

# Hranidba europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*, L. 1758) u zatvorenom recirkulacijskom sustavu s ciljem povećanja indeksa kondicije

---

Brkić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zadar / Sveučilište u Zadru**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:162:249856>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Sveučilište u Zadru  
Universitas Studiorum  
Jadertina | 1396 | 2002 |

Repository / Repozitorij:

[University of Zadar Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

Sveučilišni diplomski studij

Održivo upravljanje vodenim ekosustavima



**Marija Brkić**

**Hranidba europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*, L. 1758) u zatvorenom recirkulacijskom sustavu s ciljem povećanja indeksa kondicije**

**Diplomski rad**

Zadar, 2024.

Sveučilište u Zadru  
Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu  
Sveučilišni diplomski studij  
Održivo upravljanje vodenim ekosustavima

Hranidba europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*, L. 1758) u zatvorenom recirkulacijskom sustavu s ciljem povećanja indeksa kondicije

Diplomski rad

Student/ica:  
Marija Brkić

Mentor/ica:  
izv. prof. dr. sc. Lav Bavčević

Komentor/ica:  
izv. prof. dr. sc. Ivan Župan

Zadar, 2024.



## Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, **Marija Brkić**, ovime izjavljujem da je moj **diplomski** rad pod naslovom **Hranidba europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*, L. 1758) u zatvorenom recirkulacijskom sustavu s ciljem povećanja indeksa kondicije** rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio mojega rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši bilo čija autorska prava.

Izjavljujem da ni jedan dio ovoga rada nije iskorišten u kojem drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Zadar, 7. veljača 2024.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	4
2.1. Školjkaš kao proizvod na tržištu.....	4
2.2. NPRA - Nacionalni plan razvoja akvakulture .....	6
2.3. Recirkulacija u akvakulturi.....	7
2.4. Uzgoj fitoplanktona .....	11
2.5. Klimatske promjene – ranjivost sektora .....	13
2.6. Odabrani organizam – europska plosnata kamenica <i>Ostrea edulis</i> .....	14
2.7. Indeks kondicije školjkaša.....	18
3. CILJEVI I SVRHA RADA .....	19
4. MATERIJALI I METODE.....	20
4.1. Uzgoj fitoplanktona za potrebe provođenja pokusa .....	20
4.2. Pokus 1. ....	21
4.2.1. Postavljanje pokusa.....	21
4.2.2. Aklimatizacija .....	24
4.2.3. Provođenje pokusa .....	24
4.2.4. Uzorkovanje i mjerenje .....	29
4.3. Pokus 2. ....	31
4.3.1. Postavljanje pokusa .....	32
4.3.2. Aklimatizacija .....	33
4.3.3. Provođenje pokusa .....	33
4.3.4. Uzorkovanje i mjerenje .....	34
4.3.5. Praćenje fizikalno kemijskih parametara .....	35
4.4. Statistička obrada podataka u pokusima 1 i 2.....	37
5. REZULTATI.....	38
5.1. Pokus 1. ....	38
5.2. Pokus 2. ....	41
6. RASPRAVA .....	48
7. ZAKLJUČAK .....	52
8. POPIS LITERATURE .....	53

## **Hranidba europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*, L. 1758) u zatvorenom recirkulacijskom sustavu s ciljem povećanja indeksa kondicije**

Akvakultura školjkaša je važna grana gospodarstva. Hrvatska je jedini svjetski proizvođač europske plosnate kamenice *Ostrea edulis*. Tehnologije uzgoja u upotrebi su ekstenzivne i ovise o uvjetima ekosustava u kojem se uzgoj odvija. Živi školjkaši u ljudskoj prehrani predstavljaju rizik za zdravlje, njihov uzgoj je strogo reguliran propisima. Recirkulacijski sustavi u akvakulturi omogućuju precizno praćenje parametara kvalitete vode i kontrolu uvjeta u uzgojnim bazenima. Podrazumijevaju intenzivnu hranidbu fitoplanktonom. Porast temperature mora može negativno utjecati na primarnu produkciju, uzrokovati smanjenje dostupne količine hrane za školjkaše, posljedično smanjen prirast i indeks kondicije školjkaša. Cilj ovog rada je istražiti utjecaj intenziteta hranidbe kamenica živim planktonom i komercijalnom hranom za školjkaše uzgajanih u recirkulacijskom sustavu na promjenu indeksa kondicije kamenica. Svrha rada je ispitati mogućnosti ublažavanja negativnih posljedica smanjenja primarne produkcije. U istraživanju su provedena dva pokusa hranidbe. Pokusi su trajali tri tjedna, korištena su dva recirkulacijska sustava i provedena je svakodnevna hranidba. U prvom pokusu dnevni obrok iznosio je 3 % suhog tkiva kamenice, dvije skupine kamenica hranjene su različitim vrstama fitoplanktona. U drugom pokusu je korištena ista mješavina više vrsta fitoplanktona za obje skupine, ali različit dnevni obrok, 3 % i 6 % suhe tvari kamenice. Ciljano povećanje indeksa kondicije nije postignuto. Rezultati ukazuju na mogući utjecaj intenziteta hranidbe na promjenu indeksa kondicije ali se to ne može sa sigurnošću tvrditi. Nedovoljno jasni rezultati moguća su posljedica malog broja jedinki u uzorku. Temeljni zaključak je potreba za većom razinom količine dnevnog obroka te daljnjim dugotrajnim istraživanjima mogućnosti intenzivne hranidbe kamenice u recirkulacijskom sustavu.

Ključne riječi: europska kamenica, indeks kondicije, recirkulacija, fitoplankton, uzgoj kamenice

## **Feeding of european flat oyster (*Ostrea edulis*, L. 1758) in a closed recirculatory aquaculture system with the aim of increasing the condition index**

Bivalve aquaculture is an important sector of the economy. Croatia is the only world producer of the European flat oyster *Ostrea edulis*. Cultivation technologies in use are extensive and depend on the conditions of the ecosystem in which cultivation takes place. Live bivalves in human food pose a health risk, their cultivation is strictly regulated by regulations. Recirculation systems in aquaculture enable precise monitoring of water quality parameters and control of conditions in breeding ponds. They imply intensive feeding with phytoplankton. An increase in sea temperature can negatively affect primary production, cause a decrease in the amount of food available for bivalves, and consequently reduced growth and the condition index of bivalves.

The aim of this work is to investigate the influence of the intensity of feeding oysters with live plankton and commercial food for shellfish grown in a recirculation system on the change in the condition index of oysters. The purpose of the paper is to examine the possibilities of mitigating the negative consequences of the decrease in primary production. Two experiments were conducted in which oysters were fed in recirculatory systems. The experiments lasted three weeks, two recirculation systems were used and daily feeding was carried out. In the first experiment, the daily ration was 3% of dry oyster weight, two groups of oysters were fed different types of phytoplankton. In the second experiment, the same mixture of several types of phytoplankton was used for both groups, but a different daily ration, 3% and 6% of oyster dry weight. The target increase in fitness index was not achieved. The results indicate a possible influence of feeding intensity on the change in the condition index, but this cannot be claimed with certainty. Insufficiently clear results are a possible consequence of the small number of individuals in the sample. The fundamental conclusion is the need for a higher level of daily ration and further long-term research into the possibility of intensive feeding of oysters in a recirculation system.

Key words: European oyster, condition index, recirculation, phytoplankton, oyster cultivation

## **Zahvale**

Srdačno zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Lavu Bavčeviću i komentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu Županu na konstruktivnim savjetima i podršci tijekom provođenja pokusa i izrade ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem kolegi Petru Zuanoviću na tehničkoj podršci u laboratoriju i uvijek pozitivnom stavu. Hvala Odjelu za ekologiju, agronomiju i akvakulturu Sveučilišta u Zadru na ustupanju prostora i potrebne opreme u laboratoriju.

Hvala članovima komisije i svim kolegama koji su mi svojim savjetima i preporukama pomogli u izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na beskrajnom strpljenju, podršci i ohrabrivanju tijekom studija. Za kraj, najveće hvala mojoj sestri Sofiji kojoj posvećujem ovaj diplomski rad.



## 1. UVOD

Hrana podrijetlom iz mora i kopnenih voda od davnina je važan dio ljudske prehrane. Morski plodovi općenito su kvalitetnog hranidbenog sastava, bogati su visoko kvalitetnim i lako probavljivim proteinima i mastima, te vitaminima. Većina školjkaša koji se koriste u ljudskoj prehrani danas dolazi iz uzgoja. Uzgoj školjkaša se u najvećem dijelu provodi u Kini, Koreji, Čileu, državama Europe i Sjeverne Amerike. U 2020. godini u svijetu je proizvedeno 17,5 milijuna tona školjkaša, od čega više od 90 % u azijskim državama među kojima značajno prednjači Kina (FAO, 2022.). U globalnom uzgoju dominira 8 vrsta školjkaša koji predstavljaju 84 % ukupne proizvodnje, najzastupljenije su kamenice (*Magallana gigas*, *Crassostrea virginica*) i kućice (*Ruditapes philippinarum*), a zatim češljače (porodica *Pectinidae*) i dagnje (porodica *Mytilidae*) (FAO, 2022.).

Školjkaši su izvrstan izbor organizma za uzgoj jer su primarno biljojedi koji u otvorenoj vodi ne zahtijevaju dodatnu hranidbu, a financijski i operativni troškovi uzgoja nisu visoki. Međutim, načini uzgoja u upotrebi uvelike ovise o prikupljanju mlađi iz prirodnog okoliša, što ograničava povećanje proizvodnje, stvara ovisnost o prirodnim populacijama te uzrokuje ranjivost industrije prema klimatskim promjenama i promjenama u ekosustavu (FAO, 2022.). Mrjestilišta školjkaša omogućuju povećanje proizvodnje kao i izbor mlađi poželjnih vrsta i karakteristika za određeno područje (Helm i sur., 2004.). Prepreka široj upotrebi mrjestilišta je velika financijska i energetska zahtjevnost u odnosu na prikupljanje mlađi iz prirode, no napretkom tehnologije očekuje se postizanje komercijalno isplativih mrjestilišta (Helm i sur., 2004.).

Budući da se školjkaši hrane filtriranjem vodenog stupca, uzgajališta školjkaša moraju biti postavljena u iznimno zdravim ekosustavima kako bi se izbjegla akumulacija onečišćujućih i toksičnih tvari u organizmima namijenjenim za ljudsku konzumaciju. U protivnom je potrebno provesti mjere opreza te procese pročišćavanja školjkaša ponovnim postavljanjem u čistim ekosustavima ili držanjem u recirkulacijskim sustavima tijekom određenog vremena kako bi odgovarali standardima za sigurnost hrane (Pinn i Le Vay, 2023.).

