



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Департман за ветеринарску медицину

Утицај еколошких фактора на појаву *Marteilia refringens* код медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*)

- Докторска дисертација -

Ментори :

др Николина Новаков , доцент

др Мирослав Ћирковић, научни саветник

Кандидат :

Мр Бојан Аџић, дипл. вет

Нови Сад, 2016. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Департман за ветеринарску медицину

Утицај еколошких фактора на појаву *Marteilia refringens* код медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*)

- Докторска дисертација -

Ментори :

др Николина Новаков, доцент

др Мирослав Ћирковић, научни саветник

Кандидат :

Мр Бојан Аџић, дипл. вет

Нови Сад, 2016. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторски рад
Име и презиме аутора: АУ	мр Бојан Аџић
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	др Николина Новаков, доцент др Мирослав Ћирковић, научни саветник
Наслов рада: НР	Утицај еколошких фактора на појаву <i>Marteilia refringens</i> код медитеранске дагње (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)

Језик публикације: ЈП	Српски језик
Језик извода: ЈИ	срп. / енг.
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	АП Војводина
Година: ГО	2016
Издавач: ИЗ	ауторски репринт
Место и адреса: МА	Пољопривредни факултет, Трг Доситеја Обрадовића 8, 21 000, Нови Сад
Физички опис рада: ФО	8поглавља/116 страница/26 слика/24табеле/7 графикона / 2 мапе/ 117 референци
Научна област: НО	Ветеринарска медицина
Научна дисциплина: НД	Болести риба и аватичних организама
Предметна одредница, кључне речи: ПО	<i>Marteilia refringens</i> , протозоа, еколошки фактори, кондициони индекс, <i>Mytilus galloprovincialis</i>
УДК	591.69:639.371/374:581.5 (043.3)
Чува се: ЧУ	Библиотека Пољопривредног факултета Нови Сад

Важна напомена: ВН	Нема
Извод: ИЗ	
<p>Циљ истраживања је био да се утврди појава и преваленца паразита <i>Marteilia refringens</i> у медитеранској дагњи (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) гајеној у Бококаторском заливу. Осим тога имали смо за циљ да утврдимо да ли еколошки фактори (температура морске воде, салинитет, концентрација кисеоника, рН вредност) и присуство бактерија (<i>Escherichia coli</i> и стрептококи фекалног порекла) утичу на појаву овог паразита у медитеранској дагњи. Вршили смо испитивања на шест различитих локација – узгајалишта медитеранске дагње у Бококаторском заливу. Укупно је узорковано 960 јединки медитеранске дагње. <i>Marteilia refringens</i> је утврђена на четири локације - узгајалишта. Укупна преваленца паразита <i>Marteilia refringens</i> је износила 1,25%. Кретала се од 0% на две локације, 0,56% на једној, 1,67% на једној локацији до максимално 3,33% на две локације. Пратили смо евентуалну појаву паразита током дванаестомесечног периода, а утврдили смо његово присуство од септембра до децембра и у марту месецу. Од праћених еколошких фактора утврдили смо да највећи утицај на појаву паразита има рН вредност морске воде, с тим што се <i>Marteilia refringens</i> појављује при нижој рН вредности од просечне. Утврдили смо и утицај концентрације кисеоника у морској води, при чему се <i>Marteilia refringens</i> јављала при вишим концентрацијама кисеоника. Нисмо утврдили утицај температуре на појаву паразита, али смо забележили појаву паразита при минималној температури од 11,2°C. Нисмо статистички доказали утицај салинитета и појаве бактерија у морској води на појаву <i>Marteiliae refringens</i>. Доказали смо негативан утицај појаве паразита <i>Marteilia refringens</i> на индекс кондиције медитеранске дагње. Све мартелије утврђене цитолошким и хистолошким испитивањима смо потврдили и молекуларним испитивањима, при чему смо утврдили да наши изолати паразита припадају М типу <i>Marteiliae refringens</i>. Сви наши изолати</p>	

показују генетску идентичност, а показују и веома велику генетску сродност са другим изолатима <i>Marteilia refringens</i> добијеним из Јадранског мора.	
Датум прихватања теме од стране Сената: ДП	24.09.2015.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	<p>ментор: др Николина Новаков, доцент, Пољопривредни факултет Нови Сад</p> <hr/> <p>ментор: др Мирослав Ђирковић, научни саветник, Научни институт за ветеринарство Нови Сад</p> <hr/> <p>председник: др Драган Роган, редовни професор, Пољопривредни факултет Нови сад</p> <hr/> <p>члан: др Александар Поткоњак, доцент, Пољопривредни факултет Нови Сад</p> <hr/> <p>члан: др Митја Гомбач, доцент, Ветеринарски факултет Љубљана</p> <hr/>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Bojan Adžić, MSc
Mentor: MN	PhD Nikolina Novakov, associated professor PhD Miroslav Ćirković, principal research fellow
Title: TI	Influence of environmental factors on the occurrence of <i>Marteilia refringens</i> in Mediterranean mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)

Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	8 chapters /116 pages/26 pictures/24tables/7 graphs/2 maps/117 references
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Diseases of fish and aquatic organisms
Subject, Key words SKW	<i>Marteilia refringens</i> , protozoa, environmental factors, condition index , <i>Mytilus galloprovincialis</i>
UC	591.69:639.371/374:581.5 (043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Agriculture Novi Sad

Note: N	None
Abstract: AB	
<p>The aim of the research was to determine the presence and prevalence of the parasite <i>Marteilia refringens</i> in Mediterranean mussels (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) cultivated in Boka kotorska Bay. In addition we aimed to determine whether environmental factors (temperature of seawater, salinity, oxygen concentration, pH value) and the presence of bacteria (<i>Escherichia coli</i> and streptococci of faecal origin) have influence on the occurrence of this parasite in the Mediterranean mussels. We conducted tests at six different locations. In total 960 individuals of Mediterranean mussels were sampled and included in the study. <i>Marteilia refringens</i> was found at four locations. The overall prevalence of the parasite <i>Marteilia refringens</i> was 1.25%. It ranged from 0% at two locations, 0,56% at one, 1.67% at one to 3,33% at two locations. We traced the possible occurrence of the parasite during a twelve month period, and we found its presence from September till December and in March. We found that the pH value of seawater had the greatest impact on the occurrence of the parasite from all monitored environmental factors. <i>Marteilia refringens</i> occurs at lower pH values than the average measured pH values of seawater. We also found that <i>Marteilia refringens</i> occurred at the higher concentrations of oxygen in the seawater. We did not determine the effect of temperature on the occurrence of the parasite, but we recorded the occurrence of this parasite at a minimum temperature of 11,2°C. We did not prove that salinity and the presents of bacteria had an influence on the occurrence of <i>Marteilia refringens</i>. We determined a negative impact of <i>Marteilia refringens</i> on the condition index of Mediterranean mussel. All parasites, determined by cytologic and histologic examination were confirmed by molecular methods. We determined that all our isolates belonged to the M type of <i>Marteilia refringens</i>. All our isolates show genetic uniformity, but also show genetic similarity with other isolates of <i>Marteilia refringens</i></p>	

from Adriatic sea.	
Accepted on Senate on: AS	24.09.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>mentor: Nikolina Novakov, PhD, associated professor, Faculty of Agriculture Novi Sad</p> <hr/> <p>mentor: Miroslav Ćirković, PhD, principal research fellow, Scientific Veterinary Institute Novi Sad</p> <hr/> <p>president: Dragan Rogan, PhD, full professor, Faculty of Agriculture</p> <hr/> <p>member: Aleksandar Potkonjak, PhD, associated professor, Faculty of Agriculture Novi Sad</p> <hr/> <p>member: Mitja Gombač PhD, associated professor, Veterinary Faculty Ljubljana</p> <hr/>

Садржај

1.УВОД	1
1.1.Црногорско приморје.....	3
1.2.Узгој шкољки у Црној Гори	6
2.ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	8
2.1.Заступљеност медитеранске дагње (<i>Mytilus galloprovincialis</i>).....	8
2.2.Медитеранска дагња (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) – таксономија и порекло	9
2.3.Медитеранска дагња (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) – морфолошке карактеристике	10
2.4.Дигестивни систем	15
2.5. Физиолошки процеси у медитеранске дагње (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	20
2.5.1. Исхрана	20
2.5.2. Размножавање	20
2.6.Болести медитеранске дагње (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	21
2.7. Болести забележене у Црној Гори	22
2.8. <i>Marteilia refringens</i>	23
2.9. <i>Marteilia refringens</i> – морфологија и животни циклус	25
2.10. Распрострањеност мартелиозе	26
2.11. Епидемиолошка разматрања	27
2.12. Начин преношења	29
2.13. Генетска разматрања	31
2.14. Патогеност <i>Marteilia refringens</i>	32
2.15. Дијагностика мартелиозе	33
2.16. Контрола и превенција мартелиозе у медитеранске дагње	35
3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА И НАУЧНА ХИПОТЕЗА	37
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	38
4.1. Опис и преглед локалитета	38
4.2. Методологија испитивања физичко-хемијских параметара морске воде	40

4.3. Методологија испитивања квалитета морске воде	41
4.3.1. Идентификација <i>E.coli</i> (MPN), ISO-9308-1:2000.....	41
4.3.2. Идентификација и одређивање броја фекалних стрептокока	42
4.4. Сакупљање узорака	43
4.5. Мерење узорака	44
4.6. Узимање узорака за цитолошке анализе	45
4.7. Морфометријске карактеристике	46
4.8. Детекција <i>Marteilia refringens</i> помоћу ланчане реакције полимеразе и RFLP	47
4.8.1. Екстракција ДНК	47
4.8.2. Ланчана реакција полимеразе – PCR	49
4.8.3. PCR микс	49
4.8.4. Амплификација	50
4.8.5. Интерпретација резултата	50
4.8.6. Електрофореза	50
4.8.7. Припрема агароза гела	51
4.8.8. RFLP (Полиморфизам дужине рестрикцијских фрагмената)	51
4.8.9. Интерпретација	52
4.8.10. Пречишћавање из гела	52
4.8.11. Секвенцирање	53
4.9. Патохистолошка испитивања	54
4.10. Статистичке анализе	55
5. РЕЗУЛТАТИ	57
5.1. Резултати индекса кондиције испитиваних дагњи	68
5.2. Резултати макроскопских истраживања	73
5.3. Резултати детектоване <i>Marteilia refringens</i>	73
5.4. Епидемиологија	76
5.5. Однос еколошких фактора и појаве мартелиозе	80

5.6. Микроскопски преглед – цитолошки и хистолошки	84
5.7. Резултати молекуларних истраживања генома	85
6. ДИСКУСИЈА	92
7. ЗАКЉУЧАК	104
8. ЛИТЕРАТУРА	106

1. УВОД

Још од давнина месо шкољки је у приобалним регионима представљало значајан део људске исхране. Континуирани излов шкољки смањило је природну популацију у морима и океанима. Шкољке, заједно са морским рибама, раковима и главношцима представљају основ људске исхране добијене из мора.

Постоји велики број врста шкољки у светским морима и океанима. У водама Јадрана, односно Црногорског приморја живи велики број врста шкољки од којих се издвајају медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*), јакобова капица (*Pecten jacobus*), прстасти (*Lithophaga lithophaga*), вонголе (*Venus verrucosa*), европска острига (*Ostrea edulis*), паластура (*Pinna nobilis*), петрово уво (*Heliotis lamellosa*), пругаста капица (*Cardium tuberculatum*)...

Од наведених врста у Црној Гори се узгајају само медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) и од скоро европска острига (*Ostrea edulis*). Према томе, медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) представља најзначајнију врсту шкољки у Црној Гори. Сва узгајалишта – фарме медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*), (народно име мушље) налазе се у Бококоторском заливу и то у сва четири мала залива: Тиватском, Херцеговском (Топљанском), Которском и Рисанском заливу. У другим деловима Црногорског приморја нема планског узгоја шкољки. Укупно има седамнаест фарми дагњи, које су концентрисане (подељене) на укупно шест микролокација. На већини фарми врши се узгој искључиво медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*), док се на једној фарми поред дагњи, узгаја и европска острига (*Ostrea edulis*), чији је узгој још у зачетку, а на другој се врши и кавезни узгој морских риба бранцина (*Dicentrarchus labrax*) и ораде (*Sparus aurata*).

Месо медитеранске дагње је цењено и укусно. Дагње се у Црној Гори узгајају коришћењем система конопаца, тзв. *long-line* систем. Узгајалишта – фарме су углавном формиране са мало улагања, рустичне су и нису најбоље усклађене са техничком ефикасношћу. Неке од постојећих фарми се не налазе на

најприкладнијим местима и дугорочно нису одрживе (*Стратегија развоја рибарства Црне Горе 2015–2020, 2015*). Ипак, генерално гледано, услови за производњу дагњи су и поред ових препрека доста добри, а прираст је брз и износи између 15 и 18 месеци до величине за брање. У Бококоторском заливу већ постоји значајан природан мрест дагњи, при чему младе шкољке природно плутају, а затим се каче за природне препреке.

Просечна годишња производња дагњи током последњих неколико година је двеста тона, при чему производња нема неку значајнију тенденцију раста. Значајан чинилац у производњи шкољки, а међу њима и медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) је контрола болести.

Најчешћи патогени који нападају шкољке су свакако паразити. Један од најзначајнијих паразита медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) је *Marteilia refringens*, микроорганизам који припада разделу Paramухеа. Овај паразит изазива мартелиозу у европске остриге (*Ostrea edulis*) и у две врсте дагњи у Европи: плаве дагње (*Mytilus edulis*) и медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Иако постоје нека тумачења да мартелиозу дагњи изазива слична врста *Marteilia maurini*, према наводима *Lopez-Flores et al. (2004)* и *Novoa et al. (2005)*, *Marteilia refringens* и *Marteilia maurini* представљају само два соја исте врсте, што ћемо користити у овом раду. *Marteilia refringens* изазива значајна угинућа код острига, а може изазвати и значајне штете у производњи дагњи (*Camacho et al., 1997*).

Мартелиоза је широко распрострањена болест у Европи и свету и појављује се у више земаља (*OIE Diagnostic Manual for Aquatic Animals, 2012*). До сада у Црној Гори није било свеобухватног истраживања на ову тему. У овом раду ћемо истражити евентуални утицај паразита *Marteilia refringens* на кондициони индекс медитеранских дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) гајених у водама Црногорског приморја. Испитаћемо и утицај одређених еколошких фактора као што су температура воде, салинитет, концентрација кисеоника, рН, као и присуства бактерија у морској води на појаву мартелиозе дагњи. Такође испитаћемо и којем филогенетском типу припадају нађене *Marteiliae*.

Ово је прва студија испитивања појаве мартелиозе дагњи и утицаја еколошких фактора и бактерија (*Escherichia coli* и стрептокока фекалног порекла) на појаву овог паразита у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*).

1.1. Црногорско приморје

Црногорско приморје представља најјужнији део црногорске територије и простире се на територији шест општина (Улцињ, Бар, Будва, Тиват, Котор и Херцег Нови). Климатски и рељефно се разликује од своје залеђине, тј. средишњег дела Црне Горе. Од њега је одвојено стрмим планинама Румијом, Суторманом, Созином, Ловћеном и Орјеном. Само на крајњем југу приморски појас је шири, а чини га Улцињско поље. Црногорско приморје одликују топла лета и благе и кишовите зиме. Место са највећом годишњом просечном количином падавина у Европи су Црквице, које се налазе у залеђини Херцег Новог (www.hmz.gov.me).

Дужина црногорске обале је 293 километра, а карактерише је слаба разуђеност и мали број острва. Налази се на источној страни југа Јадранског мора које представља део Средоземног мора (Медитерана), које најдубље улази у европско копно. Обала се простире од Аде Бојане, близу границе са Албанијом, до рта Кобила, односно села Суторине у близини Игала (www.kartacrnegore.com).



Мапа 1: Црногорско приморје

Најзападнији део Црногорског приморја чини Бококоторски залив. Бококоторски залив или скраћено Бока Которска представља најјужнији фјорд Европе, а настао је као последица отапања ледника са планина Ловћен и Орјен. Бразде налик кањонима усекла је накадашња река. Бококоторски залив се састоји од четири мања залива и то: Которског, Рисанског, Тиватског и Херцеговског (Топљанског). Рисански и Которски залив представљају унутрашњи део Бококоторског залива, који је теснацом Вериге (340 метара) повезан са спољашњим делом залива. Дужина обалне линије залива износи 105,7 m. Укупна површина акваторијума Бококоторског залива износи 87,3 km² (0,06% површине Јадранског мора).

Дубина Јадранског мора је различита и шири се према северозападу, а највећа измерена дубина Јадрана је 80 километара југозападно од Херцег Новог и износи 1.233 метра. Средња дубина Бококоторског залива износи 27,6 m, а највећа дубина залива је 60 m (у Херцеговском заливу). Недавно је од стране Ратне морнарице утврђена максимална дубина мора у Которском заливу од 64 метра (*Der Map Project Report, 2011*). У заливу су присутне и морске струје, чији се ток може поделити у два слоја. У горњем слоју преовладава излазно, а у доњем слоју улазно струјање (*Pestorić, 2013*). У спољашњем делу залива струјање првенствено зависи од утицаја отвореног мора, док само површински слојеви потпадају под утицај ветрова (*Mandić et al., 2001*).

Температуре површине мора се крећу од 12°C зими, па до 26 °C лети, а у неким деловима залива могу ићи и до 30°C. Салинитет варира, али се просечно креће од око 28‰ до око 38-39‰ код Улциња. И у Бококоторском заливу салинитет знатно варира, па је минимални салинитет у Которском и Рисанском заливу око 3‰, а максимални су измерени у Тиватском и Херцеговском заливу и прелазе 37‰ (*Regner et al., 1998*). Провидност мора је доста велика, 38–56 метара. Концентрација кисеоника је различита, при чему зависи од температуре и креће се од минимално 6 mg/l лети, па до максимално 12 mg/l зими. Плима и осека нису много изражене у водама Црногорског приморја, просечно 31 центиметар. Просечна висина таласа је око пола метра, а таласи величине од преко два метра

су врло ретки. Боја мора је тамноплава, а просечан број сунчаних дана се креће око 240, а највећи је у Улцињу. Црногорску обалу карактерише велики број плажа и то 73, које се налазе на 117 локација. Услед великог броја плажа, нарочито изван Бококоторског залива, могућности и простор за узгој шкољки се значајно смањују (*Стратегија развоја рибарства Црне Горе, 2006*).

У црногорски део Јадрана се улива већи број река и потока, од којих се величином издваја река Бојана. У Бококоторски залив улива се пет речица (само су две активне током читаве године) и неколико подземних извора (*Магаš, 2002*).

Недалеко од залива налази се и место Црквице, које је најкишовитије место у Европи (5.000 mm воденог талога годишње) (www.hmz.gov.me).



Мапа 2: Бококоторски залив, ● узгајалишта шкољки

У водама црногорског приморја живи 116 различитих врста риба, велики број ракова и преко 250 врста шкољки (*Национална стратегија биодиверзитета са акционим планом 2010 - 2015, 2010*).

1.2. Узгој шкољки у Црној Гори

У Црној Гори се за сада гаје две врсте шкољки и то медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) и европска острига (*Ostrea edulis*). Главна узгојна врста је медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*), која се гаји на 17 фарми, док се европска острига (*Ostrea edulis*) гаји само на једној фарми, при чему је њен узгој још у зачетку. Све црногорске фарме шкољки смештене су у Бококоторском заливу (*Стратегија развоја рибарства у Црној Гори, 2006*).

Може се рећи да су смештене на укупно шест различитих локалитета. Укупна црногорска годишња производња дагњи износи око 200 тона, а производња по узгајалиштима се креће од 4 до максимално 30 тона по узгајалишту. Укупна годишња производња последњих година стагнира. Значајнија производња шкољки почела је деведесетих година двадесетог века, до тада су постојали само појединачни покушаји узгоја шкољки. У научноистраживачке сврхе узгојем шкољки се још много раније (током седамдесетих година двадесетог века) бавио и Институт за биологију мора из Котора, чији су научници први спровели истраживања о паразитофауни шкољки у акваторијуму Бококоторског залива (*Stjepčević i Stijepčević, 1974*).

У Црној Гори се у узгоју дагње користи тзв. long-line систем узгоја, односно, систем конопаца. Млађ се ручно бере са конопа који су нарочито постављени за качење млађи шкољки. Конопи се одржавају уз помоћ бова. Млађ се обично бере када досегне величину 1–1,5 центиметар, односно величину нокта на палцу, после чега се ставља у најлонске чарапе, тзв. перголаре. Ово се ради најчешће зими. Ови перголари су мреже дужине од око једног метра, са ситним оком у које се поставља млађ. Када достигне величину од око три центиметра млађ се скида, чисти и расађује у перголаре са већим оком, који се каче за конопце. Ово се најчешће ради лети, у јуну или јулу месецу. Ту се лакше хране и развијају. Конзумну величину достижу током следећег лета. Генерално, конзумну величину достижу у року 15–18 месеци (лична комуникација са узгајивачима).

У Црној Гори је период (када се достиже конзумна величина) најчешће лети, што одговара периоду повећане потражње за шкољкама услед туристичке сезоне. Тада се шкољке ваде, перу, чисте и остављају на сунцу, што убија организме који се закаче за љуштуру шкољке. Конзумном величина дагњи сматра се величина 6–8 центиметара (*Fantuzzi, 2005*).

Месо црногорских дагњи цењено је и укусно, врло је тражено у току туристичке сезоне, а поред тога мањи део се извози и у околне земље (Србија, Босна и Херцеговина) (лична комуникација са узгајивачима).



Слика 1 и 2: Узгој шкољки у Црној Гори, *long-line* систем

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Заступљеност медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*)

У водама Црногорског приморја живи преко 250 врста шкољки, од чега је у унутрашњости Бококоторског залива регистровано њих 127. Једна од најзаступљенијих је свакако медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) (*Национална стратегија биодиверзитета са акционим планом за период 2009–2014. године, 2009*).

Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) припада фамилији *Mytilidae*. Та фамилија је широко распрострањена врста, заступљена од субарктичког до умереног појаса. Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) се у Европи може наћи од Северног мора, дуж обала Холандије, Белгије, Француске и Британских острва, преко Шпаније и Португалије, долази до Медитерана. Заступљена је у читавом Медитеранском басену, као и Црном мору. У Северној Америци се налази на обалама Калифорније и Вашингтона, у Азији је налазимо крај обала Јапана, Кине, Кореје и на руском Далеком истоку око Владивостока. Пренета је и на обале Јужне Африке и Намибије, Јужне Америке, Аустралије и Новог Зеланда. Води порекло из Медитерана, као и са обала Галиције у Шпанији, а у друге делове Европе и света је најчешће преношена баластном водом са бродова (*Green, 2014*).

У земљама Средоземног мора најзаступљенија је узгојна врста шкољки. Слична је плавој дагњи (*Mytilus edulis*), али од ње знатно боље подноси вишу температуру воде. Може поднете температурни опсег од -3°C – 44°C и салинитет од 4‰ –40‰, (*Gosling, 2004*), али јој је оптимална температура за раст од 8°C – 25°C , а салинитет између 27‰ и 30‰ (*Fantuzi, 2005*) .

Сматра се изузетно инвазивном врстом. Према *Greenu, 2014*, из *IUCN/SSC* (Invasive Species Specialist Group)* медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) спада међу стотину најинвазивнијих врста на свету, при чему истискује домицилне врсте карактеристичне за то подручје.

Медитеранску дагњу (*Mytilus galloprovincialis*) углавном срећемо у зони плиме и осеке. Природно насељава стеновите обале са ниском плимом, мада се може наћи и у пешчаним и блатњавим лагунама, као и у бракичним водама. Ограничена дубинска распрострањеност условљена је биолошким факторима (предаторство и конкуренција), а не немогућношћу преживљавања у дубљим слојевима литоралне зоне (*Gosling, 1981*).

Према доступним подацима Организације за храну и пољопривреду Уједињених нација (ФАО-а) највећи светски произвођачи медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) су земље Медитерана (највише Италија, Француска, Шпанија), потом и Кина, Јужна Африка и др.

Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) има бројне непријатеље – предаторе, а у Бококоторком заливу се истиче орада (*Sparus aurata*) која понекад зна да десеткује производњу дагњи. Поред ораде, природни непријатељи дагњи су и морски пуж (*Nucella lapillus*), ракови, птице, морске корњаче, морске звезде и др (*Gosling, 2004*).

2.2. Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) – таксономија и порекло

Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) припада разделу мекушаца (*Mollusca, Linnaeus 1758*), класи шкољки (*Bivalvia, Linnaeus 1758*), поткласи *Metabranhia*, надреду *Fillibranchia*, реду *Pteriomorpha*, надфамилији *Mytiloidea*, фамилији дагњи *Mytilidae* и роду *Mytilus*.

Претпоставља се да је врста *Mytilus galloprovincialis* настала од *M. edulis* када се Средоземно море одвојило од Атланског океана за време плеистоцена, пре око 1–2 милиона година (*Barsotti and Meluzzi, 1968*). Морфолошке и генетске разлике између ове две врсте су врло мале па на подручјима где налазимо обе врсте, као што су Француска и Ирска (*Gosling, 1981*), природно се међусобно мресте те настају хибриди који могу производити виталне ларве (*Dardignac-Corbel, 1990*).

2.3. Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) – морфолошке карактеристике

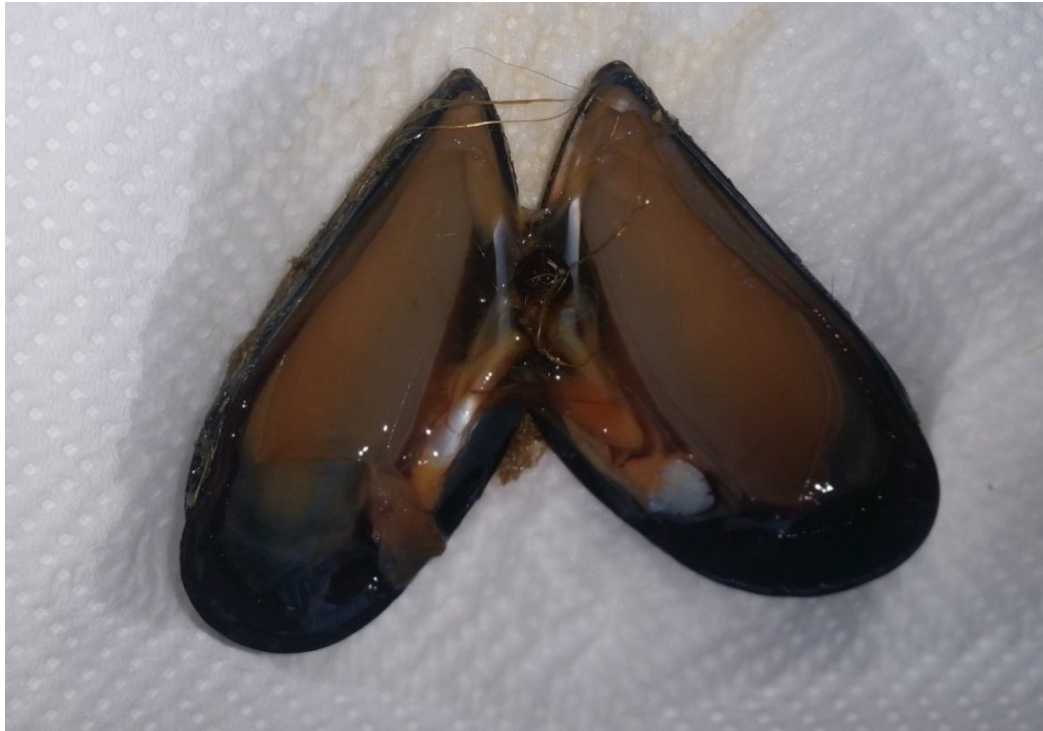
Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) је плавоцрне до љубичастоцрне боје, просечне величине одрасле шкољке око 5–6 центиметара, мада може достићи и величину до 12 центиметара (*Pagad, 2006*). Спољашња љуштура шкољке је приближно троугластог облика, састоји се од две половине, валвуле, које су прилично симетричне. Љуштура се састоји од мукополисахарида, протеина и калцијум-карбоната (*Mengoli, 1998*). Састоји се од три слоја. Половине – валвуле су одвојене плаштом испод којег се налазе унутрашњи органи дагње. Валвуле су спојене лигаментом, а затвара их снажни мишић адуктор. Љуштура има велики број улога, међу којима су најважније заштита унутрашњих органа дагње и заштита животиња од предатора.



