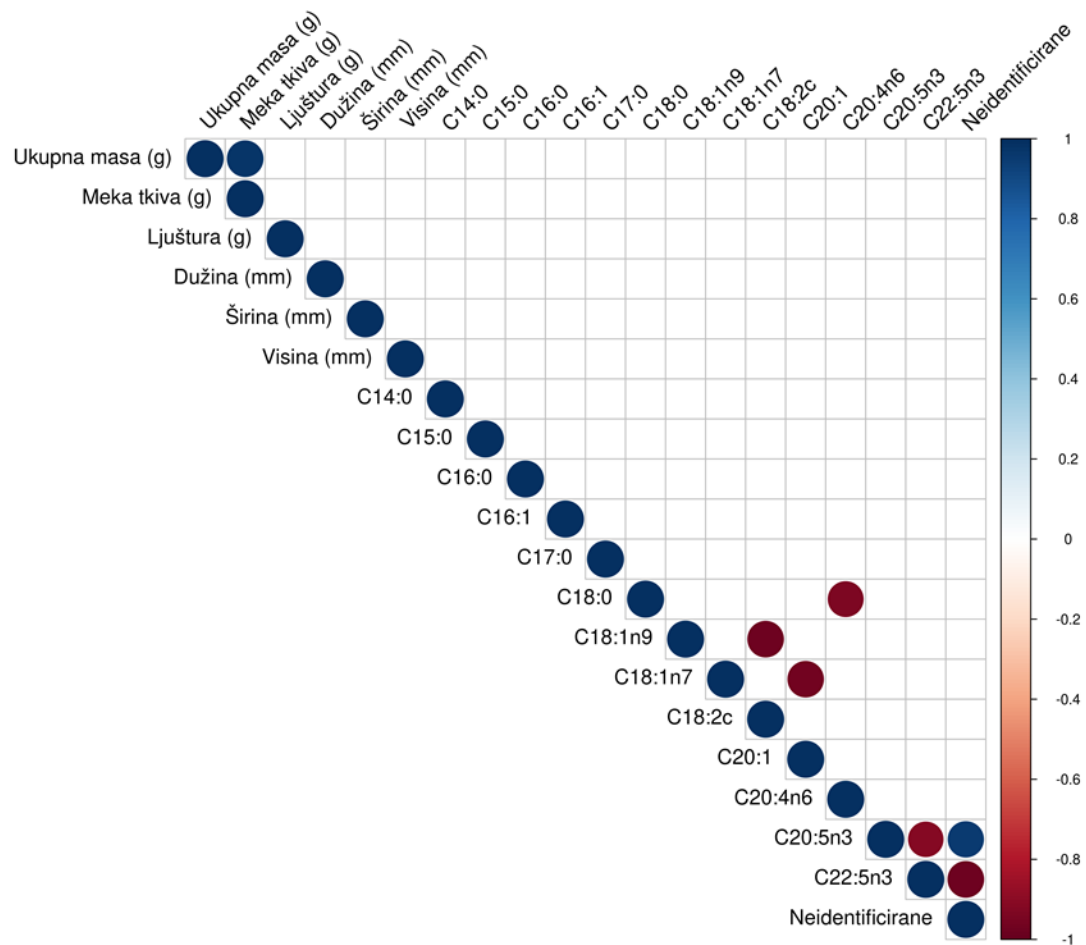
Slika 30. Korelogram ukupnog masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara mužjaka *H. tuberculata*, nezavisno od sezone



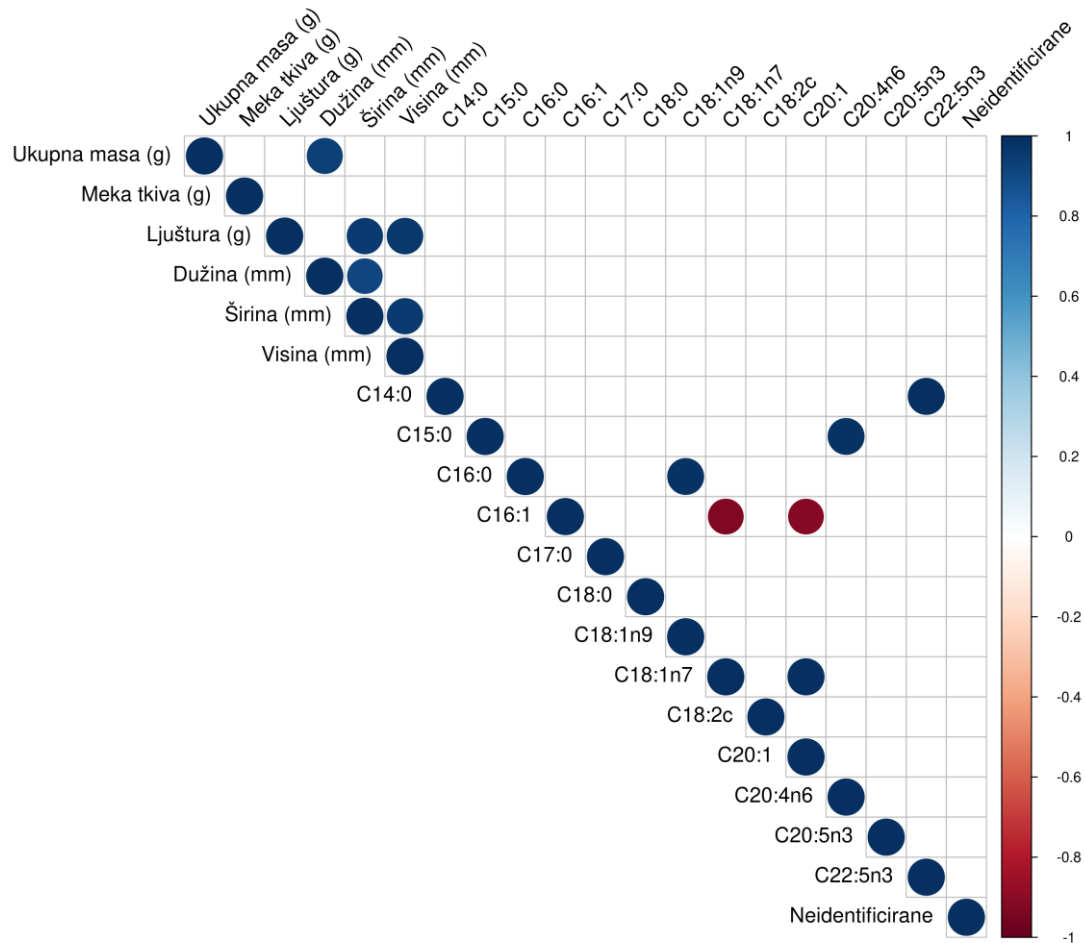
Slika 31. Korelogram masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, u proljeće



Slika 32. Korelogram masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, ljeti

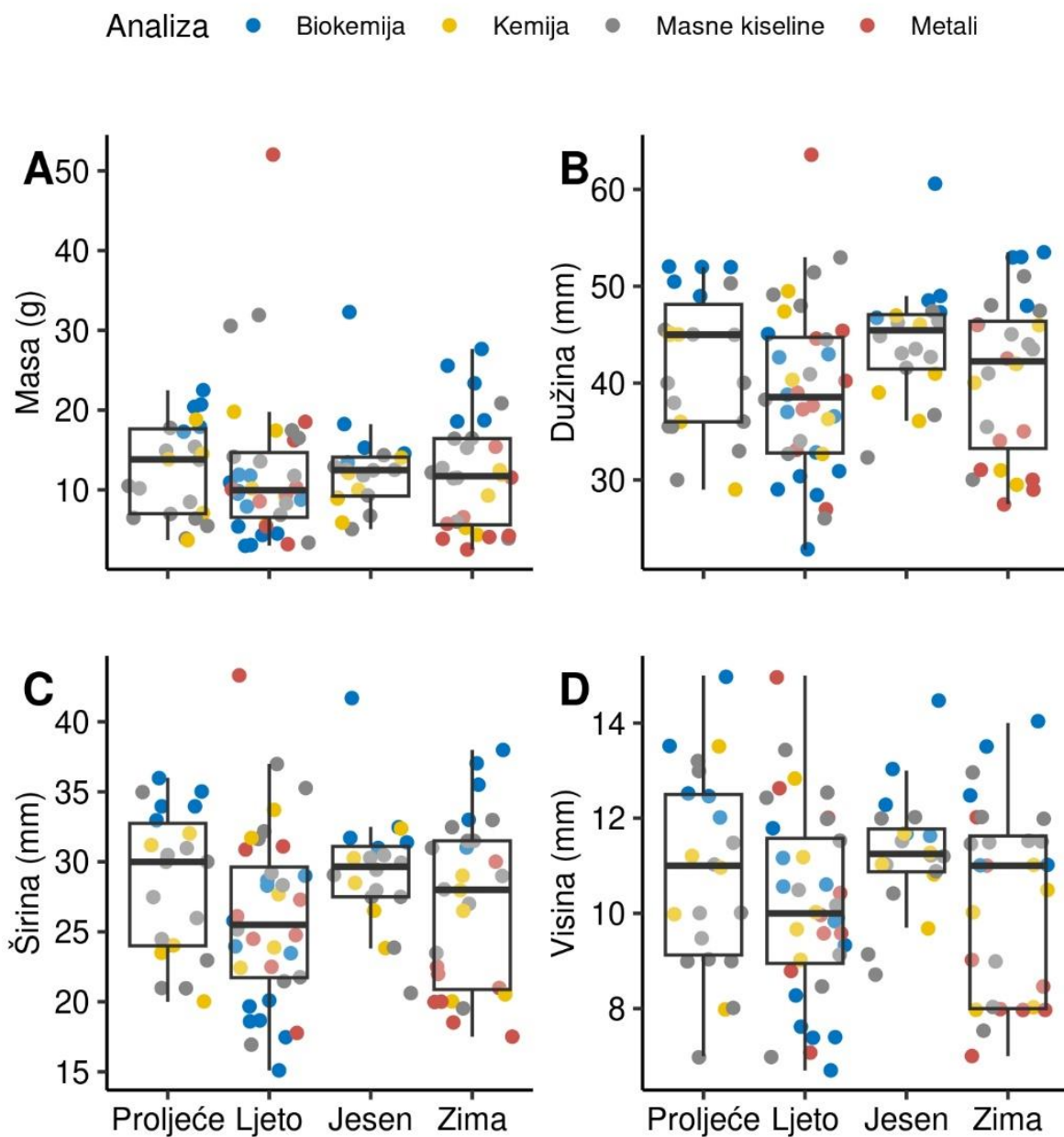


Slika 33. Korelogram masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, u jesen

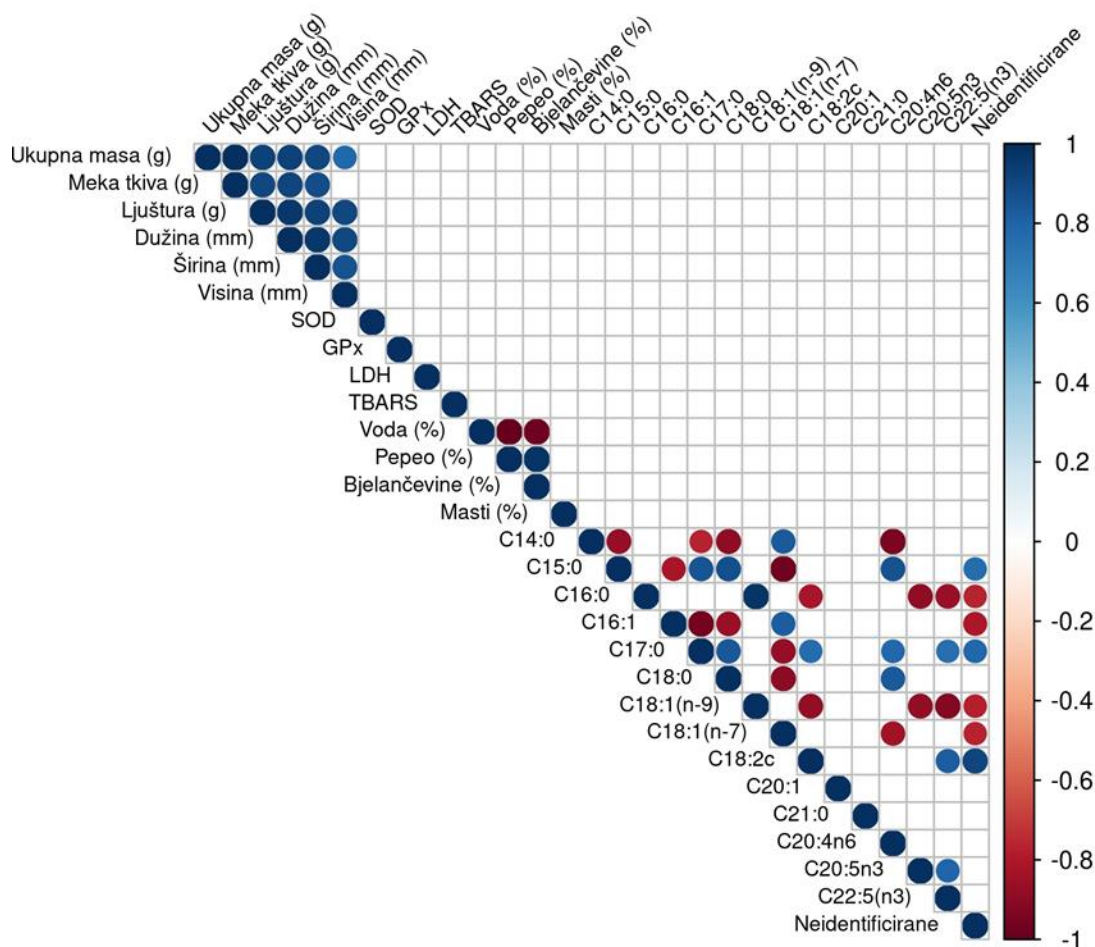


Slika 34. Korelogram masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola, zimi