Zemlje Europske Unije u 2020. godini proizvele su oko 590 000 tona školjkaša, a vodeći proizvođači su Francuska, Španjolska, Portugal i Italija (STECF-22-17). Komercijalno najvažnija vrsta u uzgoju je pacifička/japanska kamenica *Magallana gigas* (Thunberg, 1793.; MolluscaBase eds., 2024.). Plava dagnja (*Mytilus edulis*) i mediteranska dagnja (*Mytilus*

*galloprovincialis*) proizvode se u velikim količinama jer je tehnologija uzgoja jednostavnija i jeftinija, ali su manje cijenjene na tržištu. Osim ovih vrsta proizvodi se i kućica (*Ruditapes decussatus* i *Ruditapes philippinarum*) (STECF-22-17). U zemljama Europske Unije uzgoj školjkaša primarno se odvija na malim obiteljskim farmama, te predstavlja važna lokalna radna mjesta. Ukupan promet ostvaren prodajom školjkaša iz uzgoja u Europskoj Uniji procjenjuje se na oko 1,2 milijarde eura (STECF-22-17).

U sjevernim morima prednjači uzgoj kamenica na morskom dnu odnosno pridneni uzgoj. Ovakav pristup pogodan je za područja izraženih oscilacija plime i oseke. Prilikom oseke mlađ se postavlja na tlo i prekriva pijeskom te ostaje prekrivena do konzumne veličine. Tijekom uzgojnog ciklusa, za vrijeme oseke, predatori kao što su zvjezdače i puževi se skupljaju i odnose s uzgajališta. Ovakav tip uzgoja kamenice je iznimno jeftin jer ne zahtjeva dodatne intervencije u uzgojnom ciklusu niti infrastrukturu (Šimunović, 2004.). Na područjima izraženih oscilacija plime i oseke koristi se i uzgoj kamenica u vrećama ovješanim na strukturama iznad dna. Drugi tip uzgoja kamenica naziva se mediteranski tip, složeniji je od pridnenog uzgoja te financijski zahtjevniji. Podrazumijeva uzgoj na plutajućim parkovima u kojem su kamenice na pergolarima ili u kavezima suspendirane na odgovarajućoj dubini (obično 4 m) između površine mora i dna (Šimunović, 2004.).

Europska plosnata kamenica *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758.; MolluscaBase eds. 2024.) autohtona je vrsta duž europske obale Atlantskog oceana, u Sredozemnom i Crnom moru. Međutim prirodne populacije su drastično smanjene krajem 1970-ih nakon dvije epidemije parazitima *Marteilia refringens* i *Bonamia ostreae* (Robert i sur., 2017.) te se u većini područja nikad nisu oporavile. Populacije u područjima Škotske, sjevera Irske, Norveške, Švedske, Danske i Hrvatske nisu pogođene ovim bolestima (Robert i sur., 2017.).

Hrvatska je jedini proizvođač (STECF-22-17) europske plosnate kamenice u 2020. godini što je čini značajnim proizvođačem unatoč malim ukupnim proizvedenim količinama u usporedbi s vodećim proizvođačima kamenice *M. gigas*. *O. edulis* je cjenjenija zbog malih dostupnih količina (Lapegue i sur. 2006), smatra se ukusnijom i kvalitetnijeg nutritivnog sastava od pacifičke kamenice (Stojčević, 2016.). Vrijednost proizvodnje kamenice u Hrvatskoj ostvarena 2018. godine i 2020. godine procjenjuje se na 4,5 milijuna i 1,2 milijuna kuna (NPRA, 2027.). Uzgoj *O. edulis* na našem području odvija se više stoljeća, a napredak u proizvedenim količinama doživljava u 20. stoljeću. Najveće proizvedene količine (1,5 do 2 milijuna komada godišnje) postižu se 1980-ih godina, nakon čega slijedi znatno smanjenje proizvodnje (Tomšić i Lovrić, 2004.). Tehnologija uzgoja temelji se na skupljanju mlađi iz

prirode koristeći tradicionalne „fašine“, snopove grana hrasta crnike i trišlje, ili danas plastične kolektore i mreže. U Hrvatskoj još ne postoji komercijalno mrjestilište kamenica (NPRA 2027.). Kolektori se polažu na dubinu između 5 i 15 metara, obično u lipnju i rujnu kad temperatura mora iznosi više od 16°C i kad je minimalno 5 % prirodne populacije kamenica u stanju mrijesta (Treer i sur., 1995.).

Na postavljene kolektore prihvaćaju se ličinke kamenice. Idućih nekoliko mjeseci kolektori ostaju u moru, dok veličina kamenica ne dosegne 8 do 20 mm što predstavlja prvu fazu rasta. Kolektori se tad vade i mlađ se raspoređuje na veći razmak ovisno vrsti kolektora koji se koristi. Grane „fašina“ se režu i upliću u pergolare, a mlađ naseljena na mrežama se prorjeđuje (Bratoš Cetinić i Bolotin, 2016.). Pergolari i mreže se polažu se u more na dubini od pola metra i više, s obzirom da ne smiju dodirivati dno mora zbog lošeg utjecaja. Druga faza rasta traje 12 do 18 mjeseci tijekom kojih kamenice postižu rast od 4 do 6 cm duljine. Treća faza započinje skidanjem kamenica, čišćenjem i sortiranjem prema veličini, optimalno početkom lipnja. Kamenice se zatim cementiraju na konopac ili po dvije na krajeve štapića koji se upliće u pergolar. Alternativno se mogu uzgajati u kavezima ili lanternama i tad cementiranje nije potrebno (Bratoš Cetinić i Bolotin, 2016.). Polažu se u more na plutajućim parkovima gdje rastu do konzumne veličine. Treća faza uzgoja traje šest do dvanaest mjeseci do konzumne veličine kamenica od 6 centimetara, kad su spremne za izlov. Cijeli proces uzgoja traje otprilike dvije godine (Bratoš Cetinić i Bolotin, 2016.).

Uzgoj školjkaša u Hrvatskoj većinom obuhvaća mala obiteljska uzgajališta. Najviše uzgajališta kamenica nalazi se u Malostonskom zaljevu i Malom moru, a kamenica se još uzgaja i na zapadnoj obali Istre, u Šibenskom zaljevu, Velebitskom kanalu i Novigradskom moru (NPRA 2027.). Kamenice se većinski prodaju na lokalnom tržištu izuzev zimskih mjeseci kad se veća prodaja ostvaruje u unutrašnjosti države (NPRA 2027.). Prema podacima Ministarstva poljoprivrede, europska plosnata kamenica na hrvatskom tržištu postiže cijenu oko 5 € po kilogramu. Najveća potražnja za kamenicom na domaćem tržištu je tijekom turističke sezone i tada se prodaje po najvišoj cijeni (Stojčević, 2016.). Međutim, najkvalitetnija je u veljači i ožujku kad je ljuštura u najvećoj mjeri ispunjena mesom (Acarli i sur, 2011.). To je posljedica temperature mora i dostupnosti prirodne hrane u moru i prirodnih ciklusa u životu organizma (Acarli i sur, 2011.; Filippova i Vasechkina, 2023.). Korištenjem recirkulacijskih sustava mogla bi se umanjiti ovisnost o dostupnosti prirodne hrane za postizanje što veće ispunjenosti ljuštura mesom.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Školjkaš kao proizvod na tržištu

Europska plosnata kamenica (*Ostrea edulis*) cijenjena je zbog kvalitetnog nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava i smatra se delikatesom, a posebno je cijenjena malostonska kamenica koja je 2020. godine dobila europsku oznaku izvornosti (Ministarstvo poljoprivrede; Stojčević, 2016.). Bogata je proteinima, polisaharidima, taurinom, bioaktivnim peptidima, eikosapentaenskom kiselinom (EPA), dokozaheksaenskom kiselinom (DHA) i drugim bioaktivnim komponentama, koje mogu poboljšati imunitet, smanjiti krvni tlak, imaju antitumorska i druga korisna svojstva (Pleadin i sur, 2019.). Najčešće se konzumira svježa servirana na polovici ljušture te začinjena limunovim sokom. Uzgoj školjkaša odvija se u moru koje je javno dobro iz čega proizlazi javni interes za upravljanjem ovom djelatnošću. Standardi u akvakulturi su predmet europskog i nacionalnog zakonodavstva, točnije 43 EU propisa i 7 nacionalnih zakona.

Svi školjkaši akumuliraju tvari prisutne u okolišu u tjelesnim organima, a uz činjenicu da se većinski konzumira svježa, kamenica predstavlja rizik za zdravlje čovjeka te je njezin uzgoj i stavljanje na tržište detaljno regulirani propisima i nužno je provoditi sanitarno-higijenske mjere, mjere praćenja stanja i kontrole ekoloških standarda (Pinn i Le Vay, 2023.).

Stavljanje školjkaša na tržište regulirano je „Higijenskim paketom“ Europske Unije. Uključuje nadzor i pravila o higijenskoj ispravnosti okoliša u kojem se odvija uzgoj, akumulaciji štetnih tvari u školjkašima, rukovanju proizvodima i obvezama pročišćavanja školjkaša prije stavljanja na tržište. Proces uzgoja akvatičkih organizama je strogo praćen dokazima o sljedivosti od početka uzgojnog procesa do potrošača (Pravilnik o evidenciji sljedivosti za proizvode ribarstva i žive školjkaše, N.N. 68/18)

Nadzor kvalitete vode i rutinska kontrola kontaminacije fekalijama na uzgojnim područjima školjkaša propisana je zakonima Europske unije, kao i posljedična kategorizacija područja prema razini čistoće odnosno kontaminacije bakterijom *Escherichia coli* (Pinn i Le Vay, 2023.). Propis EU 2017/625 obvezuje nadležna tijela zemalja članica da klasificiraju proizvodna i područja ponovnog polaganja za žive školjkaše, a Uredba Komisije EU (EU) 2019/627 definira kategorizaciju područja za uzgoj školjkaša u 3 razreda: A, B i C (Pinn i Le Vay, 2023.). Školjkaši proizvedeni u područjima kategorije A sigurni su za izravnu ljudsku konzumaciju nakon izlova. Živi školjkaši iz područja kategorije B moraju biti obrađeni u centru za pročišćavanje ili ponovno položeni u područje kategorije A tijekom određenog kraćeg perioda prije stavljanja na tržište, dok oni proizvedeni u područjima C kategorije biti

ponovno položeni u područja kategorije A ili B tijekom dužeg vremenskog perioda kako bi mogli zadovoljiti zdravstvene standarde za stavljanje na tržište. Sva uzgajališta školjkaša u Hrvatskoj nalaze se u područjima A kategorije (NPRA 2027, 2022.). Uredbom (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća dopušten je izlov školjkaša za komercijalnu prodaju samo iz klasificiranih područja. Njome su utvrđena higijenska pravila za hranu životinjskog podrijetla i sadrži zdravstvene norme za školjkaše, uvjete za centre za pročišćavanje školjkaša, higijenske zahtjeve za objekte u akvakulturi te zdravstvene norme za preradu, pakiranje, skladištenje i prijevoz proizvoda akvakulture.