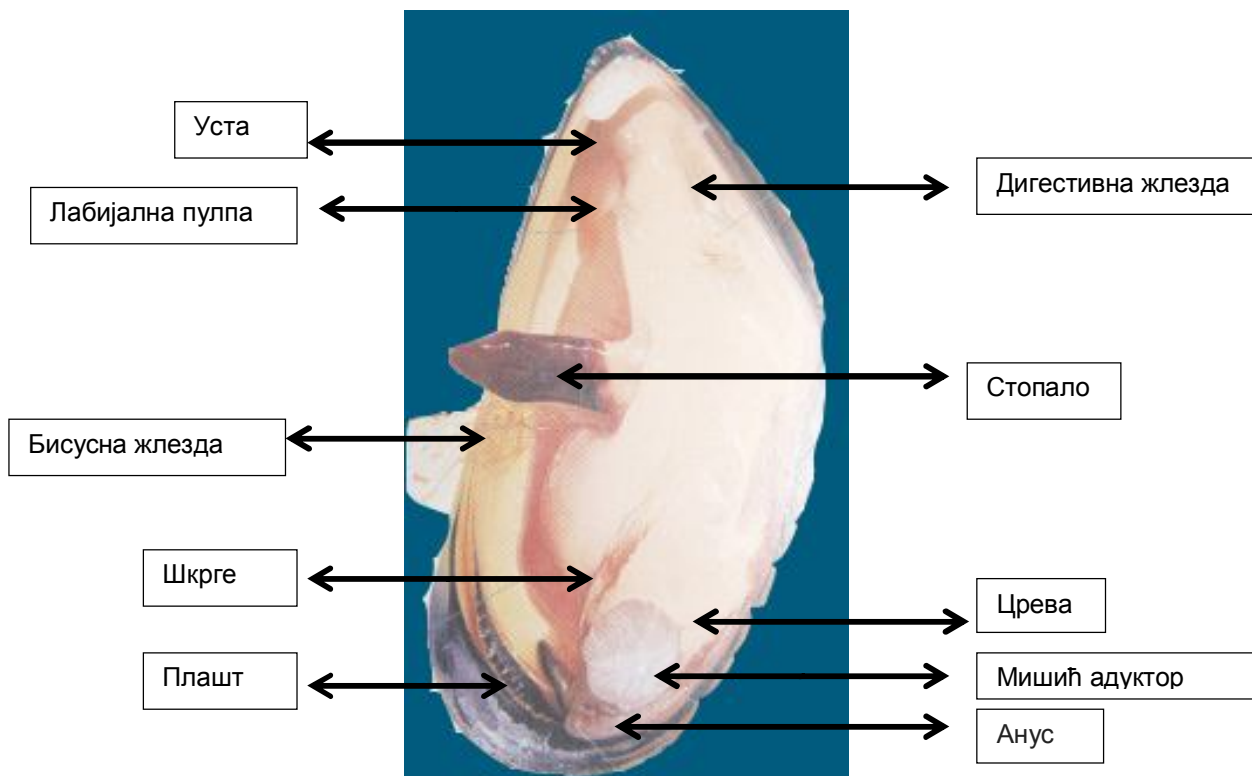
Слика 3: Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*)

(извор: <http://www.discoverlife.org/>)

Мишић адуктор или примицач има улогу да дозволи животињи да отвара или затвара љуштуру. У медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) их има два, мали антериорни и већи постериорни. Антериорни мишић затварач је редукован па је љуштура на том делу сужена, што јој даје троугласти облик (Gosling, 2004). Када су мишићи опуштени, шкољка се отвара, а када су контраховани валвуле су спојене и шкољка се затвара, што онемогућава предаторима да поједу животињу. То представља одбрамбени механизам животиње (Gosling, 2004).



Слика 4: Унутрашњост мед. дагње (*Mytilus galloprovincialis*)



Слика 5: Унутрашњи органи медитеранске дагње

Дагње, као и велики број шкољки, поседују специфичан орган – стопало. Стопало је релативно мало у медитеранске дагње, а служи да животиња мења позицију, тако што се стопало повлачи лагано напред предњим крајем, а затим повлачи целу животињу у жељеном правцу. Поред стопала, за прихватање за тло служе и бисусне жлезде, које се налазе у жлебу стопала. Оне луче вискозну течност која у додиру са морском водом очвршћава, постаје еластична и тако спаја дагњу са подлогом (*Mengoli, 1998*). Дагње продукују бисусне нити током читавог свог живота. Поред улоге у везивању за подлогу, бисусне нити могу послужити и као одбрана од предатора (*Caro et al., 2008*).

Испод спољашње љуштуре – шкољке налази се плашт који одваја љуштuru од унутрашњих органа. На плашту се налазе два сифона – отвора. Први сифон је инхалациони, кроз који улази храна. Постојећи филтер брани улазак већих партикула. Други је ексхалациони сифон. Оба су смештена на постериорном крају плашта. Сифони имају функцију у исхрани, дисању, као и у репродукцији. Вода пролази кроз инхалациони сифон, долази до шкрга преко којих животиње дишу и излази кроз ексхалациони сифон (*Mengoli, 1998*).

Шкрге представљају органе преко којих животиње дишу. Налазе се између плашта са једне и висцеларне масе, односно унутрашњих органа, са друге стране. Са обе стране се састоје од унутрашње и спољашње ламине. Свака се ламина састоји од ламела супротно од стопала и ламеле која се налази на страни плашта. Шкрге формирају облик дуплог латиничног В. Такав тип шкрга се назива филибранхије (*Le Pennec et al., 2003*).

Завршетак шкрга представљају лабијалне пулпе, које се налазе антеродорзално испод плашта. Њихова улога је усмеравање хране према дигестивној жлезди и чишћење шкрга (*Le Pennec et al., 2003*).

Полови у дагњи су одвојени, али је понекад присутан функционални хермафродитизам (*Thielley and Grizel, 2003*). Репродуктивне органе чине гонаде које окружују дигестивну жлезду. Грађене су од разгранатих тубула које се сједињују веће тубуле, при чему формирају дуктус који се завршава тзв.

гонодуктом и од фоликула у којима се развијају герминативне ћелије током сперматогенезе и оогенезе. Током фаза гаметогенезе и оогенезе њена величина варира (Gosling, 2004).

Нервни систем је релативно једноставан (нервни систем у шкољки је једноставнији него код осталих представника мекушаца) и састоји се из три пара ганглија и више пари нерава. Ганглије су церебралне, стопалне и висцеларне ганглије (Luber and Mathieu, 2003) при чему церебралне контролишу плашт, стопалне стопало (налази се на бази стопала), а висцеларне унутрашње органе и налазе се испод мишића адуктора. Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) поседује и тзв. оцели или окца (40–50 μ m у пречнику), која се налазе на углу шкрга, при чему аутори повезују њихову улогу са дугорочним одговором, као што је фотопериод, који је повезан са репродуктивним циклусом (Rosen et al., 1978).

Као и друге врсте шкољки и медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) имају отворени циркулаторни систем. Чине га срце, систем циркулаторних судова и хемолимфа. Хемолимфа плави унутрашње органе формирајући систем тзв. лагуна (Mengoli, 1998). Срце је смештено дорзално, заједно са перикардом, а састоји се од три дела, две преткоморе и једне коморе. Из коморе крв се пумпа у две аорте, предњу и задњу, а даље преко система артерија и артериола долази до тзв. шупљина, док не стигне до вентралног синуса, где долази до бубрега где се пречишћава, а затим тече до шкрга где узима кисеоник, а затим кроз друге циркулаторне судове тече опет до преткоморе срца (Le Pennec and Grizel, 2003; Gosling, 2004).

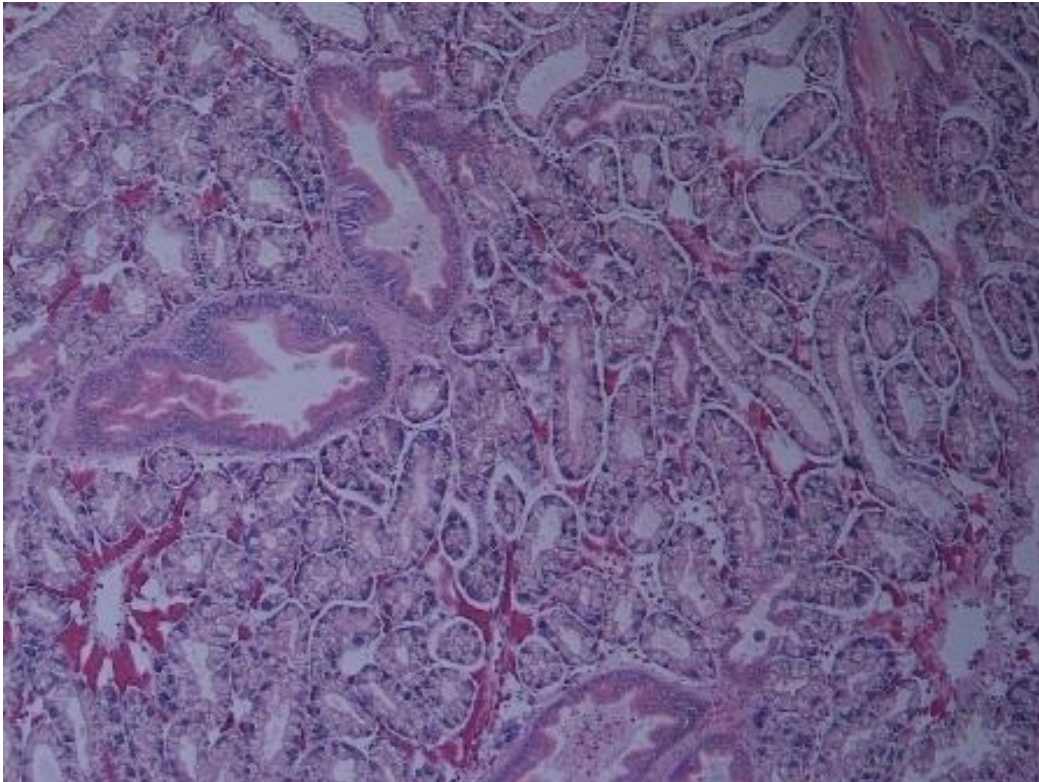
Хемолимфа се састоји од хемоцита и плазме (Gosling, 2004). Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) поседује две врсте хемоцита и то хијалиноците и гранулоците (Carballar et al., 1997). Хијалиноцити су негранулисане ћелије и имају велико једро окружено релативно малом цитоплазмом. Гранулоцити су већи од хијалиноцита и имају мање једро. Постоје три врсте гранулоцита (ацидофилни, базофилни и амфотерни који поседују оба типа гранула) (Carballar et al., 1997). Хемолимфа медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) не поседује пигмент. Хемолимфа има већи број значајних улога, као што су пренос хранљивих

материја, размена гасова, пренос ензима, избацавање штетних и токсичних материја, осморегулација и др. (*Gustafson et al., 2005*).

2.4. Дигестивни систем

Дигестивни систем је у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) добро развијен. На почетку дигестивног система се налазе уста са цилијама (*Gosling, 2004*). Уста се настављају у кратки једњак (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*) директно, пошто не постоји усна дупља. Епител једњака се састоји од ћелија са цилијама и од жлезданих ћелија, испод којих се налази танак слој мишићног и везивног ткива. На апикалном делу једњака жлездане ћелије имају већи број секреторних гранула (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Дигестивни систем је адаптиран тако да процесира само мале честице хране (*Grizel et al., 2003*). Приказ дигестивне жлезде медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) је приказан на слици 6.



Слика 6: Дигестивна жлезда – хистолошки приказ, HE, x400

На једњак се наставља доста велики желуцац. Он је овалног облика и комплетно је усађен у дигестивну жлезду (Gosling, 2004). Сложене је грађе и састоји се из неколико делова. Штит желуца, који чини склеротизована кутикула различите дебљине, прекрива епител. Епител се састоји од ћелија које садрже велики број секреторних гранула и чије се једро налази централно. Основа желуца садржи бројне мишићне фибриле и хемоците. Дорзална капа желуца је торбастог облика и лежи на желудачном штиту. Ћелије са цилијама поседују микровиле, док их нежлездане ћелије немају. Цилијарни тракт заузима велики дио површине желуца. Подељен је у леви и десни тракт, који одговарају левом и десном отвору дуктуса дигестивне жлезде. Оба тракта су ограничена са два гребена, тзв. велика и мала тифлосола. Секреторне и нецилијарне ћелије цилијарног тракта имају цилије и микровиле (Boucaud-Catou and Henry, 2003, Gombač, 2010).

Полишприцасти желуцац има бројне отворе у дигестивном каналу и велико проширење главног цревног тифлосола, као и тзв. цревни жлеб на дну желуца.

Овакав тип желуца је специјализован за тзв. микрофагоцитну филтер исхрану и јавља се у три морфолошка типа. Медитеранска дагња (*Mytilus galloprovincialis*) поседује тип III желуца, који карактерише дуги витки језичак главног тифлосола, који је ограничен са обе стране цревним жлебом. Желудац садржи бројне жлебове, који су формирано од набора желудачног епитела. Уздужни набори имају ћелије прекривене цилијама и садрже бројне инклузије. Испод епитела се налази дебела базална ламина, која се налази изнад густог везива које чини центар набора. Желудачни зид се састоји од везивног ткива и мишићних фибрила (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Иако постоје три врсте слепих црева, она нису увек присутна. То су канална слепа црева (лево и десно) у која се отварају канали дигестивне жлезде, затим сортинг слепо црево, које се може развити лево од желуца и апендикс или мало слепо црево, које може бити смештено антеро или постеродорзално. Велике честице хране које не могу проћи кроз дигестивну жлезду остају у апендиксу (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Желудац се наставља на желудачно црево које чини комплекс средњег црева и кесастог проширења. Епител је у овом делу састављен од високих ћелија које поседују вакуоле и инклузије. Састоји се од несекреторних ћелија са цилијама. Епител прекрива танку базалну ламину, која се опет налази на слоју везивног ткива у којем се налазе и бројни хемоцити и мишићне фибриле (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Средње црево или тзв. пењуће црево је паралелно са кесастим проширењем. Може бити одвојено или повезано са кесастим проширењем када формира тзв. цревни лук и повезан је са кесастим проширењем кроз уски прорез ограничен великим и малим тифлосолом. На средње црево се наставља задње црево, које се наставља у завршно црево или ректум. Ректум пролази изнад задњег мишића адуктора и завршава се анусом на плашној шупљини. Ректум је састављен од фибро-мишићног зида, који је дебљи него у другим деловима дигестивног тракта и који је прекривен епителом састављеним од жлезданих ћелија и ћелија са цилијама (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Дигестивна жлезда у потпуности окружује желудац и део црева. Састављена је од бројних тубула, које прелазе у секундарне каналиће, који опет воде у мрежу примарних канала и који завршавају у желуцу (*Gosling, 2004*).

Дигестивни тубули су састављени од дигестивних ћелија, које су карактеристичне по томе што садрже бројне празне вакуоле у горњем делу и крипте, тамна поља, састављене од секреторних ћелија, ћелија са флагелама и поља матичних ћелија (*Boucaud-Camou and Henry, 2003; Gosling, 2004*). Перитубуларно ткиво (састављено од фиброцита, мишићних фибрила, амебоцита и макрофага) окружује тубуле (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Дигестивни тубули пролазе кроз низ цитолошких промена током процеса варења. Када се животиња не храни, дигестивне ћелије су равне и широког лумена, тзв. тубули типа 1. Ово је тзв. холдинг фаза. Када се животиња храни, ћелије се мењају, постају више и испуњене вакуолама. Тада почиње апсорпција и унутарћелијско варење. Лумен ћелија се сужава и ћелије добијају цилије (тубули типа 2). У завршној фази горњи део дигестивних ћелија расте, проминира у лумен, ослобађајући бројне слободне партикуле које се испуштају у желудац (тубули типа 3). После овог процеса долази фаза регенерације, када се стварају нове дигестивне ћелије (тубули типа 4) (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Шкољке се углавном хране фитопланктоном. Честице хране улазе кроз уста па преко једњака, обавијене слузастим кончићима, ротирањем долазе до желуца. Прву фазу варења чини селекција честица које се сортирају по величини, сварљивости и густини, што се све дешава у желуцу. Ову фазу прати екстрацелуларно варење. Слузасте кончићи бивају подвргнути механичком и хемијском процесу варења. Уз помоћ цилија честице се сортирају по следећем принципу: теже честице се одмах одбацују кроз цревни жлеб до средњег црева; мале и лакше честице се преносе до отвора дигестивних каналића и дигестивне жлезде; а веће и лакше честице се враћају ради даљње поновне разградње (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*).

Мале честице улазе у дигестивну жлезду преко четкица на ивицама каналића који су пуни разних ензима и који апсорбују растворљиве молекуле. Веће честице хране иду директно у дигестивне тубуле. Следећа фаза екстрацелуларног варења се може одвијати унутар лумена тубула због присуства екстрацелуларних ензима. Иако је екстрацелуларно (ванћелијско) варење значајно, главни процес унутарћелијског варења се ипак дешава у дигестивној жлезди (*Boucaud-Camou and Henry, 2003; Gombač, 2010*). После завршеног интрацелуларног варења нутријенти иду из дигестивних ћелија у хемолимфу, амебоците и везивно ткиво. У финалној фази варења дигестивне ћелије пуцају, при чему ослобађају резидуална тела (где се акумулишу несварени остаци) и лизозоме (*Gosling, 2004*). Апсорпција и процес варења се настављају у цревима. Од одбаченог дела из желуца и дигестивне жлезде формира се фецес који путује до ануса и који се преко ексхалационог сифона избацује у море (*Gosling, 2004*).

У жлезданим ћелијама дигестивне жлезде и перигландуларном ткиву се складиште гликоген и липиди (*Boucaud-Camou and Henry, 2003*). Они представљају метаболичке резерве које се троше током гаметогенезе или током стреса (*Gosling, 2004*). Поред гликогена и липида, у дигестивној жлезди се складиште и тешки метали и органски контаминенти. Услед већег накупљања контаминената може доћи до дегенеративних процеса и инфламаторних реакција, до формирања гранулоцитома (*Gosling, 2004*). Дигестивна жлезда медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) и других врста шкољки тако представља значајан биоиндикатор загађења мора (*Regoli and Orlando, 1993*).

2.5. Физиолошки процеси у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*)

2.5.1. Исхрана

Медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) се хране углавном планктонским организмима (фито и зоопланктоном) затим детритусом и остацима насталим распадањем органских материја (Gosling, 2004).

2.5.2. Размножавање

Размножавање медитеранских дагњи (*Mytilus galloprovincialis*), као и у других врста шкољки је вантелесно. Није изражен полни диморфизам. Полна зрелост се стиче већ у првој години живота. У Јадранском мору то је обично од петог до осмог месеца, када достигну дужину 15–35 милиметара (Tušnik, 1985). Спољашњи еколошки фактори значајно утичу на репродуктивни систем медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*), а најзначајнији су температура мора, салинитет, исхрана и осветљеност (Gosling, 2004).

Гаметогенеза се одвија током јесени и зиме, при чему се користе резерве хранљивих материја сакупљене у претходним месецима. Већ касно зими гонадни фоликули су пуни зрелих гамета (Caceres-Martinez and Figueras, 1998). Мрешћење се најчешће дешава током пролећних месеци. Гонаде се брзо обнављају након мрешћења. Нови циклус гаметогенезе обично започиње већ крајем лета (Villalba, 1995).

Женске јединке ослобађају гамете у море, што потиче мушке јединке да ослобађају сперму (Mengoli, 1998), затим у води долази до оплодње. Већ након неколико часова оплођено јајашце добија цилије, а након једног дана прелази у

стадијум трохофоре и почиње да се лучи ларвена љуштура. Ларва (велигер ларва) плута од неколико седмица до неколико месеци по површини мора, а када дође до стварања стопала прихвата се за тврду подлогу. Може полако да се креће, тражећи прикладније место, а након неког времена се стварају бисусне нити (након што достигне величину од око 2 милиметра), којима се јаче прихвата за подлогу (Gosling, 2004).

2.6. Болести медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*)

Узрочници болести у медитеранске дагње су различити: вируси, бактерије, гљивице и разне врсте паразита као што су протозое, хемлинти, рачићи. И болести попут тумора су регистровани у дагњи. Bower and McGladery (2009) наводе следеће болести које погађају светску популацију дагњи:

- вирусу слична болест дагњи,
- мартелиоза дагњи изазвана са *Marteilia refringens*/*M. maurini*,
- болест изазвана са *Steinhausia mytilovum*,
- фототропна ендолитна инвазија љуштуре, болест изазвана црвом *Proctoeces maculatus*,
- турбелариоза шкрга дагњи,
- болест изазвана црвеним црвом (*Mytilicola intestinalis*),
- кокцидиоза бубрега,
- хаплоспоридиоза,
- буцефалоза дагњи,
- болест изазвама црвом *Mytilicola orientalis*,
- болест изазвана рачићем *Pinnotheres maculatus*,
- хемоцитне неоплазме,
- болест изазвана црвом *Mytilicola porrecta*,
- инфекције изазване рикеција-сличним и хламидија-сличним организмима, паразитоза изазвана грегариномама,

- паразитоза изазвана интрацелуларним цилијатама,
- *Sphenophria* – сличне цилијате,
- болест шкрга изазвана са *Ancistrum mytili*,
- гљивичо одлубљивање љуштуре,
- метацеркариозе дагњи,
- инфекције изазване рачићима,
- инфекције изазване хидрама,
- инфекције љуштуре изазване чланковитим црвима,
- инфекције љуштуре изазване сунђерима.

2.7. Болести забележене у Црној Гори

У Црној Гори до сада је одрађен само мали број испитивања везано за болести медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). *Stjepčević & Stjepčević (1974)* проналазе *Mytilicola intestinalis* у водама читавог Бококоторског залива, при чему утврђују корелацију између процента заразе и салинитета воде. Утврђено је и присуство хидре *Mytilhidra polimanti*, при чему се бележе највеће фреквенције овог паразита између октобра и фебруара (*Stjepčević & Stjepčević 1974*). У другом истраживању утврђено је да овај паразит преферира услове сниженог салинитета (*Stjepčević et al., 1976*).

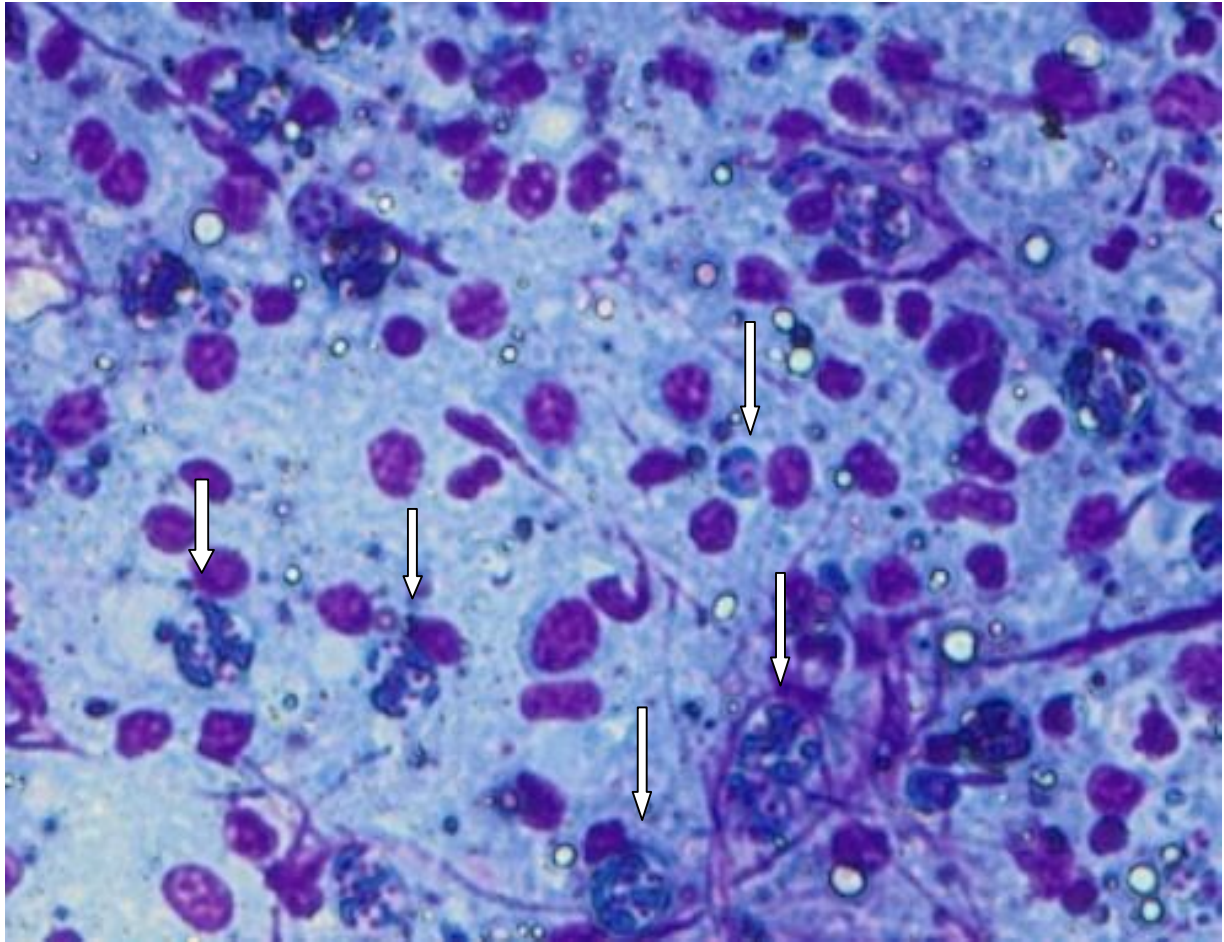
Када је реч о присуству *Marteilia refringens*, у Црној Гори до сада није било истраживања.

2.8. *Marteilia refringens*

Marteilia refringens је протозоални паразит, који припада разделу *Paramyxea* (Desportes and Perkins, 1990; Berthe et al., 2000), а напада дигестивни систем различитих врста шкољки, при чему може да узрокује физиолошке поремећаје и могућу смрт животиње (Alderman, 1979; Grizel et al., 1974). Garcia et al. (2009) наводе присуство овог паразита и у шкргама, плашту и лабијалној пулпи.