Na Slici 35. prikazan je kutijasti dijagram (engl. *boxplot* distribucija) vrijednosti biokemijskih parametara (plavo), osnovnog kemijskog sastava (žuto), masnokiselinskog sastava (sivo) i sadržaja metala, odn. elemenata u tragovima i makroelemenata (crveno) mekih tkiva petrovog uha kroz godišnja doba, prema dužinsko-masenim vrijednostima ljušture i tkiva, nezavisno od spola. Na osi x naznačena su godišnja doba. Na osi y označene su mjerene vrijednosti, koje se odnose na A: masu organizma (g), te na B: dužinu, C: širinu i D: visinu ljušture (mm). Masno otisnuta poprečna linija označava medijan, dok prostori iznad i ispod medijana označavaju prvi i treći kvartil. Linije koje izlaze izvan okvira su najviša ili najniža vrijednost koja nije veća od 1,5 puta interkvartilnog raspona prvog ili trećeg kvartila. Vrijednosti izvan tih linija su točke koje su prikazane zasebno. Sve vrijednosti, osim za kategoriju jeseni, pokazuju velike interkvartilne raspone, odn. veću disperziju vrijednosti, sa znatnim brojem točaka odstupanja, pogotovo za biokemijske parametre. Isti su parametri (osim elemenata) prikazani i na korelogramu na Slici 36., gdje je vidljivo da je najveći broj međusobnih korelacija izmjeren za masne kiseline međusobno, dok ostali parametri imaju znatno manji broj korelacija, koje se uvijek nalaze unutar kategorije (biokemijski parametri ili kemijski parametri ili dužinsko-maseni parametri).



Slika 35. *Boxplot* distribucija svih mjerenih vrijednosti biokemijskih parametara (plavo), osnovnog kemijskog sastava (žuto), masnokiselinskog sastava (sivo) i sadržaja metala, odn. elemenata u tragovima i makroelemenata (crveno) mekih tkiva *H. tuberculata* kroz godišnja doba, prema dužinsko-masenim vrijednostima ljuštura i tkiva, nezavisno od spola.



Slika 36. Korelogram biokemijskih parametara antioksidativnog kapaciteta, parametra lipidne peroksidacije, osnovnog kemijskog sastava, masnokiselinskog sastava (%) i dužinsko-masениh parametara *H. tuberculata*, nezavisno od spola i sezone, s naznačenim pozitivnim (plavo) i negativnim (crveno) Spearmanovim koeficijentima korelacije koji su izostavljeni ako nisu bili značajni nakon primjene Bonferronijeve prilagodbe p vrijednosti.

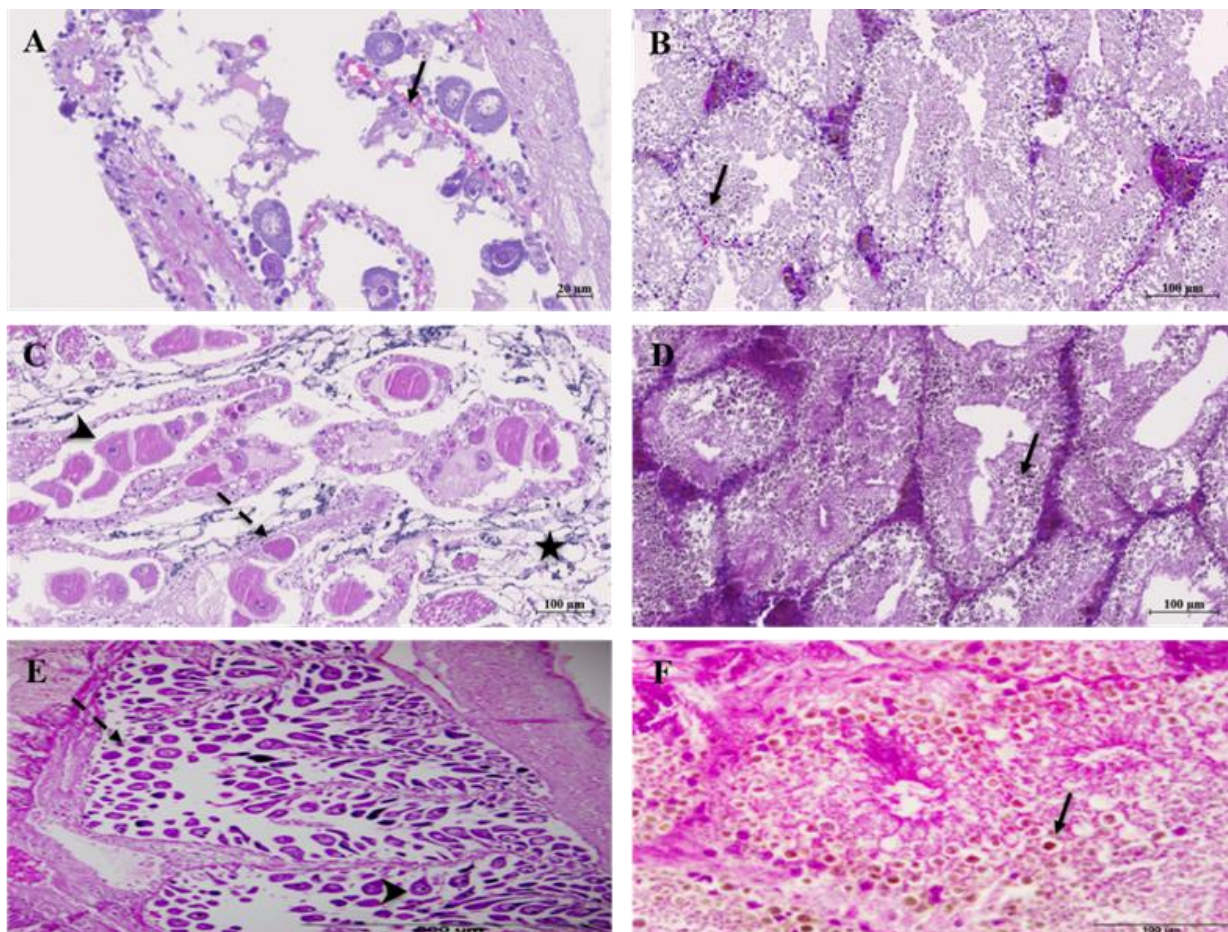
Mjerene dužinsko-masene vrijednosti se za ukupnu masu organizma, masu mekih tkiva i ljuštura odnose na grame (g), a za dužinu, širinu i visinu ljuštura na milimetre (mm). Mjerene vrijednosti za pojedine biokemijske parametre izražene su kako slijedi: SOD (U/g), GPx (U/g), LDH (U/g), TBARS (ng MDA/g), TAS (mmol/g). Ukupan masnokiselinski sastav podrazumijeva relativni udio (%) pojedinih masnih kiselina (C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1n9,

C18:1n7, C18:2c, C20:1, C21:0, C20:4n6, C20:5n3, C22:5n3, i masnih kiselina koje nije bilo moguće identificirati). Osnovni kemijski sastav podrazumijeva relativni udio (%) pojedinih kemijskih parametara (vodu, pepeo, bjelanchevine i masti). LDH je samo u proljeće davao rezultate koji su bili različiti od nule. TAS nije bio mjerljiv u ljeto.

4.6. Histološka građa

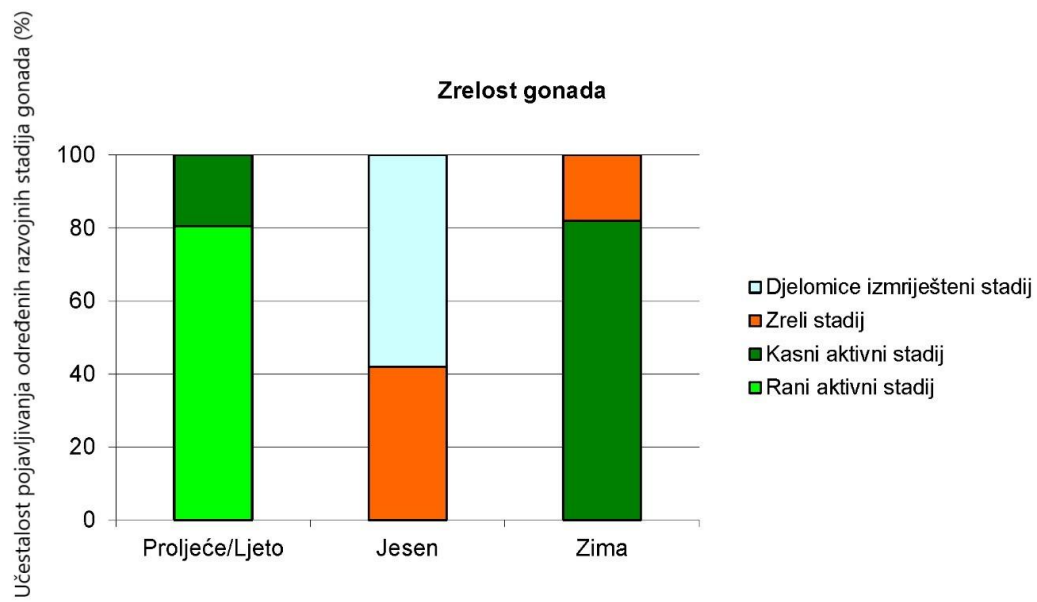
Na tkivima istraživanih organizama petrovog uha nisu ustanovljene lezije niti promjene koje bi upućivale na bolest. Nije otkrivena nazočnost nametnika, bakterija ni gljivica, kao niti oštećenja tkiva koja bi upućivala na njihovu eventualnu propagaciju. Histološko-morfološke analize nisu pokazale strukturne ni funkcionalne promjene na istraživanim tkivima mišića ni škrge kroz istraživane sezone. Na tkivima gonada ustanovljena je sezonalna varijacija razvojnih stadija, dok su na tkivima kanalića probavne žlijezde kroz sve sezone vidljive manje ili veće promjene veličine i broja lipidnih vakuola u tubuloacinarnim završecima.

Na Slici 38. prikazane su sezonalne varijacije razvojnih stadija petrovog uha. Vidljive su varijacije u pojavi različitih stadija gonada. Tijekom proljeća i ljeta gonade su uglavnom bile u fazi ranog aktivnog stadija (sazrijevanja), gdje je na tkivima ovarija vidljiva previtelogena oocita označena strelicom (37.A.), a u jesen su zabilježene faze zrelosti i djelomičnog mriještenja, gdje se vidi vitelogena oocita označena isprekidanom strelicom, zrela oocita označena vrhom strelice, te muška gonada sa spermatozoom označena zvjezdicom (37.C.). Kasna aktivna faza gonada prikazana je u zimi, gdje se vidi vitelogena oocita označena isprekidanom strelicom i zrela oocita označena vrhom strelice (37.E.). Karakteristike tubuloacinarnih završetaka kanalića probavne žlijezde prikazane su na Slici 37. B, D, F, gdje su strelicom označene lipidne kapljice. Promjene lipidne morfologije tubuloacinarnih završetaka kanalića probavne žlijezde vidljive su djelomice kroz proljeće i kroz ljeto (37.B), izraženije u jesen (37.D.) i kroz zimu (37.F.).