Pojava „cvjetanja algi“ je nasumična i nije povezana s određenim parametrima uvjeta u okolišu no uslijed klimatskih promjena mogla bi postati učestalija. Ne utječe negativno na zdravlje i život školjkaša, ali predstavlja izniman rizik za ljudsko zdravlje (Barange i sur., 2018.). Tijekom cvjetanja algi nije dopušteno stavljanje živih školjkaša na tržište.

Zakon o hrani N.N. 18/23 definira načela propisa o hrani i sigurnosti hrane i standarde za kvalitetu hrane. Također sadrži pravila sustava brzog uzbunjivanja za hranu i pravila upravljanja krizom u području sigurnosti hrane. Zakonom je uređena uspostava i koordinacija institucija, davanje znanstvenog i stručnog mišljenja te znanstvene i tehničke pomoći kao i nacionalne mjere za provedbu politike sigurnosti hrane. Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu N.N. 83/22 sadrži HACCP principe i dobre higijenske prakse te definira nadležna tijela za provođenje službenih kontrola. Uredbom (EZ) br. 852/2004 propisana su opća pravila o higijeni hrane i definirane obveze subjekata u poslovanju s hranom s naglaskom na analizu rizika i kritičnih točaka te obveze dobre higijenske prakse.

Prikupljanje podataka vezanih uz zdravstvenu ispravnost školjkaša propisano je Zakonom o hrani, Zakonom o veterinarstvu (N.N. 82/13, 148/13, 115/18, 52/21, 83/22, 152/22), Pravilnikom o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (N.N. 118/09) i Pravilnikom o posebnim pravilima organizacije i provedbe službenih kontrola koje se provode na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (N.N. 82/14). Provjera mikrobiološke kakvoće živih školjkaša, prisutnosti toksičnog i potencijalno toksičnog planktona u vodi, prisutnosti biotoksina i kemijskih zagađivača u školjkašima i sprječavanje zlouporabe u odnosu na podrijetlo živih školjkaša predmet su Pravilnika o mikrobiološkoj klasifikaciji i posebnim pravilima higijene živih školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje N.N. 126/22. Njime je također uređeno utvrđivanje naziva, broja, lokacije i granica proizvodnog područja. Na temelju

zakonskog okvira Ministarstvo poljoprivrede donosi Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. Zakonom o veterinarstvu propisane su mjere zaštite zdravlja školjkaša i suzbijanja bolesti, veterinarska zaštita okoliša te službene kontrole i inspekcijski nadzor u području veterinarstva u djelatnosti uzgoja. Ovim zakonom reguliran je transport školjkašima i uvjeti stavljanja na tržište. Zajedničko uređenje tržišta proizvodima ribolova i akvakulture opisano je Uredbom (EZ) br. 1379/2013. Prikupljanje statističkih podataka u akvakulturi propisano je Zakonom o akvakulturi (N.N. 130/17, 111/18, 144/20, 30/23). U uzgoju školjkaša prikupljaju se godišnje podaci o obilježjima uzgojnih instalacija, stanju na početku godine, prodaji, gubicima i ostvarenom prihodu. Utjecaj uzgajališta školjkaša na okoliš u Hrvatskoj ne predstavlja rizik jer se radi o malim uzgajalištima te nije potrebno pratiti parametre procjene utjecaja uzgoja na okoliš.

## **2.2. NPRA - Nacionalni plan razvoja akvakulture**

Nacionalni plan razvoja akvakulture (NPRA) za razdoblje do 2027. godine predstavlja glavni strateški dokument za razvoj akvakulture u Republici Hrvatskoj. Glavni ciljevi NPRA su povećanje proizvodnje i otpornosti sektora na klimatske promjene, jačanje konkurentnosti i sukladan doprinos obnovi gospodarstva te unaprjeđenje životnih uvjeta u ruralnim i obalnim područjima te poticanje inovacija u sektoru akvakulture (NPRA 2027.). Kako je naznačeno na stranicama Ministarstva poljoprivrede „Akcijskim planom za provedbu NPRA za razdoblje do 2024. godine pobliže se definira provedba mjera povezanih s ostvarivanjem posebnih ciljeva NPRA, kao i okvir za praćenje i vrednovanje s pokazateljima rezultata na razini mjera“.

Negativni aspekti industrije školjkaša u Hrvatskoj navedeni u NPRA 2027. su nerazvijena infrastruktura i distribucija proizvoda, nedostatak učinkovitih centara za pročišćavanje školjkaša i rješenja za gospodarenje otpadom, te uvelike nepostojanje mrjestilišta. Uz navedeno potrebno je spomenuti neorganiziranost uzgajivača, nedostatak učinkovite marketinške strategije te industrije prerade proizvoda u svrhu postizanja dodane vrijednosti. Glavne prednosti industrije školjkaša su kvaliteta i čistoća morskog okoliša, činjenica da je ovo područje jedno od rijetkih preostalih prirodnih staništa *O. edulis*, velika potražnja za proizvodima školjkaša na domaćem tržištu, socijalna prihvaćenost i povezanost s lokalnim zajednicama. Unatoč osjetljivosti sektora na klimatske promjene i promjene u ekosustavu ova industrija ima velik potencijal razvoja u smislu povećanja proizvodnje osnivanjem mrjestilišta i korištenjem novih tehnologija. Promicanje svježih proizvoda i novih proizvoda dodane vrijednosti te učinkovita marketinška strategija s naglaskom na visok ekološki standard

proizvoda i sukladno certificiranje važni su za predstavljanje iznimno kvalitetnog proizvoda koji nudi hrvatska akvakultura i postizanje sukladne cijene na tržištu (NPRA 2027.).

### **2.3. Recirkulacija u akvakulturi**

Recirkulacija u akvakulturi (RAS) označava tehnologiju uzgoja u kojoj se voda koristi više puta. Mehanički filtri i biološki filtri koriste se za obradu otpadnih voda te omogućuju ponovnu upotrebu vode odnosno recikliranje (Ahmad i sur., 2021.). Svrha recikliranja je ušteda dnevnog unosa vode u sustav, kao i ušteda energije prilikom kondicioniranja vode. Također, kružno korištenje vode smanjuje rizik od unosa stranih organizama dobavom vode. U dobro osmišljenim RAS sustavima potreban je dnevni unos od 5 do 10 % ukupne količine vode u sustavu (Kamermans i sur., 2016.). RAS omogućava precizno praćenje parametara kvalitete vode i kontrolu uvjeta u uzgojnim bazenima što teoretski omogućava uzgoj skoro svih vrsta akvatičkih organizama u umjetnom okolišu. Korištenje recirkulacije je ključno za postizanje visoke stope preživljavanja mlađi u mrjestilištima, veće gustoće jedinki u uzgojnom sustavu te komercijalne isplativosti (Kamermans i sur., 2016.). Glavni nedostatak RAS sustava je visoka cijena nabave i velik utrošak energije tijekom rada (Ahmad i sur., 2021.).

Recirkulacijski sustavi u akvakulturi generalno se sastoje od sustava dobave, mehaničke filtracije, biološke filtracije i uređaja za kondicioniranje (hlađenje, grijanje) vode. Kondicionirana voda koristi se u bazenima za uzgoj uz stalni protok koji osiguravaju pumpe te dodatno prozračivanje kako bi se osigurala adekvatna zasićenost kisikom i ugljikovim dioksidom. Dio vode koji se ispušta iz bazena smatra se iskorištenom vodom te prolazi tretmane pročišćavanja. Pročišćavanje podrazumijeva mehaničke filtre, biološke filtre, uređaje za UV sterilizaciju, a može uključivati i komponente za održavanje optimalne pH vrijednosti, i komponente za otplinjavanje viška ugljikovog dioksida, uređaje za denitrifikaciju i defosforizaciju i uređaje za okisgenaciju (Šarić i sur., 2010.). Mehanički filtri uklanjaju čestice čvrste tvari, fekalije i nepojedenu hranu. Najčešće se koriste filtri s pijeskom i rotacijski bubanj filtri (Šarić i sur., 2010.).

Biološka filtracija označava korištenje živih organizama za uklanjanje onečišćujućih tvari iz vode (Šarić i sur., 2010.). Dušik u vodi može biti prisutan kao amonijak, u obliku nitrita, nitrata i plinovitog dušika (Šarić i sur., 2010.). Amonijak je metabolički produkt razgradnje proteina koji je u višim koncentracijama toksičan za akvatičke organizme (Helm i sur., 2004.). Osim metaboličke razgradnje dušik može biti prisutan u vodi kao rezultat raspadanja mrtvih organizama i nepojedene hrane (Šarić i sur., 2010.). Biofiltracija se odnosi na tri procesa:

mikrobiološku razgradnju otopljene organske tvari na jednostavne anorganske tvari koju obavljaju heterotrofni mikroorganizmi, biološku nitrifikaciju i denitrifikaciju. Nitrifikacija je proces uklanjanja amonijaka u biofiltru koji obavljaju bakterije roda *Nitrobacter* i *Nitrosomonas*, a sastoji se od oksidacije amonijaka do nitrita i zatim nitrata (Šarić i sur., 2010.). Bakterije se pričvršćuju za tvrdi podlogu i stvaraju biofilm pa se tako povećanjem površine pospješuje efikasnost biofiltra. Ovakvi biofiltri nazivaju se još i biofilmski filtri (Šarić i sur., 2010.). Nitrifikacijske bakterije nalaze se na podlozi zajedno s heterotrofnim mikroorganizmima koji razgrađuju organske spojeve i imaju tendenciju nadvladati nitrifikacijske bakterije u kompeticiji za prostor. Iz tog razloga je važno mehaničkim filtrom ukloniti što više organske tvari prije ulaska vode u biofilar kako bi se rast kulture heterotrofnih mikroorganizama održao na poželjnoj razini. Nitrifikacija i heterotrofna razgradnja organske tvari izravno ovise o količini kisika u vodi i temperaturi (Šarić i sur., 2010.). Biofiltri se razlikuju po količini kisika potrebnog za obavljanje nitrifikacije, principu rada i načinu održavanja, optimalnoj količini biofilma i podlozi za rast bakterija. Denitrifikacija je proces kojim se nitrati u anaerobnim uvjetima prevode u plinoviti dušik uz pomoć bakterija roda *Pseudomonas* i prisutnost metanola (Šarić i sur., 2010.). Denitrifikacija je nužna u sustavima u kojima je izuzetno intenzivan uzgoj jer su nitrati toksični tek pri izrazito visokim koncentracijama.