Најчешће напада европску остригу (*Ostrea edulus*) (Grizel et al., 1974), плаву дагњу (*Mytilus edulis*) (Le Roux et al., 2001) и медитеранску дагњу (*Mytilus galloprovincialis*) (López-Flores et al., 2004; Novoa et al., 2005; Robledo et al., 1995a; Villalba et al., 1993b). Поред поменутих врста на инфекцију паразитом *Marteilia refringens* осетљиве су и следеће врсте: острига *Ostrea stentina* (Elgharsalli et al., 2012), вонголе бритве *Solen marginatus* (López-Flores et al., 2008a), венера вонголе *Chamelea gallina* (López-Flores et al., 2008b), те црне пигмејске дагње *Xenostrobus securis* (Pascual et al., 2010) и европске срчанке (*Cerastoderma edule*) (Pasqual et al., 2010). Такође и код неких других врсти острига, може доћи до инфекције када се нађу у инфицираном подручју. То су: *Ostrea chilensis*, *Ostrea puelchana*, *Ostrea angasi*, *Ostrea denselamellosa* (Berthe et al., 2004; Martin, 1993), премда то никада није потврђено молекуларним методама.

Поред набројаних врста шкољки постоје докази да и рачић *Paracartia grani* може бити заражен и да би он експериментално могао пренети инфекцију на шкољке (Audemard et al., 2002; Carrasco et al., 2008b).



Слика 7: *Marteilia refringens*, цитолошки приказ (Бојан Аџић), Hemacolor, x400

Први опис паразита из рода *Marteilia* одговара врсти *Marteilia refringens* и повезује се са морталитетом европске остриге у Бретањи, Француска крајем шездесетих и почетком седамдесетих година двадесетог века (Comps, 1970; Herrbach, 1971). Ти повремени морталитети су имали значајан утицај на производњу шкољки, а нарочито острига у Европи, од чега се та производња никада потпуно није опоравила (Carrasco et al., 2015). Управо због свог социоекономског утицаја инфекција паразитом *Marteilia refringens* је стављена на листу OIE (World organization for animal health) као болест која се обавезно пријављује, да би се могла контролисти и спречити њено преношење.

Већ од открића почела су темељна истраживања коришћењем различитих научних приступа, при чему су сакупљени значајни подаци о развоју, еколошкој

динамици и животном циклусу (*Carrasco et al., 2015*). Ипак, ни до данас комплетан животни циклус овог паразита није потпуно разјашњен.

Поред *Marteilia refringens* значајни представници рода *Marteilia*, који изазивају оболења других врста шкољки су и: *Marteilia sydneyi* (*Perkins & Wolf, 1976*), *M. lenghei* (*Comps, 1976*) и *M. christenseni* (*Comps, 1983*). Уз интрацелуларне цилијате, *Marteilia spp.* представља једину описану протозоу која напада дигестивну жлезду дагњи у Европи (*Bower and McGladdery, 2009*)

2.9. *Marteilia refringens* – морфологија и животни циклус

Marteilia refringens припада разделу *Paramyxia* (*Desportes and Perkins, 1990; Berthe et al., 2000*). То су еукариотски микроорганизми код којих спорулација резултира из низа унутрашњих диоба, унутар једне основне амебоидне ћелије, која се опет ствара из спора, у ткивима морских бескичмењака. Карактерише их то што ћелије потомци остају унутар родитељске ћелије (*Desportes and Perkins, 1990*).

Развој *Marteilia refringens* обично почиње од једне основне – примарне ћелије (пречника до 10 μm) у којој се развија осам нових. *Desportes (1981)* претпоставља да први видљиви стадијум у домаћина представља једноједарна основна ћелија, која је слична плазмодијуму, која пролази кроз процес деобе стварајући једну секундарну ћелију у цитоплазматској вакуоли. Постоји супротно мишљење да је због мале величине делова примарне ћелије може недостајати секундарна ћелија (*Perkins, 1988*). Основне ћелије се налазе углавном у епителу желуца домаћина – шкољке. Стварањем секундарне ћелије из основне ћелије повећава се интензитет инфекције (*Berthe et al, 2004*). Ћерка ћелија сада се дели бинарном деобом унутар увећане примарне ћелије. Унутар сваке ћерке ћелије унутрашњом деобом се развија по једна једноједарна ћелија. Тако се од једне развија 8 секундарних ћелија (преспорангија). Ипак, сам процес деобе никада до сада није микроскопски

забележен. У овом стадијуму, када једна примарна ћелија садржи до осам секундарних ћелија, паразит мигрира у дигестивне каналиће. У дигестивним каналићима наставља се сазревање секундарних ћелија унутар примарних ћелија, које сад саме могу садржати до четири споре (*Carrasco et al., 2015*).

Када пропада – дегенерише примарна ћелија, ослобађају се секундарне ћерке ћелије, које тада саме постају основне ћелије. Ове ослобођене спорангије са спорама унутар себе пробијају базалну мембрану тубула дигестивне жлезде. Унутар њих долази до ендоспорулације и у њима се стварају нове секундарне ћелије. Сада свака примарна ћелија (величине до 30 μm) садржи осам примодијалних спорангија (свака око 12 μm у пречнику), које садрже споре. Све секундарне ћелије сазревају у споронт који садржи 2–4 споре (терцијарне ћелије). Зреле споре достижу величину 3,5–4,5 μm и окружене су зидом без оперкулума (*Perkins and Wolf, 1976*). Током сазревања у спорама се појављују светле рефрингентне инклузије. По овим рефрингентним телашцима *Marteilia refringens* је и добила име (*Bower and McGladdery, 2007*).

Величина мартелије може знатно да варира, што настаје као резултат сталног раста цитоплазме примарне ћелије и броја ћерки ћелија (*Berthe et al., 2004*).

На крају се зреле споре ослобађају у лумену дигестивних каналића. Оне се распршују у околини, што све доводи до физиолошких поремећаја у раду дигестивног тракта, његовог нефункционисања, а потенцијално и до саме смрти домаћина (*Robledo and Figueras, 1995; Carrasco et al., 2015*).

2.10. Распрострањеност мартелиозе

Marteilia refringens је утврђена у многим регионима света. У Европи је у дагњи утврђена у већем броју држава. Регистрована је у дагњи у земљама које излазе на Атлански океан, у Француској, Шпанији, Португалији (*Comps et al., 1981; Comps et al., 1982; Auffret and Poder, 1983; Villalba et al., 1993a; Robledo and Figueras, 1995;*

Villalba et al., 1997; Longshaw et al., 2001; Fuentes et al., 2002; Novoa et al., 2005; Bower and McGladdery, 2007). У Јадрану је откривена у Италији (*Ceschia et al., 1992*), Хрватској (*Zrnčić et al., 2001*), Албанији (*Pellumb et al., 2006*) и Словенији (*Gombač, 2010; Gombač et al., 2014*). У Средоземљу је поред тога утврђена у Грчкој (*Virvilis et al., 2003; Virvilis and Angelidis., 2006; Rayyan et al., 2006*), затим у Тунису (*Elgharsalli et al., 2012*). Забележена је у дагњи и у Персијском заливу (*Bower and McGladdery, 2007*). *Marteilia refringens* је нађена у остригама и у другим земљама, као што је нпр. Мексико (*Grijalva-Chon, 2015*).

2.11. Епидемиолошка разматрања

Преваленца мартелиозе медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) узроковане паразитом *Marteilia refringens* је у различитим истраживањима била различита и кретала се од 0,3% па до 70% (*Gombač et al., 2014; Aufret and Poder, 1983*).

У Шпанији, у делти реке Ебро, преваленца је од године до године варирала и то од 1,67% у 2003. години, затим 2,23–12,2% у 2004, а 3,34%–26,67% у 2005. (*Carrasco et al., 2007a*). У Галицији, у Шпанији, где је иначе концентрисано и до 90% шпанског узгоја шкољки, преваленца се кретала између 5,5%–38,5% од 1987–1990: (*Robledo and Figueras, 1995*). У северној Бретањи у Француској је забележена преваленца између 37–70%. (*Auffret and Poder, 1983*). У Италији, на западној обали Јадрана, забележена је преваленца 16,6%–22,2% (*Ceschia, 1992*), док су *Serracca et al. (2014)* четворогодишњим испитивањем (2010–2013) у заливу Ла специја у Лигурском мору, бележили преваленцу од 4,05% при чему је забележен силазни тренд. У Грчкој је утврђена преваленца од 14,6% у заливу Термаикос (*Rayyan et al., 2006*) до 21,25% (*Virvilis et al., 2003*).

И на источној јадранској обали варира преваленца *Marteilia refringens*. У Хрватској се бележи преваленца од 5% дагњи позитивних на *Marteilia refringens* (*Zrnčić et al., 2001*), у Албанији 19,3% (*Pellumb et al., 2006*). У Словенији је забележена најмања преваленца, само 0,3% (*Gombač, 2010*).

Утицај доба године на појаву и преваленцу мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) доста је значајан. Ипак у различитим регионима различито је време појављивања мартелиозе. У Италији је забележена појава ове болести у априлу и између јуна и септембра (*Ceschia, 1992*). У Шпанији је налазе од фебруара до октобра (*Carrasco et al., 2007b*), у Грчкој од маја до новембра (*Photis et al., 1997*), у Хрватској се бележи у августу (*Zrnčić et al., 2001*), а у Словенији у августу и од децембра до фебруара (*Gombač, 2010*), а у Албанији у априлу (*Pellumb et al., 2006*).

Температура морске воде игра значајну улогу у појави мартелиозе у дагњи. Нека истраживања показују да се инфекције паразитом *Marteilia refringens* дешавају када је температура морске воде виша од 17°C (*Carrasco et al., 2008; Audemard et al., 2001*). То је температура која омогућава спорулацију и преношење паразита. Од те граничне температуре се могу јавити инфекције у естуарима и заливима, при чему је преваленца већа ближе површини мора. Пре њих *Grizel (1985)* интерпретира да је за развој мартелије неопходна минимална температура морске воде од 12°C. *Gombač (2010)* пак у Словенији бележи присуство и спорулацију *Marteilia refringens* и на 9°C. *Villalba 1993*, уочава да инфекција у дагњи перзистира током читаве године са највећим процентом током летњих месеци.

Дагње су знатно чешће заражене у близини обале (38,5%), а преваленца опада са удаљеношћу (5,5%), као и са дубином, на два метра дубине (13,3%), односно на пет метара (8,3%) (*Robledo and Figueras, 1995*). *Grizel (1985)* уочава ретко појављивање болести на отвореном мору.

Истраживања су показала да се уношењем здраве дагње у воду, односно узгајалиште инфицирано паразитом *Marteilia refringens*, развија инфекција након четири месеца (*Villalba et al., 1993a*).

На појаву медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) могу утицати и други фактори. *Ceschia (1992)* сматра да и салинитет може утицати на појаву

мартелиозе, тако што повећани салинитет негативно утиче на појаву болести. *Raayan et al. (2006)* истичу да је у загађенијој води појава мартелиозе израженија.

Очекивано, старије јединке чешће буду заражене од млађих (*Fuentes et al., 1998*), што је донекле у корелацији са истраживањем да се инфекција развија након четири месеца кохабитације у инфицираној води.

Такође, утврђена је и разлика у преваленци мартелиозе у односу на начин узгоја дагњи. Тако је утврђена знатно већа преваленца појаве мартелије код тзв. узгоја на столовима (*on-table*), него код узгоја по тзв. *long-line* систему. Истраживачи наводе нижу преваленцу мартелиозе од 11,67% у дагњи гајених по *long-line* систему и знатно већу од 27,78% гајеним на столовима (*Karagiannis et al., 2013*). .

2.12. Начин преношења

Начин преношења мартелиозе још увек није у потпуности разјашњен. Вршена су многа истраживања на ову тему. Истраживање преношења мартелиозе путем кохабитације било је неуспешно (*Comps and Joly, 1980*). Такође ни покушај убризгавањем инфицираног материјала у животињу није довео до развоја инфекције (*Berthe et al., 1998*). Покушавало се и са храњењем шкољки материјалом инфицираним спорама мартелије, али безуспешно, није дошло до развоја инфекције. Тако су сви покушаји хоризонталног преношења мартелиозе остали безуспешни (*Berthe et al., 1998*).

Негативни резултати довели су до размишљања да у преношењу мартелиозе значајну улогу може имати прелазни домаћин. Први покушаји храњењем животиња рачићима *Carcinus maenas*, *Carcinus crangon* и *Marinogammarus marinus* нису били успешни (*Van Banning, 1979*).

Касније су *Audemard et al. (2002)* посумњали у могућност да копепода *Paracartia grani* може имати улогу у преношењу мартелиозе. Ту сумњу поткрепљују чињеницом да се мартелиоза јавља у исто време када се бележи присуство овог

рачића, дакле у пролећним и летњим месецима. *Carrasco et al. (2008)* тврде да се мартелија изолована из дагњи не размножава у копеподама. Ипак нека друга каснија истраживања не потврђују такве закључке (*Boyer et al., 2013*) .

И неке друге врсте копепода, као што су *Acartia (Paracartia) latisedosa*, *Oithona spp.*, могући су преносиоци, чак и вероватнији прелазни домаћин паразита *Marteilia refringens* него *Paracartia grani*, пошто је молекуларним методама мартелија доказана у овим организмима (*Carrasco et al., 2008*). У делти реке Ебро ланчаном реакцијом полимеразе нађено је да шест зоопланктонских врста позитивних на *Marteilia refringens*. То су *Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica*, *Euterpina acutifrons*, *Oithona sp.* и вероватно ларвени стадијум рачића *Portumnus sp.* (*Carrasco et al., 2007b*). *Carrasco et al. (2007a)* претпоставља да и неке друге врсте, као што су: *Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica* и *Portumnus spp.* могу бити преносиоци, односно прелазни домаћини паразита *Marteilia refringens*.

Boyer et al. (2013) радећи истраживања на дагњама и копеподи *Paracartia grani*, подржава тезу да се мартелиоза преноси са ове копеподе на медитеранску дагњу (*Mytilus galloprovincialis*) и обрнуто. Паразит је нађен у дигестивном тракту, гонадама, као и јајима ове копеподе, па се претпоставља да *Marteilia refringens* преживљава зиму управо у јајима ове копеподе. Такође, претпоставља се да сви ступњи у развоју овог организма могу учествовати у преношењу мартелије (*Boyer et al., 2013*). *Arzul et al. (2013)* тврде да је више зоопланктонских врста, укључујући копеподне врсте из родова *Cladocera*, *Appendicularia*, *Chaetognatha* и *Polychaeta*, било позитивно на присуство паразита *Marteilia refringens*, иако је само *Paracartia latisedosa* била позитивна и методом хибридизације *in situ*. Паразитске ћелије су пронађене у ткиву гонада женских јединки ове копеподе и то је био први установљени случај да је још нека врста, осим *Paracartia grani*, заражена овим паразитом.

2.13. Генетска разматрања

У погледу врста која инфицирају различите врсте шкољки (остриге и дагње), постојали су различити погледи. Још 1982. године *Comps et al.* су тврдили да медитеранску дагњу (*Mytilus galloprovincialis*) инфицира друга врста у односу на *Marteilia refringens* која инфицира остриге. Названа је *Marteilia maurini*.

Berthe et al. (2000) испитују секенцу 18S rRNK и не утврђују разлике између ове две врсте. Такође, каснијим истраживањима ултраструктуре мартелија изолованих из острига и дагњи закључено је да нема разлика међу њима (*Longshaw et al.*, 2001). Они тврде да је *Marteilia maurini* само синоним за *Marteilia refringens*. *Lopez-Flores et al.* (2004) и *Novoa et al.* (2005) тврде да су то два различита генотипа исте врсте. *Le Roux et al.* (2001), такође тврде да је то једна врста са два различита генотипа, генотипом О, који углавном погађа остриге и генотипом М који инфицира дагње. Ипак каснија истраживања то демантују, тврде да специфичност по врсти коју инфицира није стриктна, па тако тип М може инфицирати остриге заједно са типом О, а тип О се може наћи и у дагњама (*Lopez-Flores et al.*, 2004; *Novoa et al.*, 2005; *Balseiro et al.*, 2007). Такође може доћи и до коинфекције са оба типа. Ипак, већа је вероватноћа да генотип који је преодоминантан у неком подручју инфицира и дагње и остриге (*Carrasco et al.*, 2007b). Типови М и О су детектовани и у других врста, тако је тип О детектован у *Cerastoderma gallina*, а тип М у *Solen marginatus* (*Lopez-Flores et al.*, 2008a, 2008b) и *Xenostrobus securis* у Галицији, Шпанија (*Pasqual et al.*, 2010).

Касније је откривен и трећи генотип, тип Ц, који је узроковао морталитет код срчанке *Cerastoderma edule*, на медитеранској обали Шпаније (*Carrasco et al.*, 2012). *Arzul et al.*, 2013, у свом истраживању у дагњама налазе типове О и М, а у зоопланктону типове М и Ц.

2.14. Патогеност *Marteilia refringens*

Marteilia refringens је изазивач озбиљног обољења различитих врста шкољки. Највише штете наноси европској остриги (*Ostrea edulis*), нарочито у Француској где је производња ове врсте шкољки током шездесетих и седамдесетих година двадесетог века десеткована (Grizel, 1985), а код којих се мартелиоза назива и Аберова болест (Renault, 1996). Значајне штете може нанети и медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*), нарочито у случају тежих инфекција (Camacho et al., 1997).

Marteilia refringens значајно смањује апсорпцију органских материја током тежих инфекција, односно ако се инфекција прошири целим дигестивним трактом дагње. Такође, теже инфекције узрокују значајно смањење кондиције дагњи, што настаје као последица смањеног добијања енергије (Camacho et al., 1997). *Marteilia refringens* показује изразити тропизам према дигестивној жлезди домаћина (Pekala and Pazdzior, 2012). Код дагњи овај паразит узрокује хемокитне инфилтрације везивно ткива дигестивне жлезде, као и епителних ћелија желуца. Ова реакција повремено може резултирати фокалној, масовној концентрацији хемокита (гранулоцитоме), што доводи до деструкције и паразита и ткива домаћина (Villalba et al, 1997). Carballar et al 1998, тврде да значајан раст хемокита у циркулацији може успорити или чак зауставити инфекцију. Теже инфекције могу довести до значајне деструкције дигестивне жлезде (Figueras et al., 1991; Robledo and Figueras, 1995). У случајевима тежих инфестација споре могу напунити лумен желуца и црева. И сама физичка присутност паразита може ометати исхрану и апсорпцију нутријената код дагњи (Villalba et al., 1993b)

Такође, теже инфекције могу довести до недовољне развијености гонада, што настаје услед смањене апсорпције нутријената (Villalba et al, 1993b, 1997, Fuentes et al, 1995, Rayyan et al, 2006).

Присуство мартелије може инхибирати развој ћелија које служе за складиштење масти у плашту дагњи (Villalba et al, 1993a)

Villalba et al. (1993b) наводе да је *Marteilia refringens* потенцијално леталан патоген. Иако се код острига сматра значајним узрочником морталитета, популација дагњи из различитих региона показује различиту осетљивост на мартелију, зависно од њених генетских карактеристика (*Fuentes et al, 2002, Carella et al, 2010*). Забележена су значајна угинућа медитеранске дагње у Шпанији, при чему је утврђено да морталитет расте са интензитетом инфекције (*Villalba et al., 1993a*). *Robledo and Figueras (1995)* представљају резултате према којима кумулативни морталитет настао услед инфекције изазване паразитом *Marteilia refringens* у медитеранске дагње може ићи до 29,6%. *Gombač (2010)* пак, осим спорадичних поремећаја у епителним ћелијама дигестивних тубула и спорадичне фокалне деструкције дигестивних тубула, не бележи значајније хистолошке и морфолошке промене.

Код здравих јединки дагњи, које су унесене у инфицирано подручје, бележи се морталитет чак и од 100% након шест месеци култивације (*Thébault et al., 1999*).

2.15. Дијагностика мартелиозе

Дијагностика мартелиозе изазване паразитом *Marteilia refringens* врши се различитим методама. За дијагностику се користе цитолошке и хистолошке претраге, електронска микроскопија, ланчана реакција полимеразе, хибридизација *in situ*, имунолошке методе и секвенцирање (www.eurl-mollusc.eu) .

Европска референтна лабораторија за болести шкољки из Ла Тремблада, Француска препоручује као методе за скрининг цитолошке и хистолошке претраге и ланчану реакцију полимеразе, а као потврдне методе ланчану реакцију полимеразе са RFLP, хибридизацију *in situ* и секвенцирање. *OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012*, препоручује хистолошке, цитолошке технике и ланчану реакцију полимеразе као методе у случају надзора и

претпоставке, а конфирматорно предлажу ланчану реакцију полимеразе и секвенцирање.

Клинички се може приметити отварање и споро затварање љуштуре у болесних животиња. Патоанатомски се код дагњи примећује смањен раст и недовољна развијеност гонада (*Villalba et al., 1993a*).

Од цитолошких техника значајни су отисак препарати. Узорци дигестивне жлезде се ваде, суше на папиру, а затим се на микроскопску плочицу благо притисну неколико пута, након чега се боје коришћењем китова који служе за бојење крвних размаза (*OIE Manual for Aquatic Animals, 2012*).

Хистолошки, ткиво које мора укључивати и дигестивну жлезду се фиксира одговарајућим фиксативом (Davidson, Carson, десетопостотни раствор формалина), затим се парафинизује, реже, боји хематоксилином и еозином и посматра под светлосним микроскопом. Хистолошки се могу видети различити стадијуми паразита, али се *Marteilia refringens* не може диференцирати од других врста рода *Marteilia* (*Berthe et al., 2004; Bower and McGladdery, 2007*).

Имунолошки огледи нису много заступљени у дијагностици. *Tiscar et al. (1993)* је направио поликлонска антитела на *Marteilia spp.* из медитеранске дагње која се директно бојењем имунопероксидазом маркирају. Коришћење моноклонских антитела даје различите резултате у различитим имунолошким методама, при чему нешто боље резултате дају технике индиректне имунофлуоресценције и ELISA (*Pernas et al., 2000*).

Постоји више објављених PCR протокола за дијагностику *Marteilia refringens* (*Berthe et al., 2000; Le Roux et al., 1999; 2001; López-Flores et al., 2004*). PCR прајмери који циљају ITS1 регион (*Le Roux et al., 2001*) су препоручени од OIE јер амплификују само *Marteilia refringens*. Постоје и прајмери који циљају малу субјединицу SSU рибозомалне RNK, али дозвољавају амплификацију и *Marteilia refringens* и *Marteilia sydneyi* (*Grizel et al., 1974; Le Roux et al., 1999*). Такође, развијен је тзв. nested PCR, који таргетира rDNK интергени простор. Међутим, овом методом се могу пропустити слабије инфекције, а увек је обавезно

коришћење позитивне и негативне контроле (*Le Roux et al., 1999*). RFLP (restricted fragment length polymorphism), који се примењује на PCR производ добијен коришћењем ITS1 регион прајмера омогућује разликовање M и O генотипа *Marteilia refringens* (*Le Roux et al., 2001*).

Хибридизација *in situ* (ISH) је једна од потврдних метода доказивања. Протокол се базира на коришћењу Smart2 пробе од 266 базних парова обележених дигоксигенином, која циља SSU rDNA (*Le Roux et al. 1999*). Smart2 проба омогућава разликовање врста унутар рода *Marteilia* (*Kleeman et al., 2002*), али се препоручује комбиновање са класичним хистолошким методама.

Електронска микроскопија се препоручује за разликовање врста *Marteilia refringens* и *Marteilia sydneyi* (*OIE Manual for Aquatic Animals, 2012*). Није рутинска метода, а препоручује се и када се први пут описује паразит у новом домаћину (www.eurl-mollusc.eu).

Секвенцирање је метода која се користи за коначну потврду позитивног резултата. Циљају се региони SSU rDNK и ITS1. Добијене секвенце се могу поредити са доступним секвенцама из банке гена (Gen Bank) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.16. Контрола и превенција мартелиозе у медитеранске дагње

OIE Manual for Aquatic Animals (2012) не препоручује вакцинацију нити лечење у случају појаве мателиозе у дагњи. Не препоручује се ни сузбијање болести због могућег остатка паразита у дивљој популацији. Дагње не треба пребацити из региона где постоји инфекција паразитом *Marteilia refringens* у регије где није забележена појава болести. Такође их не треба пребацити из региона где је

појава мартелиозе забележена у остригама (*Bower and McGladdery, 2007*). *Fuentes et al. (1995)* тврде да узгој дагњи што даље од обале знатно умањује појаву мартелиозе. *Robledo et al. (1994b)* предлажу сакупљање млађи из области слободних од мартелиозе, док *Karagiannis and Angelidis (2007)* налазе да се узгојем методом бова и конопаца (*long-line*), знатно смањује преваленца болести у односу на методу узгоја на столовима у мрежама.

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА И НАУЧНА ХИПОТЕЗА

Имајући у виду литературне податке, као и сопствена запажања, у овом истраживању постављени су следећи циљеви:

- утврђивање појаве и учесталости паразита *Marteilia refringens* у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) у Бокоторском заливу, праћењем на месечном нивоу током године,
- утврђивање утицаја евентуалне појаве протозое *Marteilia refringens* на кондициони индекс медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*),
- одређивавање типа *Marteilia refringens* и утврђивање филогенетске сродности са до сада детектованим типовима у региону,
- утврђивање међузависности појаве овог паразита и еколошких фактора, као што су температура морске воде, салинитет, засићеност кисеоником, рН вредност и др., као и разјашњавање да ли присуство бактерија *Escherichia coli* и стрептокока фекалног порекла у морској води на узгајалиштима има утицај на појаву паразита у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*).

На основу досадашњих истраживања, која су објављена из области мартелиозе дагњи постављена је научна хипотеза, да ћемо доказати присуство *Marteilia refringens*, и њен утицај на кондициони индекс медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) која се гаји у водама Црногорског приморја, као и да на њену појаву могу утицати неки од испитиваних еколошких фактора.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

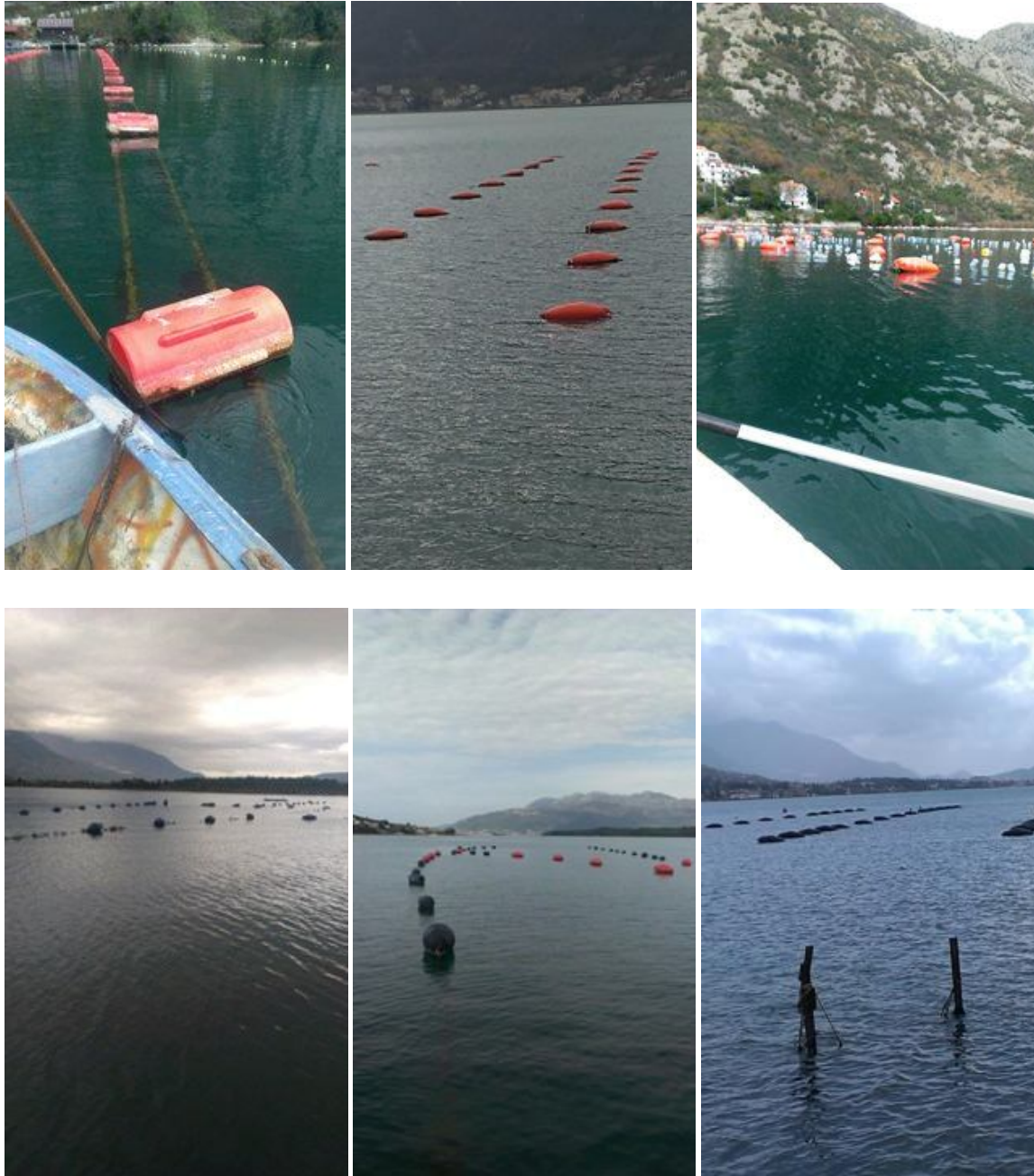
4.1. Опис и преглед локалитета

Испитивање праћења присуства паразита *Marteilia refringens* у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) вршено је на шест различитих локалитета на подручју Бококоторског залива. То су: Ораховац, Брбат, Липци, Кукуљина, Солила (тиватска) и Света Неђеља. Свих шест локалитета се налазе у акваторијуму Бококоторског залива.