Slika 37. Prikaz histološko-morfoloških presjeka tkiva gonada i probavne žlijezde *H. tuberculata*. Prvi red (A,B) označava proljeće i ljeto, drugi red (C,D), jesen, i treći red (E,F) zimu.

Gametogeni ciklus kroz sezone prikazan je histogramom na Slici 35., gdje se vidi sezonski uvjetovana učestalost pojavljivanja određenih razvojnih stadija gonada. Kroz proljeće i ljeto dominira rani aktivni stadij sa gotovo 80 % zastupljenosti, i ponešto kasnog aktivnog stadija, dok u jesen nalazimo djelomice izmrješteni stadij (42 %) i zreli stadij gonada (58 %). Zimi je najizraženiji kasni aktivni stadij (82 %), i donekle zreli stadij gonada.



Slika 38. Zrelost gonada i sezonski gametogeni ciklus *H. tuberculata*

5. RASPRAVA

Ovaj rad prvi je istraživački rad koji proučava odgovore organizma petrovog uha (*H. tuberculata*), vrste prisutne u sjevernom dijelu Jadranskog mora, na temperaturne promjene tijekom godišnjih doba. Istraživanje se sastoji od sveobuhvatnih panel testova koji uključuju određivanje njegovog osnovnog kemijskog sastava, mjerenje koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata, analizu biokemijskog sastava tkiva, kao i procjenu kapaciteta antioksidativne obrane i razinu peroksidacije lipida. Također, istražuje se i masnokiselinski sastav i histološko-morfološka građa ovog mekušca, pružajući sveobuhvatan uvid u fiziološke i biokemijske odgovore na sezonske promjene temperature.

Temperaturni pomaci, bilo da su uzrokovani sezonskim ekstremima, postupnim klimatskim promjenama ili povremenim oštrim klimatskim događanjima, mogu značajno promijeniti strukturu morskih populacija i imati štetne učinke na homeostazu gastropoda (Carregosa i sur., 2014), te dovesti do ozbiljnog fiziološkog stresa za ove organizme. Plitki sjeverni Jadran postao je žarište u vezi s klimatskim promjenama, s posljedicama poput porasta temperature mora i povećanja njegova saliniteta u najtoplijim mjesecima. Temperatura površine mora jedan je od bitnih klimatskih parametara koji doprinose karakterizaciji lokalne, regionalne i globalne klime. Na sjevernom Jadranu, temperatura površine mora ima brži uzlazni trend u usporedbi s južnim dijelom Jadranskog mora, pri čemu se more na sjevernom Jadranu brže zagrijava (počevši krajem svibnja/početkom lipnja), ali se također i brže hladi (počevši već krajem srpnja/početkom kolovoza) (Bonacci i Vrsalović, 2022). Zagrijavanje Jadranskog mora posebno se intenziviralo od 2008. godine, s trendovima koji dosežu čak 1,56 °C po desetljeću. Ovaj je trend izražen čak i tijekom veljače kada na sjevernom jadranskom šelfu temperature dosežu svoje minimume i stvara se gusta voda. Ti se trendovi procjenjuju na stopu od oko 0,09 °C po desetljeću, što ukazuje na komparativno zagrijavanje čak i tijekom hladnog dijela godine (Grbec i sur., 2018).

Takvi pomaci i promjene temperature općenito povećavaju energetska potražnju mekušaca, dok se zbog smanjene mogućnosti cirkulacijskog sustava u dostavi kisika tkivima, normalne fiziološke funkcije narušavaju, a organizmi moraju modificirati svoje fiziološke i biokemijske odgovore na temperaturni stres, što je detaljno opisano u radu Carregose i suradnika (2014). Tijekom ljetnog uzorkovanja mora salinitet je na mikrolokaciji uzorkovanja petrovog uha, suprotno od očekivanja, dosegao svoj minimum od 36,48 psu. Niži salinitet mogao bi doprinijeti proizvodnji oksiradikala u petrovom uhu, što predstavlja dodatni stres budući da petrovo uho nije sposobno podnijeti smanjeni salinitet tijekom produljenog razdoblja (Mgaya i Mercer, 1994). Razlog ovakvih promjena leži u stratifikaciji vodenog stupca koja je na području sjevernog Jadrana intenzivnija

ljeti zbog dotoka površinskih voda rijeke Po i manjih istarskih vodotokova što doprinosi pridnom raslojavanju slanije tople vode (Jeffries i Lee, 2007).

U ovom istraživanju zabilježeno je da su vrijednosti glukoze (GLU) bile prosječno najviše tijekom ljetnog razdoblja u mekim tkivima mužjaka petrovog uha, dok su kod ženki najviše vrijednosti zabilježene u jesenskom razdoblju. Taj je nalaz moguće staviti u odnos i s dostupnošću hrane jer je u jesenskom razdoblju morski ekosustav bogat dijatomejama (algama kremenjašicama) i kokolitoforidama (fitoplanktonskim algama) koje se nalaze i kao epifiti na brojnim morskim makroalgama kojima se petrovo uho hrani (Godrijan, 2015; Barber i Blake, 2016; Gobet i sur., 2018). Naime, miješanje vodenog stupca, koje u sjevernom Jadranu počinje u listopadu, utječe na sukcesiju različitih vrsta dijatomeja, a ta se izmjena najbrže događa tijekom jeseni i zime. Koncentracije glukoze (GLU) u mekim tkivima mekušaca mogu se povisiti i tijekom izrazitog stresa, primjerice uslijed rasta ili pada temperature, a te se promjene odvijaju na račun nevitarnih funkcija organizma kao što su rast, reprodukcija i kretanje i moguće ih je ustanoviti testovima izlaganja (Hannan i sur., 2016). Koncentracija lipidnih parametara, kao što su kolesterol (CHOL) i trigliceridi (TRIG) bila je najviša tijekom ljeta, kako za ukupne jedinke, tako i za jedinke pojedinačnih spolova. Ustanovljeni su negativni koeficijenti korelacije između glukoze (GLU) i kolesterola (CHOL) u ukupnim uzorcima, pri čemu su te vrijednosti značajno varirale između proljetnih i ljetnih jedinki. Naime, energetske se rezerve pohranjene u mišiću i probavnoj žlijezdi upotrebljavaju za razvoj gameta i variraju s obzirom na dostupnost hrane, no ako je dostupnost hrane dovoljna za oba procesa, i za somatogeni i za gametogeni rast, katabolizam mišićnih rezervi se ne odvija (Barber i sur., 2016). Kolesterol (CHOL) je drugi važan energetski izvor za metaboličke potrebe mekušaca, s najvišim zabilježenim vrijednostima ljeti. Povišenje vrijednosti kolesterola (CHOL) može upućivati na pojačanje rigidnosti staničnih membrana u tkivima s obzirom na to da je sadržaj CHOL u izravnom odnosu s rigidnošću membrana, što djeluje kao zaštitni mehanizam u temperaturnim ekstremima. Istovremeno, pad vrijednosti CHOL može upućivati na povećanje fluidnosti membrana (Rodrigues i sur., 2023). S obzirom na to da je tijekom mrijesta izgledan prekid hranjenja petrovog uha (Mgaya, 1995), koncentracije TRIG, CHOL i GLU u tkivima djeluju kao glavni izvori energije za metaboličke potrebe (Palacios i sur., 2007; Pernet i sur., 2007; Martinez-Pita i sur., 2012). Mekušci, naime, tvore cikluse pohrane i korištenja energije u vezi s godišnjim sezonama i ciklusima gametogeneze. Promjene u biokemijskom sastavu tkiva tako pokazuju koji od ovih supstrata djeluje u metabolizmu energije, u različitim sezonskim uvjetima.

Trendovi kretanja prosječnih vrijednosti elektrolita magnezija (Mg) i kalcija (Ca) pokazivali su podudarnost, s time da su prosječne vrijednosti Mg bile više kroz sve sezone. Elektroliti su

dosezali najviše vrijednosti tijekom jeseni, a zapaženo je da su vrijedosti i Mg i Ca bile značajno više kod mužjaka nego kod ženki. Magnezij i kalcij mekih tkiva aktivni su u održavanju ionske homeostaze; sudjeluju u oslobađanju prostaglandina iz tkiva i imaju važnu ulogu u kontroli reprodukcije (Freas i Grollman, 1980; Deridovich i Reunova, 1993; Carregosa i sur., 2014). Donekle korigiraju ionske koncentracije okoliša i varijacije saliniteta vode (Carregosa i sur., 2014). Osim toga, tkivni Mg ima regulatornu ulogu u oksidativnim procesima i smatra se esencijalnim kofaktorom za sintezu glutaciona (GSH). Pad koncentracije Mg u tkivima dovodi do smanjenja razina GSH i intenzivnije proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Brucka-Jastrzebska i sur., 2009), što može imati štetne posljedice na stanice i tkiva. Kalcij, s druge strane, regulira vezanje adenozin difosfata i afinitet aktina kod mekušaca. U odsutnosti Ca, dolazi do potiskivanja napetosti poprečno prugastog mišića i smanjenja pokretljivosti ovisne o aktinu. Podizanje koncentracije Ca iznad mikromolarnih razina značajno povećava ove aktivnosti (Chantler, 2016), što je ključno za pravilno funkcioniranje mišića.

Parametri antioksidativne obrane tkiva u ovom istraživanju pokazali su značajne varijacije prema godišnjim dobima, ali su razlike između spolova bile manje izražene. Prethodna su istraživanja dokazala da promjene temperature mora, bilo smanjenje ili povećanje, mogu potisnuti imunitet petrovog uha (*H. discus hannah*) i potaknuti povećanu proizvodnju ROS-a (Ding i sur., 2015). Histološka analiza gonada petrovog uha otkrila je dva vrhunca gonadalne zrelosti i jedan vrhunac mrijesta, tijekom jeseni. Mrijest je proces koji zahtijeva energiju, a većina energije dolazi iz metabolizma masti pohranjenih u probavnoj žlijezdi (Le Pennec i sur., 2001). Stoga bi ovaj energetski zahtjevan proces mogao doprinijeti povećanoj proizvodnji antioksidansa i reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS) u gonadama kako bi se masne kiseline i oocite zaštitile od lipoperoksidativne štete (Barišić i sur., 2017). Općenito, smanjenje antioksidativne obrane obično se događa tijekom zimskih mjeseci, što je povezano s povećanom peroksidacijom lipida (Power i Sheehan, 1996). Gastropodi s nižim antioksidativnim statusom podložniji su peroksidaciji lipida, što se manifestira višim razinama malondialdehida (MDA) i degradacijom staničnih membrana (Bouzahouane i sur., 2018). Jedan od terminalnih produkata u peroksidativnoj razgradnji lipida, MDA, mjerio se TBARS testom, a dobiveni su rezultati bili u skladu s prethodnim istraživanjima, pokazujući najniže vrijednosti kod oba spola zimi. Vrijednosti TBARS-a više su se razlikovale između godišnjih doba (jedinke uzorkovane tijekom ljeta i jeseni imale su značajno više vrijednosti u usporedbi s jedinkama uzorkovanim tijekom proljeća i zime) nego između spolova u tim godišnjim dobima. Najviše vrijednostima TBARS-a zabilježene su tijekom jeseni kod mužjaka i tijekom ljeta kod ženki. Nisu uočene značajne razlike između godišnjih doba i spolova tijekom zime i proljeća. Stoga se može zaključiti da su visoke ljetne temperature veća prijetnja za

peroksidaciju lipida ove vrste puža, budući da su TBARS vrijednosti bile čak četiri puta veće u usporedbi sa zimskim niskim vrijednostima, posebno kod ženki. Značajan porast TBARS-a djelomično bi mogao biti uzrokovan povećanom proizvodnjom ROS-a zbog pojačane metaboličke aktivnosti, kako je pokazano u studiji Nahrgang i sur. (2013), a podržano je povećanom aktivnošću superoksid dismutaze (SOD) tijekom maksimalnih razina TBARS-a. Najveća aktivnost za SOD u ovom radu bila je zabilježena ljeti za oba spola, a razlike uočene između spolova nisu bile značajne. Iznimka je bila aktivnost SOD za sveukupne jedinke gdje su se vrijednosti kod puževa uzorkovanih tijekom ljeta značajno razlikovale od ostalih godišnjih doba. SOD je prva linija antioksidativne obrane, također i najjači antioksidans u stanicama koji katalizira razgradnju superoksidnog radikala u molekulu kisika i vodikov peroksid, koji se dalje razgrađuje na vodu i kisik pomoću glutation peroksidaze (GPx) (Nahrgang i sur., 2013). U ovom je istraživanju uočena i varijabilnost u godišnjim dobima za ukupni antioksidativni status (TAS) i GPx, iako su statistički značajne varijacije zabilježene samo za TAS (značajno više vrijednosti u proljetnim u usporedbi s zimskim jedinkama), dok spol nije pokazao značajan statistički učinak na ove parametre. Niske sezonske promjene aktivnosti GPx-e, posebno kod ženki, mogu se smatrati prednošću za njihovu upotrebu u ekološkom monitoringu (Nahrgang i sur., 2013). Učinak godišnjih doba na enzimske aktivnosti u ovom istraživanju nije bio uniforman, pokazujući značajno veće vrijednosti za SOD ljeti i za laktat-dehidrogenazu (LDH) i TAS u proljeće, dok su jedine značajne razlike između spolova uočene u slučaju LDH-e, gdje su vrijednosti bile značajno više kod mužjaka. Mrijest se smatra prirodnim oksidativnim stresom s porastom aktivnosti GPx-e. Budući da GPx nije konstitutivni, već inducibilni enzim, važno je procijeniti razdoblje mrijesta mekušaca (Soldatov i sur., 2008). Biomarkeri stresa mogu stoga poslužiti kao izvrsni alati za procjenu fizioloških i biokemijskih učinaka stresa na puževe, bilo da je uzrokovan temperaturnim promjenama, mrijestom, onečišćenjem ili drugi faktorima (Carregosa i sur., 2014). Ovi biomarkeri mogu pomoći u razumijevanju prilagodbenih mehanizama koje puževi koriste za suočavanje sa stresnim uvjetima u svom okolišu, omogućujući preciznije praćenje zdravlja i stanja njihovih populacija.