Uklanjanje ugljikovog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) iz vode postiže se raspršivanjem vode u sitne kapljice što rezultira većom površinom vode i ubrza difuziju  $\text{CO}_2$  u atmosferu. Prokapni filtri sadrže mrežaste strukture preko kojih se voda razlijeva i ubrza otplinjavanje  $\text{CO}_2$ , a na njima se mogu razviti kulture bakterija koje dodatno pospješuju nitrifikaciju (Šarić i sur., 2010.). Oksigenacija vode podrazumijeva dodavanje čistog kisika u vodu, najčešće pod tlakom kako bi se postiglo bolje otapanje, a trebala bi biti smještena nakon prokapnog filtra da se spriječi otplinjavanje kisika.

UV sterilizacija se postiže izlaganjem tankog sloja vode ultraljubičastoj svjetlosti koja ima dezinfekcijsko, algicidno, baktericidno i viricidno djelovanje (Helm i sur., 2004.). Djelomična sterilizacija vode osigurava maksimalnu korist jer omogućava dominaciju korisnih bakterija nad patogenim i sprječava izbijanje bolesti.

Tehnologija koja se koristi u komercijalnim mrjestilištima nije mnogo napredovala od njezinih početaka 1970 ih godina u smislu da se generalno u mrjestilištima koriste protočni sustavi u kojima se kontinuirano dodaje hrana (Kamermans i sur., 2016.). Protočna mrjestilišta ovise o odabiru lokacije i opskrbi kvalitetne morske vode jer zahtijevaju



kontinuiranu opskrbu vodom. Korištenje recirkulacije značajno smanjuje potrebe za opskrbom vode te omogućuje precizno kondicioniranje vode i upravljanje parametrima kvalitete vode u bazenu (Helm i sur., 2004.). Dizajn mrjestilišta se može razlikovati ovisno o opsegu proizvodnje, uzgojnom stadiju koji se postiže i uvjetima lokacije na kojoj se nalazi (Helm i sur., 2004.). Sva podrazumijevaju sistem dobave morske vode, mehaničke filtre, dobavu koprimiranog zraka, prostor za uzgoj kultura fitoplanktona, te posebne bazene za matični stok, mriještenje, valjenje ličinki i uzgoj mlađi (Helm i sur., 2004.). Mogu biti opremljena jedinicama za kondicioniranje vode (hladnjaci ili grijači), biološkim filtrima i drugim komponentama (Kamermans i sur., 2016.). Glavni procesi u mrjestilištima školjkaša su odabiranje matičnog stoka, kondicioniranje matičnog stoka, uzgoj ličinki, prihvata ličinki i uzgoj mlađi. Držanje živih školjkaša u recirkulacijskom sustavu, bilo da se radi o kondicioniranju matičnog stoka ili uzgoju ličinaka podrazumijeva popunu ili djelomičnu hranidbu s jednostaničnim planktonskim algama. U tu svrhu je potrebno provoditi procese uzgoja kultura fitoplanktona za hranidbu matičnog stoka, ličinki i mlađi (Helm i sur., 2004.). Prednost hranidbe živim fitoplanktonom je visoka hranjiva vrijednost, a nedostatak visoki troškovi uzgoja.

Komercijalna fitoplanktonska hrana za školjkaše može biti sušena ili koncentrirana u obliku paste. Prednost ovakve hrane je jednostavnost korištenja i manji financijski trošak od uzgoja živog fitoplanktona. Nedostatak je nepokretnost stanica i potreba za stalnim protokom vode kako bi stanice ostale suspendirane u vodi (Helm i sur., 2004.). Nadalje, sušeni fitoplankton ima manju nutritivnu vrijednost od živog. Koncentrirani fitoplankton ima jednaku nutritivnu vrijednost živom fitoplanktonu, ali ona opada tijekom vremena. Ličinke je potrebno hraniti nutritivno bogatim vrstama algi, s adekvatnim postotkom visoko nezasićenih masnih kiselina, dok se mlađ može hraniti manje bogatom ishranom u svrhu uštede uzgojem otpornijih i jeftinijih vrsta fitoplanktona (Helm i sur., 2004.).

Intenzitet hranidbe kamenica uz temperaturu ima najveći utjecaj na asimilaciju energije, a stoga i na indeks kondicije i rast kamenice (Filippova i Vasechkina, 2023.). Optimalna temperatura pri kojoj je stopa filtracije najbrža te se asimilira najviše energije je 22-24°C (Filippova i Vasechkina, 2023.). Rast tkiva ovisi o starosti kamenice, manje jedinice rastu brže, veće jedinice troše više asimilirane energije na metaboličke procese i rast gonada. Fiziološki procesi metabolizma, razmnožavanja i filtracije ovise o veličini i starosti kamenice, temperaturi vode, salinitetu, dobu godine, dostupnosti hranjivih tvari te individualnim karakteristikama jedinice.

Jedinke izlovljene iz prirodnog okoliša koje će se koristiti kao matični stok potrebno je aklimatizirati na uvjete u uzgojnom bazenu (Helm i sur., 2004.). Kondicioniranje matica obuhvaća intenzivnu hranidbu s ciljem osiguravanja dovoljno energije za stvaranje reproduktivnog materijala i rast gonada. Hranidba se obično provodi s dnevnim obrokom od 2 do 4 % suhe tvari kamenice (Millican i Helm, 1994.; Helm i sur., 2004.).

Uspješno umjetno mriještenje kamenica moguće je u zatvorenim recirkulacijskim sustavima no nije rašireno zbog većih financijskih troškova u usporedbi s kontinuiranim protokom (Kamermans i sur., 2016.). Korištenje zatvorenih recirkulacijskih sustava u mrjestilištu pruža veće mogućnosti praćenja i kontroliranja uvjeta u uzgojnim bazenima, što može povećati stopu preživljavanja i omogućiti uzgoj veće gustoće jedinki u bazenima.

Kuhn i sur. (2013.) uspješno su proveli istraživanje hranidbe kamenice *M. gigas* fitoplanktonom roda *Chaetoceros* i *Isochrysis* u RAS tijekom perioda od dvanaest tjedana. Količina dnevnog obroka u istraživanju iznosila je više od 300 milijuna stanica po kamenici. Također je korišten kalcij kao suplement za rast školjkaša. Stopa preživljavanja kamenica iznosila je preko 99 %, dokazan je poželjan prirast mase i rast kamenica.

Intenzivna hranidba kamenica *M. gigas* u recirkulaciji s ciljem ozelenjivanja tkiva prikazana je u znanstvenom radu *Greening phenomenon in bivalve by marenine produced from Haslea ostrearia and its consequences on bivalve's integrated response* (Prasetya, 2015.). Ozelenjivanje je prirodna posljedica akumulacije pigmenta marenina u tkivu kamenice. Pigment potječe od dijatomeje *Haslea ostrearia* kojom se *M. gigas* hrani u prirodnim uvjetima. Svrha istraživanja je postizanje zelene boje tkiva jer je takva kamenica cijenjena na tržištu i ima veću vrijednost (Prasetya, 2015.). Pigment marenin ima antibakterijska i antivirusna svojstva te se pretpostavlja da bi mogao imati korisnu funkciju u zaštiti zdravlja kamenica u akvakulturi. U navedenom radu opisana su istraživanja utjecaja hranidbe *M. gigas* različitim veličinama dijatomeje *H. ostrearia*, utjecaja ozelenjavanja na ponašanje, fiziologiju i biokemijska svojstva *M. gigas* te hranidba dijatomejom *H. ostrearia* u kombinaciji s drugim mikroalgama koje se koriste u akvakulturi školjkaša (Prasetya, 2015.).

Pročišćavanje školjkaša može se provoditi u recirkulaciji sa steriliziranom morskom vodom u trajanju od 48 do 72 sata (Ruano i sur., 2012.). Pročišćavanje je proces u kojem se školjkaši iz relativno onečišćenih područja polažu u sterilnu morsku vodu sa svrhom pročišćavanja organizma školjkaša od toksičnih tvari i mikroorganizama kako bi se postigao standard sigurnosti nužan za ljudsku konzumaciju (Ruano i sur., 2012.). Primjer komercijalnog uređaja za pročišćavanje školjkaša koristi mehaničke filtre, biofiltre, UV sterilizaciju te uređaje za

hlađenje vode. Snažan protok vode odnosi feces sa dna bazena, a raspršivanje vode po površini uklanjanja pjenu i nečistoće s površine (Ruano i sur., 2012.). Za vrijeme ovog procesa školjkaši se ne hrane nego su podvrgnuti gladovanju. Gladovanje tijekom 72 sata uzrokuje smanjenje indeksa kondicije kod većine školjkaša, pa tako i kamenica, no kamenice pokazuju veću otpornost na uvjete gladovanja i manji mortalitet u usporedbi s dagnjama (Ruano i sur., 2012.).

#### **2.4. Uzgoj fitoplanktona**

Fitoplankton obuhvaća jednostanične alge to jest jednostanične fotosintetske organizme. Komercijalno se uzgajaju brojne vrste jednostaničnih algi u različite svrhe, kao hrana za čovjeka i mnogobrojne životinje, za proizvodnju lijekova, kozmetike, biogoriva i za znanstvena istraživanja (Hallmann i Rampelotto, 2019.). Količinski najveća proizvodnja uključuje vrste *Spirulina* (*Arthrospira*), *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* i *Nannochloropsis* (Hallmann i Rampelotto, 2019.). Generalno se uzgoj fitoplanktona može podijeliti na uzgoj u otvorenom sustavu i uzgoj u zatvorenom sustavu (Hallmann i Rampelotto, 2019.). U otvorenom sustavu kultura algi je u doticaju s atmosferom. Otvoreni sustavi najčešće su jezera (pond) i protočni bazeni (raceways) gdje se kao izvor svjetlosti koristi sunčeva svjetlost (Hallmann i Rampelotto, 2019.). Otvoreni sustavi ovise o klimatskim uvjetima i promjenama ali je njihova upotreba jako raširena zbog malih financijskih troškova (Hallmann i Rampelotto, 2019.). Zatvoreni sustavi uključuju uzgoj u zatvorenim fotobioreaktorima i korištenje umjetne svjetlosti za potrebe fotosinteze algi.

Svi tipovi komercijalnog uzgoja fitoplanktona podrazumijevaju prethodno tretiranje morske vode te dodavanje nutrijenata koji uključuju nitrate, fosfate, mikroelemente i vitamine, te ugljikov dioksid kao izvor ugljika za vršenje fotosinteze (Helm i sur., 2004.). Uzgojni medij je otopina preciznog sastava koja sadrži sve potrebne makroelemente i mikroelemente za uspješan rast kulture (Erdschreiber, F/2, HESAW, Guillard) (Helm i sur., 2004.; Guillard i Ryther, 1962.).