Локалитет Ораховац се налази на североисточном делу Бококоторског залива, тачније Которског залива; локалитет Брбат нешто западније од Ораховца, такође у Которском заливу; локалитет Липци се налази у северном делу залива, тачније на западној страни Рисанског залива; док се локалитет Кукуљина налази у Тиватском заливу са источне стране залива у близини тиватског аеродрома. Локалитет Солила се налази јужније од Кукуљине, где Тиватски залив најдубље улази у копно. Локалитет Света Неђеља се налази са супротне, западне стране Бококоторског, односно Тиватског залива, у близини насеља Бијела. Географски смештај узгајалишта приказан је у табели 1.

Табела 1: Географске координате фарми шкољки (*Mandić et al, 2012*).

Редни број	Локалитет	Северна географска ширина	Источна географска дужина
1	Ораховац	42° 29' 20"	18° 45' 51"
2	Брбат	42° 29' 09"	18° 44' 37"
3	Липци	42 °29' 36"	18° 39' 06"
4	Кукуљина	42° 24' 48"	18° 42' 03"
5	Солила	42° 24 ' 17"	18° 42' 23"
6	Света Неђеља	42° 27' 33"	18 °40' 21"



Слике 8–13: Локалитети/узгајалишта Ораховац, Брбат, Липци, Кукуљина, Солила и Света Неђеља

На свим локалитетима врши се узгој шкољки помоћу бова и конопаца (тзв. *long-line* систем). На локалитету Ораховац се налазе три узгајалишта смештена једно близу другог.

Локалитети су различито удаљени од обале. Удаљеност локалитета, односно узгајалишта Ораховац је најмања од обале и износи просечно 40 метара, а удаљеност узгајалишта Липци од обале износи 50 метара. Просечна удаљеност узгајалишта Света Неђеља и Брбат износе 60 метара, а узгајалишта Кукуљина 80 метара. Најудаљенија од обале су Солила, чак 270 метара далеко од обале.

Капацитети узгајалишта варирају и крећу се од око 8 тона на локалитету Липци, па до приближно 90 тона на локалитету Брбат. Ипак стварна производња је значајно мања. Током претходног периода нису пријављивани значајнији морталитети дагњи, с тим што је главни производни проблем представљао предатор, риба орада (*Sparus aurata*). Дагње са испитиваних узгајалишта се углавном пласирају на црногорско тржиште, нарочито током летње сезоне, док се један део извози у земље региона.

4.2. Методологија испитивања физичко-хемијских параметара морске воде

Узорци морске воде за одређивање физичко-хемијских параметара воде са узгајалишта шкољки, узорковани су сваког месеца. Узимање узорака воде за хидрографска испитивања вршено је помоћу Нискиновог црпца на дубини од 0,5метара. За ту намену вршено је узорковање по 5l морске воде са сваког узгајалишта/локалитета. Одмах након узорковања измерене су вредности неких од основних физичко-хемијских параметара, док су остали параметри одређивани у Лабораторији за хемију, биохемију и молекуларна истраживања, Института за биологију мора из Котора.

Вредност основних физичко-хемијских параметара одређивани су аутоматским сондама MultiLine 4, WTW. Сва испитивања физичко-хемијских параметара морске воде (концентрација кисеоника, салинитет, нитрати) извршене су у лабораторијама Института за биологију мора из Котора.

4.3. Методологија испитивања квалитета морске воде

4.3.1. Идентификација *E. coli* (MPN), ISO-9308-1:2000

Узорци морске воде за одређивање микробиолошких параметара воде са узгајалишта шкољки узорковани су сваког месеца у количини од 500 ml. За идентификацију *E. coli* и одређивање највероватнијег броја (MPN) користили смо методу у складу са ISO-9308-1:2000.

Поступак којим су вршена истраживања:

Филтрирати 100 узорака који ће се испитивати помоћу мембранског филтера. Поставити филтер на одговарајући медијум са агаром, тако да не остане заробљен ваздух испод филтера.

Након филтрације поставити мембрану на лактозни ТТЦ агар и инкубирати на $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (21 ± 3) h.

Прегледати мембране и сматрати све карактеристичне колоније, независно од њихове величине, које доводе до настанка жуте боје у медијуму испод мембране лактоза позитивним бактеријама. За оксидаза и индол тестове, издвојити по могућности све, или репрезентативан број (најмање десет) пораслих карактеристичних колонија и засијати на неселективни агар (триптон соја агар-ТСА) и у триптофан бујон. Инкубирати неселективни агар на $36 \pm 2^\circ\text{C}$, 21 ± 2 сата и извести оксидаза тест. Сматрати појаву тамно плаве/љубичасте боје у оквиру 30 секунди позитивном реакцијом.

Инкубирати епрувету са Л-триптофан бујоном на $44,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (21 ± 3) х и испитати стварање индола додавањем 0,2 мл до 0,3 мл Ковачевог реагенса. Стварање трешња црвене боје на површини бујона потврђује стварање индола.

Све колоније које дају негативну оксидаза реакцију сматрати колиформним бактеријама. Све колоније које дају негативну оксидаза и позитивну индол реакцију сматрати *E. coli*.

Помоћу броја карактеристичних колонија избројаних на мембрани и узимајући у обзир резултате потврдног теста, израчунати бројност *E.coli*, колиформних бактерија.

4.3.2. Идентификација и одређивање броја фекалних стрептокока

За идентификацију стрептокока фекалног порекла и одређивање највероватнијег могућег броја (*MPN*) користили смо методу у складу са ISO-7899-2:2000.

Поступак

Филтрирати запремину воде од 100 мл

Поставити мембран филтер на Сланец и Бартли медијум.

Инкубирати медијум на $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $44\text{ h} \pm 4$.

Након инкубације све колоније са црвеном, браон (кестењастом) или розе бојом само у центру колоније, или по читавој површини, сматрати типичним.

Уколико постоје типичне колоније, стерилним маказама, без окретања, пренијети мембрану са колонијама на жучни-ескулин-азид агар, који је претходно загријан на $44\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Инкубирати на $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 2 h.

Очитати резултате одмах након тога.

Сматрати да све типичне колоније које дају мрку до црну боју медијуму који их окружује дају позитивну реакцију и треба их сматрати фекалним стрептококама.

4.4. Сакупљање узорака

Узорци су сакупљани сваког месеца, од септембра 2014. године до августа 2015. године. Сакупљање је вршено у исто време када су узимани узорци морске воде за анализе. Током истраживања је укупно сакупљено 960 дагњи. Месечно је сакупљано по 80 дагњи са 6 различитих локалитета. Са локалитета Брбат је сакупљано по 30 дагњи (због величине узгајалишта), а са осталих локалитета по 10.

Шкољке су вађене директно са перголара (слика 14) са просечне дубине око 2,5 метара. (настојали смо да узмемо узорке и са веће и мање дубине). Транспортовани су у ручном фрижидеру на температури од 4°C (слике 15) од места узорковања до Специјалистичке ветеринарске лабораторије у Подгорици у најкраћем временском интервалу. Дагње су у лабораторију допремљене живе. Шкољке су прво очишћене од нечистоћа, а затим опране у хладној води. Прањем су уклоњене и ситније нечистоће, песак и сл. Затим је са шкољки оцеђен вишак течности, а потом су биле остављене краће време на собној температури да се осуше.



Слика 14: Вађење перголара



Слика 15: Стављање узорка у фрижидер

4.5. Мерење узорака

Пре отварања прегледана је љуштура, да евентуално на њој нема неких ломова или деформитета. После прања, цеђења од вишка течности и сушења вршено је отварање дагњи специјалним тупим ножем. Дагње су тада мерене на техничкој ваги марке АСОМ JW-1, тачности 0,01 грам. Мерење је вршено два пута, први пут је мерена маса целе шкољке, тј. укупна маса шкољке, а након одстрањивања унутрашњости шкољке, мерена је само маса љуштуре, да бисмо одузимањем друге од прве вредности добили масу меса шкољке. Индекс кондиције је израчунаван по следећој формули:

$$IC = M_m / M_t \times 100$$

Где је IC индекс кондиције, M_m – маса меса, M_t – укупна маса шкољке.



Слика 16: Мерење шкољки

По отварању, а пре одстрањивања унутрашњости, шкољке су макроскопски испитане, на могуће присуство, неких патоанатомских абнормалности или голим оком видљивих паразита.

4.6. Узимање узорака за цитолошке анализе

Након одстрањивања унутрашњих органа из љуштуре вршено је одвајање органа за даље прегледе. Део дигестивне жлезде и шкрга је одвајан за цитолошка и молекуларна испитивања, а остатак висцералне масе, укључујући дигестивну жлезду, шкрге, плашт и гонаде, одрезан на отприлике 5 милиметара дебљине одвајан је и стављан у пластичне корпице за хистолошка истраживања.

Од дела узетог за цитолошка и молекуларна испитивања пинцетом је одвајан комадић дигестивне жлезде, пажљиво, водећи рачуна да се не уништи остатак дигестивне жлезде. Комадић није био већи од милиметра у пречнику. Комадић је затим добро осушен на абсорбентном папиру, а затим је благим притиском на унапред означено микроскопско стакло урађен отисак препарат. На једном

микроскопском стаклу од једне дигестивне жлезде је одрађено између шест и осам отисак препарата.



Слика 17: Узимање отисак препарата

Након сушења, препарат је фиксиран у метил-алкохолу минут, а потом бојен комерцијалним китом за бојење Hemacolor. Након фиксације у метил-алкохолу, микроскопске плочице су стављане минут у *Hemacolor.2*, а затим један минут у *Hemacolor.3*. Након бојења препарати су остављени да се осуше, а затим покривени са покровним стаклом.

Посматрање је вршено на микроскопу *Olympus BX53*, прво под увећањима $\times 200$ и $\times 400$, а по потреби и под имерзионим увећањем $\times 1000$. Како је микроскоп повезан софтверским програмом са рачунаром, посматрање се могло пратити и на монитору рачунара.

4.7. Морфометријске карактеристике

За мерење *Marteilia refringens* коришћен је рачунарски програм *Cell Sens Standard*. Мерена је дужина пречника 100 насумично изабраних *Marteilia refringens* и

узрaчунaтa прoсeчнa дужинa и пoвршинa. Oсим тoгa мeрeнe су и вeличинe спoрa пaрaзитa *Marteilia refringens*.

4.8. Дeтeкцијa *Marteiliae refringens* пoмoћу лaнчaнe рeaкцијe пoлимeрaзe и RFLP

4.8.1. Екстрaкцијa ДНК

Прe лaнчaнe рeaкцијe пoлимeрaзe, кao прeдрaдњу смo извршили екстрaкцију нуклeинскe кисeлинe. ДНК пaрaзитa *Marteilia refringes* је екстрaхoвaн из узoрaкa дигeстивнe жлeздe мeдитeрaнскe дaгњe (*Mytilus galloprovincialis*) кoришћeњeм китa зa екстрaкцију ДНК, *QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)* пoмoћу слeдeћeг прoтoкoлa:



Сликa 18: Узимaњe узoрaкa зa мoлeкулaрнa испитивaњa

- Изрeзaти кoмaдић ткивa дигeстивнe жлeздe oд 25 милигрaмa у мaњe кoмaдићe, стaвити у 1,5 милилитaрску микрoтубу и прeлити сa 180 μ l *Buffer ATL*.

- Додати 20 μl *Proteinase K*, вортексовати и ставити у суво купапатило на 56°C преко ноћи док се ткиво не лизира. У међувремену повремено вортексовати, а након тога кратко центрифугирати да се спусте капљице са зинова микротубе.
- Додати 200 μl *Buffer AL* у узорак, вортексовати 15 секунди, а затим инкубирати 10 минута на 70°C. Након тога кратко центрифугирати микротубе да се спусте капљице.
- Додати 200 μl 100% етанола, а затим вортексовати и кратко центрифугирати да се спусте капљице.
- Пажљиво апликовати смешу у *QIAamp Spin Column* (у микротубу од 2 милилитра) без квашења ивица поклопца, Затворити и центрифугирати на 10.000 rpm, а затим пребацити *QIAamp Spin Column* у другу микротубу, а филтрат са претходном микротубом бацити.
- Пажљиво отворити *QIAamp Spin Column* и додати 500 μl *Buffer AW1* без квашења ивица. Затворити и центрифугирати на 10.000 rpm минут, а затим пребацити *QIAamp Spin Column* у другу микротубу, а филтрат са претходном микротубом бацити.
- Пажљиво отворити *QIAamp Spin Column* и додати 500 μl *Buffer AW2* без квашења ивица. Затворити и центрифугирати на 14.000 rpm, три минута.
- Пажљиво пребацити *QIAamp Spin Column* у другу микротубу, а бацити претходну микротубу са филтратом. Центрифугирати на 14.000 rpm један минут.
- Пребацити *QIAamp Spin Column* у једноипомилилитарску микротубу, а претходну бацити. Пажљиво отворити *QIAamp Spin Column* и додати 50 μl дестиловане воде. Инкубирати на собној температури један минут, а затим центрифугирати на 10.000rpm један минут.
- Припремити разређења добијеног узорка да има финалну концентрацију од 100 ng/ μl .
- Добијену ДНК чувати на 4°C до постављања ланчане реакције полимеразе.

4.8.2. Ланчана реакција полимеразе – PCR

По завршеној екстракцији приступило се припреми PCR микса.

Реагенси:

- 10 X Buffer
- MgCl₂, 50 mM
- *Platinum Taq DNA Polymerase (Goldstar, Eurogentec) 5 U/μl*
- dNTP Mix 20 mM, разређен на 2 mM прије употребе (*Goldstar, Eurogentec*)
- H₂O (слободна од ДНК)

Прајмери

M2A 5'- CCG CAC ACG TTC TTC ACT CC - 3'

M3AS 5'- CTC GCG AGT TTC GAC AGA CG - 3'

4.8.3. PCR микс

Табела 2: Припрема мастер микса за детекцију *M. refringens*

	Zapremina po mikrotubi	Finalna koncentracija
Buffer 10x	5 μl	1x
MgCl ₂ (25 mM)	5 μl	2,5mM
dNTP (2mM)	5 μl	0,2mM
M2A (100μM)	0,5 μl	1 μM
M3AS(100μM)	0,5 μl	1 μM
Taq polymérase (5U/μl)	0,5 μl	2,5U
dH ₂ O	32,5 μl	

49 μl добијеног PCR микса се улије у сваку PCR микроубу (200 μl)
1 μl екстраховане ДНК (100 ng/μl) по микроуби

Коришћене су и негативна и позитивна контрола. Негативну контролу је чинила дестилована вода, а позитивну 1 µl ДНК *Marteilia refringens*, добијен од Европске референтне лабораторије за болести шкољки из Ла Тремблада, Француска

4.8.4. Амплификација

Амплификација је вршена у термосајклеру ТС 400 на следећи начин:

- Иницијална денатурација 10 минута на 94°C
- Амплификација: 30 циклуса (1мин. 94°C, 1мин. 55°C, 1мин.72°C)
- Финална елонгација 10 минута на 72°C

4.8.5. Интерпретација резултата

Интерпретација је вршена на 1% агарозном гелу, након електрофорезе. Позитиван резултат представља ампликон приближне величине од 412 базних парова, са негативним резултатом код негативних контрола, а позитивним код позитивних контрола.

4.8.6. Електрофореза

Реагенси

- 10x TAE, *Gibco*
- *Sybr Safe*
- Агароза гел (1% за ланчану реакцију полимеразе)
- Loading blue dye - Blue Juice, *Invitrogen*

- DNA Ladder, 100bp, *Invitrogen*

4.8.7. Припрема агароза гела

1,5 gr агарозе и 150 ml 1X TAE се одмери у ерленмајерицу и промеша, а затим греје до кључања.

Након што се течност охлади на шездесетак степени дода се 15µl *Syber Safe*, а затим благо промеша кружним покретима.

Раствор се сипа у посуду за електрофорезу са чешљевима.

Када се гел полимеризује, чешљеви се изваде, а успе се 1xTAE да прекрије гел.

У прву рупу се апликује 3 µl DNA Ladder, 100bp.

10 µl PCR производа производа се помеша са 2 µl Blue Juice.

Посуда се прекрије и пусти напон од 100 V током 70 минута.

Резултати се читавају коришћењем система за визуелизацију *Euro-Lone*.

Гел се посматра под UV светлошћу трансилуминатора.

Документује се коришћењем фото-апарата *Cannon*.

4.8.8. RFLP (Полиморфизам дужине рестрикцијских фрагмената)

- Buffer 10x
- H₂O (DNA free)
- HhaI (10 U/µl)

- Говеђи серум албумин

Метод RFLP смо користили да бисмо утврдили којем типу *M. refringens* припадају детектоване мартелије. PCR производи (по један позитивни са сваког локалитета где су детектовани) су подвргнути RFLP анализи коришћењем HhaI (Promega, USA), према упутствима препорученим од IFREMER, Француска, Европске референтне лабораторије за болести шкољки. Укратко, реакциона смеша (20 µl се састојала од 10 µl PCR ампликона, 1 µl рестрикционе ендонуклеазе HhaI (10 U/µl), 2 µl рестрикционог Buffer C, 0,2 µl BSA (говеђи серум албумин) и стерилне дестиловане воде до финалне запремине. Рестрикциона смеша је инкубирана сат на 37°C и 15 минута на на 65°C за деактивацију ензима. Након рестрикције узорци су анализирани коришћењем QIAxcel система за електрофорезу,

4.8.9. Интерпретација

M2A, M3AS PCR производи су дигестирани различито према типу *Marteilia refringens*. Очекивани рестрикциони профили су били:

M. refringens тип M: 157 bp + 156 bp + 68 bp + 31 bp;

M. refringens тип O: 226 bp + 156 bp + 31 bp.

4.8.10. Пречишћавање из гела

Након завршене и очитане електрофорезе приступило се сечењу добијених бендова скалпелом. Бендови су стављени у микротубе од 1,5 ml, након чега се приступило њиховој пурификацији. За пурификацију је коришћен кит за екстракцију из гела по следећем протоколу:

- измерена је маса гела, па затим додат трострука запремина Buffera QG,
- инкубирати на 50°C десет минута повремено вортексујући,
- након комплетног растварања проверити боју раствореног гела (жута),
- додати у микротубу исту запремину изопропанола,
- све преапликовати у *QIAquick* колоне, а потом све центрифугирати минут на 10.000 грм,
- одбацити филтрат, а *QIAquick* колону потом вратити у исту тубицу
- додати 0,5 ml Buffera QG, а потом центрифугирати у центрифуги минут на 10.000 грм,
- за испирање додати 0,75 ml Buffera PE у *QIAquick* колону потом центрифугирати минут на 10.000грм,
- одбацити филтрат, а затим вратити *QIAquick* колону у исту тубицу и
- центрифугирати на 13.000 грм додатно 1 минут,
- пребацити *QIAquick* колону у чисти 1,5ml микротубу,
- додати 50 µl Buffera EB у центар *QIAquick* мембране и центрифугирати 1 минут на максималној брзини.

4.8.11. Секвенцирање

За коначну потврду резултата рестрикционих анализа, PCR ампликони *Marteilia refringens* су секвенцирани у оба смера (SEQme, <https://www.seqme.eu/en/>) употребом Pr4 и Pr5 прајмера. Добијене форвардне и реверзне фрагмент секвенце су обрађене коришћењем SeqManII v5.05 program (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

Добијене секвенце су поређене са секвенцама добијеним из Банке гена (*GenBank*) коришћењем Blast алгоритма (*Altschul et al. 1997*).

Неколико ITS -1 секвенци *Marteilia refringens* је даунлодовано са GenBank и коришћено за филогенетске анализе заједно са секвенцама добијеним из нашег истраживања. Уравнање секвенци је рађено коришћењем ClustalX v.2 (*Larkin et al., 2007, Le Roux et al., 2001*)

4.9. Патохистолошка испитивања

Након што су стављани у специјалне обележене корпице за хистологију, узорци су стављани у 10% раствор формалина, где су остали 18–24 часа. Након тога сви узорци бивају парафинизовани и укалупљени. Припрема узорака за патохистолошки преглед приказана је на слици 19.



Слика 19: Припрема узорка за патохистолошка испитивања

Узорци који су били позитивни или сумњиви на цитолошком испитивању и анализом и методом PCR су микротомом исечени на исечке дебљине неколико μm , а затим бојени стандардним бојењем хематоксилином и еозином.

Узорци су посматрани под увећачањем x200 и x400 микроскопа Olympus. Мартелије су фотографисане и мерене помоћу софтверског система *Cell Sens Standard*.

4.10. Статистичке анализе

После завршеног испитивања наших узорака извршена је обрада резултата, као и њихово табелирање. Резултати су табелирани у програму *Microsoft Excel*, а потом је извршена обрада резултата савременим статистичким методама, при чему су обрађен већи број статистичких параметара.

процент инвадираних јединки,
аритметичка средина,
стандардна девијација,
минимум,
максимум,
корелација,
Т-тест,
анализа варијансе и F-тест,
Tukey тест (Такијев тест)

Тестирање хипотезе је захтевало апликацију различитих статистичких метода на нашем узорку.

Селекција статистичког метода је зависила првенствено од типа варијабиле: наши подаци су укључивали интервалне и номиналне варијабиле. Када смо поредили статистичку значајност (сигнификантност) између различитих категорија (група) користили смо анализу варијансе и F-test. За мултиплу компарацију (нпр. између еколошких фактора на појединим узгајалиштима користили смо *post-hoc Tukey test* (Такијев тест). Основни статистички параметри израчунавани су у програму

Microsoft Excel, а за обраду података сложенијим статистичким методама користили смо програм SPSS.

5. РЕЗУЛТАТИ

Свакога месеца на шест контролних тачака су мерени температура, салинитет, концентрација кисеоника и рН вредност. Прва четири месеца узорковања мерили смо и концентрацију нитрата (касније није рађено услед техничких недостатака).

Температура је била највећа током летњих месеци, нарочито јула, салинитет током летњих и пролетњих месеци, од априла до августа, а концентрација кисеоника је била највећа зими, током децембра и јануара. Рн је био релативно уједначен, премда у јесен и зими нешто нижи.

Табела 3: Температура, салинитет, концентрација кисеоника, NO₃ и рН, на контролној тачки Ораховац.

Месец	Температура	Салинитет	Конц. кисеоника	NO ₃	рН
Септембар	16.1	19.4	8.03	6.879	8.11
Октобар	19.5	19.5	8.55	4.457	8.1
Новембар	15	18.4	9.61	8.451	8.04
Децембар	12.5	8.6	11.07	11.33	8.11
Јануар	8.9	5.9	9.56		8.05
Фебруар	10.2	2.2	7.48		8.04
Март	11.2	7.2	9		8.04
Април	14.9	31.7	8.86		8.27
Мај	20.5	28.4	5.85		8.27
Јун	21.5	31.5	7.62		8.19
Јул	27	31.1	6.87		8.19
Август	25.8	29.9	5.08		8.18
Просек	16.925	19.483	8.132	7.779	8.1325

Табела 4: Температура, салинитет, концентрација кисеоника, NO₃ и pH, на контролној тачки Брбат

Месец	Температура, (°C)	Салинитет, ‰	Концентрација кисеоника, mg/l	NO ₃ , µg/l	pH
Септембар	18.3	24.7	7.65	2.963	8.2
Октобар	18.9	23.5	9.22	5.049	8.15
Новембар	13.2	10.6	9.74	8.734	8.06
Децембар	12.6	9.7	10.67	11.44	8.13
Јануар	14.7	10	7		8.22
Фебруар	10.9	4.4	6		8.06
Март	11.3	8.7	9.36		8.06
Април	16.7	29.2	9.11		8.25
Мај	20.5	29.1	5.75		8.25
Јун	20.7	31.3	7.77		8.18
Јул	28.1	32.2	7.34		8.22
Август	24.3	31.4	6.24		8.22
Просек	17.51667	20.4	7.9875	7.0465	8.166667

Табела 5: Температура, салинитет, концентрација кисеоника, NO₃ и pH, на контролној тачки Липци

Месец	Температура, (°C)	Салинитет, ‰	Концентрација кисеоника, mg/l	NO ₃ , µg/l	pH
Септембар	19.3	26.6	7.63	2.293	8.18
Октобар	19.7	29.2	8.41	0.257	8.15
Новембар	13	12.9	9.29	4.483	8.05
Децембар	11.7	9	10.68	9.968	8.12
Јануар	9.8	8.1	9.58		8.1
Фебруар	11.3	8.9	4.62		8.05
Март	12	12.6	8.97		8.05
Април	14.5	25.6	8.45		8.3
Мај	18.9	28.5	4.87		8.3
Јун	22.6	32.6	7.83		8.18
Јул	27.5	32.6	7.54		8.21
Август	24.5	31.5	6		8.23
Просек	17.06667	21.50833	7.8225	4.25025	8.16

Табела 6: Температура, салинитет, концентрација кисеоника, NO₃ и pH, на контролној тачки Кукуљина

Месец	Температура, (°C)	Салинитет, ‰	Концентрација кисеоника, mg/l	NO ₃ , µg/l	pH
Септембар	22.2	34.3	7.11	0.412	8.18
Октобар	22	36	7.75	0.232	8.09
Новембар	14	26.3	7.99	0.773	8.09
Децембар	15.7	30.6	9.59	5.024	8.07
Јануар	11.2	23.6	9.35		8.19
Фебруар	12.5	26.7	3.24		8.09
Март	13.2	32.5	6.22		8.09
Април	16.2	36.3	5.61		8.19
Мај	19.9	34.7	6.04		8.19
Јун	23.8	36	6.01		8.22
Јул	28.4	35.4	6.45		8.18
Август	27.3	35.1	5.76		8.22
Просек	18.8666667	32.29166667	6.76	1.61025	8.15

Табела 7: Температура, салинитет, концентрација кисеоника, NO₃ и pH, на контролној тачки Солила

Месец	Температура, (°C)	Салинитет, ‰	Концентрација кисеоника, mg/l	NO ₃ , µg/l	pH
Септембар	21.8	33.7	6.33	0.132	8.17
Октобар	21.6	35.7	6.95	0.489	8.05
Новембар	13.6	30.4	7.21	2.602	8.11
Децембар	14.6	23.1	8.71	5.514	8.07
Јануар	10.3	19.7	7.35		8.22
Фебруар	12.5	23.5	4.75		8.11
Март	14.4	33.2	6.16		8.11
Април	15.9	35.7	8.36		8.19
Мај	19.7	34.4	5.47		8.19
Јун	23.5	36.2	6.3		8.23
Јул	28.6	35.6	7.68		8.19
Август	27.7	35.6	6.12		8.26
Просек	18.68333	31.4	6.7825	2.18425	8.158333

Табела 8: Температура, салинитет, концентрација кисеоника, NO₃ и рН, на контролној тачки Света Неђеља

Месец	Температура, (°C)	Салинитет, ‰	Концентрација кисеоника, mg/l	NO ₃ , µg/l	рН
Септембар	20.1	31.7	6.47	1.984	8.17
Октобар	20.6	34.3	7.46	2.473	8.14
Новембар	15.2	27.3	7.51	3.838	8.12
Децембар	15.9	28.3	8.64	4.56	8.11
Јануар	11.3	23.8	8.43		8.15
Фебруар	12	19.8	3.95		8.12
Март	12.7	26.4	6.41		8.12
Април	15.7	34.5	8.33		8.15
Мај	19.6	33.2	5.06		8.15
Јун	22.2	35.8	7.64		8.18
Јул	26.9	34.4	7.51		8.19
Август	26.4	32.6	5.48		8.23
Просек	18.21667	30.175	6.9075	3.21375	8.1525

Температура и салинитет су најнижи у Ораховцу, док је температура највиша у Кукуљини. Концентрација кисеоника је била највиша у Ораховцу, а најнижа у Кукуљини и Солилима. РН вредност је релативно уједначена, просечно најнижа у Ораховцу, а највиша у Брбату

Статистичке податке температуре, салинитета, концентрације кисеоника и рН вредности је могуће упоредити у табели 9.