Puževi bi mogli biti idealni organizmi za biomonitoring metala, odnosno elemenata u tragovima i makroelemenata zbog njihove ograničene pokretljivosti, stalne prisutnosti i dostupnosti tijekom cijele godine i jednostavnosti uzorkovanja. Oni preuzimaju metale iz morskog okoliša putem ingestije i zatim ih koncentriraju u svojim mekim tkivima i ljušturi (León i sur., 2021). Ipak, najveći dio metala puževi dobivaju putem hrane (pri čemu su crvene alge njihova preferirana hrane), a manje iz vodenog stupca (Bryan i sur., 1977). Stoga koncentracija elemenata u probavnoj žlijezdi petrovog uha uglavnom premašuje koncentraciju u mišiću stopala ili drugim

tkivima (Bryan i sur., 1977). Poznato je da je metabolizam elemenata u tkivima puža pod utjecajem nekoliko fizioloških i fizikalno-kemijskih čimbenika poput dobi, spola, saliniteta i temperature. Temperatura posebno utječe na tjelesnu aktivnost gastropoda putem njihovog utjecaja na metaboličku dinamiku što je povezano s kinetikom akumulacije i izlučivanja elemenata (Bouzahouane i sur., 2018; Taylor i Maher, 2006). Postoji vrlo malo studija koje su se bavile istraživanjem elemenata u tragovima u tkivima petrovog uha, a samo nekoliko radova govori o njihovim koncentracijama u petrovom uhu s lokaliteta južne Italije (Conte i sur., 2015), Azora (Torres i sur., 2020) i francuskih Kanalskih otoka (Bryan i sur., 1977). Međutim, nijedna od tih studija nije uzela u obzir sezonalnost izmjerenih koncentracija. U ovom smo istraživanju primijetili sezonske fluktuacije (uspoređujući ljetne i zimske ekstreme) elemenata u tragovima i makroelementata u mekim tkivima i ljušturama petrovog uha. Naime, od 33 elemenata izmjerenih u cjelovitim mekim tkivima, značajno veći sadržaj Ba, Co, Ni, Mn, Pb, Sb i Se uočen je u zimskim uzorcima u usporedbi s ljetnim, dok je značajno veći sadržaj As uočen tijekom ljetnog razdoblja. Nasuprot toga, u ljušturama u dva temperaturna ekstrema mjereni metali imali su značajno niže vrijednosti za Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Rb, S, U, V i Y tijekom zime, dok su više vrijednosti za Be i Cd uočene u istim uzorcima u usporedbi s ljetom. U svakom slučaju, značajne razlike između spolova nisu uočene niti u tkivima niti u ljušturama. Općenito uzevši, 83 % analiziranih elemenata iz ljuštura imalo je višu koncentraciju ljeti, a 67 % analiziranih elemenata iz tkiva imalo je višu koncentraciju zimi.

Suprotno tome, studija provedena u američkom habitatu (Frazier, 1976) utvrdila je da se kinetika apsorpcije većine elemenata u tragovima kod mekušaca ubrzava višim temperaturama i potiskuje nižim temperaturama, što se može pripisati izravnom učinku na metabolizam ili neizravnom učinku na dostupnost metala (Taylor i Maher, 2006). Međutim, na području Mediterana zabilježeni su drukčiji obrasci: primjerice, puž *Stramonita haemastoma* (Bouzahouane i sur., 2018) imao je maksimalne zimske koncentracije bakra i cinka, baš kao i naši primjerci petrovog uha. Visoke zimske razine bakra i cinka, koji su bitni elementi za mekušce, odgovaraju visokom razdoblju pohrane energetske rezerve prije mrijesta. Visoke zimske koncentracije elemenata u tragovima i makroelementata mogu se također povezati i s nižom respiracijom, smanjenim stopama probave i izlučivanja (Taylor i Maher, 2006). Različite sezonske varijacije Cd, Cu, Pb, Ni i Mn također su primijećene u nekoliko drugih vrsta mediteranskih mekušaca (Frías-Espéricueta i sur. 1999), u kojima su koncentracije metala počele rasti tek u jesen, kada je tkivo gonade smanjeno nakon mrijesta, da bi dosegnule vrhunac zimi.

Uspoređujući sadržaj elemenata u mekim tkivima i ljušturama petrovog uha, primijetili smo da većina elemenata pokazuje veće koncentracije u mekim tkivima nego u ljušturama. Više

koncentracije u mekim tkivima mogu biti povezane s mnogo bržim metabolizmom tih tkiva u usporedbi s inernim strukturama ljuštura (Torres i sur., 2020). U skladu s tim, Torres i suradnici (2020) utvrdili su da su elementi poput Li, Pb i Sr akumulirani u većim koncentracijama u ljušturama petrovog uha nego u mekim tkivima. U ovom istraživanju, primijećene su veće koncentracije u ljušturama za elemente poput Ba, Be, Li, Se, Sr i U, pri čemu su posebno visoke vrijednosti zabilježene za Se i Sr. Visok sadržaj Se mogao bi potjecati od unosa selena u organizam putem hrane ili od spore difuzije iz sedimenta (Montroni i sur., 2021). S druge strane, visok sadržaj Sr povezan je s njegovim visokom afinitetom prema Ca, glavnom strukturnom elementu ljušture, što omogućava stronciju da kemijski, a u određenoj mjeri i fiziološki zamijeni kalcij u ljušturi (Torres i sur., 2020). Analizom odnosa zastupljenosti Mg i Ca u ljušturama, mogu se dobiti vrijedne informacije o varijacijama saliniteta i temperature tijekom formiranja ljušture (Tynan i sur., 2016).

Neki elementi u ovom istraživanju pokazali su primjetnu, iako statistički neznčajnu, diferencijaciju unutar spola i između spolova. Primjerice, elementi poput Cu (ljetu) i Zn (zimu), te Fe (ženke u oba temperaturna ekstrema), kao i Mn, Ti, Ca i Mg (kod ženki i mužjaka zimi i ljetu). Ako takvu varijabilnost među jedinkama uzrokuju metaboličke promjene tijekom njihovog reproduktivnog ciklusa, može se pretpostaviti da bi prikupljanje nezrelih životinja moglo smanjiti varijabilnost unutar uzorka (Taylor i Maher, 2006). Međutim, uzorkovanje nezrelih jedinki uz pomoć ronilaca predstavlja težak zadatak zbog relativno male veličine petrovog uha i dubine lokacija uzorkovanja.

Taylor i Maher (2006) pretpostavljaju da bi se za objektivnu analizu elemenata između spolova i mužjaci i ženke trebali mrijestiti istom stopom i u isto vrijeme (što bi također bio preduvjet za uspješnu oplodnju). Ipak, iako je sinkrono mriještenje uobičajeno kod mnogih morskih beskrležnjaka, prirodni mrijest haliotida je nepredvidljiv (Counihan i sur., 2001). Na temelju rezultata ovog istraživanja moguće je zaključiti da bi procjena elemenata u tragovima i makroelemenata petrovog uha iz određenog okoliša trebala biti provedena na sveukupnim mekim tkivima, umjesto na nekom određenom tkivu. Budući da razlike između spolova u ovom istraživanju nisu bile značajne, analize sveukupnih organizama vjerojatno neće dovesti do pristranih pretpostavki u vezi s koncentracijama istraživanih elemenata. Nadalje, već uspostavljeni visoki potencijal bioakumulacije mediteranskog puža (*Hexaplex trunculus*) u odnosu na morski krastavac (*Holothuria polii*) i školjkaša *Tapes decussatus* (León, i sur., 2021; María-Cervantes i sur., 2009), mogao bi implicirati da se petrovo uho također može koristiti kao organizam od interesa za proučavanje zagađenja metalima. Zahvaljujući svojim fiziološkim i biokemijskim karakteristikama, puževi pružaju dragocjene podatke o stanju okoliša u kojem žive.

Njihova sposobnost akumulacije metala u tkivima omogućuje precizno praćenje zagađenja i promjena u okolišu, čime se potvrđuje njihova uloga kao pouzdanih biomonitora. Petrovo uho može postati ključni indikator ekološkog stanja morskog okoliša, pružajući korisne podatke za monitoriranje zagađenja metalima i drugih elemenata u tragovima i makroelementima, što je ključno za očuvanje morskih ekosustava i razumijevanje utjecaja antropogenih aktivnosti na morski okoliš. Rezultati ovog istraživanja naglašavaju važnost uzimanja u obzir sezonalnosti pri interpretaciji podataka o koncentracijama elemenata u tragovima i makroelementima, čime se osigurava točnije razumijevanje ekoloških i biokemijskih procesa koji se odvijaju u morskom okolišu.

Razmatrajući osnovni kemijski sastav mekih tkiva petrovog uha, uočili smo da svi parametri pokazuju značajnu povezanost s godišnjim dobom, ali ne i sa spolom. Općenito, udio vlage bio je najviši tijekom ljetnih mjeseci, što je rezultiralo najnižim vrijednostima za sve ostale parametre. Svi parametri pokazali su značajne razlike između godišnjih doba, osim udjela sirovih masti između zime i jeseni. Naime, sadržaj sirovih masti bio je najviši u jesen, dok je sadržaj sirovih proteina i pepela dosegnuo vrhunac u proljeće. Najniži sadržaj sirovih masti i proteina, koje smo utvrdili u tkivima petrovog uha tijekom ljetnog razdoblja, vjerojatno je povezan s reproduktivnim statusom ovih organizama. Kako gonade sazrijevaju i dozrijevaju u proljeće, sadržaji proteina rastu, što sugerira nakupljanje energetske rezerve potrebnih za reprodukciju. Nakon mrijesta, sadržaji proteina padaju na najniže razine, što ukazuje na mobilizaciju somatske rezerve u potporu reprodukciji (Pichaud i sur., 2009). Istovremeno s mrijestom, probavna žlijezda prelazi u fazu mirovanja, što dodatno objašnjava niski sadržaj masti i proteina mekih tkiva ljeti, a posljedično i najviši udio vlage ljeti. Nakon ispuštanja spolnih produkata dolazi do resorpcije gonadalnog tkiva, praćeno nakupljanjem produkata razgradnje, uključujući metabolite peroksidacije lipida. Tijekom jeseni i zime, moguće je da organizmi ulaze u fazu intenzivnog hranjenja i rasta te nakupljanja lipidne rezerve, što objašnjava visoki sadržaj sirovih masti u mekim tkivima u tim razdobljima (Mateos i sur., 2010).