Matična (master/stock) kultura je glavna osnova proizvodnje i sadrži jednu ciljanu vrstu alge (Helm i sur., 2004.). Čuva se u posebnim prostorijama i optimalnom uzgojnom mediju (Erdschreiber, F/2, HESAW) u posudama malog volumena ili u petrijevim zdjelicama u agar mediju (Helm i sur., 2004.). Obično se drže pod minimalnim svjetlom i na nižoj temperaturi (4 °C do 12 °C) kako bi se spriječio brz rast i održala čistoća kulture. Također se ne prozračuju i ne dodaje se CO<sub>2</sub> (Helm i sur., 2004.). Svaki mjesec se od matične kulture u

sterilnim uvjetima započinje nova matična kultura kako bi se održala u najzdravijem stanju. Potrebno je provesti sve mjere opreza kako bi se spriječila kontaminacija ovih kultura.

Matične kulture se koriste za inokulaciju startnih kultura algi prilikom čega je također iznimno važno osigurati sterilne uvjete i spriječiti kontaminaciju kultura. Starter kulture uzgajaju se u posudama volumena do 500 ml, a služe za inokulaciju kultura većih volumena (Helm i sur., 2004.). Iz tog razloga je potreban brz rast ovih kultura, pa se uzgajaju na temperaturi od 18 °C do 22 °C izložene optimalnoj svjetlosti uz prozračivanje i dodavanje CO<sub>2</sub>. Za vrste dijatomeja uzgoj starter kultura traje 3 do 5 dana, a za vrste flagelata od 7 do 14 dana (Helm i sur., 2004.). Nakon tog perioda, dio starter kulture (20 do 50 ml) koristi se za započinjanje nove starter kulture, a ostatak se koristi za inokulaciju kulture većeg volumena (do 25 l).

Kulture većeg volumena mogu se uzgajati kao „batch“ kulture u kojima je poželjan ubrzan rast do trenutka kad gustoća stanica u mediju ograničava prodor svjetla te se rast usporava. Tad se sav volumen iskorištava, posude se steriliziraju i započinje se nova kultura. Polukontinuirani uzgoj kultura je sličan, ali se prije postizanja ograničavajuće gustoće dio kulture iskorištava i volumen nadomješta svježim medijem. Na taj način moguće je određene kulture uzgajati i do tri mjeseca prije kompletnog iskorištavanja i započinjanja nove kulture. Uzgoj u „batch“ kulturama obično se koristi za osjetljive i brzorastuće vrste, dok se otpornije vrste češće uzgajaju u polukontinuiranim kulturama (Helm i sur., 2004.). Kulture velikih volumena mogu se uzgajati u polietilenskim vrećama, bazenima ili sofisticiranim uređajima koji su kontrolirani elektronski (Helm i sur., 2004.). Cilindrični oblik posude je optimalan jer omogućava adekvatno miješanje kulture prozračivanjem i izloženost svjetlosti. Automatizirani sustavi omogućuju kontinuirano praćenje parametara, automatsko podešavanje dodavanja hranjivog medija i CO<sub>2</sub> te kontinuirano iskorištavanje kulture.

Fitoplankton se uzgaja za potrebe hranidbe svih stadija razvoja školjkaša, od ličinki do odraslih jedinki (Helm i sur., 2004.). Glavne skupine jednostaničnih algi u uzgoju za svrhu hranidbe školjkaša su flagelati (*Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Tisochrysis lutea* (T-ISO), *Pavlova lutherii*) i dijatomeje (*Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros gracilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricorutum*) (Helm i sur., 2004.). Fitoplankton je glavni izvor visoko nezasićenih masnih kiselina u hranidbenoj mreži vodenih ekosustava. Hranidbena vrijednost algi za hranidbu školjkaša određena je profilom visoko nezasićenih masnih kiselina, a posebno su važne eikozapentanoična (EPA, 20:5n-3), dokosaheksaenoična (DHA,

22:6n-3), i arahidonska kiselina (AA, 20:4n-6) (Ronquillo i sur., 2012.). Mješovitom hranidbom od dvije ili više vrsta algi može se osigurati bolju ravnotežu hranjivih tvari, jer se određene alge razlikuju po sadržaju lipida i visoko nezasićenih masnih kiselina i nijedna vrsta ne sadrži potpun profil potreban za hranidbu larvi i mlađi školjkaša. Rodovi *Chaetoceros*, *Pavlova*, *Skeletonema* i *Tisochrysis* komercijalno se koriste za hranidbu kamenica zbog njihove visoke hranjive vrijednosti ( ). T-ISO je adekvatna hrana za kamenice zbog kvalitetnog sadržaja lipida i visokog postotka dugolančanih visoko nezasićenih masnih kiselina (EPA i DHA). Veličina T-ISO je u rasponu između 3 i 7,5  $\mu\text{m}$  te je prikladna za hranidbu svih razvojnih stadija kamenice. Tolerancija T-ISO na širok raspon fizikalno-kemijskih uvjeta, ponajprije temperature, i brza stope rasta su povoljna svojstva ove alge u uzgoju (Leal i sur., 2021.).

U uzgoju fitoplanktona nužno je pratiti brojnost odnosno koncentraciju stanica u mediju. Koncentracija se može odrediti na više načina, korištenjem spektrometra, fluorometra, hemocitometra ili coulter countera (Helm i sur., 2004.). Hemocitometar je debelo predmetno stakalce s dvije komorice površine  $1\text{mm}^2$ . Korištenjem predviđenog pokrovnog stakalca dobiva se sloj tekućine debljine točno 0,1 mm. Komorice imaju ucrtanu mrežu koja olakšava brojanje stanica pod mikroskopom. na ovaj način moguće je izračunati prosječan broj stanica u 1 ml odnosno koncentraciju stanica u kulturi.

## **2.5. Klimatske promjene – ranjivost sektora**

Načini uzgoja kamenica u upotrebi uvelike ovise o uvjetima ekosustava u kojem se odvija uzgoj. Prirodne populacije kamenica usko su povezane s ekosustavom u kojem se nalaze, ovise o temperaturnom režimu mora, primarnoj produkciji ekosustava, prisutnim hranjivim tvarima, kemijskom sastavu mora, salinitetu, zasićenosti kisikom te drugim čimbenicima (Gosling, 2008.). Promjene temperature zraka i oborinskih režima utječu na temperaturu, salinitet, koncentraciju kisika u moru i stratifikaciju. Pojava i brojnost mlađi u prirodi direktna su posljedica stanja prirodnih populacija i uvjeta u ekosustavu i ograničavajući faktor proizvodnje školjkaša.

U najvećoj mjeri uzgoj kamenica ovisan je o temperaturi mora jer temperatura izravno uvjetuje preživljavanje i prirast svih stadija razvoja (Kamermans i Saurel, 2022.), a indirektno utječe na salinitet i kiselost mora. Negativan utjecaj temperature već je zabilježen na malostonskim uzgajalištima (NPRA 2027.). Promjene u kemijskom sastavu mora u budućnosti mogle bi utjecati na stvaranje vapnenačkih ljuštura kamenica (Barange i sur., 2018.).

Uzgoj kamenica u moru temelji se na prisutnosti prirodne hrane (primarno fitoplanktona) u moru odnosno primarnoj produkciji ekusustava (Kamermans i Saurel, 2022.). Porast temperature mora može negativno utjecati na primarnu produkciju i uzrokovati pad produktivnosti (Kamermans i Saurel, 2022.). Manja primarna produkcija znači manje dostupne hrane za školjkaše te posljedično smanjen prirast i indeks kondicije školjkaša (Kamermans i Saurel, 2022.; Acarli i sur, 2011.). Indeks kondicije školjkaša je u izravnoj vezi s temperaturom mora i dostupnom hranom (Kamermans i Saurel, 2022.). Koncentracija otopljenog kisika u moru opada porastom temperature i uzrokuje sporiju stopu „čišćenja“ fitoplanktona filtracijom što negativno utječe na prirast i indeks kondicije (Kamermans i Saurel, 2022.). Uslijed porasta prosječnih temperatura mora uzgajivači školjkaša suočavaju se sa smanjenim prirastom, sporijim rastom organizama te smanjenim indeksom kondicije.

## **2.6. Odabrani organizam – europska plosnata kamenica *Ostrea edulis***

Europska plosnata kamenica *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758.) autohtona je vrsta u Jadranskom moru, pripada razredu školjkaša te koljenu mekušaca (MolluscaBase eds., 2024.). Najčešći lokalni nazivi za ovu vrstu su oštriga, loštriga i štroliga. Ljuštura *O. edulis* je okrugla i plosnatija od ljušture kamenice vrste *M. gigas*, te je poznata po kvalitetnijem mesu i boljim hranjivim vrijednostima. Maksimalna duljina ljušture *O. edulis* je oko 100 mm, dok *M. gigas* raste i do 3500 mm (Gosling, 2008.). *O. edulis* najčešće nastanjuje kamenito dno, no živi i na pjeskovito-šljunčanim staništima. U Jadranu nastanjuje zaljeve i kanale, obično do 10 metara dubine (Bolotin, 2022.). Brojnost divljih populacija europske kamenice na istočnoj obali Jadranskog mora pada zbog intenzivnog izlova, bolesti, pojave stranih vrsta i kompeticije za stanište te antropogenog utjecaja na ekosustav (MacKenzie, 1997.) Prosječni životni vijek kamenice je 5 do 10 godina (Roberts i sur., 2010.).

Vanjsku građu školjkaša čini nesimetrična ljuštura nepravilnih rubova, najčešće ovalnog ili kruškastog oblika. Lijeva odnosno donja ljuštura je pričvršćena na podlogu i zaobljenog oblika. Desna odnosno gornja ljuštura je plosnatija, ljuskava i ima grublje rubove. Vapnenačku ljušturu luči plašt koji obavija unutarnje organe, procesom ugradnje  $\text{CaCO}_3$  u matriks proteina conchiolina (Gosling, 2008.). Ljušture *O. edulis* su dorzalno spojene rožnatim ligamentom, imaju ulogu vanjskog skeleta i štite mekano tijelo (Gosling, 2008.). Sačinjene su od tri sloja, vanjskog periostakuma, srednjeg ostrakuma i unutarnjeg hipostrakuma (Gosling, 2008.). Ljuštura europske kamenice izvana je sivo smeđe boje, ali zbog obraštaja može biti i zelenih nijansi. Unutrašnjost je blijeda s vidljivim mjestom hvata mišića aduktora (Slika 1.). *O. edulis* je monomijarna vrsta školjkaša što znači da ima samo

jedan mišić aduktor koji spaja gornju i donju ljušturu (Helm i sur., 2004.). Mišić aduktor otvara i zatvara ljušturu školjkaša.