Табела 9: Статистички показатељи еколошких фактора на узгајалиштима шкољки

		Просек	Стандардна девијација	Стандардна грешка	Минимум	Максимум
Температура, °C	Ораховац	16.925	5.963	1.721	8.9	27
	Брбат	17.517	5.338	1.541	10.9	28.1
	Липци	17.067	5.828	1.682	9.8	27.5
	Кукуљина	18.867	5.882	1.698	11.2	28.4
	Солила	18.683	6.024	1.739	10.3	28.6
	Св. Неђеља	18.217	5.284	1.525	11.3	26.9
	Тотал	17.87933			8.9	28.6
Салинитет, ‰	Ораховац	19.483	11.161	3.222	2.2	31.7
	Брбат	20.4	10.753	3.104	6	32.2
	Липци	21.508	10.204	2.946	9	32.6
	Кукуљина	32.292	4.437	1.281	23.6	36.3
	Солила	31.4	5.893	1.701	19.7	36.2
	Св. Неђеља	30.175	5.017	1.448	19.8	35.8
	Тотал	25.87633			6	36.3
Концентрација кисеоника, mg/l	Ораховац	8.132	1.682	0.489	5.08	11.07
	Брбат	7.988	1.61	0.465	5.75	10.67
	Липци	7.823	1.856	0.536	4.87	10.68
	Кукуљина	6.76	1.827	0.527	3.24	9.59
	Солила	6.783	1.154	0.333	4.75	8.71
	Св. Неђеља	6.908	1.463	0.422	3.95	8.64
	Тотал	7.399			3.24	11.07
pH	Ораховац	8.133	0.086	0.025	8.04	8.27
	Брбат	8.167	0.074	0.021	8.05	8.25
	Липци	8.16	0.09	0.026	8.05	8.3
	Кукуљина	8.15	0.058	0.017	8.07	8.22
	Солила	8.158	0.067	0.019	8.05	8.26
	Св. Неђеља	8.153	0.035	0.01	8.11	8.23
	Тотал	8.1535			8.04	8.3

Анализом варијансе и Такијевим тестом утврдили смо да постоје значајне разлике међу узгајалиштима у неким еколошким факторима. Најзначајније разлике између узгајалишта су утврђене у салинитету, затим у концентрацији нитрата, а утврђене

су и разлике у концентрацији кисеоника. Разлике нису утврђене код температуре и рН. У табелама 10 и 11 су значајне разлике болдиране, односно означене звездом.

Табела 10: Разлике у еколошким факторима по узгајалиштима

		Сума квadrата	df	Средњи квadrат	F	Сиг.
Т	Између група	41.253	5	8.251	.252	.938
	Унутар групе	2165.066	66	32.804		
	Укупно	2206.319	71			
С	Између група	2161.032	5	432.206	6.118	.000
	Унутар групе	4662.938	66	70.651		
	Укупно	6823.970	71			
О	Између група	25.109	5	5.022	1.959	.096
	Унутар групе	169.218	66	2.564		
	Укупно	194.328	71			
NO ₃	Између група	130.114	5	26.023	2.954	.040
	Унутар групе	158.547	18	8.808		
	Укупно	288.661	23			
рН	Између група	.008	5	.002	.333	.891
	Унутар групе	.329	66	.005		
	Укупно	.338	71			

Табела 11: *Tukey test* (Такијев тест) – мултипла компарација

Зависна варијабила	(I) M	(J) M	Средња разлика (I-J)	Стр.грешка	Сиг.	95% Интервал поверења		
						Доња граница	Горња граница	
T	Tukey HSD	2.00	-.59167	2.33823	1.000	-7.4546	6.2713	
		3.00	-.14167	2.33823	1.000	-7.0046	6.7213	
		1.00	4.00	-1.94167	2.33823	.961	-8.8046	4.9213
		5.00	-1.75833	2.33823	.974	-8.6213	5.1046	
		6.00	-1.29167	2.33823	.994	-8.1546	5.5713	
		2.00	1.00	.59167	2.33823	1.000	-6.2713	7.4546
		3.00	.45000	2.33823	1.000	-6.4129	7.3129	
		4.00	-1.35000	2.33823	.992	-8.2129	5.5129	
		5.00	-1.16667	2.33823	.996	-8.0296	5.6963	
		6.00	-.70000	2.33823	1.000	-7.5629	6.1629	
		3.00	1.00	.14167	2.33823	1.000	-6.7213	7.0046
		2.00	-.45000	2.33823	1.000	-7.3129	6.4129	
		4.00	4.00	-1.80000	2.33823	.972	-8.6629	5.0629
		5.00	-1.61667	2.33823	.982	-8.4796	5.2463	
		6.00	-1.15000	2.33823	.996	-8.0129	5.7129	
		4.00	1.00	1.94167	2.33823	.961	-4.9213	8.8046
		2.00	1.35000	2.33823	.992	-5.5129	8.2129	
		3.00	1.80000	2.33823	.972	-5.0629	8.6629	
		5.00	5.00	.18333	2.33823	1.000	-6.6796	7.0463
		6.00	.65000	2.33823	1.000	-6.2129	7.5129	
		1.00	1.75833	2.33823	.974	-5.1046	8.6213	
		2.00	1.16667	2.33823	.996	-5.6963	8.0296	
		5.00	3.00	1.61667	2.33823	.982	-5.2463	8.4796
		4.00	-.18333	2.33823	1.000	-7.0463	6.6796	
6.00	.46667	2.33823	1.000	-6.3963	7.3296			
1.00	1.29167	2.33823	.994	-5.5713	8.1546			
2.00	.70000	2.33823	1.000	-6.1629	7.5629			
6.00	3.00	1.15000	2.33823	.996	-5.7129	8.0129		
4.00	-.65000	2.33823	1.000	-7.5129	6.2129			
5.00	5.00	-.46667	2.33823	1.000	-7.3296	6.3963		

S	Tukey HSD	2.00	-0.91667	3.43149	1.000	-10.9884	9.1551	
		3.00	-2.02500	3.43149	.991	-12.0967	8.0467	
		1.00	4.00	-12.80833*	3.43149	.005	-22.8801	-2.7366
		5.00	-11.91667*	3.43149	.011	-21.9884	-1.8449	
		6.00	-10.69167*	3.43149	.031	-20.7634	-.6199	
		1.00	.91667	3.43149	1.000	-9.1551	10.9884	
		3.00	-1.10833	3.43149	1.000	-11.1801	8.9634	
		2.00	4.00	-11.89167*	3.43149	.012	-21.9634	-1.8199
		5.00	-11.00000*	3.43149	.024	-21.0717	-.9283	
		6.00	-9.77500	3.43149	.062	-19.8467	.2967	
		1.00	2.02500	3.43149	.991	-8.0467	12.0967	
		2.00	1.10833	3.43149	1.000	-8.9634	11.1801	
	3.00	4.00	-10.78333*	3.43149	.029	-20.8551	-.7116	
	5.00	-9.89167	3.43149	.057	-19.9634	.1801		
	6.00	-8.66667	3.43149	.132	-18.7384	1.4051		
	1.00	12.80833*	3.43149	.005	2.7366	22.8801		
	2.00	11.89167*	3.43149	.012	1.8199	21.9634		
	4.00	3.00	10.78333*	3.43149	.029	.7116	20.8551	
	5.00	5.00	.89167	3.43149	1.000	-9.1801	10.9634	
	6.00	6.00	2.11667	3.43149	.989	-7.9551	12.1884	
	1.00	11.91667*	3.43149	.011	1.8449	21.9884		
	2.00	11.00000*	3.43149	.024	.9283	21.0717		
	5.00	3.00	9.89167	3.43149	.057	-.1801	19.9634	
	6.00	4.00	-.89167	3.43149	1.000	-10.9634	9.1801	
1.00	6.00	1.22500	3.43149	.999	-8.8467	11.2967		
2.00	1.00	10.69167*	3.43149	.031	.6199	20.7634		
3.00	2.00	9.77500	3.43149	.062	-.2967	19.8467		
4.00	3.00	8.66667	3.43149	.132	-1.4051	18.7384		
5.00	4.00	-2.11667	3.43149	.989	-12.1884	7.9551		
6.00	5.00	-1.22500	3.43149	.999	-11.2967	8.8467		
O	Tukey HSD	2.00	.14417	.65370	1.000	-1.7745	2.0628	
		3.00	.30917	.65370	.997	-1.6095	2.2278	
		1.00	4.00	1.37167	.65370	.301	-.5470	3.2903
		5.00	1.34917	.65370	.319	-.5695	3.2678	
		6.00	1.22417	.65370	.428	-.6945	3.1428	
		1.00	1.00	-.14417	.65370	1.000	-2.0628	1.7745
	3.00	.16500	.65370	1.000	-1.7537	2.0837		
	2.00	4.00	1.22750	.65370	.425	-.6912	3.1462	
	5.00	1.20500	.65370	.446	-.7137	3.1237		
	6.00	1.08000	.65370	.568	-.8387	2.9987		

		1.00	-.30917	.65370	.997	-2.2278	1.6095
		2.00	-.16500	.65370	1.000	-2.0837	1.7537
3.00		4.00	1.06250	.65370	.585	-.8562	2.9812
		5.00	1.04000	.65370	.607	-.8787	2.9587
		6.00	.91500	.65370	.727	-1.0037	2.8337
		1.00	-1.37167	.65370	.301	-3.2903	.5470
		2.00	-1.22750	.65370	.425	-3.1462	.6912
4.00		3.00	-1.06250	.65370	.585	-2.9812	.8562
		5.00	-.02250	.65370	1.000	-1.9412	1.8962
		6.00	-.14750	.65370	1.000	-2.0662	1.7712
		1.00	-1.34917	.65370	.319	-3.2678	.5695
		2.00	-1.20500	.65370	.446	-3.1237	.7137
5.00		3.00	-1.04000	.65370	.607	-2.9587	.8787
		4.00	.02250	.65370	1.000	-1.8962	1.9412
		6.00	-.12500	.65370	1.000	-2.0437	1.7937
		1.00	-1.22417	.65370	.428	-3.1428	.6945
		2.00	-1.08000	.65370	.568	-2.9987	.8387
6.00		3.00	-.91500	.65370	.727	-2.8337	1.0037
		4.00	.14750	.65370	1.000	-1.7712	2.0662
		5.00	.12500	.65370	1.000	-1.7937	2.0437
		2.00	.73275	2.09859	.999	-5.9366	7.4021
		3.00	3.52900	2.09859	.560	-3.1404	10.1984
1.00		4.00	6.16900	2.09859	.079	-.5004	12.8384
		5.00	5.59500	2.09859	.132	-1.0744	12.2644
		6.00	4.56550	2.09859	.296	-2.1039	11.2349
		1.00	-.73275	2.09859	.999	-7.4021	5.9366
		3.00	2.79625	2.09859	.764	-3.8731	9.4656
2.00		4.00	5.43625	2.09859	.150	-1.2331	12.1056
		5.00	4.86225	2.09859	.238	-1.8071	11.5316
		6.00	3.83275	2.09859	.475	-2.8366	10.5021
		1.00	-3.52900	2.09859	.560	-10.1984	3.1404
		2.00	-2.79625	2.09859	.764	-9.4656	3.8731
3.00		4.00	2.64000	2.09859	.803	-4.0294	9.3094
		5.00	2.06600	2.09859	.917	-4.6034	8.7354
		6.00	1.03650	2.09859	.996	-5.6329	7.7059
		1.00	-6.16900	2.09859	.079	-12.8384	.5004
		2.00	-5.43625	2.09859	.150	-12.1056	1.2331
4.00		3.00	-2.64000	2.09859	.803	-9.3094	4.0294
		5.00	-.57400	2.09859	1.000	-7.2434	6.0954
		6.00	-1.60350	2.09859	.970	-8.2729	5.0659

		1.00	-5.59500	2.09859	.132	-12.2644	1.0744
		2.00	-4.86225	2.09859	.238	-11.5316	1.8071
	5.00	3.00	-2.06600	2.09859	.917	-8.7354	4.6034
		4.00	.57400	2.09859	1.000	-6.0954	7.2434
		6.00	-1.02950	2.09859	.996	-7.6989	5.6399
		1.00	-4.56550	2.09859	.296	-11.2349	2.1039
		2.00	-3.83275	2.09859	.475	-10.5021	2.8366
	6.00	3.00	-1.03650	2.09859	.996	-7.7059	5.6329
		4.00	1.60350	2.09859	.970	-5.0659	8.2729
		5.00	1.02950	2.09859	.996	-5.6399	7.6989
		2.00	-.03417	.02884	.843	-.1188	.0505
		3.00	-.02750	.02884	.931	-.1122	.0572
	1.00	4.00	-.01750	.02884	.990	-.1022	.0672
		5.00	-.02583	.02884	.946	-.1105	.0588
		6.00	-.02000	.02884	.982	-.1047	.0647
		1.00	.03417	.02884	.843	-.0505	.1188
		3.00	.00667	.02884	1.000	-.0780	.0913
	2.00	4.00	.01667	.02884	.992	-.0680	.1013
		5.00	.00833	.02884	1.000	-.0763	.0930
		6.00	.01417	.02884	.996	-.0705	.0988
		1.00	.02750	.02884	.931	-.0572	.1122
		2.00	-.00667	.02884	1.000	-.0913	.0780
	3.00	4.00	.01000	.02884	.999	-.0747	.0947
		5.00	.00167	.02884	1.000	-.0830	.0863
		6.00	.00750	.02884	1.000	-.0772	.0922
		1.00	.01750	.02884	.990	-.0672	.1022
		2.00	-.01667	.02884	.992	-.1013	.0680
	4.00	3.00	-.01000	.02884	.999	-.0947	.0747
		5.00	-.00833	.02884	1.000	-.0930	.0763
		6.00	-.00250	.02884	1.000	-.0872	.0822
		1.00	.02583	.02884	.946	-.0588	.1105
		2.00	-.00833	.02884	1.000	-.0930	.0763
	5.00	3.00	-.00167	.02884	1.000	-.0863	.0830
		4.00	.00833	.02884	1.000	-.0763	.0930
		6.00	.00583	.02884	1.000	-.0788	.0905
		1.00	.02000	.02884	.982	-.0647	.1047
	6.00	2.00	-.01417	.02884	.996	-.0988	.0705

3.00	-.00750	.02884	1.000	-.0922	.0772
4.00	.00250	.02884	1.000	-.0822	.0872
5.00	-.00583	.02884	1.000	-.0905	.0788

*. Средња разлика је значајна на нивоу 0,05

Осим претходно изнесених показатеља на два контролна локалитета, Брбат и Липци мерен је и укупан број фекалних стрептокока и *Escherichia coli*. Мерења су вршена једном месечно, а вода је узоркована са узгајалишта шкољки. Резултати су приказани у табели 12. Узгајалишта, односно локалитети Брбат и Липци су узети као репрезентативни с обзиром на то да су то узгајалишта са највећим односно најмањим капацитетом производње дагњи (Брбат највећи, а Липци најмањи капацитет).

Табела 12: Број стрептокока фекалног порекла и *E.coli* на узгајалиштима

Месец	E.coli		Streptococci фекалног порекла	
	Брбат	Липци	Брбат	Липци
Септембар	1000	0	200	6
Октобар	1000	70	400	80
Новембар	4900	0	26	5
Децембар	220	80	7	5
Јануар	13	0	7	12
Фебруар	0	0	1	36
Март	0	0	0	0
Април	0	0	0	0
Мај	0	0	22	1
Јун	0	0	1	1
Јул	0	0	1	5
Август	0	0	0	6
Просек	594.4166667	12.5	55.41666667	13.08333333

Међу испитиваним узгајалиштима нема статистички значајних разлика у броју бактерија. Подаци су дати у табели 13.

Табела 13 : Преглед статистичких разлика у броју бактерија међу узгајалиштима

		Парне разлике				t	df	Сиг.	
		Ар. средина	Стд. девијација	Срења стд. грешка	95% Интервал поузданости разлике				
					Доњи				Горњи
1	Е. coli_Брбат Ecoli_Липци	581.91667	1408.77590	406.67857	-313.17684	1477.01017	1.431	11	.180
2	Стрептококе фекал. пор. _Брбат Стрепт. фекал. пор. Липци	42.33333	104.75889	30.24129	-24.22729	108.89395	1.400	11	.189

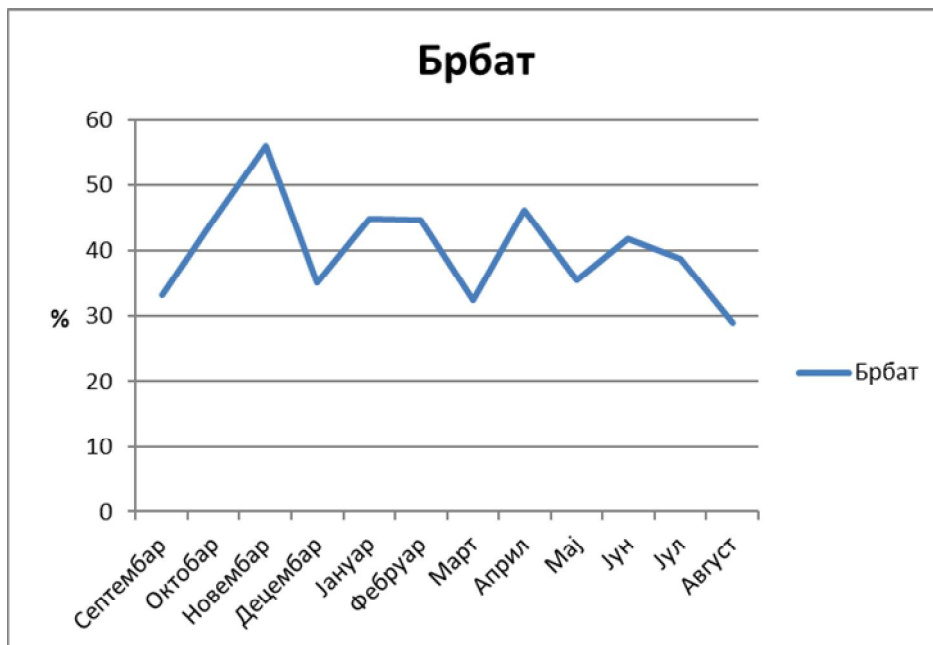
5.1. Резултати индекса кондиције испитиваних дагњи

У следећој фази се приступило мерењу шкољки да бисмо утврдили индекс кондиције животиња. Шкољке су мерене тако што им је прво мерена укупна маса, а касније маса љуштуре (са тачношћу од 0,01 грам), након чега је израчунавана маса меса одузимањем друге од прве добијене масе. Затим је израчунаван индекс кондиције или кондициони индекс (IC) испитиваних дагњи, тако што је рачунат однос масе меса и укупне масе животиње (*IFREMER, 2003*), који је затим тај однос множен са сто. Месечне варијације индекса кондиције по узгајалиштима су приказане на следећим графиконима (1–6).

Графикон 1: Кретање индекса кондиције узоркованих дагњи на контролној тачки Ораховац



Графикон 2: Кретање индекса кондиције узоркованих дагњи на контролној тачки Брбат



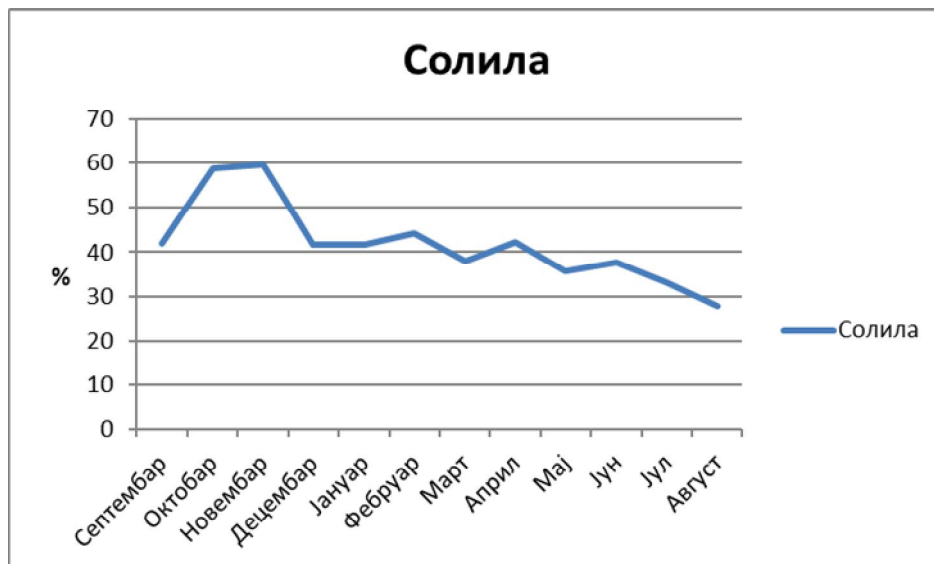
Графикон 3: Кретање индекса кондиције узоркованих дагњи на контролној тачки Липци



Графикон 4: Кретање индекса кондиције узоркованих дагњи на контролној тачки Кукуљина



Графикон 5: Кретање индекса кондиције узоркованих дагњи на контролној тачки Солила



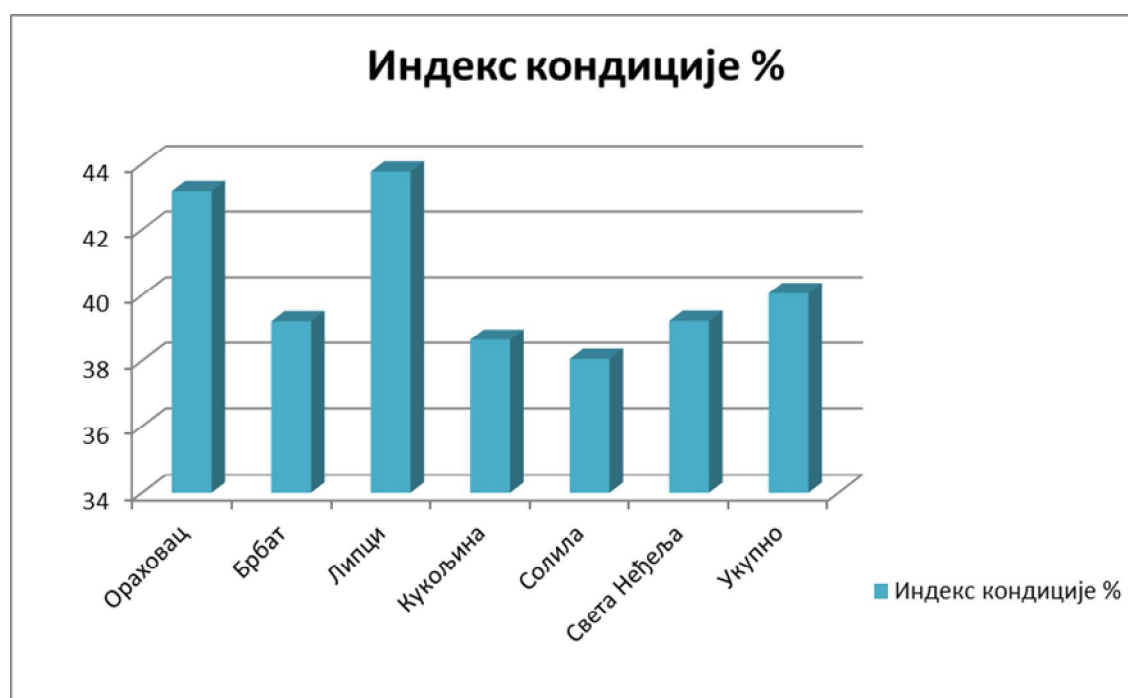
Графикон 6: Кретање индекса кондиције узоркованих дагњи на контролној тачки Света Неђеља



Индекси кондиције појединачних животиња су се кретали од 16,93 до 71,25, а гледано по месецима, највиши су били у октобру 2014. године, а најнижи у августу 2015.

Највиши просечан кондициони индекс забележен је на контролној тачки Липци, а најнижи на тачки Солила. Просечан кондициони индекс по узгајалиштима је изгледао приказан на графикону 7.

Графикон 7: Кондициони индекс по узгајалиштима.



Просечан индекс кондиције свих 960 узоркованих медитеранских дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) износио је 40,062% (графикон 7). Индекс кондиције је генерално гледано био већи код старијих, односно животиња веће укупне масе.