Posljedično tome, sastav masnih kiselina u mekim tkivima petrovog uha varirao je značajno između godišnjih doba, ali i između spolova. Značajna varijabilnost pokazala se između godišnjih doba za sve masne kiseline osim C22:5n3 (DPA), i između spolova za sve osim C21:0 (HNA). Istraživane masne kiseline bile su značajno povezane s godišnjim dobom, ali ne uvijek i sa spolom. Svakako, glavni razlog za razlike između spolova proizlazi iz interakcijskog učinka godišnjeg doba i spola. Naime, koncentracije masnih kiselina nisu različite između spolova tijekom zime i jeseni, već samo tijekom proljeća i ljeta, gdje su neke više kod ženki, a druge kod mužjaka. Posebno su koncentracije C15:0 (PDA), C17:0 (HA), C18:0 (SA), C18:2c (LA), C20:4n6

(AA), C20:5n3 (EPA) i C22:5n3 (DPA) bile veće kod mužjaka nego kod ženki tijekom toplijeg dijela godine, dok su ostale bile više kod ženki nego kod mužjaka. Budući da haliotidi, kao poikilotermi, nemaju sposobnost regulacije tjelesne temperature, njihove se stanične membrane moraju prilagoditi promjenama temperature. Oni se hvataju u koštac s niskim temperaturama mijenjajući lipide membrana na način da im smanjuju prosječnu temperaturu tranzicije, i obrnuto. Stoga je jedan od ključnih mehanizama za temperaturnu prilagodbu upravo modifikacija sastava masnih kiselina petrovog uha (Guschina i Harwood, 2006). Kao rezultat takve modifikacije, u ovom se istraživanju očekivao porast ukupnog sadržaja PUFA zimi. To je uglavnom bilo zbog većih prethodno zabilježenih koncentracija n-3 PUFA (Dunstan i sur., 1996). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s prethodnim studijama (Hernández i sur., 2013; Mateos i sur., 2010) koje su ustanovile nakupljanje PUFA pri nižim temperaturama mora. Također su ustanovile da petrovo uho može sintetizirati masne kiseline iz njihovih prekursora čak i kada C20:5n3 (EPA) i C22:5n3 (DPA) nisu prisutne u njihovoj prehrani. Doista, baš kao i u našem istraživanju, utvrđeno je da su i EPA i DPA obilne pri nižim temperaturama, ali da C22:6 (DHA) uopće nije determinirana. Stoga je vrlo vjerojatno da petrovo uho ne sintetizira DHA, ali ju može akumulirati u membranama samo kada je DHA zastupljena u prehrani (Hernández i sur., 2013).

Očito je kako je sastav masnih kiselina haliotida drugačiji od drugih morskih životinja, koje imaju EPA i DHA kao glavne PUFA u tkivima (Dunstan i sur., 1996; Su i sur., 2004). Povećani sadržaj EPA također može biti prilagodba niskoj lipidnoj makroalgalnoj prehrani petrovog uha, koji preferira DPA umjesto DHA u svojoj prehrani (Dunstan i sur., 1996). Profili lipida makroalgi koje doprinose prirodnoj prehrani haliotida razlikuju se između taksona i variraju sezonski (Su i sur., 2004). EPA se često povezuje s peroksidacijom ili smanjenjem propusnosti membrana mekušaca (Silva i sur., 2017), iako je općenito važna predstavница PUFA u morskim puževima (Dunstan i sur., 1996). U haliotidima se često mjeri i C20:4n6 (ARA) kao primarna PUFA (Lou i sur., 2013), iako je u ovom istraživanju bila druga najzastupljenija PUFA.

Udio ukupnih MUFA povećavao se u jesen. Udio ukupnih SFA bio je sličan u proljeće i jesen, najviši ljeti i najniži zimi. Dakle, zastupljenost SFA u petrovom uhu bila je najviša u razdoblju visoke temperature morske vode, posebno kod ženki za C16:0 (PA). Veća akumulacija lipida tijekom ljeta može sugerirati da petrovo uho može nelipidne prehrambene komponente pretvoriti u lipide, posebno zasićene masne kiseline (Su i sur., 2006). Smanjenje udjela zasićenih masnih kiselina zimi, zajedno s povećanjem razina PUFA, značajno bi moglo doprinijeti održavanju fluidnosti staničnih membrana budući da PUFA imaju nižu točku taljenja od SFA (Dunstan i sur., 1999). U manjoj mjeri, povećana nezasićenost nemembranskih lipida mogla bi doprinijeti

održavanju tjelesne fleksibilnosti za kretanje pri niskim zimskim temperaturama (Dunstan i sur., 1996).

S obzirom na nutritivne značajke (poglavito mišićnog) tkiva petrovog uha, rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je nutritivna kvaliteta mišića izraženija zimi i u proljeće, kada su razine CHOL i TRIG bile najniže. U tom je razdoblju i ukupna masa mekih tkiva, kao i masa probavne žlijezde i mišića, bila najviša. S obzirom na to da se petrovo uho intenzivno hrani u jesen i zimu (Dunstan i sur., 1996), ne iznenađuje niti povišena razina PUFA zimi i MUFA u jesen, dok razina SFA raste ljeti. Potrošači pridaju sve veću pozornost nutritivnoj kvaliteti hrane kako bi unaprijedili zdravlje, smanjili učestalost bolesti i povećali životni vijek konzumacijom hranjivih tvari iz hrane. Poznato je kako se petrovo uho smatra „ginsengom oceana“ i delikatesom, poglavito u azijskoj gastronomiji, što pogotovo vrijedi za krupne haliotide koji se komercijalno eksploatiraju (De Zoysa, 2013). Takvi varijeteti petrovog uha obilati su hranjivim tvarima i bioaktivnim komponentama poput mikronutrijentata, Mg, Fe, silikata, sulfata, fosfata i klora (De Zoysa, 2013), što je dokazano i ovim istraživanjem. Osim što je niskokalorično sa tek 40-80 kcal na 100 g mekog tkiva, petrovo uho ima dobar masni profil te je bogato visokovrijednim bjelančevinama (Boye i sur., 2012). U ovom je istraživanju udio sirove masti bio najviši u jesen i zimu, dok je udio sirovih bjelančevina bio najviši u proljeće. Meka tkiva petrovog uha u ovom istraživanju vrlo su bogat izbor bjelančevina koje su bile najzastupljenija kemijska komponenta tkiva. Bjelančevine su među ključnim parametrima koji određuju nutritivnu vrijednost hrane, a mišić petrovog uha sadrži visokokvalitetne bjelančevine (Shi i sur., 2020). Biološka vrijednost i kvaliteta bjelančevina ovise o sastavu aminokiselina i prikladnosti za probavu, apsorpciju i sintezu u tijelu, a esencijalne se aminokiseline ne mogu sintetizirati u ljudskom organizmu i moraju se unositi iz prehranbenih proteina (Shi i sur., 2020). Bjelančevine podrijetlom iz mekih tkiva petrovog uha lako su probavljive, dobro iskoristive i imaju pogodan aminokiselinski sastav u odnosu na druge mekušce (Boye i sur., 2012). Tkiva petrovog uha sastoje se i od polisaharida i masnih kiselina koji imaju potencijalno pozitivne učinke na zdravlje ljudi (Suleria i sur., 2015). Ona su bogat izvor omega-3 masnih kiselina koje povoljno djeluju na kardiovaskularni sustav, kognitivne funkcije, štite od malignih i kroničnih upalnih bolesti (Han i sur., 2015), što je osobito važno jer ljudski organizam ne može sintetizirati omega-3 masne kiseline, već ih mora unositi hranom ili dodacima prehrani. Osim toga, za pravilan unos masnih kiselina izuzetno je važan omjer omega-3 i omega-6 masnih kiselina, koji se kroz zadnjih nekoliko desetljeća u ljudskoj prehrani povećava u korist omega-6 masnih kiselina (Riediger i sur., 2009). U ovom istraživanju omjer omega-3 i omega-6 bio je najviši u proljeće (3:1), dok je tijekom ostalih sezona bio 2:1. S obzirom na to da neuravnotežena prehrana nepravilnim omjerom masnih kiselina (pogotvo podrijetlom iz mesa uzgajanih životinja

dohranjivanih žitaricama) dovodi do upalnih procesa, alergija, kardiovaskularnih poremećaja te potiče rast tumorskih stanica (Riediger i sur., 2009), petrovo uho možemo smatrati izuzetno zdravom prehrambenom namirnicom. Nadalje, organizmi iz mora predstavljaju važan izvor bioaktivnih spojeva zbog razvoja u širokom rasponu okoliša, što zahtijeva brojne mehanizme prilagodbe. Ti mehanizmi uključuju sintezu bioaktivnih molekula koje djeluju kao signalne molekule, služe u obrani protiv predatora te za inhibiciju bakterijskih i/ili gljivičnih infekcija (Rivera-Pérez i sur., 2023). Osim toga, ti se spojevi sintetiziraju u visokim koncentracijama kako bi se omogućilo njihovo izlučivanje u vodeni medij i osigurala njihova učinkovitost. Trenutno je opisano preko 3 000 spojeva (npr. bjelančevina, polisaharida, pigmenata, itd.) s novom bioaktivnošću iz morskih izvora. Primjerice, peptidi dobiveni hidrolizom tkiva petrovog uha pokazuju antimikrobno djelovanje protiv različitih patogena te citotoksične učinke protiv stanica raka (Rivera-Pérez i sur., 2023). Mediteranske civilizacije koje su tradicionalno konzumirale petrovo uho kao funkcionalnu hranu imale su iskustvenu potvrdu o njegovim zdravstvenim učincima (Suleria i sur., 2015).

S obzirom na to da je globalni ulov beskralježnjaka dramatično porastao tijekom zadnjih godina, uključujući širenje postojećih i pojavu novih ribolovnih metoda na mekušce, uključujući puževe, ozbiljne posljedice osjećaju se pri sveukupnom funkcioniranju i strukturi ekosustava (Eddy et al, 2017). Čak i ako nije izravno cilj ribolova, petrovo uho može biti pogođeno pridnenim ribolovnim alatima i narušavanjem morskog dna (Kaiser et al, 2006). Zbog sve većeg pritiska na divlje morske populacije, uključujući sjeverni Jadran gdje su pritisci ribarenja pridnenom povlačnom mrežom – kočom već desetljećima uobičajena praksa, što dovodi do uništavanja morskog dna i staništa mekušaca, uzgoj gastropoda, posebno petrovog uha, u sjevernom Jadranu čini se potencijalno mogućim, posebno nakon uspješnih praksi u nekim europskim zemljama. U tu svrhu, ovo istraživanje doprinijelo je dobivanju uvida u učinke promjena temperature mora na biološke karakteristike petrovog uha, njegove fiziološke i biokemijske prilagodbe putem sveobuhvatnog panela provedenih testova. Rezultati ovog istraživanja ističu i samoregulirajuće procese kojima biološki sustavi petrovog uha teže očuvati stabilnost dok se prilagođavaju različitim temperaturnim/sezonskim uvjetima, te pokazuju da petrovo uho podliježe snažnim sezonskim promjenama u sjevernom Jadranu. Istovremeno, važno je napomenuti da je tumačenje bioloških odgovora petrovog uha na promjene temperature prilično kompleksno u kontekstu prirodnog morskog okoliša (Topić Popović i sur., 2023). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem od izuzetne su važnosti za upravljanje ovom vrstom u Jadranskom moru i mogu poslužiti kao dragocjeni ishodišni podaci za potencijalni ugoj petrovog uha.

Razumijevanje sezonskih varijacija u kemijskom sastavu i fiziološkim procesima petrovog uha ključno je za planiranje održivih strategija upravljanja i očuvanja ove vrste. Adaptacije na

temperaturne promjene, izražene kroz promjene u sastavu masnih kiselina, odražavaju biološku fleksibilnost i kapacitet prilagodbe na promjenjive uvjete okoliša. Ovakvi uvidi pružaju neophodne informacije za optimizaciju potencijalnih uzgojnih praksi, čime bi se mogla povećati produktivnost i održivost uzgoja petrovog uha u sjevernom Jadranu, što bi istovremeno moglo dovesti do smanjenja pritiska na divlje populacije i direktnog utjecaja na očuvanje vrste.

6. ZAKLJUČCI

Utjecaj promjene temperature mora, odnosno prilagodbe homeostaze petrovog uha na sezonske promjene temperature u sjevernom Jadranu, odražava se na biokemijske pokazatelje i histološko-morfološku građu tkiva, peroksidaciju lipida i antioksidativni kapacitet, osnovni kemijski i masnokiselinski sastav tkiva, te na koncentraciju elemenata u tragovima i makroelemenata. Rezultati istraživanja ukazuju na samoregulirajuće procese kojima biološki sustavi petrovog uha nastoje održati stabilnost dok se prilagođava različitim temperaturnim, odn. sezonskim uvjetima kroz godinu. S tim u vezi, bitno je istaknuti da je ustanovljen snažan utjecaj sezona na sve mjerene parametre petrovog uha istočnog dijela sjevernog Jadrana.