Slika 1. Unutrašnjost *Ostrea edulis* (Autor: Marija Brkić)

Plast se sastoji od dva reznja tkiva koji okružuju unutarnje organe školjkaša, a između njih nalazi se plaštana šupljina (Gosling, 2008.). Plast je tanak i proziran, a prema rubovima deblji i tamno obojen. Čini ga vezivno tkivo s hemolimfom odnosno krvnim stanicama školjkaša, živcima i mišićima. Kamenice imaju otvoren optjecajni sustav. Osjet i pokretljivost plašta iznimno su razvijeni na rubnim dijelovima, služe prepoznavanju predatora i selekciji hrane. Trepaljke na unutrašnjim dijelovima plašta imaju transportnu ulogu, pa tako služe usmjeravanju čestica hrane prema škrgama te izbacivanju neželjenih čestica prema usisnom otvoru (Prasetya, 2015.). Povremeno se čestice izbacuju snažnim i brzim zatvaranjem ljuštura koje ispire plaštanu šupljinu (Gosling, 2008.). Probavni sustav kamenice sastoji se od usta, jednjaka, želudca, probavne žlijezde, srednjeg crijeva te rektuma (Walne, 1972.).

Škrge (ktenidiji) su iznimno važan organ kamenica jer služe kao dišni organ i organ za hranjenje (Walne, 1972.). Čine ih dva reda škžnih listića (lamela), a površina im je dodatno povećana strukturama oblika slova w. Škrge plaštanu šupljinu dijele na veću ulaznu i manju izlaznu komoru (Gosling, 2008.).

Nakon unosa čestica hrane u šupljinu plašta slijedi prijenos preko škrge do labijalnih palpi. Labijalni palpi dio su plašta koji s prednje strane kamenice čini usni otvor, a nastavljaju se na škrge. Organ su na kojem se vrši selekcija hranjivih tvari odnosno unešenih čestica (Arapov i sur., 2010.). Selekcija podrazumijeva gutanje poželjnih i izbacivanje nepoželjnih čestica u

formi pseudofecesa. Ovisi o kemijskom i energetskom sastavu čestice, veličini i obliku čestice, dostupnosti i vrsti dostupnih hranjivih tvari. U želucu započinje mehanička obrada većih čestica odnosno lomljenje i usitnjavanje, a istovremeno započinje i enzimatska razgradnja čestica te se vrši ponovna selekcija (Gosling, 2008.; Arapov i sur., 2010.). Odabrana hrana ulazi u kanal probavnog divertikula gdje se događa unutarstanična probava. Ostatak poluprobavljenog sadržaja nastavlja put kroz crijevo gdje se miješa s ostalim neprobavljenim česticama. Neprobavljene čestice i tvari predstavljaju feces koji se iz tijela izbacuje kroz anus i otvor za disanje (Gosling, 2008.; Arapov i sur., 2010.). Uslijed visoke koncentracije hranjivih tvari smanjuje se filtracija i apsorpcija hranjivih tvari (Nielsen i sur., 2017.).

Rast kamenice ovisi o fiziološkim procesima filtracije, konzumacije hrane, respiracije, izlučivanja i razmnožavanja (Filippova i Vasechkina, 2023.). Odvijanje navedenih fizioloških procesa ovisi o veličini i starosti kamenice, temperaturi vode, salinitetu, dobu godine, dostupnosti hranjivih tvari te individualnim karakteristikama jedinke (Filippova i Vasechkina, 2023.). Stopa filtracije, koncentracija i hranjiva vrijednost hrane u vodi uvjetuju količinu unesene i asimilirane energije. Samo dio energije koju kamenica unese filtracijom se asimilira, drugi dio je odbačen selekcijom hrane. Asimilirana energija troši se na respiraciju, izlučivanje, rast tkiva, gonada i ljuštore. Stopa filtracije ovisi o starosti i veličini kamenice, temperaturi vode, koncentraciji hrane i hranjivoj vrijednosti i dobu dana. Općenito se odvija sporije na nižim temperaturama i ubrzava povećanjem temperature, a nakon 23°C stupnja počinje se usporavati. Filtracija ovisi o koncentraciji hrane u vodi, prezasićenost vode hranom ili niska koncentracija uzrokuju sporiju filtraciju. Stopa respiracije je uvjetovana temperaturom vode i veličinom jedinke. Izlučivanjem se troši energija, najvećim dijelom odnosi se na amonijak, a ovisi o temperaturi i veličini jedinke. Veća jedinka, veće mase tkiva može asimilirati više energije, ali troši više energije na metaboličke procese i stvaranje gonada. Najbrža stopa rasta somatskog tkiva primijećena je kod manjih jedinki. Filippova i Vasechkina (2023.) tvrde da je optimalna temperatura pri kojoj se asimilira najviše energije 22-24°C.

Europska kamenica je protandrični hermafrodit, sadrži ženske i muške reproduktivne organe. Prvo spolno dozrijeva kao mužjak, već u drugoj godini života, dok sazrijevanje ženskih gonada nastupa iduće godine, te nema mogućnosti samooplodnje (Cole, 1942.). Gonade su građene od reproduktivnog i vezivnog tkiva. Sastoje se od folikula i izvodnih kanalića koji se spajaju u gonodukt, koji spolne stanice izlučuje u plaštanu šupljinu (Cole, 1942.). Izlučivanje



spolnih stanica i promjena spola događa se sezonski, u hladnijim morima odvija se jednom u godini dok se u toplijim morima kao što je Jadransko more događa dva puta u godini (Bolotin i sur., 2022.). U jednoj sezoni mrijesta organizam izlučuje muške spolne stanice, zatim prolazi inverziju spola te stvara ženske gamete. Stvaranje ženskih gameta energetski je zahtjevnije stoga inverzija spola iz muškog u ženski spol traje dulje nego obratno. Sezoni mrijesta prethodi povećanje primarne produkcije i prisutnost visoke koncentracije hrane koji izaziva ubrzan rast i povećanje mase kamenice. Nakon sezone mrijesta dostupno je manje hrane, te se rast sasvim usporava jer se asimilirana energija troši primarno na respiraciju i metabolizam (Filippova i Vasechkina, 2023.).

U sezoni mrijesta na omjer spolova utječu uvjeti u ekosustavu, primjerice visoka temperatura i salinitet uzrokuju veći udio muških jedinki (Eagling i sur., 2017.). Izlučivanje spolnih stanica ovisi o kemijskim i temperaturnim uvjetima okoliša, u Jadranskom moru odvija se u lipnju i rujnu (Eagling i sur., 2017., Bolotin i sur., 2022.). U periodu pred mrijest gonade tvore mliječno bijeli sloj deo 2 do 3 mm koji prekriva tamnu boju probavne žlijezde (Zapata-Restrepo i sur., 2019.). Nakon izlučivanja iz gonada jajne se stanice zadržavaju unutar plaštane šupljine ženke te izgledaju poput mliječne mase. Spolno zrela kamenica u ženskoj fazi može proizvesti 1 do 1,5 milijuna jaja. Oplodnja kod *O. edulis* je unutrašnja, što znači da muške spolne stanice koje se izbacuju van organizma budu unesene u plaštanu šupljinu organizma u ženskoj fazi ciklusa gdje se događa oplodnja ženskih gameta (Yonge, 1960.). Oplodena jajna stanica dalje se razvija u plaštanoj šupljini ženke, do stadija velinger ličinke koja se još naziva i D ličinka zbog oblika. Inkubacija ovisi o temperaturi mora, prosječno traje 8 do 14 dana na temperaturama između 18 °C i 20 °C (Martin i sur., 1995.). Velinger ličinke veličine 160 do 200 µm izbacuju se iz plaštane šupljine u okoliš (Martin i sur., 1995.). Slijedi stvaranje poluprozirne ljuštare i organa veluma koji ima ulogu plivanja, izmjene plinova i apsorpcije otopljenih nutrijenata (Erdmann, 1935.). Pedivelinger ličinka ima razvijeno stopalo i može plivati i kretati se po podlozi, te razvija tamnu očnu pjegu (Erdmann, 1935.). Ovaj stadij ličinke kreće se suprotno od izvora svjetlosti u potrazi za odgovarajućim mjestom za pričvršćivanje prije nego što završi proces metamorfoze nakon kojeg više nema sposobnost plivanja. U trenutku pronalaska pogodne mikrolokacije žlijezda izlučuje spoj sličan cementu kojim se trajno pričvršćuje za podlogu te započinje sesilni stadij života i gubi velum, očnu pjegu i stopalo (Harper, 1991.). Temperatura ima najveći utjecaj na rast ličinki jer uvjetuje stopu metabolizma i uzrokuje pojačanu hranidbu (Robert i sur., 2017.). Ličinke često podnose više temperature od temperature vode u kojoj se nalazi matični stok, te pokazuju bolji rast na

višim temperaturama (Helm i sur., 2004.). *O. edulis* tolerira temperature od -1,5 °C do 35 °C i salinitet od 18 do 40 ‰, dok je optimalan raspon saliniteta 24-35 ‰ (Nielsen i sur., 2017.).

## 2.7. Indeks kondicije školjkaša

Indeks kondicije (IK) školjkaša pokazuje omjer količine mesa i ljuštore školjkaša (Župan i Šarić, 2014.). Značajan je prilikom procjene kvalitete školjkaša i plasmana na tržište, a koristi se u različite znanstvene i komercijalne svrhe (Župan i Šarić, 2014.). Školjkaš s većim udjelom mesa u odnosu na ukupnu masu organizma smatra se kvalitetnijim i poželjnijim (Župan i Šarić, 2014.). Kao što je ranije spomenuto, kamenica u prirodnim uvjetima okoliša najveći indeks kondicije ima u zimskim mjesecima s maksimumom u veljači i ožujku, niži u ljetnim mjesecima. Navedeno je posljedica uvjeta u ekosustavu i reproduktivnog ciklusa jedinki (Acarli i sur, 2011.).

Postoji više metoda računanja indeksa kondicije, a najčešće se koriste sljedeći izrazi:

$$\text{Indeks kondicije} = \frac{\text{masa prokuhanog mesa}}{\text{masa prokuhanog mesa} + \text{masa ljuštore}} \times 100 \quad [1]$$

$$\text{Indeks kondicije} = \frac{\text{masa prokuhanog mesa}}{\text{ukupni volumen} - \text{volumen ljuštore}} \times 100 \quad [2]$$

$$\text{Indeks kondicije} = \frac{\text{masa sušenog mesa}}{\text{masa ljuštore}} \times 100 \quad [3]$$

### 3. CILJEVI I SVRHA RADA

Istraživanje je osmišljeno kako bi se istražila mogućnost tovljenja kamenica u recirkulacijskom sustavu. Cilj ovog rada je istražiti utjecaj intenziteta hranidbe kamenica živim planktonom i komercijalnom hranom za školjkaše uzgajanih u recirkulacijskom sustavu na promjenu indeksa kondicije kamenica tijekom tri tjedna hranidbe.