5.2. Резултати макроскопских истраживања

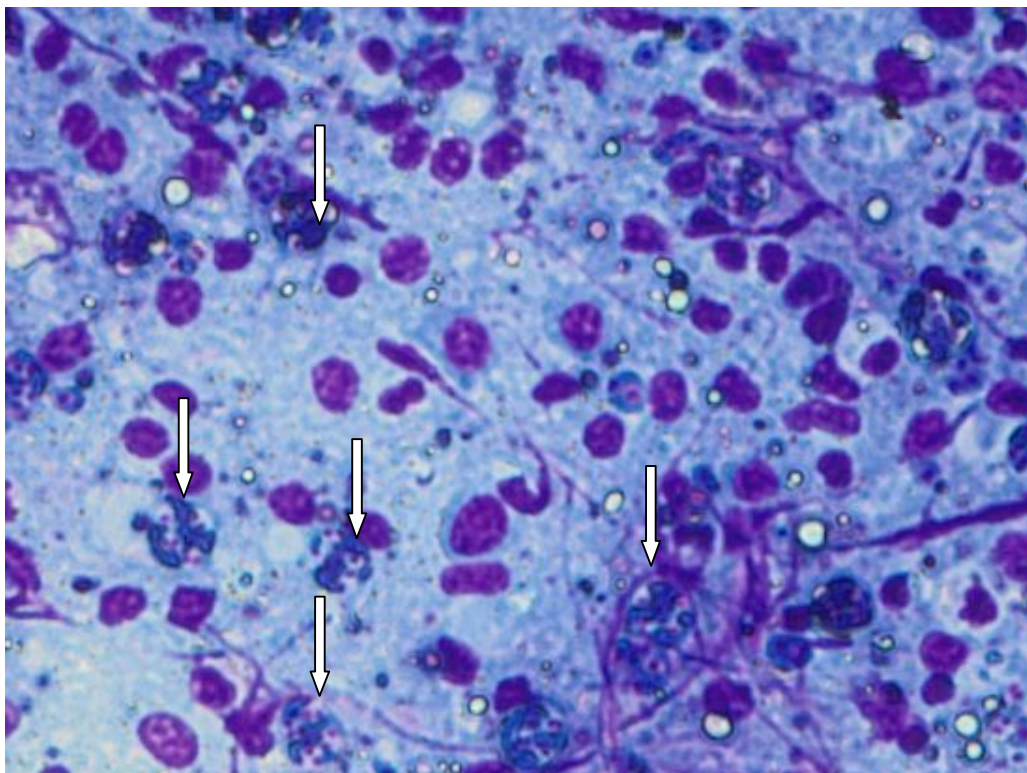
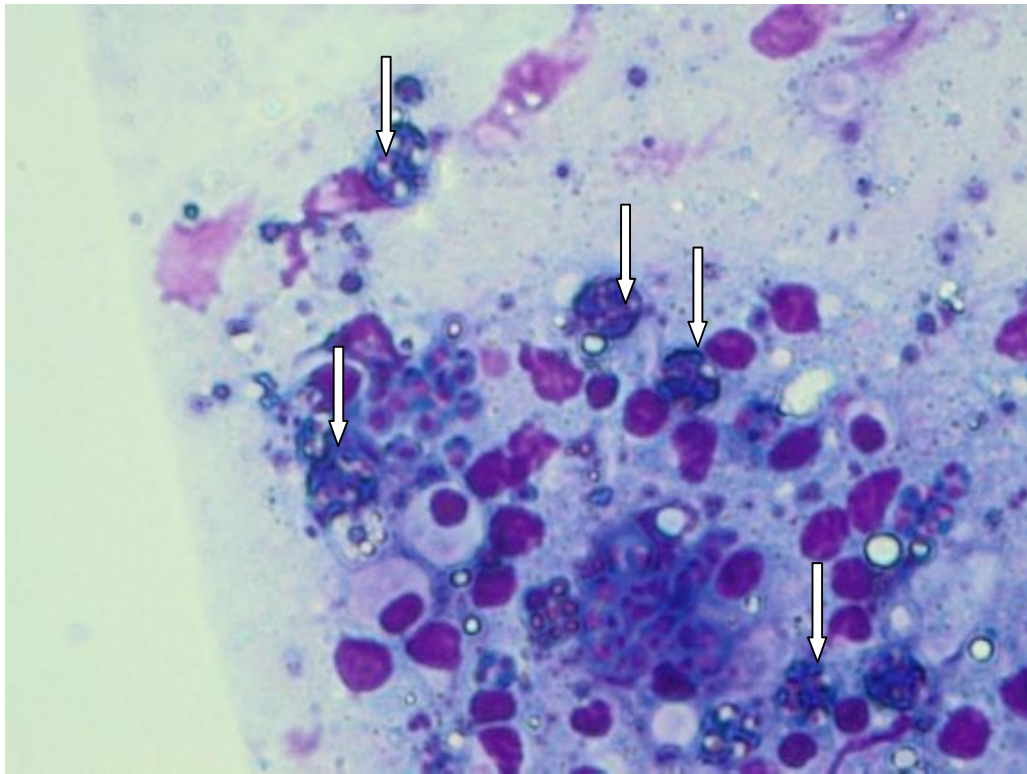
Током испитиваног периода (септембар 2014. – август 2015.) на узгајалиштима није забележен неуобичајани морталитет дагњи, нити су неуобичајени морталитети уочени и пријављени од стране власника узгајалишта.

Приликом прегледа спољашњости дагњи нису забележени случајеви лома или оштећења љуштуре. Приликом прегледа унутрашњости шкољки утврђено је да су јединке биле макроскопски здраве, без видљивих оштећења унутрашњих органа. Унутрашњи органи су били јасно оивичених контура, шкрге и плашт чисти. Нису уочене нечистоће и стране материје, нити су били присутни голим оком видљиви паразити, нити њихови паразитски елементи. Није забележен морталитет код узоркованих шкољки.

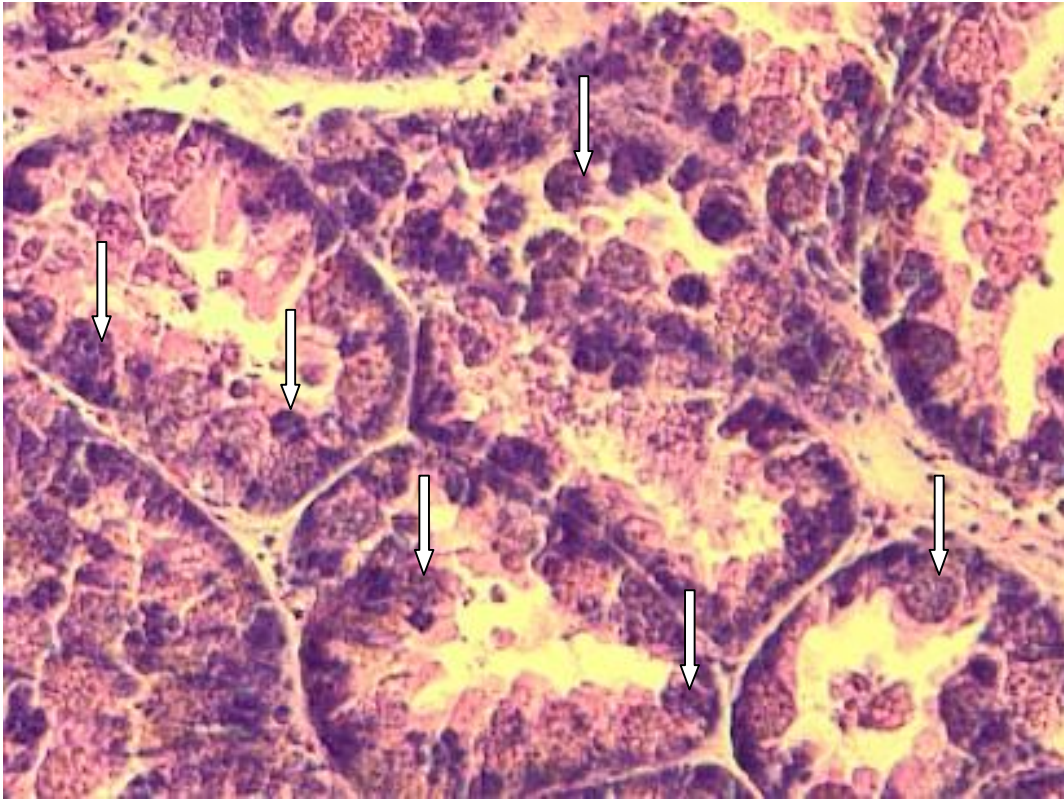
5.3. Резултати детектоване *Marteilia refringens*

Од укупно 960 испитаних јединки медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) нађено је свега дванаест јединки инфицираних паразитом *Marteilia refringens*.

Број од дванаест заражених дагњи представља 1,25% од укупно прегледаних јединки медитеранске дагње. Присуство паразита је детектовано цитолошким методама, а затим је потврђено и хистолошким прегледом (методом бојења хематоксилином и еозином).



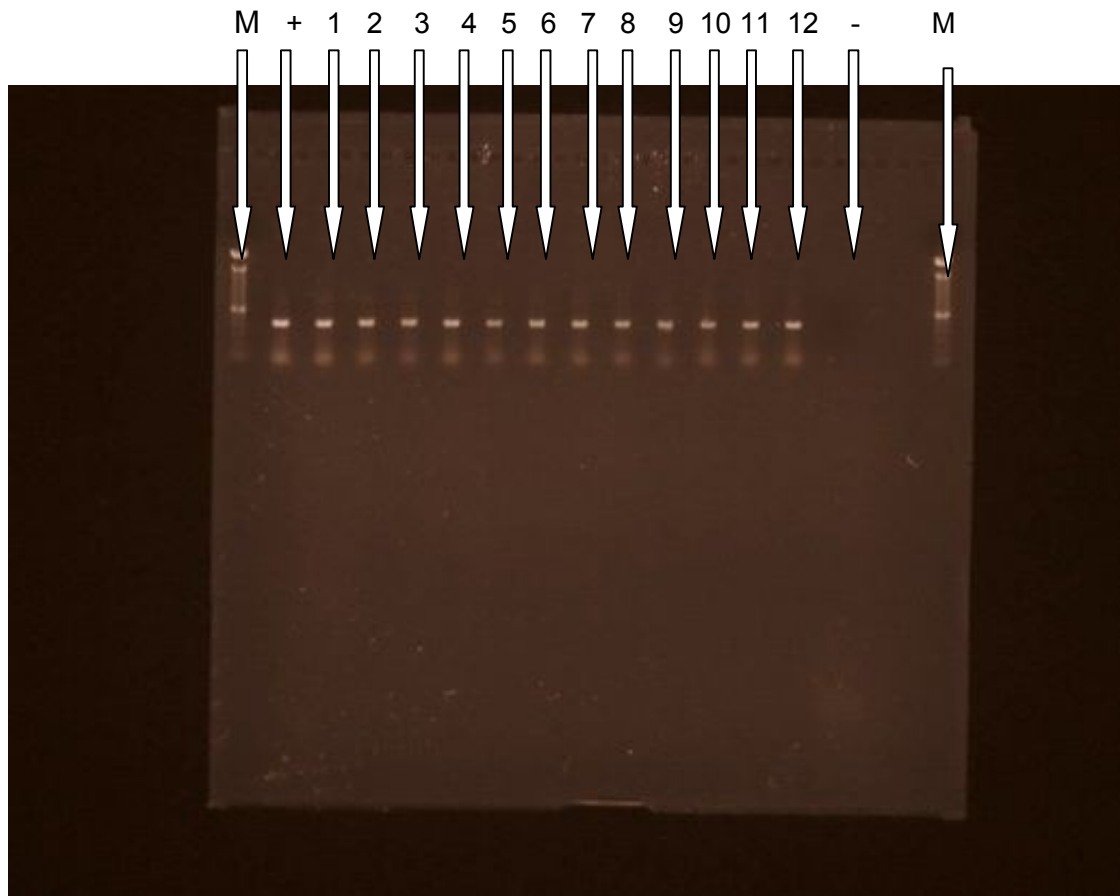
Слике 20 и 21: Цитолошки приказ паразита, *Marteilia refringens*, увеличање x400, *Marteilia refringens* – обележена стрелицом



Слика 22: *Marteilia refringens* – хистолошки приказ паразита, увећање x400, *Marteilia refringens* – обележена стрелицом

Након цитолошких и хистолошких претрага рађене су молекуларне анализе свих узорака. Молекуларне методе су рађене конвенционалном PCR методом (ланчана реакција полимеразе).

Добијени су идентични резултати као и цитолошким методама. Након визуелизације помоћу мрачне коморе и ултраљубичасте светлости детектовали смо дванаест позитивних бендова. Бендови су били јасно видљиви, при чему су се делимично разликовали по дебљини зависно од концентрације ДНК (приказано на слици 23).



Слика 23 : Резултати PCR анализе приказани на гелу након електрофорезе

M – маркер, + позитивна контролна, 1–12 позитивни узорци (1–4 – Ораховац, 5–6 – Брбат, 7–8 Липци, 9–12 Кукуљина), – негативна контрола

5.4. Епидемиологија

Паразит *Marteilia refringens* нађен је укупно у 12 или 1,25% испитаних јединки. Прва нађена дагња заражена паразитом *Marteilia refringens* је утврђена у септембру месецу на локалитетима Брбат и Ораховац, при чему смо на оба узгајалишта утврдили по две заражене животиње. Резултати прегледаних и инфицираних јединки медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) приказани су у табели 14.

Табела 14: Преглед узоркованих и инфицираних јединки медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) по локалитетима

Локалитет	Број узоркованих јединки	Број позитивних јединки	Процент позитивних
Ораховац	120	4	3.33
Брбат	360	2	0.56
Липци	120	2	1.67
Кукуљина	120	4	3.33
Солила	120	0	0
Света Неђеља	120	0	0
Укупно	960	12	1.25

Број инфицираних јединки по локалитетима и месецима приказан је у табели 15.

Табела 15: Број медитеранских дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) инфицираних са *M. refringens*

	Ораховац	Брбат	Липци	Кукуљина	Солила	Света Неђеља	Укупно
Септембар	2	2	0	0	0	0	4
Октобар	1	0	1	2	0	0	4
Новембар	0	0	1	0	0	0	1
Децембар	0	0	0	1	0	0	1
Јануар	0	0	0	0	0	0	0
Фебруар	0	0	0	0	0	0	0
Март	1	0	0	1	0	0	2
Април	0	0	0	0	0	0	0
Мај	0	0	0	0	0	0	0
Јун	0	0	0	0	0	0	0
Јул	0	0	0	0	0	0	0
Август	0	0	0	0	0	0	0

Табела 16: Процент инфицираних јединки по месецима

	Ораховац %	Брбат %	Липци %	Кукуљина %	Солила %	Света Неђеља %	Укупно %
Септембар	20	5.55	0	0	0	0	5
Октобар	10	0	10	20	0	0	5
Новембар	0	0	10	0	0	0	1.25
Децембар	0	0	0	10	0	0	1.25
Јануар	0	0	0	0	0	0	0
Фебруар	0	0	0	0	0	0	0
Март	10	0	0	10	0	0	2.5
Април	0	0	0	0	0	0	0
Мај	0	0	0	0	0	0	0
Јун	0	0	0	0	0	0	0
Јул	0	0	0	0	0	0	0
Август	0	0	0	0	0	0	0

Као што се из приложених табела 15 и 16 види највише инфицираних јединки у укупном огледу утврђено је у септембру и октобру 2014. (по 5%), затим у марту 2015. године (2,5%), док је у новембру и децембру 2014. забележена по једна инфицирана дагња (по 1,25%). У осталим месецима нисмо утврдили јединке медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) инфициране са *Marteilia refringens*. Дакле, у петомесечном периоду, од априла до августа 2015. године нисмо утврдили ниједну јединку медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) инфицирану паразитом *Marteilia refringens*.

Највише инфицираних дагњи утврђено је на локалитетима/узгајалиштима у Ораховцу и Кукуљини, по четири, док су на локалитетима/узгајалиштима Брбат и Липци утврђене по две инфициране дагње. На узгајалиштима Солила и Света Неђеља нису утврђене инфициране дагње.

На узгајалиштима где је утврђено присуство мартелиозе покушали смо да утврдимо да ли мартелиоза утиче на индекс кондиције. Тако смо поредили индекс кондиције дагњи код којих је утврђено присуство паразита *Marteilia refringens* и

индекса кондиције здравих дагњи, односно дагњи код којих није утврђена мартелиоза.

Табеле 17 и 17а: Разлика у индексу кондиције здравих јединки и јединки инфицираних паразитом *Marteilia refringens*

		Просек	N	Станд, девијација	Средња стандардна грешка
Pair 1	IC болесне	37,0675	12	9,42341	2,72031
	IC здраве	40,1950	12	8,10508	2,33973

Тестирање парних узорака

	Парне разлике					t	df	Сиг.
	Ар. средина	Стд. девијација	Средња стд. грешке	95% Интервал поузданости разлике				
				Доњи	Горњи			
IC болесне – IC здраве јединке на инф. узгајалиштима	-3,12750	4,68697	1,35301	-6,10546	-,14954	-2,312	11	,041

Из претходних табела се види да постоје разлике у индексу кондиције код инфицираних животиња и индексу кондиције здравих животиња на узгајалиштима/месецима која су инфицирана паразитом *Marteilia refringens*. Кондициони индекс заражених животиња је нижи него кондициони индекс здравих животиња на узгајалишту. Разлика између ова два третмана је сигнификантна уз ризик грешке од 5%.

5.5. Однос еколошких фактора и појаве мартелиозе

Најближе обали од свих узгајалишта је узгајалиште на локалитету Ораховац, затим Света Неђеља, Липци, затим Кукуљина, а најудаљеније је узгајалиште на локалитету Солила, што је приказано у табели 18.

Табела 18: Однос удаљености узгајалишта и броја инфицираних дагњи

Локалитет -узгајалиште	Ораховац	Брбат	Липци	Кукуљина	Солила	Света Неђеља
Удаљеност у метрима од обале	40	60	50	80	270	60
Процент инфицираних дагњи	3,33	0,56	1,67	3,33	0	0

Корелација између удаљености узгајалишта од обале у метрима и броја је негативна (- 0,46). Мада не показује статистичку значајност, ипак указује да се инвадираност смањује са удаљеношћу. Приметно је да су на обали најближем узгајалишту Ораховац, забележене 4 инфициране животиње, а на најудаљенијем Солила није забележена ниједна инфицирана јединка.

Даље смо покушали да установимо да ли има значајних разлика међу аритметичким срединама еколошких фактора, као што су температура, салинитет, концентрација кисеоника и рН на узгајалиштима/месецима где је утврђена мартелиоза и на онима где није нађена *Marteilia refringens* у дагњама. Резултати су приказани у табелама (19-23). За доказивање смо користили F тест са анализом варијансе. У табелама су бројем један обележени третмани (узгајалишта/месеци) са болесним јединкама, а бројем два узгајалишта/месеци када није утврђена мартелиоза.

Табела 19. Дескриптивна статистика

Дескриптивна статистика							
	N	Минимум	Максимум	Ар. средина		Стд. девијација	Варијан.
	Статист.	Статист.	Статист.	Статист.	Ст. грешка	Статист.	Статист.
Темп. негат. (2)	63	8.90	28.60	18.0730	.73020	5.79575	33.591
Темп. поз. (1)	9	11.20	22.00	16.5222	1.20621	3.61862	13.094
Салин..негат. (2)	63	2.20	36.30	26.2079	1.24312	9.86697	97.357
Салин. позит. (1)	9	7.20	36.00	23.5556	3.18944	9.56832	91.553
Конц. кис. негат. (2)	63	3.24	11.07	7.2732	.21352	1.69472	2.872
Конц. кис. позит. (1)	9	6.22	9.59	8.2767	.34010	1.02031	1.041
pH_негативно (2)	63	8.04	8.30	8.1610	.00860	.06824	.005
pH_позитивно (1)	9	8.04	8.20	8.1000	.01658	.04975	.002
Валид. N	9						

Табела 20: Утицај температуре на појаву паразита *Marteilia refringens*

Температура

	Сума квадрата	df	Средњи квадрат	F	Сиг..
Између група	18.939	1	18.939	.606	.439
Унутар групе	2187.380	70	31.248		
Укупно	2206.319	71			

Табела 21: Утицај салинитета на појаву паразита *Marteilia refringens*

Салинитет

	Сума квадрата	df	Средњи квадрат	F	Сиг.
Између група	55.402	1	55.402	.573	.452
Унутар групе	6768.568	70	96.694		
Укупно	6823.970	71			

Табела 22: Утицај концентрације кисеоника на појаву паразита *Marteilia refringens*

Конц. кисеоника

	Сума квадрата	df	Средњи квадрат	F	Сиг..
Између група	7.930	1	7.930	2.978	.089
Унутар групе	186.398	70	2.663		
Укупно	194.328	71			

Табела 23: Утицај рН вредности на појаву паразита *Marteilia refringens*

рН

	Сума квадрата	df	Средњи квадрат	F	Сиг.
Између група	.029	1	.029	6.638	.012
Унутар групе	.309	70	.004		
Укупно	.338	71			

F-тестом смо установили значајне разлике између испитиваних рН вредности на узгајалиштима/месецима где је нађена мартелиоза и на оним где није утврђена појава мартелиозе. Ниво вероватноће износи 0,012 (табела 23) и веома је близак највишем нивоу вероватноће од 0,01. Просечан рН је статистички значајно нижи на узгајалиштима/месецима где је утврђено присуство *Marteiliae refringens* у односу на она где је нисмо утврдили. Од свих испитиваних еколошких фактора стандардна девијација је била најнижа управо код рН, 0,069, а колебања су била најмања. Укупна просечна рН вредност на свим узгајалиштима, током дванаест месеци је била 8,1533, на узгајалишта односно месецима где/када није било

инфекције износи 8,161 а на узгајалиштима, односно у месецима где и када су утврђене инфициране животиње рН вредност је била 8,1, што уз јако ниску стандардну девијацију знатно одудара од просека.

Утврђене су сигнификантне разлике и међу испитиваним вредностима концентрације кисеоника на узгајалиштима/месецима где је нађена мартелиоза и на оним где није утврђена појава мартелиозе, за ниво вероватноће од 0,1. Добијени ниво вероватноће износи 0,089 (табела 22). Просечна концентрација кисеоника на свим узгајалиштима током дванаест месеци је износила 7,399mg/l, док је концентрација кисеоника на узгајалиштима са инфицираним дагњама у датим месецима износила 8,277 mg/l, а на неинфицираним узгајалиштима/месецима износила 7,273 mg/l.

Статистички значајне разлике нису утврђене код испитивања температуре морске воде и салинитета. Ипак, разлике постоје. Тако је просечна температура на свим узгајалиштима била 17,879°C, а на узгајалиштима са утврђеним инфицираним животињама је била 16,522 °C, али без статистички сигнификантних разлика.

Просечан салинитет на узгајалиштима износио је 25,876, док је на узгајалиштима са утврђеним инфицираним животињама износио 23,556. Стандардне девијације ова два испитивана еколошка фактора на комплетном узорку су била високе и износиле су 5,574 за температуру, 9,804 за салинитет, што показује знатна колебања ова два еколошка фактора на различитим узгајалиштима током године.

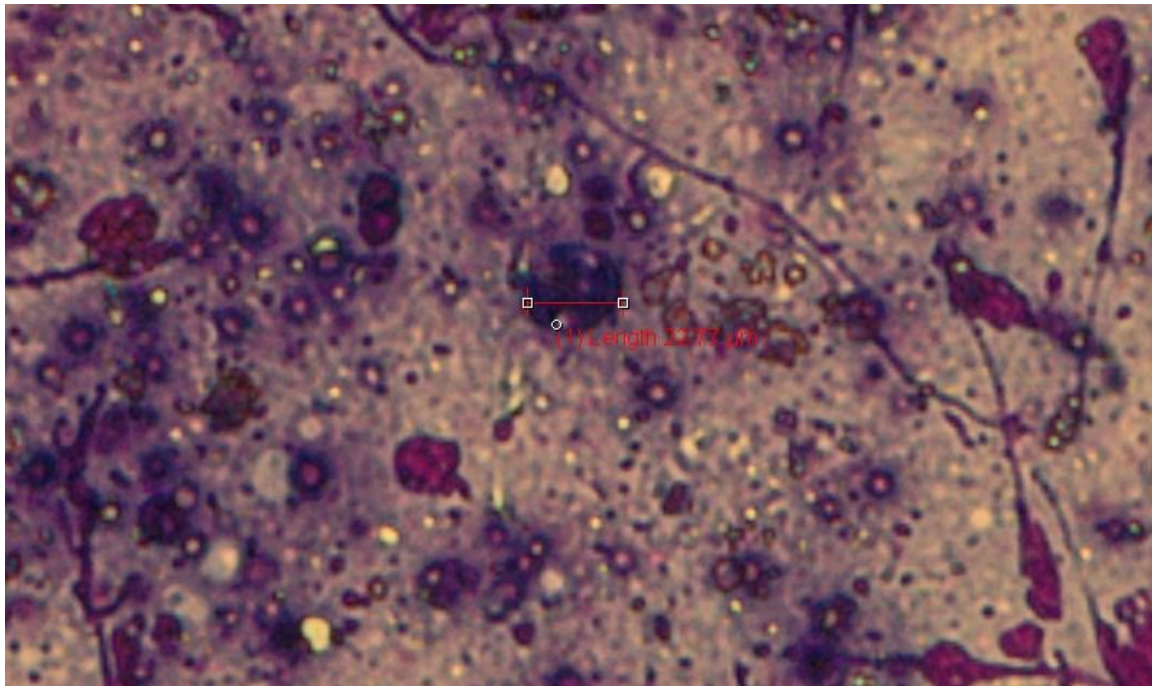
Испитивали смо и утицај бактерија у морској води на појаву мартелиозе на узгајалишту. Ипак, због веома малог броја позитивних сличајева, укупно 3 (2 пута на локалитету Липци и једанпут на локалитети Брбат) нисмо успели да докажемо значај појаве и броја *E.coli* и стрептокока фекалног порекла на појаву мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*).

5.6. Микроскопски преглед – цитолошки и хистолошки

Испитивањем хистолошких препарата инфицираних дагњи утврдили смо различит степен инфекције. Мартелије смо углавном утврдили у дигестивним тубулима, а мањи број и у лумену дигестивне жлезде. У једној трећини случајева утврђен је релативно мали број инфицираних дигестивних тубула (око 10%), у другој трећини је била висока ивадираност (око 70-80% дигестивних тубула), а у трећој трећини утврдили смо присуство *Marteilia refringens* у готово свим дигестивним тубулима. У везивном ткиву дигестивне жлезде инфицираних дагњи углавном је била приметна слаба до умерена хемоцитна инфилтрација.

Хистолошким прегледом позитивних препарата приметна су била рефрингентна тела, по којима је *Marteilia refringens* и добила име.

Иако је било и других стадијума *Marteiliae refringens* (нарочито у децембру), у дигестивним каналићима и тубулима су преовладавале псеудоплазмодије (примарне ћелије или спорангиосоруси). Помоћу софтверског програма *CellSens Standard* мерили смо и величину *Marteiliae refringens*, детектоване у инфицираним животињама. Мерене мартелије су биле сферичног облика. Величине су биле различите, од 15,18 μm до максимално 29,36 μm . Просечна измерена величина *Marteiliae refringens* је износила 23,28 μm . У ћелијама мартелије су се налазили споронти у којима је било било је између 2 и 4 споре. Просечна величина измерених спора је износила 3,743 μm .



Слика 24: Микрометарско мерење паразита *Marteilia refringens*, увеличање x400

Табела 24: Просечна величина паразита *Marteilia refringens* детектованог у дагњи по месецима

Месец	Септембар	Октобар	Новембар	Децембар	Март
Просечна величина / μm	21.394	24.326	25.642	21.57	24.632
Ст.девијација	3.974	3.211	3.134	4.144	2.943

Табела показује да је утврђена *Marteilia refringens* била највећа у новембру, а најмања у септембру и децембру.