Petrovo uho imalo je najvišu masu cjelovitog mekog tkiva i ljuštore u proljeće. No, masa najzastupljenijih mekih tkiva (probavne žlijezde i mišića) bila je najviša zimi, što se podudara s miješanjem vodenog stupca, koje u sjevernom Jadranu počinje u listopadu, te utječe u jesensku i zimsku izmjenu više vrsta algi i omogućuje veću dostupnost hrane.

Histološko-morfološke analize ukazale su na sezonalnu varijaciju razvojnih stadija te produženi reproduktivni ciklus s pojavom ranog i kasnog aktivnog stadija kroz sezone proljeća i ljeta. U jesen su zabilježene faze gametogene zrelosti i djelomičnog mrijesta. Drugim riječima, petrovo uho prolazi kroz snažnu gametogenu i reproduktivnu aktivnost u toplim mjesecima i ranu jesen kada se odvija mrijest. Osim gonada, nisu uočene značajne strukturne ni morfološke promjene drugih mekih tkiva.

Od osnovnog kemijskog sastava važno je istaknuti da su svi parametri pokazali značajnu povezanost s godišnjim dobom, ali ne i sa spolom. Sadržaj vlage u mekim tkivima uha bio je najviši ljeti. Udio sirove masti bio je najviši u jesen i zimu, dok je udio sirovih bjelančevina i pepela bio najviši u proljeće, a vrijednosti su bile značajno različite po sezonama. Intenzivna faza hranjenja i rasta te nakupljanje lipidnih rezervi tijekom jeseni i zime objašnjavaju visoki sadržaj sirovih masti u mekim tkivima u tom razdoblju.

Koncentracija osnovnih biokemijskih parametara - metabolita (GLU), lipida (CHOL, TRIG) i elektrolita (Mg i Ca) varirala je s godišnjim dobima, gdje su elektroliti imali najviše vrijednosti u jesen, a ostali parametri ljeti, osim za GLU kod ženki, koja je bila najviša u jesen. Promjene u biokemijskom sastavu tkiva pokazuju koji od ovih supstrata djeluje u metabolizmu energije i ciklusima gametogeneze u različitim sezonskim uvjetima.

Parametri antioksidativne obrane tkiva u ovom istraživanju varirali su prema godišnjim dobima, no ne toliko između spolova. Utjecaj godišnjih doba na enzimske aktivnosti nije bio uniforman, pokazujući značajno više vrijednosti za SOD ljeti a za LDH i TAS u proljeće, dok su

značajne razlike između spolova zabilježene samo u slučaju LDH, koji je bio značajno viši kod mužjaka. TBARS je pokazao najviše vrijednosti tijekom jeseni kod mužjaka i tijekom ljeta kod ženki, što je moguće povezati i s reproduktivnim stresom. Svakako, visoke ljetne temperature veća su prijetnja za peroksidaciju lipida ove vrste puža, budući da su TBARS vrijednosti bile čak četiri puta veće u usporedbi sa zimskim niskim vrijednostima, posebno kod ženki.

Sastav masnih kiselina mekih tkiva petrovog uha varirao je između godišnjih doba i između spolova. Masne kiseline C15:0 (PDA), C17:0 (HA), C18:0 (SA), C18:2c (LA), C20:4n6 (AA), C20:5n3 (EPA) i C22:5n3 (DPA) bile su više kod mužjaka nego kod ženki tijekom toplijeg dijela godine, dok su preostale bile više kod ženki. Veća akumulacija lipida tijekom ljeta može sugerirati da petrovo uho nelipidne prehrambene komponente pretvara u lipide, posebno u zasićene masne kiseline. Ovo je istraživanje pokazalo da petrovo uho vjerojatno ne sintetizira dokosaheksaenoičnu kiselinu (DHA).

Od 33 elemenata u tragovima i makroelemenata mjerenih u ukupnom mekom tkivu petrovog uha, značajno više koncentracije imali su Ba, Co, Ni, Mn, Pb, Sb i Se zimi u usporedbi s toplim mjesecima, dok je značajno veći sadržaj As zabilježen tijekom ljetnog razdoblja. Većina elemenata imala je više koncentracije u mekim tkivima nego u ljušturama. Radi visokog potencijala bioakumulacije, petrovo uho je organizam od interesa za proučavanje zagađenja okoliša onečišćujućim elementima.

7. POPIS LITERATURE

1. AOAC. (1995). Official Methods of Analysis (16 ed.). Arlington, WA, USA: AOAC International.
2. Arranz K., Urrutxurtu I., Prieto D., Ibarrola I., Bego Urrutia M., Navarro E. (2021). Methods for assessment of body tissue composition an indication of the energetic status in bivalve populations: A comparison of biochemical and elemental analysis. *Ecological Indicators*, 121, 107074. doi: 10.1016/j.ecolind.2020.107074
3. Artegiani A., Paschini E., Russo A., Bregant D., Raicich F., Pinardi N. (1997). The Adriatic Sea General Circulation. Part I: Air-Sea Interactions and Water Mass Structure. *Journal of Physical Oceanography* 27(8): 1492-1514. doi: 10.1175/1520-0485(1997)027<1492:TASGCP>2.0.CO;2
4. Arts M.T., Ackman R.G., Holub B.J. (2001). Essential fatty acids in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 122-137. doi: 10.1139/f00-22
5. Avant P. (2007). *Haliotis tuberculata* Green ormer (ur: Tyler-Walters, H. Hiscock, K.) Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews, Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. London.
6. Avignon S., Auzoux-Bordenave S., Martin S., Dubois P., Badou A., Coheleach M., Richard N., Di Giglio S., Malet L., Servili A., Gaillard F., Huchette, S., Roussel S. (2020). An integrated investigation of the effects of ocean acidification on adult abalone (*Haliotis tuberculata*). *ICES Journal of Marine Science* 77(2): 757–772. doi: 10.1093/icesjms/fsz257
7. Babić S., Barišić J., Malev O., Klobučar G., Popović N. T., Strunjak-Perović I., Krasnići N., Čož-Rakovac R., Klobučar R. S. (2016). Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight? *Environmental Science and Pollution Research* 23(12): 12150-12163. doi: 10.1007/s11356-016-6097-3
8. Barber B.J., Blake N. (2016). Reproductive Physiology. U: *Scallops Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries* (ur. Shumway S.E., Parsons G.J.). Elsevier Ltd., Amsterdam, Netherlands, str. 253-299.
9. Barišić J. (2015). Varijacija masnokiselinskog sastava lipidnih frakcija i antioksidativni status europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) tijekom godine. Doktorska disertacija.

10. Barišić J.; Čož-Rakovac R.; Delaš I.; Topić Popović N; Gavrilović A.; Jug-Dujaković J.; Brailo M.; Sauerborn-Klobučar R.; Babić S.; Strunjak-Perović I. (2017). Predictive modeling of European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) fatty acid composition. *Aquaculture International* 25: 805–825. doi: 10.1007/s10499-016-0079-9
11. Bičanić Z., Baković T. (2000). Temperature, salinity, and density of seawater in the Northern Adriatic Sea. *Geografski Vestnik* 72(1): 41-51. In Slovenian, with English summary.
12. Bonacci O., Vrsalović A. (2022). Differences in Air and Sea Surface Temperatures in the Northern and Southern Part of the Adriatic Sea. *Atmosphere* 13(7): 1158. doi: 10.3390/atmos13071158
13. Bouzahouane H., Barour C., Sleimi N., Ouali K. (2018). Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *Stramonita haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere* 207: 725-741. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.118
14. Boye J., Wijesinha-Bettoni R., Burlingame B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108: 183-211. doi: 10.1017/S0007114512002309
15. Brucka-Jastrzebska E., Kawczuga D., Grzelak A., Bartosz G. (2009). Magnesium content, total antioxidant status and lipid peroxidation in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum). *Magnesium Research* 22: 273–279.
16. Bryan G. W., Potts G. W., Forster G. R. (1977). Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 57(2): 379-390. doi:10.1017/S0025315400021822
17. Carefoot T.H., Qian P.Y., Taylor B.E., West T., Osborne J. (1993). Effect of starvation on energy reserves and metabolism in the Northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture* 118(3-4): 315-325. doi: 10.1016/0044-8486(93)90466-C
18. Carregosa V., Velez C., Soares A.M., Figueira E., Freitas R. (2014). Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 177-178: 1-9. doi: 10.1016/j.cbpb.2014.08.001
19. Chambers J.M. (2008). *Software for data analysis: programming with R* (Vol. 2, No. 1). New York: Springer.

20. Chantler P.D. (2016). Scallop Adductor Muscles: Structure and Function. In *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*, 3rd (ur. Shumway S.E. Parsons, G.J.), Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 161–218.
21. Clark M.S., Peck L.S., Arivalagan J., Backeljau T., Berland S., Cardoso J.C.R., Caurcel C., Chapelle G., De Noia M., Dupont S., Gharbi K., Hoffman J.I., Last K.S., Marie A., Melzner F., Michalek K., Morris J., Power D.M., Ramesh K., Sanders T., Sillanpää K., Sleight V.A., Stewart-Sinclair P.J., Sundell K., Telesca L., Vendrami D.L.J., Ventura A., Wilding T.A., Yarra T., Harper E.M. (2020). Deciphering mollusc shell production: the roles of genetic mechanisms through to ecology, aquaculture and biomimetics. *Biological Reviews* 95: 1812-1837. doi: 10.1111/brv.12640.
22. Clavier J., Chardy P. (1989). Investigation into the ecology of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.), factors influencing spatial distribution. *Aquatic Living Resources* 2: 191-197. doi: 10.1051/alr:1989024.
23. Clavier J. (1992). The ormer (*Haliotis tuberculata*) fishery of France and the Channel Islands, Abalone of the world: biology, fisheries and culture (ur. Shepherd S.A., Tegner M.J., Guzman del Pro S.A.), Oxford. Fishing News Books.
24. Coleman A. W., Vacquier V.D. (2002). Exploring the Phylogenetic Utility of ITS Sequences for Animals: A test case for Abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution* 54: 246-257. doi: 10.1007/s00239-001-0006-0
25. Conte F., Copat C., Longo S., Oliveri Conti G., Grasso A., Arena G., Brundo M.V., Ferrante M. (2015). First data on trace elements in *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) from southern Italy: Safety issues. *Food and Chemical Toxicology* 81: 143-150. doi: 10.1016/j.fct.2015.04.020
26. Cook P.A. (2016). Recent Trends in Worldwide Abalone Production. *Journal of Shellfish Research* 35(3): 581-583. doi: 10.2983/035.035.0302
27. Counihan R.T., McNamara D.C., Souter D.C., Jebreen E.J., Preston N.P., Johnson C.R., Degnan B.M. (2001). Pattern, synchrony and predictability of spawning of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) from Heron Reef, Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 213, 193-202. doi:10.3354/meps213193
28. De Zoysa J.R. (2013). Vasculitis in New Zealand. *Clinical and Experimental Nephrology*, 17, 712-714. doi: 10.1007/s10157-012-0703-6
29. Delaš I. (2011). Benefits and hazards of fat-free diets. *Trends in Food Science & Technology* 22(10): 576-582. doi: 10.1016/j.tifs.2011.08.008

30. Deridovich I.I., Reunova O.V. (1993). Prostaglandins: Reproduction control in bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 104(1): 23-27. doi: 10.1016/0300-9629(93)90003-M
31. Deschaseaux E, Taylor A, Maher W (2011). Measure of stress response induced by temperature and salinity changes on hatched larvae of three marine gastropod species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 397(2): 121-128. doi: 10.1016/j.jembe.2010.11.023
32. Ding J., Li L., Wu F., Zhang G. (2015). Effect of chronic temperature exposure on the immunity of abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture Research* 47: 2861–2873. doi: 10.1111/are.12736
33. Dunstan G.A., Baillie H.J., Barrett S.M., Volkman, J.K. (1996). Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture* 140(1): 115-127. doi: 10.1016/0044-8486(95)01191-
34. Dunstan G.A., Olley J., Ratkowsky, D.A. (1999). Major environmental and biological factors influencing the fatty acid composition of seafood from Indo-Pacific to Antarctic waters. *Recent Research Development in Lipids Research* 3(1999): 63-86.
35. Durazo-Beltrán E., Toro-Vázquez, J. F., Vásquez-Peláez C., Viana M.T. (2003). Effect of the seaweed *Macrocystis pyrifera* and a formulated diet on growth and fatty acid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, under commercial culture conditions. *Ciencias marinas* 29(4B): 645-654.
36. Eddy T.D., Lotze H.K., Fulton E.A., Coll M., Ainsworth C.H., Araújo J.N., Bulman C.M., Bundy A., Christensen V., Field J.C., Gribble N.A., Hasan M., Mackinson S., Townsend H. (2016). Ecosystem effects of invertebrate fisheries. *Fish and Fisheries* 18: 40-53. doi: 10.1111/faf.12165
37. FAO (2021). Global Aquaculture Production 1950–2019 (Online Query) <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>. [Pristupljeno 25 siječanj 2024].
38. Fazio F., Marafioti S., Arfuso F., Piccione G., Faggio C. (2013). Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. *Veterinarni Medicina* 58(11): 576-581. doi:10.17221/7139-VETMED
39. Flassch J. P., Aveline C. (1984). Production de jeunes ormeaux à la station expérimentale d'Argenton. Publications du Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO), Série Rapports scientifiques et techniques, 50, ISSN 0339-2899. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/4950/> [Pristupljeno 22 ožujak 2024].