Svrha rada je ispitati mogućnosti ublažavanja negativnih posljedica smanjenja primarne produkcije u prirodi, koje dovode do smanjenja potpunosti mesom, hranidbom kamenica u recirkulacijskom sustavu u sezoni kad su najtraženije. Na ovaj način moglo bi se proizvesti vrhunski kvalitetan proizvod u trenutku kad je najtraženiji i kad mu je cijena najviša te ostvariti najveću dobit.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Uzgoj fitoplanktona za potrebe provođenja pokusa

Uzgoj fitoplanktona za svrhu hranidbe kamenica u recirkulaciji započeo je 31. ožujka 2023. godine. Za uzgoj fitoplanktona korišten je fotobioreaktor PBR 1250 l proizvođača Industrial Plankton prikazan na Slici 2. Uređaj je bilježio podatke o temperaturi, pH vrijednosti, jakosti svjetla, rastu i gustoći planktona te povećanju volumena u stvarnom vremenu uz grafički prikaz. Doziranje hranjivog medija, dodavanje vode, upuhivanje CO<sub>2</sub> i zraka te miješanje planktona su automatizirani i izvršavaju se prema unaprijed određenim postavkama. Automatska filtracija, UV sterilizacija vode i filtracija zraka sprječavaju kontaminaciju kulture. Jednostanična alga *Tisochrysis lutea* (T-ISO) kontinuirano se uzgajala u umjetnoj morskoj vodi pri temperaturi od 22°C, pH vrijednosti 8,2 i jakosti svjetla od 50 %.



Slika 1. Fotobioreaktor Industrial Plankton (Autor: Marija Brkić)

Brzina dodavanja hranjivog medija podešena je na 1,0 ml/sat na 1 litar mora dodanog u sustav. Za „ishranu“ fitoplanktona korišten je modificirani F/2 hranjivi medij po Guillardu dobiven prema recepturi dostupnoj na internetskoj stranici [https://ncma.bigelow.org/PDF%20Files/NCMA%20algal%20medium%20f\\_2.pdf](https://ncma.bigelow.org/PDF%20Files/NCMA%20algal%20medium%20f_2.pdf) (Guillard, 1975., Guillard i Ryther, 1962.). Maksimalna gustoća T-ISO postignuta u kontinuiranom uzgoju za vrijeme prvog pokusa je bila 12 milijuna stanica/ml. Maksimalna gustoća T-ISO postignuta uzgojem u „batch“ kulturi u drugom pokusu je bila 30 milijuna stanica/ml. Procjena koncentracije fitoplanktona u kulturi je napravljena pri svakom uzimanju kulture za hranidbu kamenica u pokusu. Koncentracija je procijenjena na temelju brojanja stanica pod mikroskopom u Thoma hemocitometru.

## **4.2. Pokus 1.**

### **4.2.1. Postavljanje pokusa**

Pokus je proveden u travnju 2023. godine u trajanju od 3 tjedna. Korištena su dva recirkulacijska sustava. Svakom sustavu nalazila su se tri cilindrična polietilenska (PE 100) uzgojna bazena s konusnim dnom i ventilom za otpuštanje vode (Slika 3.), biofilar System 1000 proizvođača Biosystems (Slika 4.) i sustav polietilenskih cijevi s ventilima za upravljanje protokom vode. Ukupni volumen bazena iznosi 150 l, a u svakom bazenu tijekom provođenja pokusa nalazi se 130 l umjetne morske vode. Biofilar System 1000 ima spremnik volumena 250 l, sadrži mehanički vrećasti filtar finoće 200 µm, pumpu za vodu REEF-Pump 2000 DC, biološki filtar REEF-Filter Bio 1500, prokapni biofilar, uređaj za uklanjanje proteina REEF-Skim PRO 1500 DC i komercijalni UV sterilizator P2-110W. Prokapni biofilar sadrži plastične prstenove promjera 1“ kao supstrat za naseljavanje kulture bakterija prosječne površine 210 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>. Ima funkciju biološke filtracije, otplinjavanja CO<sub>2</sub> i reoksigenacije vode. Sve komponente uređaja izrađene su od visokokvalitetnih netoksičnih polipropilenskih, PVC i akrilnih materijala.

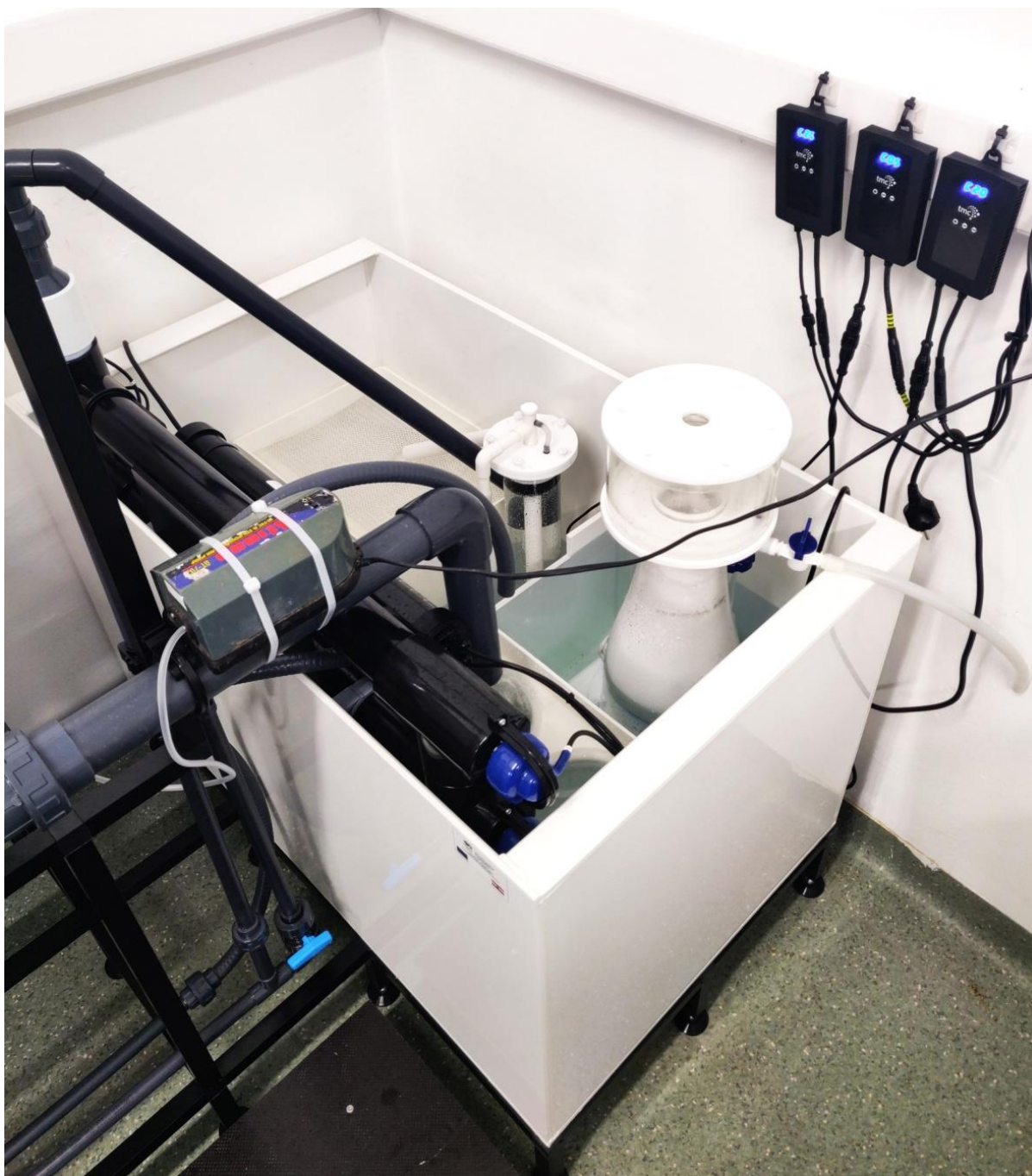
Temperatura umjetne morske vode u recirkulacijskom sustavu je održavana pomoću uređaja za grijanje/hlađenje morske vode Teco TK2000 G2 R290 kroz koji je prolazila voda u recirkulaciji.



Slika 3. Uzgojni bazeni u recirkulacijskom sustavu (Autor: Marija Brkić)

Pokus je proveden u umjetnoj morskoj vodi. Umjetna morska voda je pripremljena dodavanjem mješavine soli za pripremu umjetne morske vode „Tropic Marine Sea salt“ u RO vodu, odnosno vodovodnu vodu koja je prethodno pročišćena pomoću uređaja za reverzibilnu osmozu V2 Pure 100 RO System proizvođača Tropical Marine Centre. Slanost umjetne morske vode u pokusu je iznosila 35 ‰. U svakom bazenu je postavljen kamen za prozračivanje preko kojeg je pumpanjem zraka osigurano stalno prozračivanje (aeracija) morske vode. Cijeli sustav za provođenje pokusa je pokrenut 21. ožujka 2023. godine s ciljem uspostavljanja biofiltracije, prvenstveno biofiltracije amonijaka. U svrhu brže uspostave rada biofiltra u bazene je dodana otopina EasyStart proizvođača EasyLife koja sadrži aktivne kulture bakterija za pokretanje biofiltra u akvarijima s morskom vodom. Prostorija u kojoj se nalaze recirkulacijski sustavi je klimatizirana na temperaturu što bližu temperaturi vode za vrijeme provođenja pokusa.





Slika 4. Biološki filter u recirkulacijskom sustavu (Autor: Marija Brkić)

Kamenice za pokus su izlovljene 28. ožujka 2023. godine na uzgajalištu PLATFORMA 22 d.o.o. u Šibenskom zaljevu gdje je temperatura mora iznosila 15 °C. Očišćene su od organizama koji su obrasli ljuštore (obraštaj) kako bi se smanjio unos stranih organizama u sustav recirkulacije te osiguralo preciznije mjerenje vaganjem. Istovremeno su uklonjene iznimno male i velike jedinice s ciljem postizanja ujednačenog uzorka.

Kamenice su raspoređene u šest uzgojnih bazena tako da je u svaki stavljena 21 jedinka. Tri bazena (označena 1, 2, 3) čine liniju 1 a druga tri bazena (označena 4, 5, 6) liniju 2. Dvije linije podvrgnute su različitom tretmanu pokusa, a tri bazena u liniji predstavljaju replikacije pokusa.

#### **4.2.2. Aklimatizacija**

Temperatura bazena u trenutku postavljanja kamenica iznosila je 15 °C. Ciljana temperatura u pokusu je bila 20 °C. kako pokusu ne bi prethodio temperaturni stres kamenice su aklimatizirane kroz sedam dana, postupnim povećanjem temperature od 0,5 °C po danu, do temperature od 18 °C. Tijekom aklimatizacije kamenice nisu hranjene kako bi se umanjio mogući stres. Nakon prvog uzorkovanja počelo je postupno privikavanje kamenica na prisutnost hrane u vodi, a temperatura se i dalje postupno (0,5 °C/dan) povećavala do temperature provođenja pokusa od 20 °C.