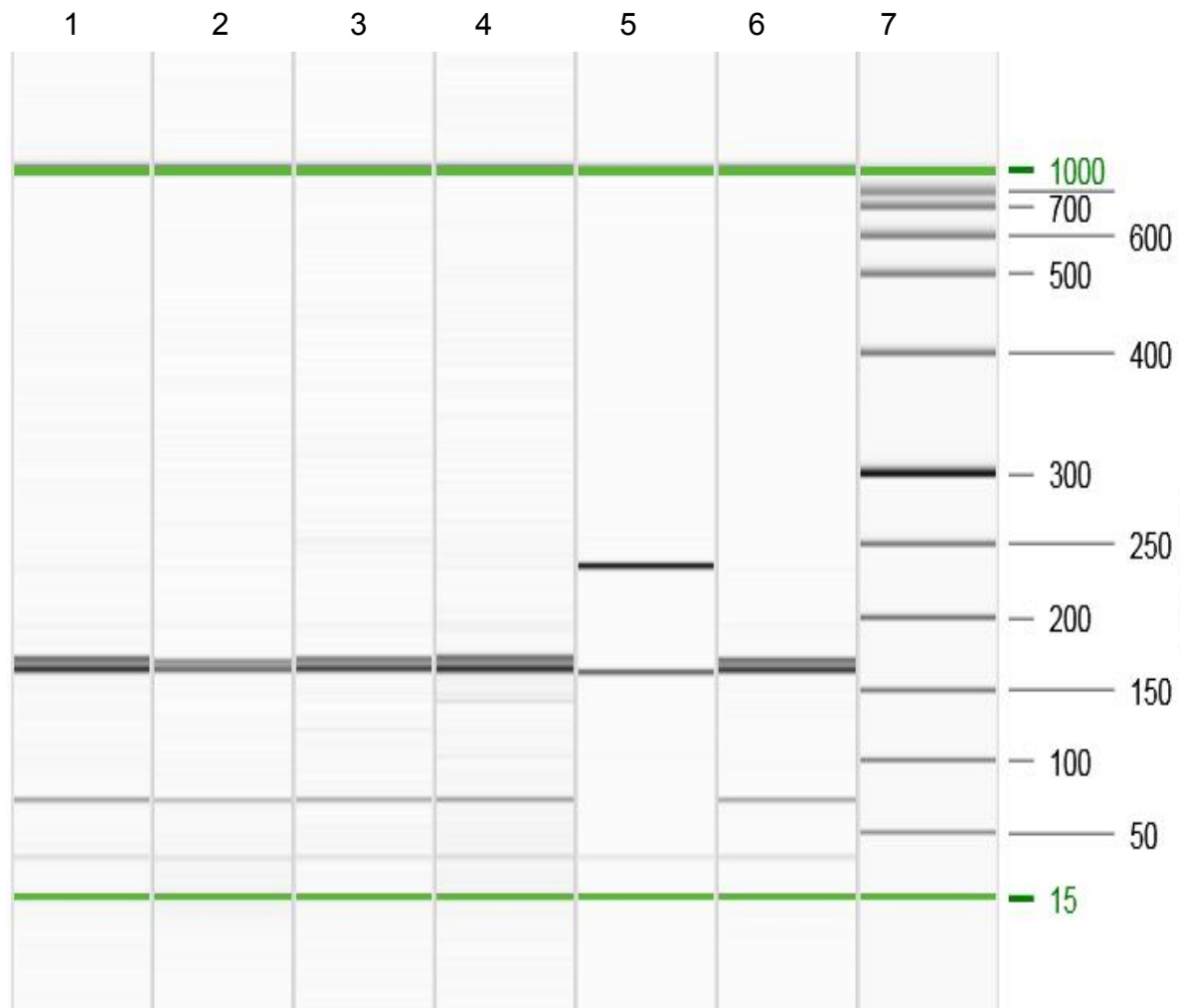
5.7. Резултати молекуларних истраживања генома

Након ланчане реакције полимеразе позитивне бендове смо пажљиво изрезали из гела, измерили концентрацију ДНК, затим смо одрадили пречишћавање ДНК из

гела, а потом смо прешли на методу RFLP (полиморфизам дужине рестрикцијских фрагмената).

Методом RFLP покушали смо да утврдимо којем типу мартелије припада изолована мартелија.

Поредили смо наше узорке са позитивним контролама за *Marteilia refringens* тип О и *Marteilia refringens* тип М (слика 25). Позитивна контрола тип О, у складу са очекивањима, садржала је рестрикционе фрагменте од 226, 156 и 31 базни пар, а позитивна контрола тип М фрагменте од 157, 156, 68 и 31 базни пар.



Слика 25: Резултати RFLP анализа (QIAxcel)

У линији пет је позитивна контрола за тип О, а у линији 6 позитивна контрола за тип М. Наши позитивни узорци су приказани у прве четири линије (1 – Ораховац, 2 – Брбат, 3 – Липци, 4 – Кукуљина). Према резултатима PCR-RFLP анализе сви наши обрађени узорци (означени са Ораховац, Брбат, Кукуљина и Солила) припадају М типу. Линија 7 приказује ДНК маркер величине од 50-800 базних парова.

На слици 26 приказано је уравниање секвенци.

```

1_DNAOR -----TTCAC TCCGACAGTAGCCGGTCGAAGGCTTCGAAGCTAGCAGTGGTGGCGTTCGTCGTTTCGCTACGCTGTCCGAG
3_DNALP -----.....
2_DNABR -----C.....
4_DNAKU -----.....
JQ898013 -----.....
JQ898014 -----.....
DQ426599 -----.....
DQ426605 -----.....
DQ426550 CCGCACACGTTC.....
DQ426553 CCGCACACGTTC.....
AB513427 CCGCACACGTTC.....
AJ629340 -----.....
DQ426583 -----.....
DQ426595 -----.....
DQ426626 -----.....
AJ629337 -----.....

```

90 (according to Le Roux et al. 2001)

```

1_DNAOR AATACCTAGCGGGTTTTGCTACTCGTTTTTACGCGTCCCGGTGCTCTCTGCGGGCTCGGAGACGATCGCGCGTGCCCTCCCGAGGCTGCAA
3_DNALP .....
2_DNABR .....
4_DNAKU .....
JQ898013 -----.....
JQ898014 -----.....A.....
DQ426599 -----T.....
DQ426605 -----T.....
DQ426550 .....
DQ426553 .....
AB513427 .....
AJ629340 -----.....
DQ426583 -----T.....C.....
DQ426595 -----T.....C.....C.....
DQ426626 -----.....C.....C.....
AJ629337 -----.....

```

180

1_DNAOR	ACTACGCGGAAACACACTACTCTTCGCTTTCGATCGTCGCAACAGGAAGCGGCTCTCGTGTTCCGGCACGGGTA
3_DNALP
2_DNABR
4_DNAKU
JQ898013
JQ898014
DQ426599
DQ426605
DQ426550
DQ426553
AB513427
AJ629340C.....
DQ426583
DQ426595
DQ426626
AJ629337

270

1_DNAOR	GCCGTTAGAACCGGCCGGCATTATCGTGTCGTCGTAGACGATAGCACGGTACAGCCAGGCGAGTGCTCTCGTTGC	323	3
3_DNALP		
2_DNABR		
4_DNAKU		
JQ898013		
JQ898014		
DQ426599	A.....		
DQ426605	A.....		
DQ426550		
DQ426553		
AB513427		
AJ629340		
DQ426583	A.....	T	
DQ426595	CT.....G.....A.....	T	
DQ426626	CT.....G.....A.....	T	
AJ629337	CT.....A.....	T	

```
1_DNAOR  GTGCTGCGTCGAAACAGCTGAATAATATCAGATCACGT-----  
3_DNALP  .....  
2_DNABR  .....CTGTC-----  
4_DNAKU  .....CTGTC-----  
JQ898013 .....  
JQ898014 .....  
DQ426599 .....  
DQ426605 .....  
DQ426550 .....CTGTCGAAACTCGCGAG  
DQ426553 .....CTGTCGAAACTCGCGAG  
AB513427 .....CTGTCGAAACTCGCGAG  
AJ629340 .....  
DQ426583 .....  
DQ426595 .....  
DQ426626 .....  
AJ629337 .....  
.....
```

Слика 26: Уравнање секвенци (стране изнад)

Секвенце под редним бројевима од 1 до 4 су секвенце изловане у нашем истраживању (1_DNAOR секвенца са локалитета Ораховац, 2_DNABR секвенца са локалитета Брбат, 3_DNALP секвенца са локалитета Липци, 4_DNAKU секвенца са локалитета Кукуљина). Осим секвенци добијених нашим истраживањем приказали смо још дванаест секвенци доступних са *GenBank*, у шта смо укључили неколико секвенци које су детектоване у Јадранском мору (AB513427, DQ426553, DQ426550, JQ898013 и JQ898014). Уочено је присуство пет јасних разлика, које одвајају типове О и М на позицијама 323, 344, 348, 349 и 353 (*Le Roux et al. 2001*), при чему је тип М потврђен на нивоу секвенци у сва четири наша испитивана узорка.

6. ДИСКУСИЈА

Пре нашег истраживања здравствени статус медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) гајене у водама Црногоског приморја, везано за инфекцију паразитом *Marteilia refringens* био је непознат. Обзиром да је *Marteilia refringens* детектована у медитеранској дагњи у земљама које излазе на Јадранско море јавила се потреба свеобухватног истраживања у Црној Гори.

Наша истраживања показују знатна колебања температуре и салинитета морске воде у Бококоторском заливу на локалитетима где се врши узгој медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Најнижа измерена температура износила је 8,9°C, а највиша је износила 28,6°C. Најнижи измерени салинитет морске воде износио је 6‰, а највиши 36,3‰. Најнижа концентрација кисеоника морске воде износила је 3,24 mg/l, а највиша 11,07 mg/l. РН вредност морске воде је најмање варирала, била је базног карактера и износила је између 8,04 и 8,3. У истраживању спроведеном од марта до октобра 2010. године бележи се просечна температура на узгајалиштима око 20°C, док се концентрација кисеоника кретала од 7,38 до 9,18 mg/l. Салинитет је и у том истраживању највише варирао са просеком по узгајалишту између 10-33‰ (*Joksimović et al., 2012*).

Еколошки фактори, попут температуре, салинитета, концентрације кисеоника, рН и других показују да су воде Црногорског приморја оптималне за узгој медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) (*Joksimović et al, 2012*), пошто медитеранска дагња расте до своје оптималне величине, при температури морске воде 15–25°C, уз идеалан салинитет између 20–35‰ (*Braby & Somero, 2006*).

Највиша просечна температура у нашем истраживању измерена је у јулу, а најнижа у јануару месецу, а просечан измерен салинитет је био највиши такође у јулу, а најнижи у фебруару. Концентрација кисеоника у води је била највиша у децембру, а најнижа у фебруару, а затим у лето, док је вредност рН најмање

варирала, премда је била виша у пролећним и летњим месецима у односу на јесен и зиму.

И међу узгајалиштима/локалитетима међусобно су утврђене знатне разлике, нарочито у погледу салинитета, концентрације кисеоника морске воде и нитрата. Најнижи салинитет забележен је на локалитету Ораховац. Крај овог локалитета постоји већи број слатководних извора који се уливају у море, што знатно снижава салинитет, нарочито у зимским и у раним пролећним месецима. На овом локалитету је осим најнижег салинитета забележена и најнижа измерена температура морске воде и највиша измерена концентрација кисеоника у односу на све посматране локалитете. И крај неких других испитиваних узгајалишта постоје повремени слатководни токови, који се уливају у море. Највиши салинитет измерен је на локалитетима Кукуљина и Солила, која се налазе близу некадашњих сакупљалишта соли. Разлике у температури и рН вредности нису показале сигнификантност између локалитета/узгајалишта.

Број утврђених бактерија *Escherichia coli* и стрептокока фекалног порекла је у водама наших огледних локалитета, знатно варирао током испитивања. Највећи број утврђених *E. coli* је изолован у новембру 2014, а поред новембра квалитет воде ни у септембру ни у октобру није био задовољавајући. Међутим, због јако високих разлика у броју изолованих *E. coli* и стрептокока фекалног порекла (током више месеци нису изоловане из морске воде) није утврђена сигнификантна разлика у броју бактерија између локалитета. Ипак, уочљиво је да је број бактерија, нарочито у јесен 2014. године био знатно већи на локалитету Брбат у односу на локалитет Липци.

Mandić et al., (2012) у свом истраживању 2010–2011. године такође указују на колебања у броју *E. coli* и стрептокока фекалног порекла на овим, а и на осталим узгајалиштима медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*), при чему највећи број проналазе у децембру 2010. године (Липци). У летњим месецима, као и у нашем истраживању углавном нису изоловане ове бактеријске врсте.

Током испитиваног периода (септембар 2014. – август 2015) на узгајалиштима није забележен неуобичајани морталитет дагњи. За разлику од нас, *Robledo & Figueras (1995)* региструју морталитет између 8,3 – 29,6% у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) инфициране паразитом *Marteilia refringens*.

У нашем истраживању није било ни дагњи са макроскопски видљивим патолошким променама, нити је било макроскопски видљивих паразита.

Кондициони индекси медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) су варирали од месеца до месеца. Просечно индекс кондиције свих узоркованих дагњи са свих шест испитиваних локалитета/узгајалишта износио је 40,06%. Највиши индекс кондиције забележен је на локалитету Липци и износио је 43,77%, а најнижи је био на локалитету Солила 38,06%.

Индекси кондиције су варирали и по месецима. Највиши индекс кондиције свих дагњи је био у новембру и износио је високих 59,13%, а најнижи измерени индекс кондиције је био у августу и износио је 31,26%. Свеукупно најнижи индекс кондиције је забележен на локалитету Солила у августу и износио је 27,78%. Генерално, индекси кондиције су били нижи током летњих месеци, што се може објаснити мрешћењем које се код дагњи одиграва у летњем периоду године. Такође, током истраживања смо уочили да веће, односно масивније дагње имају и виши индекс кондиције. *Gombač, 2010*, наводи мање разлике у индексу кондиције по месецима, а бележи и знатно мањи кондициони индекс од 28,14%. Он такође уочава нижи индекс током летњих месеци, а бележи највећи индекс током зимских месеци и у мају. Виши индекс кондиције у Бококоторском заливу се вероватно може објаснити оптималним природним условима за узгој и развој медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) (*Joksimović et al, 2012*).

Нашим истраживањем утврдили смо први пут присуство *M. refringens* у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) која се узгаја у Црној Гори, односно у водама Бококоторског залива. Од шест испитиваних локалитета/узгајалишта *M. refringens* смо утврдили на четири. *M. refringens* је утврђена на локалитетима Ораховац, Брбат, Липци и Кукуљина. Географски посматрано *M.refringens* је

утврђена на северној (Ораховац, Брбат, Липци) и источној страни Бококоторског залива (Кукуљина), док је нисмо утврдили на западној страни залива (локалитет Света Неђеља). Пре нас у Јадрану је *M. refringens* већ утврђена у Италији (*Ceschia et al., 1992*), Хрватској (*Zrnčić et al., 2001*), Албанији (*Pellumb et al., 2006*) и Словенији (*Gombač, 2010*).

Од укупно 960 прегледаних медитеранских дагњи (*Mytilus galloprovincialis*), *M. refringens* је утврђена у дванаест огледних животиња. То је доста ниска преваленца и износи 1,25%. Ипак, знатно је виша од 0,3% укупно, односно 0,4% код узгојних дагњи, колико је утврђено у словеначком делу Јадранског мора (*Gombač, 2010*), али је и знатно нижа од осталих истраживања. Наиме, *Zrnčić et al. (2001)* у Хрватској бележе преваленцу од 5%, *Pellumb et al. (2006)* у Албанији бележе 19,3%. У Италији (*Ceschia et al., 1992*) је забележена највећа преваленца на Јадрану која је ишла и до 22,2%. У северној Бретањи, Француска преваленца мартелиозе је достигала и до 70% (*Auffret and Poder, 1983*). Ипак, у новијим истраживањима, у односу на ранија приметан је силазни тренд у преваленци мартелиозе у дагњи (*Serracca et al., 2014*). По испитиваним локалитетима/узгајалиштима преваленца је у нашем истраживању варирала и кретала се од 0% на локалитетима Солила и Света Неђеља, затим 0,55% на локалитету Брбат, 1,67% на локалитеу Липци, па до 3,33% на узгајалиштима Ораховац и Кукуљина. Ипак, и за последња два локалитета можемо рећи да имају ниску преваленцу мартелиозе.

Величина измерених утврђених мартелија је варирала и у пречнику је износила 15,18 μm до 29,36 μm . Просечна измерена величина је варирала и зависно од месеца, па је највиша била у новембру, 25,642 μm , а најнижа у септембру 21,394 μm и децембру 21,57 μm . Иако смо уочили и друге стадијуме, преовладавале су псеудоплазмодије (примарне ћелије) са споронтима, у којима су се налазиле споре. Величина спора у нашем истраживању је износила просечно 3,743 μm . Иначе, због броја ћерки ћелија и сталног раста цитоплазме примарне ћелије, величина *Marteilia refringens* може знатно да варира (*Berthe, 2004*). Тако *Gombač*

et al., (2014) бележи дужину пречника 13,3 – 21,8 μm а, уочавају и слободне споре у лумену тубула дигестивне жлезде (спорулација).

Поред цитолошких и хистолошких испитивања урађена су и молекуларна испитивања узорака медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) на присуство генома *Marteilia refringens*. Геном (ДНК) паразита *Marteilia refringens* је утврђен у дванаест случајева. Узорци дагњи где је утврђен геном *Marteilia refringens* су се у потпуности поклапали са мартелиоза позитивним узорцима из цитолошких и хистолошких испитивања.

Након визуелизације помоћу ултраљубичасте светлости били су видљиви бендови који су били мање или више јаки у зависности од количине PCR производа, односно од количине ДНК испитиване *Marteilia refringens*. Јасноћа, односно дебљина бенда се поклапала са интензитетом инфекције.

Анализирали смо затим RFLP методом по један позитиван узорак са сваког узгајалишта/локалитета, где смо утврдили присуство паразита (Ораховац, Брбат, Липци и Кукуљина). На основу добијених резултата утврдили смо да сва четири детектоване *Marteiliae refringens* одговарају М типу, пошто су садржале рестрикционе фрагменте од 157, 156, 68 и 31 базног пара. Фрагменти су у потпуности одговарали позитивној контроли за М генотип *Marteilia refringens*, а разликовали су се од позитивне контроле за О генотип *Marteilia refringens*. И други истраживачи везују за дагње присуство М генотипа, а О генотипа за остриге, премда је могуће у дагњама наћи и О тип и обрнуто (*Lopez-Flores et al.*, 2004, *Novoa et al.*, 2005, *Balseiro et al.*, 2007, *Arzul et al.*, 2013), а може доћи и до коинфекције паразитима оба типа. У Јадрану *Gombač, 2010*, утврђује само М генотип у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*). Неки аутори као *Comps (1982)*, су тврдили да дагњу инфицира различита врста од *Marteilia refringens* која је названа *Marteilia maurini*. Ипак каснији аутори на бази ултраструктурних карактеристика (*Longshaw, 2001*) и на бази секвенце мале субјединице рибозомалне ДНК (*Berthe et al, 2000*) утврђују да је реч само о једној врсти.

Да бисмо потврдили да је у питању М тип *Marteilia refringens*, извршили смо секвенцирање ITS-1 segmenta наших изолата ДНК *Marteilia refringens*. Радили смо секвенцирање 4 изолата, по један са сваког локалитета где смо утврдили њено присуство. *HhaI* рестрикциона места (GCGC) су коришћена да раздвоје М и О типове *Marteilia refringens*, при чему су она на слици обележена жутом бојом. На уравниању су обележена и пет дискриминативних места на позицијама нуклеотида 323, 344, 348, 349 и 353 (*Le Roux et al, 2001*)

Извршено је, такође, уравниање и поређење наших секвенци са секвенцама добијеним добијеним из *GenBank*. Међу осталима наше секвенце смо поредили и са пет секвенци из Јадранског мора (AB513427, DQ426553, DQ426550, JQ898013 и JQ898014). Све четири секвенце из наше студије, као и секвенце JQ898013, JQ898014, DQ426599, DQ426605, DQ426550, DQ426553, AB513427 и AJ629340 одговарају М профилу *Marteilia refringens*, (обележене плавом бојом) док су секвенце DQ426583, DQ426595, DQ426626 и AJ629337, одговарале О профилу *Marteilia refringens* (обележене црвеном бојом). Тиме смо и методом секвенцирања потврдили претходне резултате RFLP методе.

Посматрањем секвенци добијених из нашег истраживања уочава се генетска идентичност наших изолата, при чему сва четири изолата показују идентичну секвенцу. Поређењем наших секвенци са секвенцама добијеним из *GenBank*, утврдили смо идентичност наше секвенце са секвенцама добијеним од изолата из Јадранског мора. Од пет поређених изолата из Јадрана наше секвенце су идентичне са четири, док се од пете секвенце разликују само у једном нуклеотиду. И остале секвенце М типа *Marteilia refringens* показују сличност са добијеним секвенцама из нашег истраживања, при чему показују разлику у не више од два нуклеотида. Разлике са секвенцама О типа *Marteilia refringens* су значајније.

Интензитет инфекције дагњи варира у нашем истраживању, при чему смо у једној трећини позитивних узорака утврдили ниску инвадираност (10%) инфицираних тубула, у другој средњу инвадираност (70-80% инфицираних тубула) и у трећој трећини високу инвадираност (готово сви инфицирани тубули). И *Gombač 2010*, налази значајне разлике у степену инвадираност мартелија позитивних узорака

медитеранске дагње. Он наводи у једној четвртини позитивних узорака инфицираност од око 10% дигестивних тубула, у другој четвртини инфицираност дигестивних тубула од готово 90%, а у половини мартелиоза позитивних дагњи налази све инфициране тубуле.

У везиву дигестивне жлезде инфицираних дагњи утврђеним у нашем истраживању бележимо благе до умерене хемоцитне инфилтрације. *Carballal et al. (1998)* су установили да инфекција дагње паразитом *M.refringens* може изазвати значајне хемоцитне инфилтрације у везивном ткиву, што у нашем истраживању нисмо забележили. Ово је важно истаћи с обзиром на то да хемоцити у циркулацији могу успорити или чак стопирати инфекцију мартелиозе (*Carballal et al., 1998*). *Gombač (2010)* наводи и промене на епителу дигестивних каналића и појединачних некротичних тубула у свим инфицираним дагњама. *Robledo & Figueras (1995)* наводе да секундарни дигестивни каналићи дагњи теже заражених мартелијом у стадијуму спорангиосоруса (плазмодијума) могу бити тотално уништени, када се развојни облици овог стадијума почну отпуштати у лумен дигестивних тубула.

Начин преношења паразита *Marteilia refringens* и даље је недовољно јасан. *Audemard et al. (2002)* и *Boyer et al. (2013)* тврде да зоопланктонска копепода *Paracartia grani* игра важну улогу у преношењу *Marteiliae refringens*. *Carrasco et al. (2007b)* сугерише да су потенцијални преносиоци *Marteiliae refringens* још неке врсте копепода као што су: *Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica*, *Euterpina acutifrons*, *Oithona spp.* и вероватно ларвени стадијум рачића *Portumnus spp.* Испитивањем зоопланктонских копепода *Pestorić (2013)* у Бококоторском заливу од наведених детектује следеће врсте: *Oithona nana* са заступљеношћу од 32,34%, *Acartia clausi* (11,74%), *Euterpina acutifrons* (6,52%), *Oithona similis* (1,78%) и *Oithona plumifera* (0,07%). У истраживању није детектована врста *Paracartia grani*. *Arzul et al. (2013)* наводе и врсту *Paracartia latisedosa*, која је методом хибридизације *in-situ* била позитивна на присуство паразита *Marteilia refringens*, али *Pestorić (2013)* у Бококоторском заливу не детектује ни ову врсту. До данас, истраживања зоопланктона на присуство паразита *Marteilia refringens* у Црној Гори није рађено.

Потврдили смо и у нашем истраживању да утицај појаве мартелиозе на кондициони индекс дагњи постоји. Вршили смо поређење индекса кондиције здравих дагњи и инфицираних животиња током месеци када је утврђена мартелиоза на инфицираним узгајалиштима. Утврдили смо статистички да постоје значајне разлике у индексу кондиције код инфицираних и здравих животиња на узгајалиштима/месецима која су инфицирана паразитом *Marteilia refringens*. Просечан кондициони индекс инфицираних животиња је износио 37,0675%, а индекс кондиције здравих у исто време је износио 40,195%. Анализом варијансе смо доказали да је кондициони индекс заражених животиња нижи него кондициони индекс здравих животиња на узгајалиштима где је утврђена мартелиоза, односно да су, уз ризик грешке од 5%, разлике између ових вредности сигнификантне. И други аутори утврђују разлике у индексу кондиције између болесних и здравих дагњи. *Rayuan et al. (2006)*, такође бележе да је кондициони индекс болесних животиња знатно нижи од индекса кондиције здравих дагњи на истом узгајалишту. *Figueras et al. (1991)* пак наводи да само теже инфестације доводе до губитка индекса кондиције у дагњи.

Испитивали смо затим утицај удаљености узгајалишта од обале са појавом и преваленцом мартелије у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*). У нашем истраживању виша је преваленца мартелиозе у узгајалиштима која се налазе ближе обали. Тако на узгајалишту Ораховац налазимо највећи проценат инфицираних животиња, а на узгајалишту Солила, које је најудаљеније од обале, нисмо утврдили мартелијом инфициране дагње. И мада наши резултати не показује статистичку сигнификантност (корелација износи -0,46), а што се дешава због малог броја утврђених мартелија, постоји тренд пада преваленце мартелиозе са удаљеношћу од обале. *Robledo & Figueras (1995)* сугеришу да је појава и преваленца мартелиозе знатно интензивнија у близини обале и да опада са удаљеношћу узгајалишта од обале. На отвореном мору је значајно ређе појављивање ове болести у односу на обалне зоне (*Grizel, 1985*).

У односу на период године мартелиозу бележимо у периоду између септембра и децембра и у марту месецу. Ранија истраживања детектују паразита *Marteilia*

refringens у различитим периодима године. Тако *Ceschia* (1992) у Италији бележи појаву ове болести у априлу и између јуна и септембра. У Шпанији *Marteilia refringens* је утврђена од фебруара до октобра (*Carrasco et al., 2007b*), у Грчкој од маја до новембра (*Photis et al., 1997*), у Хрватској се бележи у августу (*Zrnčić et al., 2001*), у Словенији од децембра до фебруара и у августу (*Gombač, 2010*), а у Албанији у априлу (*Pellumb et al., 2006*). Период године када је утврђена мартелиоза у дагњи у Црној Гори, знатно се разликује од већине пређашњих истраживања, где се мартелиоза бележи највише у летњим месецима. Ипак, еколошки фактори могу знатно варирати и током истог перида.

Централна тема нашег истраживања била је утицај еколошких фактора морске воде, као што су температура, салинитет, концентрација кисеоника, рН вредност и других на појаву *Marteilia refringens* у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Почев од септембра 2014. године закључно са августом 2015. пратили смо утицај набројаних фактора на појаву и преваленцу мартелиозе. У последња четири месеца 2014. смо мерили и количину нитрата у морској води на посматраним локалитетима/узгајалиштима.

Статистичким анализама нисмо утврдили утицај температуре на појаву и преваленцу мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Најнижа температура када је утврђена мартелиоза на неком узгајалишту износила је 11,2°C и измерана је на локалитету Ораховац у марту 2015. године, а највиша је износила 22°C и измерена је на локалитету Кукуљина у октобру 2014. Просечна температура на инфицираним узгајалиштима током месеци када је утврђена мартелиоза износила је 16,52°C, уз стандардну девијацију од 3,618. Просечна температура на свим узгајалиштима током дванаестомесечног периода посматрања износила је 17,879°C. Неки аутори сматрају да је за развој, спорулацију и инвазивност *Marteilia refringens* потребна температуре воде више од 17°C (*Carrasco et al., 2008, Audemard et al., 2001*). *Grizel* (1985) пак минималну температуру морске воде потребну за развој мартелије спушта на 12°C. *Gombač, (2010)* бележи мартелиозу и на нижим температурама (око 10°C), док *Villalba (1993a)* уочава да инфекција у дагњи перзистира током читаве године са највећим

процентом током летних месеци. Ипак, динамика појаве *Marteilia refringens* у Бококоторском заливу је доста специфична, с обзиром да током пет узастопних испитиваних месеци (од априла до августа 2015) нисмо утврдили ниједну инфицирану животињу. У водама Јадрана слична је ситуација и у словеначким водама, где је *Marteilia refringens* утврђена током зимских месеци (децембар, јануар, фебруар), па затим у августу (Gombač, 2010), док су рецимо истраживања у Хрватској и Албанији рађена само у одређеном периоду године.