40. Forster G.R. (1962). Observations on the ormer population of Guernsey. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 42: 493-8. doi: 10.1017/S0025315400054199
41. Forster G.R., Potts G.W. Swinfen R. (1982). Changes in the ormer populations of Guernsey and Jersey. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62, 717-27. doi: <https://doi.org/10.1017/S0025315400054199>
42. Frazier J.M. (1976). The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. II. Environmental effects. *Chesapeake Science* 17(3): 188-197. doi: 10.2307/1351197
43. Freas W., Grollman S. (1980). Ionic and osmotic influences on prostaglandin release from the gill tissue of a marine bivalve, *Modiolus demissus*. *Journal of Experimental Biology*, 84(1): 169-185. doi: 10.1242/jeb.84.1.169
44. Fretter Y., Graham A. (1964). Reproduction. (ur. Wilbur K.M., Yonge C..M.), *Physiology of Mollusca* 1, str. 127-64. New York. Academic Press.
45. Frías-Espericueta M.G., Osuna-López J.I., Páez-Osuna F. (1999). Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: seasonal variation. *The Science of the Total Environment* 231: 115-123. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00097-2
46. Gobet A., Mest L., Perennou M., Dittami S.M., Caralp C., Coulombet C., Sylvain H., Sabine R., Gurvan M., Leblanc C. (2018). Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome* 6(1): 1-14. doi: 10.1186/s40168-018-0430-7
47. Godrijan J. (2015). Značaj, bioraznolikosti i dinamika kokolitoforida u obalnom području istočnog djela sjevernog Jadrana. Doktorska disertacija.
48. Graham A. (1988). Molluscs: prosobranch and pyramidellid gastropods. Keys and notes for the identification of species (2nd edn) *Synopses of the British Fauna* 2. Leiden. Brill.
49. Grbec B., Matić F., Beg Paklar G., Morović M., Popović R., Vilibić I. (2018). Long-term trends, variability and extremes of in situ sea surface temperature measured along the eastern adriatic coast and its relationship to hemispheric processes. *Pure and Applied Geophysics* 175(11): 4031-4046. doi: 10.1007/978-3-030-11958-4_19
50. Guschina I.A., Harwood J.L. (2006). Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS Letters* 580(23): 5477-5483. doi: 10.1016/j.febslet.2006.06.066
51. Han S.W., Chee K.M., Cho S.J. (2014). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, 172: 766-769. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.127

52. Hannan K.D., Jeffrey J.D., Hasler C.T., Suski C.D. (2016). Physiological responses of three species of unionid mussels to intermittent exposure to elevated carbon dioxide. *Conservation physiology* 4(1): 066. doi: 10.1093/conphys/cow066
53. Hannon C, Officer RA, Le Dorven J (2013). Review of the technical challenges facing aquaculture of the European abalone *Haliotis tuberculata* in Ireland. *Aquaculture International* 21: 243-254. doi: 10.1007/s10499-012-9584-7
54. Hayashi I. (1982). Small scale laboratory culture of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 62: 835-844. doi: 10.1017/S0025315400070375
55. Hensey J. (1993) Abalones the Irish ongrowing experience. (ur. van Patten M.S.), Irish-American technical exchange on the aquaculture of abalone, sea urchins, lobsters and kelp, 5-6. Connecticut Sea Grant College Program, publication no. CT-SG-93-05.
56. Hernández J., de la Parra A.M., Lastra M., Viana, M.T. (2013). Effect of lipid composition of diets and environmental temperature on the performance and fatty acid composition of juvenile European abalone (*Haliotis tuberculata* L. 1758). *Aquaculture* 412-413: 34-40. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.005
57. ISO. (2000). ISO 5509:2000 Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids.
58. Jeffries M.A., Lee C.M. (2007). A climatology of the northern Adriatic Sea's response to bora and river forcing. *Journal of Geophysical Research* 112:C03S02: 1-18. doi: 10.1029/2006JC003664
59. Kaiser M.J., Clarke K.R., Hinz H., Austen M.C.V., Somerfield P., Karakassis I. (2006). Global analysis of response and recovery of benthic biota to fishing. *Marine Ecology Progress Series* 311: 1-14. doi: 10.3354/meps311001
60. Koike Y. (1978). Biological and ecological studies on the propagation of the ormer, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. I: Larval development and growth of juveniles. *La Mer (Bulletin de la Societe Franco Japonaise d'Océanographie)* 16(3): 124-36. doi: 10.2331/suisan.61.638
61. Lachambre S., Day R., Boudry P., Huchette S., Rio-Cabello A., Fustec T., Roussel S. (2017). Stress response of farmed European abalone reveals rapid domestication process in absence of intentional selection. *Applied Animal Behaviour Science* 196: 13-21. doi: 10.1016/j.applanim.2017.07.004
62. Lachambre S., Huchette S., Day R., Boudry P., Rio-Cabello A., Fustec T., Roussel S. (2017). Relationships between growth, survival, physiology and behaviour — A multi-

- criteria approach to *Haliotis tuberculata* phenotypic traits. *Aquaculture* 467: 190-197. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.04.028
63. LaTouche B., Moylan K., Twomey W. (1993). Abalone on-growing manual. *Aquaculture Explained* 14. Dublin. Bord Iascaigh Mhara.
 64. Lau P.S., Wong H.L. (2003). Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 46: 1563-1572. doi: 10.1016/S0025-326X(03)00321-7
 65. Le Pennec G., Le Pennec M., Beninger G. (2001). Seasonal digestive gland dynamics of the scallop *Pecten maximus* in the Bay of Brest (France). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81(4): 663-671. doi:10.1017/S0025315401004349
 66. León V.M., Moreno-González R., Besada V., Martínez F., Ceruso C., García V., Schultze F., Campillo J.A. (2021). Sea snail (*Hexaplex trunculus*) and sea cucumber (*Holothuria polii*) as potential sentinel species for organic pollutants and trace metals in coastal ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* 168: 112407. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112407
 67. Linehan L.G., O'Connor T.P., Burnell G. (1999). Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry* 64: 211-214. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00144-7
 68. Lodeiros C.J., Rengel J.J., Guderley H., Nusetti O., Himmelman J.H. (2001). Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture* 199(1): 63-72. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00505-1
 69. Lou Q.M., Wang Y.M., Xue C.H. (2013). Lipid and fatty acid composition of two species of abalone, *Haliotis discus* Hannai Ino and *Haliotis diversicolor* Reeve. *Journal of Food Biochemistry* 37(3): 296-301. doi: 10.1111/j.1745-4514.2011.00631.x
 70. Maicu F., De Pascalis F., Ferrarin C., Umgiesser G. (2018). Hydrodynamics of the Po river-delta-sea system. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 123(9): 6349-6372. doi: 10.1029/2017JC013601
 71. María-Cervantes A., Jiménez-Cárceles F.J., Álvarez-Rogel J. (2009). As, Cd, Cu, Mn, Pb, and Zn Contents in Sediments and Mollusks (*Hexaplex trunculus* and *Tapes decussatus*) from Coastal Zones of a Mediterranean Lagoon (Mar Menor, SE Spain) Affected by Mining Wastes. *Water, Air, and Soil Pollution* 200(1): 289-304. doi: 10.1007/s11270-008-9913-7
 72. Marshall D.J., McQuaid C.D. (2020). Metabolic Regulation, oxygen limitation and heat tolerance in a subtidal marine gastropod reveal the complexity of predicting climate change vulnerability. *Frontiers in Physiology* 11, doi: 10.3389/fphys.2020.01106.

73. Martínez-Pita I., Sánchez-Lazo C., Ruíz-Jarabo I., Herrera M., Mancera M. (2012). Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture* 358–359: 274–283. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.06.003
74. Mateos H.T., Lewandowski P.A., Su X.Q. (2010). Seasonal variations of total lipid and fatty acid contents in muscle, gonad and digestive glands of farmed jade tiger hybrid abalone in Australia. *Food Chemistry* 123(2): 436-441. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.062
75. Mercer J.P., Mai K.S., Donlon, J. (1993). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus and *Haliotis discus hannai* Ino. I: Effects of algal diets on growth and biochemical composition. *Invertebrate Reproduction and Development* 23: 75-88. doi: 10.1080/07924259.1993.9672298
76. Mgaya Y.D. (1995). Synopsis of biological data on the European abalone (ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae). FAO Fisheries Synopsis. No 156, Rome, FAO, str. 28.
77. Mgaya Y.D., Mercer J.P. (1994). A review of the biology, ecology, fisheries and mariculture of the European abalone *Haliotis tuberculata* Linnaeus 1758 (Gastropoda: Haliotidae). *Biology and Environment* 94B: 285-304.
78. Montroni D., Simoni A., Pasquini V., Dinelli E., Ciavatta C., Triunfo C., Secci M., Marzadori, C., Addis P., Falini G. (2021). A non-lethal method to assess element content in the endangered *Pinna nobilis*. *Scientific Reports* 11(1): 19244. doi: 10.1038/s41598-021-98535-2
79. Morash A.J., Alter K. (2015). Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: Perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Reviews in Aquaculture* 7: 1–27. doi: 10.1111/raq.12097
80. Morse D.E., Duncan H., Hooker N., Morse A. (1977). Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoper oxide synthetase. *Science* 196: 298-300. DOI: doi: 10.1126/science.4036
81. Mottet M.G. (1978). A review of the fishery biology of abalones. Washington. Department of Fisheries Technical Report no. 37.
82. Moylan K., Mercer J. P. (1993). Abalone conditioning, spawning techniques, and nursery systems at the Shellfish Research Laboratory, Carna. (ur. van Patten M.S.). Irish-American technical exchange on the aquaculture of abalone, sea urchins, lobsters and

- kelp, 23-4. Abstracts of an international workshop. Connecticut Sea Grant College Program, publication no. CT-SG-93-05.
83. Nahrgang J., Brooks S.J., Evenset A., Camus L., Jonsson M., Smith T.J., Lukina J., Frantzen M., Giarratano E., Renaud P.E. (2013). Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)—Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic Toxicology* 127: 21-35. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.01.009
 84. Neori A., Ragg N., Shpigel M. (1998). The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquacultural Engineering* 17(4): 215–239. doi:10.1016/S0144-8609(98)00017-x
 85. Nguyen T.V., Alfaro A.C., Mundy C., Petersen J., Ragg N.L. (2022). Omics research on abalone (*Haliotis* spp.): Current state and perspectives. *Aquaculture* 547: 737438. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737438
 86. Palacios E., Racotta I.S., Arjona O., Marty Y., Le Coz J.R., Moal J., Samain J.F. (2007). Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis 2. Lipid classes and sterols. *Aquaculture* 266: 266–273. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.030
 87. Pázos A.J., Román G., Acosta C.P., Abad M., Sánchez J.L. (1997). Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 211: 169-193. doi: 10.1016/S0022-0981(96)02724-4
 88. Peck L.S. (1983). An investigation into the growth and early development of the ormer, *Haliotis tuberculata*, L. Doktorska disertacija, Portsmouth Polytechnic.
 89. Peck L.S. (1989). Feeding, growth and temperature in the ormer, *Haliotis tuberculata* L. *Progress in Underwater Science* 14: 95-107.
 90. Pernet F., Tremblay R., Comeau L., Guderley H. (2007). Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology* 210: 2999–3014. doi: 10.1242/jeb.006007
 91. Pichaud N., Briatte S., Desrosiers V., Pellerin J., Fournier M., Blier P. U. (2009). Metabolic Capacities and Immunocompetence of Sea Scallops (*Placopecten magellanicus*, Gmelin) at different ages and life stages. *Journal of Shellfish Research* 28(4): 865-876. doi: 10.2983/035.028.0416