Слично температури ни салинитет на нашим огледним локалитетима није статистички значајно утицао на појаву мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Анализирали смо и поредили вредности салинитета на узгајалиштима када је утврђена мартелиоза са вредностима када није утврђена. Просечан годишњи салинитет на шест испитиваних узгајалишта износио је 25,876‰, док је на узгајалиштима са утврђеним инфицираним животињама у месецима када је утврђена мартелиоза износио 23,556‰, а на узгајалиштима где, односно када није утврђена мартелиоза је износила 26,21‰. Установљене међусобне разлике у салинитету по узгајалиштима нису статистички значајне. Стандардна девијација за салинитет на комплетном узорку је била јако висока, износила је 9,804, што показује велике разлике међу испитиваним узгајалиштима. Највећи проценат инфицираних животиња пронађен је на узгајалиштима са најнижим и највишим салинитетом (Ораховац и Кукуљина). Најнижи салинитет када је утврђена појава мартелиозе био је на узгајалишту Ораховац у марту 2015. године и износио је свега 7,2‰, а највиши на локалитету Кукуљина у октобру 2014. када је износио 36‰. Те вредности представљају једне од најнижих и највиших вредности салинитета која су измерена на узгајалиштима. Ceschia (1992) сматра да и салинитет утиче на појаву мартелиозе, тако што повећани салинитет инхибира појаву болести. Ипак, ми не можемо са сигурношћу тврдити да салинитет нема утицај на појаву мартелиозе јер су наше измерене вредности испод просечне вредности салинитета за јужни Јадран, која износи 38,6‰ (Artegiani et al., 1997).

Статистички је утврђено да постоји утицај концентрације кисеоника на појаву мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Анализирали смо и поредили вредности концентрације кисеоника на узгајалиштима када је утврђена мартелиоза са вредностима када није утврђена мартелиоза. Укупна измерена просечна вредност на свим узгајалиштима/локалитетима је била 7,399 mg/l уз стандардну девијацију од 1,654. У случајевима када нисмо утврдили појаву мартелиозе измерена је концентрација кисеоника од 7,233, а у случајевима када је утврђена мартелиоза износила је 8,277 mg/l. Методом анализе варијансе смо израчунали да постоје статистички значајне разлике између ова два третмана. Уз ризик грешке од 10% смо показали да је већа вероватноћа појављивања мартелиозе у случајевима више концентрација кисеоника у морској води. Мали број аутора је посматрао утицај овог фактора на појаву мартелиозе изазване паразитом *Marteilia refringens* код дагњи. Једино *Gombač, 2010*, прати тај еколошки фактор, али услед јако ниске преваленце мартелиозе не изводи закључке.

Од свих испитиваних еколошких фактора показало се да највиши утицај на појаву *Marteiliae refringens* у дагњи има рН вредност. рН вредност је на испитиваним узгајалиштима најмање варијала. Просечна рН на испитиваним локалитетима је износила 8,153, уз стандардну девијацију од 0,069. На локалитетима на којима је и у време када је изолована *Marteilia refringens* рН је износила 8,1, а у случајевима када није утврђена мартелиоза 8,161. Методом анализе варијансе утврдили смо да разлика између ових третмана постоји (уз минимални ризик грешке од нешто више од 1%). По добијеним резултатима из нашег истраживања можемо закључити да се појава паразита *Marteilia refringens* може повезати са смањеном рН вредношћу, односно да са смањењем рН постоји већа вероватноћа појаве мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). У литературним подацима нисмо пронашли истраживања утицаја рН вредности морске воде на појаву мартелиозе. Иако разлике између третмана делују мале, колебања тог еколошког фактора су на нивоу године јако мала, као и разлике рН вредности између узгајалишта, па стога и закључујемо да и мале промене овог фактора могу знатно утицати на појаву паразита *Marteilia refringens* у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*).

Током прва четири месеца испитивања (од септембра до децембра 2014) испитивали смо и утицај нитрата на појаву мартелиозе (због техничких недостатака нисмо могли завршити испитивања до краја године), ра због кратког временског периода испитивања нисмо могли утврђивати утицај тог фактора на појаву *Marteilia refringens* у дагњи.

Покушали смо да установимо да ли бактерија *Escherichia coli* и стрептококе фекалног порекла утичу на појаву *Marteilia refringens* у дагњи. У том циљу пратили смо број бактерија на два узгајалишта/локалитета: Брбат и Липци. Број бактерија је јако варирао на испитивана два узгајалишта. Број бактерије *Escherichia coli* је варирао зависно од месеца испитивања и кретао се од 0 до 4.900 (стандардна девијација 594,42), а број стрептокока фекалног порекла од 0 до 400 (стандардна девијација 55,42). Статистички значајна разлика између третмана није могла бити утврђена јер је од 24 испитивана узорковања (по 12 Брбат и Липци), *Marteilia refringens* утврђена само током три узорковања, што је било недовољно за даљу анализу. Ипак, запажамо да је сваки пут када је утврђена *Marteilia refringens*, било утврђено присуство бактерија (*Escherichia coli* два пута, а стрептококе фекалног порекла сва три пута). У литератури нисмо наишли на истраживања о утицају бактерија у морској води на појаву мартелиозе у дагњи.

7. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата испитивања извршених у оквиру ове дисертације могу се извести следећи закључци:

1. Доказано је присуство паразита *Marteilia refringens* у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*), која се узгаја на територији Бококоторског залива.

2. Укупна преваленца *Marteilia refringens* код испитиваних медитеранских дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) је током спроведеног истраживања износила 1,25%.

3. Преваленца на испитиваним узгајалиштима је варијала. Кретала се од 0% на два испитивана узгајалишта/локалитета (Солила и Света Неђеља), затим 0,56% на локалитету Брбат, 1,67% на локалитету Липци, до 3,33% на локалитетима Ораховац и Кукуљина.

4. Утврђен је утицај паразита *Marteilia refringens* на индекс кондиције медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*). Анализом варијансе и F-тестом су утврђене разлике између индекса кондиције инфицираних животиња и индекса кондиције здравих животиња на инфицираним узгајалиштима. Статистички је доказано да индекс кондиције инфицираних животиња одударе (нижи је) од индекса кондиције здравих животиња.

5. *Marteilia refringens* изолована из медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*) гајене у Црној Гори припада М генотипу *Marteilia refringens*.

6. На основу секвенцирања ITS-1 сегмента утврђена је филогенетска блискост, односно идентичност наших изолата *Marteiliae refringens* са другим изолатима добијеним из Јадранског мора.

7. *Marteilia refringens* је утврђена у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*) у периоду од септембра до децембра и у марту месецу. Током осталих месеци нисмо утврдили њено присуство у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*).

8. Није утврђен утицај температуре на појаву паразита *Marteilia refringens* у медитеранској дагњи (*Mytilus galloprovincialis*). Најнижа температура при којој је утврђено присуство *Marteiliae refringens* је износила 11,2°C, а највиша 22°C.
9. Није утврђен утицај салинитета на појаву мартелиозе у медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*).
10. Статистички је доказан утицај концентрације кисеоника на појаву мартелиозе.
11. Статистички је доказан значајан утицај рН вредности морске воде на појаву мартелиозе дагњи.
12. Статистички није доказан утицај повећаног броја бактерија (*Escherichia coli* и стрептокока фекалног порекла) на појаву мартелиозе медитеранске дагње (*Mytilus galloprovincialis*).

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Alderman D.J.(1979): Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe, *Mar.Fish.Rev.*41, 67-69
2. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang j, Zhang Z, Miler W, Lipman D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs., *Nucleic Acid Res*, 25, 3389-3402
3. Arzul I, Chollet B, Boyer S, Bonet D, Gaillard J, Baldi Y, Robert M, Joly J.A.P. (2013): Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*, *Parasitology* 141(02) 1-14
4. Audemard C, Barnaud A, Collins CM et al (2001): Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives, *J Exp Mar Biol Ecol* 257: 87-108.
5. Audemard C, Le Roux F, Barnaud A et al. (2002): Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology* 124: 315-23.
6. Artegiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F., & Russo, A. (1997a): The Adriatic Sea general circulation. Part I: Air–sea interactions and water mass structure. *Journal of Physical Oceanography*, 27, 1492–1514.
7. Auffret M, Poder M (1983): Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les cotes de Bretagne nord. (Studies on *Marteilia maurini*, parasite of *Mytilus edulis* from the north coasts of Brittany). *Rev Trav Inst Pêches Marit* 47: 105-9.
8. Balseiro P, Montes A, Ceschia G, Gestal C, Novoa B, Figueras A.(2007) Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M.edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update,Bull. Eur.Ass.Fish Pathology 27,, 148-156
9. Barsotti G, Meluzzi C (1968): Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck (A proposito dei *Mytilus* di Viserbella, Rimini). *Conchiglie*, 4, 50–58.
10. Berthe FCJ, Pernas M, Zerabib M, Haffner P, Thébault A, Figueras AJ (1998): Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. *Dis Aquat Org* 34: 135-44.

11. Berthe FCJ, Le Roux F, Peyretailade E et al. (2000): Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). *J. Eukaryot Microbiol.* 47: 288-93.
12. Berthe FCJ, Le Roux F, Adlard RD, Figueras A (2004): Marteiliosis in molluscs: a review, *Aquat Living Resour* 17: 433-48.
13. Boucaud-Camou E, Henry M (2003): The digestive system. In: Grizel H, eds. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. *Plouzane: Editions Ifremer*, 65-116.
14. Bower SM, McGladdery SE (2007): Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Marteilia refringens/maurini* of mussels
<http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/mrmaurmu-eng.htm> (17. 12. 2009)
15. Boyer S, Chollet B, Bonet D, Arzul I (2013): New evidence for the involvement of *Paracartia grani* (Copepoda, Calanoida) in the life cycle of *Marteilia refringens* (Paramyxea), *Int. Journal for Parasitology* 43, 1089-1099
16. Braby C, Somero G. (2006): Following the heart: Temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*), *Journal of experimental biology*, 209, 2554-66
17. Caceres-Martinez J, Figueras A. (1998): Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck) colonization on artificial substrates in the Ria de Vigo of NW Spain, *Journal of Shellfish Research* 17: 153-157 (1998)
18. Camacho A, Villalba A, Beiras R, Labarta U. (1997): Absorbtion efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* LINNAEUS) of Galicia (NW Spain) infected by *Marteilia refringens* (Grizel et al) and *Mytilicola intestinalis* (Steven). *J. Shellfish Res* 16, 77-82
19. Cano A., Escobar J., Bozinovic F., Navarrete S., Castilla J.C. (2014): Phenotip variability in byssus thread production of intertidal mussels induced by predators with different feeding strategies. *Mar. Ecology Progress Series*, 372, 127-134
20. Carballal MJ, Villalba A, López C (1998): Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonad development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus edulis*. *J. Invertebr Pathol* 72: 304-12.
21. Carella F, Aceto S, Marrone R, Maiolino P, De Vico G (2010): *Marteilia refringens* infection in cultured and natural beds of mussels (*Mytilus*

galloprovincialis) along the Campanian coast (Tirrenian sea, South of Italy), *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 30(5) 2010, 189

22. Carrasco N, Arzul I, Furonés D et al. (2005): Comparative experimental infection of *Marteilia* spp. from mussels and oysters in the copepod *Paracartia grani*. In: 12th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Copenhagen, Denmark, 206 str.
23. Carrasco N, Lopez-Flores I, Alcaraz M, Furonés MD, Berthe FCJ, Arzul I (2007a): First record of a *Marteilia* parasite (Paramyxia) in zooplankton populations from a natural estuarine environment, *Aquaculture* 269: 63-70.
24. Carrasco N, Lopez-Flores I, Alcaraz M, Furonés MD, Berthe FC, Arzul I (2007b). Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxia) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology* 134: 1541-50.
25. Carrasco N, Arzul I, Berthe F, Fernández M, Dufort M, Furonés D (2008): "Delta de l'Ebre" as a natural Bay model for *Marteilia* spp. (Paramyxia) dynamics and life cycle studies, *Dis Aquat Org* 79: 65-73.
26. Carrasco N, Andree K, Lacuesta B, Roque A, Rodgers C · Furonés D (2012) Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast A new *Marteilia* species affecting bivalves in Europe?, *Aquaculture* 324-325, 20-26
27. Carrasco N, Green T, Itoh N (2015): *Marteilia* spp. parasites in bivalves: A revision of recent studies, *Journal of Invertebrate Pathology* 131: 43-57
28. Cavalier –Smith, T & Chao, E.E-Y (2003): Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154 (3-4), 341-358
29. Ceschia G, Mion A, Orel G, Giorgetti G (1992): Indagine parassitologica delle mitilicoltura del Friuli-Venezia Giulia (Nord-Est Italia), *Boll Soc Ital Patol Ittica* 9: 24-36.
30. Chollet B, Arzul I, Garcia C, Berthe F (2003): Ciliates. In: Histology and anatomopathology of molluscs: a guide for diagnosticians. La Tremblade: Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 22.
31. Comps M. (1970): Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes, *Rev Trav. Ins. Pêches Marit* 34, 317-326

32. Comps M, Grizel H, Tige G, Dutholt J.L. (1975): Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L., et *Cardium edule*, *Comp Rendus Acad Sci. Paris Ser D281*, 179-181
33. Comps M, Joly J-P (1980): Contamination expérimentale de *Mytilus galloprovincialis* Lmk par *Marteilia refringens*. *Sci Pêche* 301: 19-21.
34. Comps, M., Y. Pichot and P. Papagianni. (1981): Research on *Marteilia maurini* n. sp. parasite of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 45: 211-214. (In French, with English summary).
35. Comps M, Pichot Y, Papagianni P (1982): Research on *Marteilia maurini* n. sp. parasite of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Rev Trav Instit Pêches Marit* 45: 211-4.
36. Dardignac-Corbel, M.J. (1990): Traditional mussel culture, In: *Aquaculture Vol. I*, D. G. Barnabe, (Ed.), Ellis Horwood Chichester, pp 284–341.
37. Desportes I. (1981): Étude ultrastructurale de la sporulation de *Paramyxa paradoxa* Chatton (Paramyxida) parasite de l'Annelide Polychète *Poecilochaetus serpens*. *Protistologica* 17: 365-386
38. DerMap Project Report (2011): Satellite Spectral Analyses of the Bay of Kotor, Montenegro 2010-2011: 1-94.
39. Desportes I., Perkins F. (1990): Phylum Paramyxia. In: *Handbook of Protozoa* (Eds. L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, D. J. Chapman). *Jones and Bartlett Publishers, Boston*, 30-35
40. http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_MWS75135&res=640&mobile=1
41. Elgharsalli R, Aloui-Bejaoui N, Salah H, Chollet B, Joly J.P, Robert M, Couraleau Y, Arzul I (2012): Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, *Journal of Invertebrate Pathology*, 175-183
42. www.eurl-mollusc.eu , poslednji put pregledano u aprilu 2016
43. Fantuzzi N (2005): *Importanza della diagnosi istopatologica nei molluschi bivalve marini*. Bologna: Medicina Veterinaria Università degli Studi di Bologna. Dottorska disertacija
44. Feist S.W, Hine P.M, Bateman K.S, Stentiford G, Longshaw M (2009): *Paramartellia canceri* sp. n. (Cercozoa) in the European edible crab (Cancer

pagurus) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911, *Folia parasitologica* 56,73-85

45. Figueras AJ, Jardon CF, Caldas JR (1991): Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture* 99: 17-33.
46. Fuentes J, Villalba A, Zapata C, Alvarez G (1995): Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain), *Dis Aquat Org* 21: 221-6.
47. Fuentes J, Molares J, Villalba A (1998): Growth, mortality and parasitization of mussels cultivated in the Ria de Arousa (NW Spain) from two sources of seed: intertidal rocky shore vs. collector ropes, *Aquaculture* 162: 231-40.
48. Fuentes J, López JL, Mosquera E, Vázquez J, Villalba A, Alvarez G (2002): Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ria de Arousa (NW of Spain), *Aquaculture* 213: 233-1.
49. Garcia C, Arzul I, Robert M et al. (2009): Detection of atypical *Marteilia refringens* in mussels, *Mytilus edulis* in France. *J Shellfish Res* 28: 688.
50. Gombač M. (2010): Protozoan infestation dynamics and occurrence occurrence of neoplasias in digestive gland of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Slovene sea in correlation with sea temperature, salinity and oxygenation, Doctoral Thesis, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta 1-159
51. Gombač M, Kušar D, Očepek M, Pogačnik M, Arzul I, Couraleau Y, Jenčič V. (2014): Marteiliosis in mussels: A rare disease?, *Journal of Fish Diseases* 37 (9)
52. Gosling (1981): Ecological Genetics of the Mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on Irish Coasts, marine ecology progress series, Vol 4, 221-227
53. Gosling E (2004): Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Oxford: *Blackwell Publishing*, 7-43.
54. Grizel H, Comps M, Bonami JR, Cousserans F, Duthoit JL, Le Pennec MA (1974): Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sci Pêche* 240: 7-29.

55. Grizel H (1985): Étude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Montpellier: Universe Sciences et Techniques du Languedoc. Doktorska disertacija.
56. Grizel H, Besnard-Cochennec N, Auffret M (2003). The hemocytes. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzane: Editions Ifremer, 131-44.
57. Grijalva-Chon J.M, Castro-Longoria R, Enriquez-Espinoza T.L, Maeda-Martinez A.N., Mendoza-cano F.(2015): Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California, *Lat.Am.J.Aquat.Res.* 43, 776-780
58. Gustafson L.L, Stoskopf M.K, Bogan A.E, Showers W, Kwak T.J, Hanlon S, Levine JF.(2005): Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: Unionidae), *Diseases of Aquatic organisms*, 65, 159-165
59. Herrbach, B. (1971): Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*. 35: 79-87. (In French)
60. Green A. (IUCN/SSC* *Invasive Species Specialist Group*) (2014): Invasive species report, http://depts.washington.edu/oldenlab/wordpress/wp-content/uploads/2015/09/Mytilus_galloprovincialis_Green_2014.pdf
61. Jabbour-Zahab R, Blanc F, Grizel H (2003): The mantle. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzane: Editions Ifremer, 11-34.
62. Joksimović D., Pestorić B. (2012): The quality of sea water on the farms in the Boka Kotor bay, Montenegro, Balwois 2012, Ohrid, Republic of Macedonia
63. Karagiannis D, Angelidis P. (2007). Infection of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* by the protozoan *Marteilia* sp. in the Thermaikos Gulf (N Greece). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 27: 131-141.
64. www.kartacrnogore.com, poslednji put pregledano u aprilu 2016
65. Kleeman SN, Le Roux F, Berthe F, Adlard RD (2002). Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology* 125: 131-41.

66. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.(2007): Clustal W and Clustal Xversion 2.0, *Bioinformatics* 23, 2497-2498
67. Le Pennec M, Barille L, Grizel H (2003): The gills. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzane: Editions Ifremer, 35-52.
68. Le Pennec M, Grizel H, Barille L (2003): The labial palps. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzane: Editions Ifremer, 53-64.
69. Le Pennec M, Grizel H (2003). The cardio-vascular system. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. 1st ed. Plouzane: Editions Ifremer, 117-30.
70. Le Roux F, Audemard C, Barnaud A, Berthe F (1999): DNA Probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar Biotechnol* 1: 588-97.
71. Le Roux F, Lorenzo G, Peyret P et al. (2001): Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J Eukaryot Microbiol* 48: 449-54.
72. Longshaw M, Feist SW, Matthews RA, Figueras A (2001): Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis Aquat Org* 44: 137-42.
73. López-Flores I, Robles F, Valencia J.M, Grau A, Villalba A, de la Herran R, Garido-Ramos M.A., Ruiz-Rejon C, Ruiz-Rejon M, Navas J.I. (2008a): Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridization in *Chamelea galina* from Balearic Islads (Spain), *Dis. Aquatic Organisms* 82, 79-87
74. López-Flores I, De la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Navas JI, Ruiz Rejón M (2004): The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129: 411-19.
75. López-Sanmartín M, Batista F, Marin M , Garrido I, Quintero D, Grade A, Ruano F, Herran R · Navas J(2015): Detection of *Marteilia refringens* infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* and the dwarf oyster *Ostrea stentina* in southern Portugal and Spain, 2015, *Journal of Invertebrate Pathology*
76. Luber P, Mathieu M (2003): The neurosecretory cells. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. 1st ed. Plouzane: Editions Ifremer, 157-68.

77. Magaš D. (2002): Natural-geographic characteristics of Boka Kotorska area as the basis of development, *Geoadria* 7, 51-81
78. Mandić M, Huter A, Joksimović D, Drakulović D, Mandić S. (2012): Water quality analysis on mussel farms (*Mytilus galloprovincialis*) in the Boka kotorska bay, Montenegro, *Agriculture and Forestry* 54, 75-94
79. Mandić, S., Regner, D., Regner, S., Joksimović, A., Kljajić, Z. & Gojković, M. (2001): Elaborat: Istraživanje, korišćenje, i zaštita litoralnog područja Južnog Jadrana. Institut za biologiju mora, Kotor. Projekat OSI-267. Završni izvještaj: 1-94.
80. Martin A.G. (1993): Relance de l'huitre plate – Rapport d'avancement des travaux année 1991. Rapport Ifremer. RIDRV-93.026 RA/Trinité, pp 40.
81. Mengoli A (1998): Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Laguna* 4: 12-9.
82. Ministarstvo turizma i zaštite životne sredine (2009): Nacionalna strategija biodiverziteta sa Akcionim planom za period 2009-2014. godine, <http://www.gov.me/files/1244447058.pdf>
83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
84. Novoa B, Posada D, Figueras A (2005): Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J Fish Dis* 28: 331-8.
85. OIE (2012). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 4th ed. Paris: Office International des Épizooties, 331-41.
86. Pagad S (2006). *Mytilus galloprovincialis* (mollusc) The global invasive species database. Auckland: Invasive species specialist group. (9th May 2006) <http://www.issg.org/database/species/ecology>. (17. 12. 2009)
87. Pascual, S., A. Villalba, E. Abollo, M. Garci, A.F. González, M. Nombela, D. Posada and A. Guerra (2010): The mussel *Xenostrobus securis*: a well-established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions* 12: 2091-2103.
88. Pëllumb A, Ceschia G, Kapllan S (2006): First report of Marteiliosis in *Mytilus galloprovincialis* in Albania. *Ittiopatologia* 3: 47-52.

89. Pekala A, Padzior E (2012): Marteilliosis of oysters an invasive disease of molluscs, *Medycina weterynaryjna* 68, 728-731
90. Perkins F.O, Wolf P.H. (1976): Fine structure of *Marteilia sydneyensis* haplosporidian pathogen of Australian oysters, *J. Parasitol.* 62, 528-548
91. Perkins FO (2005): Parasite morphology, strategy and evolution. Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. *Am Fish Soc Spec Publ* 18: 93-111.
92. Pernas M, Novoa B, Tafalla C, Figueras A (2000): Efficiency of different monoclonal antibodies in immunological assays developed for the detection of *Marteilia* sp. isolated from *Mytilus galloprovincialis*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 20: 193-8.
93. Pestorić B. (2013): Dinamika zajednica zooplanktona u Bokokotorskom zalivu, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, doktorska disertacija.
94. Photis G, Kyriazi-Papadopoulou A, Pneumatikatos I, Kaldrymidou E, Kanakoudis G (1997): Preliminary study of the protozoan *Marteilia* sp. as a cause of mussel death (*Mytilus galloprovincialis*) of the Thermaikos Gulf-Thessaloniki. *Bull Hellenic Vet Med Soc* 48: 121-5.
95. Rayyan A, Damianidis P, Antoniadou C, Chintiroglou CC (2006): Protozoan parasites in cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (north Aegean Sea, Greece). *Dis Aquat Org* 70: 251-4.
96. Regner, D., Vuksanović, N., Dutina, M., Stjepčević, B. & Šestović, K. (1998): Kvalitet mora i stepen zagađenja priobalnog južnog Jadrana. *Jugoslovenska Akademija Znanosti i Umjetnosti*: 27-46.
97. Regoli F, Orlando F. (1993): *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Sci total Environ. (Suppl)* 2, 1983-1992
98. Renault T (1996): Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 15: 551-61.
99. Robledo JAF, Caceres-Martinez J, Figueras A (1994): *Marteilia refringens* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) beds in Spain. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 14: 61-3.

100. Robledo JAF, Figueras A (1995): The effect of culture-site, depth, season, and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from Galicia, Spain. *J Parasitol* 82: 354-63.
101. Rosen MD, Stasek CR & Hermans CO (1978): The ultrastructure and evolutionary significance of the cerebral ocelli of *mytilus edulis*, the bay mussel, *Veliger* 21.10-18
102. Serracca L., Prearo M, Rossini I, Battistini R , Corsi M, Ercolini C (2014): Four-Year Surveillance of *Marteilia refringens* in Shellfish Farms in the Gulf of La Spezia (Liguria, Italy), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*
103. Stjepčević J., Stjepčević B (1974): Prilog proučavanju parazitne faune kod dagnji i kamenica u Bokokotorskom zalivu, *Glasnik Republičkog zavoda zaštite prirode – Prirodnjačkog muzeja Titograd*, 77-95
104. Stjepčević J., Stjepčević B, Mandić S (1976): Novi predstavnici parazitne faune kod dagwe (*Mytilus galloprovincialis* LAMK.) i obične pljosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) u eksperimentalnim gajilištima Bokokotorskog zaliva, *Crnogorska akademija nauka i umjetnosti* 357-368
105. Strategija razvoja ribarstva Crne Gore, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Crne Gore, 2006
106. Strategija ribarstva Crne Gore 2015-2020 (2015), Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja, Crna Gora
107. Thielley M, Grizel H (2003): Reproductive organs and gametogenesis. In: Grizel H, ed. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzane: Editions Ifremer, 169-200.
108. Tiscar PG, Tempesta M, Compagnucci M (1993): Peroxidase conjugated polyclonal antibody against *Marteilia* sp. purified from infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk) cultivated in Apulia, southern Italy. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 13: 53-5.
109. Tušnik P (1985): Raziskovanje bioloških in eko-fizioloških značilnosti školjk *Mytilus galloprovincialis* Lamarc gojenih v čistem in onesnaženem okolju. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, VTOZD za biologijo. Doktorska disertacija.

110. Van Banning P (1979): Haplosporidian diseases of imported oysters *Ostrea edulis*, in Dutch Estuaries. *Mar Fish Rev* 41: 8-18.
111. Villalba A (1995): Gametogenic cycle of cultured mussel , *Mytilus galloprovincialis* in bay of Galicia, *Aquaculture* 130. 269-277
112. Villalba A, Mourelle SG, López MC, Carballal MJ, Azevedo C (1993a): Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Aetiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis Aquat Org* 116: 61-72.
113. Villalba A, Mourelle SG, Carballal MJ, López MC (1993b): Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Org* 17: 205-13.
114. Villalba A, Mourelle SG, Carballal MJ, López C (1997): Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Org* 31: 127-39.
115. Virvilis C, Angelidis P, Photis G (2003): Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos Gulf in northern Greece. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 23: 157-61.
116. Virvilis C, Angelidis P. (2006): Presence of the parasite *Marteilia* sp. In the flat oysters (*Ostrea edulis* L) in Greece , *Aquaculture* 259, 1-5
117. Zrnčić S, Le Roux F, Oraić D, Šoštarić B, Berthe FCJ (2001): First record of *Marteilia* sp. in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. *Dis Aquat Org* 44: 143-8.