92. Polimene L., Pinardi N., Zavaterelli M., Colella S. (2006). The Adriatic Sea ecosystem seasonal cycle: Validation of a three-dimensional numerical model. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 111: C03S19. doi: 10.1029/2005JC003260
93. Power A., Sheehan D. (1996). Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 114(2): 99-103. doi: 10.1016/0742-8413(96)00024-2
94. Prince J.D., Sellers T.L., Ford W. B., Talbot S.R. (1987). Experimental evidence for limited dispersal of haliotid larvae (genus *Haliotis*; Mollusca: Gastropoda) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 106: 243-63. doi: 10.1016/0022-0981(87)90096-7
95. Riediger N.D., Othman R.A., Moghadasia M.H. (2009). A Systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association* 109: 668-679. doi: 10.1016/j.jada.2008.12.022
96. Rivera-Pérez C., Ponce González X.P., Hernández-Savedra, N.Y. (2023). Antimicrobial and anticarcinogenic activity of bioactive peptides derived from abalone viscera (*Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata*). *Scientific Reports* 13: 15185 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41491-w>
97. Rodrigues J.A., Bispo D.S.C., Silva M.G., Araújo R., Soares A.M.V.M., Freitas R., Gil A.M. (2023). Impact of Sea Warming and 17- α -Ethinylestradiol Exposure on the Lipid Metabolism of *Ruditapes philippinarum* Clams. *International Journal of Molecular Sciences* 24(11): 9485. doi: 10.3390/ijms24119485
98. Rodrigues L.C., Van Den Bergh J.C.J.M., Massa F., Theodorou J.A., Ziveri P., Gazeau F. (2015). Sensitivity of Mediterranean bivalve mollusc aquaculture to climate change, ocean acidification, and other environmental pressures: Findings from a producer survey. *Journal of Shellfish Research* 34(3): 1161-1176. doi: 10.2983/035.034.0341
99. Roussel S., Bisch T., Lachambre S., Boudry P., Gervois J.L., Lambert C., Huchette S., Day R. (2019a). Anti-predator response of *Haliotis tuberculata* is modified after only one generation of domestication. *Aquaculture Environment Interactions, Inter-research science publisher* 11: 129-142. doi: 10.3354/aei00300
100. Roussel S., Caralp C., Leblanc C., Le Grand F., Stiger-Pouvreau V., Coulombet C., Le Goïc N., Huchette S. (2019b). Impact of nine macroalgal diets on growth and initial reproductive investment in juvenile abalone *Haliotis tuberculata*, *Aquaculture* 513, 734385. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734385

101. Roussel V., Huchette S., van Wormoudt A. (2010). Phylogeny and genetic resources of European Abalone (*Haliotis tuberculata*). Conference: 9th World Congress on Genetics applied to livestock production.
102. Sajjadi N., Eghtesadi-Araghi P. (2011). Determination of Fatty Acid Compositions as Biomarkers in the Diet of *Turbo coronatus* in Chabahar Bay. Journal 2(5): 35-42.
103. Shi L., Hao G., Chen J., Ma S., Weng W. (2020) Nutritional evaluation of Japanese abalone (*Haliotis discus hannai* Ito) muscle: Mineral content, amino acid profile and protein digestibility, Food Research International, 129: 108876, doi: 10.1016/j.foodres.2019.108876.
104. Sifi K., Soltani N. (2018). Seasonal changes of two biomarkers of oxidative stress (LDH, MDA) in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria): correlation with carbohydrate and lipid contents. Molluscan Research 39(1): 315-323. doi: 10.1080/13235818.2018.1499389
105. Silva C.O., Simões T., Novais S.C., Pimparel I., Granada L., Soares A., Barata C., Lemos, M.F.L. (2017). Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. Science of The Total Environment 586: 542-550. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.015
106. Sluczanowski P.R. (1986). A disaggregate model for sedentary stocks: the case of south Australian abalone. (ur. Jamieson G.S., Bourne N.) North Pacific workshop on stock assessment and management of invertebrates, str. 393-401. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 92. Ottawa. National Research Council of Canada.
107. Smedes F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst 124: , 1711-1718. doi: 10.1039/A905904K
108. Sokolova I.M., Pörtner H.O. (2003). Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. Journal of Experimental Biology 206: 195–207. doi: 10.1242/jeb.00054
109. Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V. (2008). State of the antioxidant enzyme complex in tissues of the Black Sea mollusc *Mytilus galloprovincialis* under natural oxidative stress. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 44(2): 175-182. doi: 10.1134/S0022093008020047
110. Starić R. (2019). Najčešći organizmi morskog ekosustava sjevernog Jadrana. Doktorska disertacija

111. Su X.Q., Antonas K.N., Li D. (2004). Comparison of n-3 polyunsaturated fatty acid contents of wild and cultured Australian abalone. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 55(2): 149-154. doi: 10.1080/09637480410001666469
112. Su X.Q., Antonas K.N., Li D., Nichols P. (2006). Seasonal variations of total lipid and fatty acid contents in the muscle of two Australian farmed abalone species. *Journal of Food Lipids* 13(4): 411-423. doi: 10.1111/j.1745-4522.2006.00063.x
113. Suleria H.A.R., Masci P.P., Gobe G.C., Osborne S.A. (2015). Therapeutic potential of abalone and status of bioactive molecules: A comprehensive review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57: 1742-1748. doi: 10.1080/10408398.2015.1031726
114. Taylor A., Maher W. (2006). The Use of Two Marine Gastropods, *Austrocochlea constricta* and *Bembicium auratum*, as Biomonitors of Zinc, Cadmium, and Copper Exposure: Effect of tissue distribution, gender, reproductive state, and temporal variation. *Journal of Coastal Research* 2006(222): 298-306, 299. doi: 10.2112/05-0601.1
115. Toledo-Agüero P.H., Viana M.T. (2009). Fatty acid composition of juvenile abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*) fed formulated diets containing various n3 HUFA levels. *Ciencias marinas* 35(1): 101-112. doi: 10.7773/cm.v35i1.1442
116. Topić Popović N., Kozačinski L., Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R., Jadan M., Cvrtila-Fleck Z., Barišić J. (2012). Fatty acid and proximate composition of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) muscle with regard to plasma lipids. *Aquaculture Research* 43(5): 722–729. doi: 10.1111/j.1439-0426.2008.01108.x
117. Topić Popović N., Krbavčić Jambrošić M., Janči T., Babić S., Beer-Ljubić B., Fiket Ž., Bojanić K., Strunjak Perović I., Tomljanović T., Čož-Rakovac R. (2023). Effect of seasonal temperature shifts on body homeostasis, biochemical parameters and chemical composition of green ormer (*Haliotis tuberculata*) in the Northern Adriatic. *Food Chemistry* 421: 136204. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136204
118. Topić Popović N., Krbavčić M., Barišić J., Beer Ljubić B., Strunjak-Perović I., Babić, S., Lorencin V., Matulić D., Tomljanović T., Čož-Rakovac R. (2021) Comparative tissue responses of marine mollusks on seasonal changes in the northern Adriatic sea. *Applied Sciences* 11: 2874. doi: 10.3390/app11062874
119. Torres P., Rodrigues A., Prestes A.C.L., Neto A.I., Álvaro N., Martins, G.M. (2020) The Azorean edible abalone *Haliotis tuberculata*, an alternative heavy metal-free marine resource? *Chemosphere* 242: 1-9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125177

120. Travers M.A., Basuyaux O., Le Goic N., Huchette S., Nicolas J.L., Koken M., Paillard C. (2009). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15: 1365–1376. doi: 10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x
121. Troell M., Robertson-Andersson D., Anderson R. J., Bolton J. J., Maneveldt G., Halling C., Probyn T. (2006). Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture* 257(1-4): 266-281. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.066
122. Tynan S., Opdyke B.N., Walczak M.H., Eggins S., Dutton A. (2016). Assessment of Mg/Ca in *Saccostrea glomerata* (the Sydney rock oyster) shell as a potential temperature record. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 484(19): 79–88. doi: 10.1016/j.palaeo.2016.08.009
123. Velez C., Figueira E., Soraes A.M.V.M., Freitas R. (2016). Native and introduced clams' biochemical responses to salinity and pH changes. *Science of The Total Environment* 566-567: 260-268. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.019
124. Venter L., Vosloo A., Loots D.T., Mienie L.J., Jansen van Rensburg P.J., Lindeque, J. Z. (2018). Characterising the metabolic differences related to growth variation in farmed *Haliotis midae*. *Aquaculture* 493: 144–152. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.04.05
125. Viličić D. (2014). Specific oceanological characteristics of the Croatian part of the Adriatic. *Hrvatske vode* 22: 297-314.
126. Vosloo A., Laas A., Vosloo D. (2013). Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 164, 1: 192-199. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.09.002
127. Werner I. (1993). Experimental evaluation of sand as a barrier to abalone (*Haliotis* spp.) movement. Doktorska disertacija, University College Cork
128. Wessel N., Martin S., Badou A., Dubois P., Huchette S., Julia V., Nunes F., Harney, E., Paillard C., Auzoux-Bordenave S. (2018). Effect of CO₂ induced ocean acidification on the early development and shell mineralization of the European abalone (*Haliotis tuberculata*) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 508: 52-63. doi: 10.1016/j.jembe.2018.08.005
129. WFA (1968). The potential of the ormer in marine fish farming. Marine Cultivation Unit Trials Record no. 15. Hunterston. White Fish Authority

130. Wu F., Zhang G., (2016). Pacific abalone farming in China: recent innovations and challenges. *Journal of Shellfish Research* 35: 703–710. doi: 10.2983/035.035.0317
131. Xu W., Mai K., Zhang W., Liufu Z., Tan B., Ma H., Ai Q. (2004). Influence of dietary lipid sources on growth and fatty acid composition of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Journal of Shellfish Research*, 23(4), 1041-1045.

8. ŽIVOTOPIS

Martina Krbavčić Jambrošić, magistra struke molekularne biologije, rođena je 26.09.1986. godine u Kopru (Republika Slovenija). Osnovnu školu završila je u Buzetu, a klasičnu gimnaziju u Pazinu. Studij molekularne biologije završila je 2012. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U razdoblju od veljače do lipnja 2013. godine radila je u Centru za proteomiku Medicinskog fakulteta u Rijeci, od lipnja 2013. godine do srpnja 2014. godine kao pripravnik Adris grupe, a od srpnja 2014. godine do danas obnaša funkciju najprije tehnologinje i glavne tehnologinje na Uzgajalištima Lim i Budava, a od 2019. godine funkciju rukovoditeljice Uzgajališta Budava u tvrtki Cromaris d.d. Poslijediplomski doktorski studij upisuje 2014. godine, te pod vodstvom prof. dr. sc. Tee Tomljanović i dr. sc. Natalije Topić Popović, dr. med. vet. izrađuje ovu disertaciju. Doktorandica je autorica tri znanstvena rada i dva konferencijska sažetka.

Popis radova:

1. Tomljanović T., Krbavčić Jambrošić M., Topić Popović N., Strunjak Perović I., Čož-Rakovac R., Špoljar M., Matulić D. (2023). Environmental biology, life history traits and aquaculture of green ormer *Haliotis tuberculata*. Journal of Central European Agriculture (JCEA). 24: 3, 643-651. doi: /10.5513/JCEA01/24.3.3924
2. Topić Popović N*, Krbavčić Jambrošić M.*, Janči T., Babić S., Beer-Ljubić B., Fiket Ž., Bojanić K., Strunjak Perović I., Tomljanović T., Čož-Rakovac R. (2023). Effect of seasonal temperature shifts on body homeostasis, biochemical parameters and chemical composition of green ormer (*Haliotis tuberculata*) in the Northern Adriatic. Food Chemistry 421: 136204. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136204. *jednakovrijedno autorstvo
3. Topić Popović N., Krbavčić M., Barišić J., Beer Ljubić B., Strunjak-Perović I., Babić, S., Lorencin V., Matulić D., Tomljanović T., Čož-Rakovac R. (2021). Comparative tissue responses of marine mollusks on seasonal changes in the northern Adriatic Sea. Applied Sciences 11: 2874. doi: 10.3390/app11062874
4. Topić Popović N. Krbavčić Jambrošić M., Beer Ljubić B., Barišić, Josip; Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R. (2022). Green ormer (*Haliotis tuberculata*) tissue responses to seasonal variations in the northern Adriatic Sea // WORLD AQUACULTURE 2021, 24-27.5.2022, Merida, Mexico. Abstract book. Mérida, Meksiko, 2022. str. 251-251
5. Krbavčić Jambrošić M., Tomljanović T., Obradović Ž., Janči T., Topić Popović N. (2022). Seasonal variations in chemical composition and fatty acid profile of European abalone (*Haliotis tuberculata*) from Northern Adriatic // Conference of the West European Fish Technologists' Association (WEFTA) : Book of Abstracts. Rotterdam, Nizozemska, 2022. str. 130-130