#### **4.2.3. Provođenje pokusa**

Prvi uzorci za analizu indeksa kondicije uzorkovani su 3. travnja 2023. godine - nakon provedene aklimatizacije. Iz svakog bazena uzorkovano je 7 jedinki, ukupno 42 jedinke. U svakom bazenu ostalo je 14 kamenica. Na temelju podataka o prosječnoj težini suhe mase tkiva kamenica iz prvog uzorkovanja izračunat je dnevni obrok kamenica koji iznosi 3 % prosječne suhe mase kamenice. Izračun je napravljen prema Helm i sur. (2004.).

Nakon provedene aklimatizacije započelo je postupno privikavanje kamenica na prisutnost hrane u vodi. Prvog dana u svaku liniju (odnosno 3 bazena) dodano je 0,5 l živog planktona *Tisochrysis lutea* (T-ISO) koncentracije od 6 milijuna stanica/ml. Narednog dana dodan je 1 l T-ISO u svaku liniju a sljedećeg dana 1,5 l. Količina se postupno povećavala do količine od 3 l T-ISO koncentracije 6 milijuna stanica/ml po liniji, odnosno 1 l koncentracije 6 milijuna stanica/ml po bazenu, kojom su se kamenice hranile do početka pokusa. Prvih dana privikavanja kamenica na prisutnost hrane je otvoren protok vode kroz bazene i biofiltre. Količina amonijaka u bazenima mjerena je koristeći Salifert Profi NH<sub>4</sub> Test koji može otkriti 0,5 µg/l ukupnog amonijaka s visokom preciznošću. Nisu utvrđene količine amonijaka opasne za kamenice što upućuje na pravilan rad biofiltra. Tijekom privikavanja kamenica na hranidbu temperatura se nastavlja postupno povećavati do 20 °C.

Pokus je započeo 12. travnja 2023. godine i provodio se na temperaturi bazena od približno 20 °C u dvije linije po tri bazena. Za vrijeme trajanja pokusa bazeni su bili pored prozora pa je duljina trajanja svjetla i tame ovisila o prirodnom fotoperiodu. Tijekom hranjenja u svakom



bazenu nalazilo se 14 kamenica. Linija 1 hranjena je živim planktonom T-ISO, a linija 2 komercijalnom koncentriranom hranom za školjkaše Instant Algae Shellfish diet 1800 proizvođača Reed Mariculture (Anonimus, n.d.). Dnevni obrok iznosio je 3 % prosječne suhe mase kamenice (Helm i sur., 2004.). Prosječna suha masa kamenice dobivena je iz analize prvog uzorka i iznosila je 1,25 g. Broj kamenica u bazenu je 14, pa je ukupno po bazenu potrebno dati 1,575 g suhe tvari hrane kako bi se osigurao dnevni obrok po kamenici od 3 % prosječne suhe mase kamenice.

Iz ukupne mase suhe tvari hrane po bazenu izračunat je ekvivalentan broj stanica T-ISO prema izrazu:

$$\frac{\text{ukupna masa suhe tvari hrane po bazenu}}{0,000022} \times 1\,000\,000 \quad [4]$$

Broj stanica T-ISO u suhoj tvari hrane po bazenu podijeljen je s koncentracijom živog planktona po litru čime je dobivena količina fitoplanktona u dnevnom obroku za svaki bazen izražena u litrama.

Na početku hranidbe koncentracija T-ISO iznosila je 6 milijuna stanica/ml, pa je ukupna količina hrane po danu za liniju 1 iznosila 12 l planktona, odnosno 4 l planktona po bazenu. Prije ulijevanja fitoplanktona u bazen prilikom hranidbe pomoću ventila na dnu otpuštena je ekvivalentna količina vode. Otpuštanjem se ujedno odnosi talog neprobavljene organske tvari i sedimentiranih stanica fitoplanktona sa dna bazena. U trenutku hranjenja koncentracija fitoplanktona u vodi u uzgojnom bazenu iznosila je približno 180 000 stanica/ml.

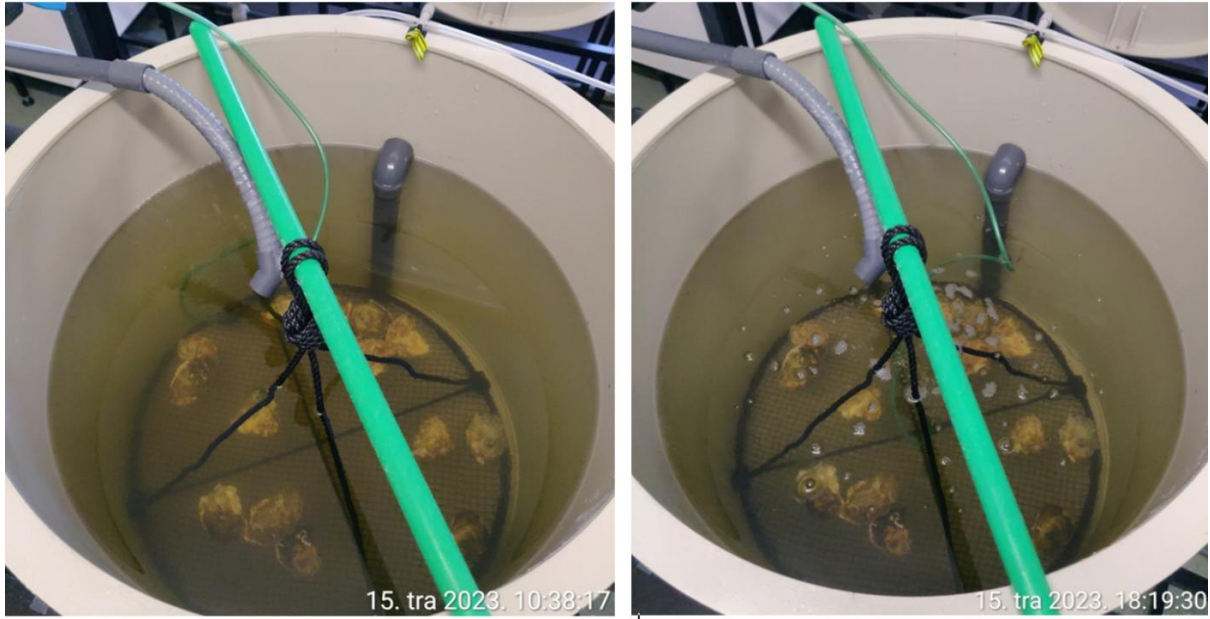
Linija 2 hranjena je komercijalnom koncentriranom hranom za školjkaše Shellfish diet 1800. Shellfish diet 1800 je mješavina algi koja sadrži vrste *Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana* i *Thalassiosira weissflogii*. Masa suhe tvari Shellfish diet 1800 iznosi 8 %. Količina koncentrirane hrane za školjkaše koju je potrebno dati po danu kako bi se postigao dnevni obrok po kamenici od 3 % suhe mase iznosi 20 ml za cijelu liniju 2. Količina od 20 ml koncentrirane hrane je razmućeno u 3 l mora iz linije 2. U svaki bazen je dodan 1 l dobivene otopine dnevno.

Kamenice su hranjene u jutarnjim satima, na način da je ukupan dnevni obrok dodan u bazen u dva navrata u razmaku od nekoliko sati kako bi se umanjio stres izazvan promjenom koncentracije hranjive tvari u vodi i temperaturni stres. Naime, temperatura u kulturi fitoplanktona je bila 22 °C pa bi prevelik unos uzrokovao porast temperature u uzgojnim bazenima. Za vrijeme hranjenja protok vode kroz bazene je zatvoren kako bi se spriječio gubitak hrane filtriranjem kroz biofilar, što su kao problem hranidbe u recirkulacijskim

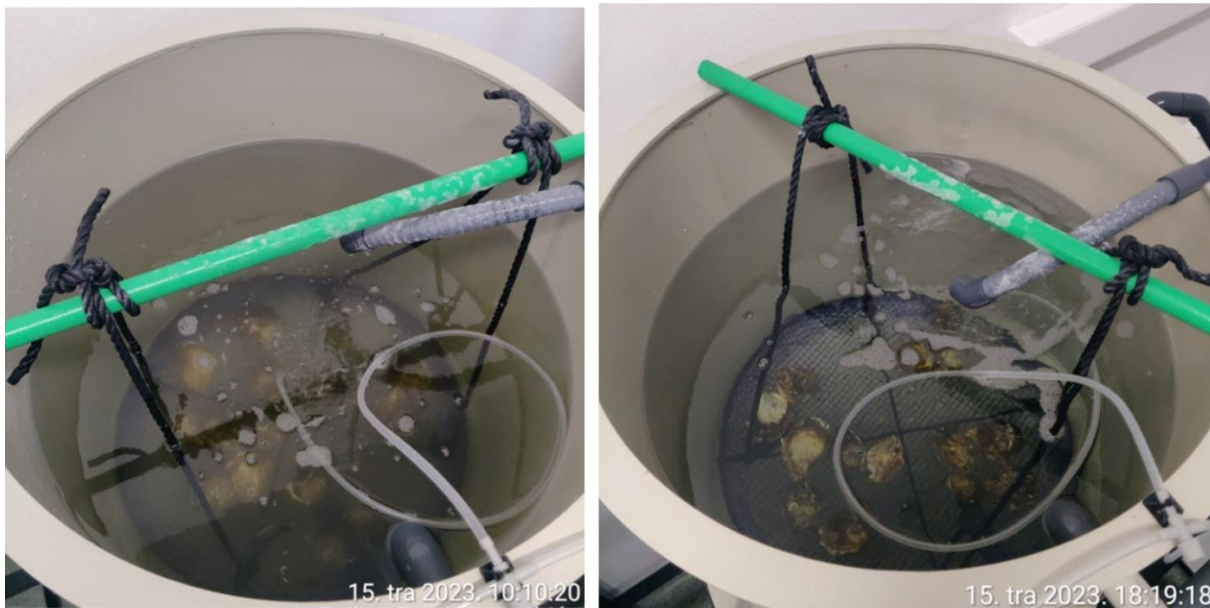
sustavima naveli Kamermans i sur. (2016.). Održavanje ravnomjerne koncentracije fitoplanktona u bazenima za vrijeme zatvorenog protoka je postignuto prozračivanjem bazena, čime je istovremeno osigurana i oksigenacija mora u bazenima (Slika 5.). Nakon hranidbe u kasnim popodnevnim satima se uključuje protok vode kroz bazene i biofiltrar radi mehaničke i biološke filtracije morske vode u bazenima. Hranjenje se provodilo za dnevnog svjetla i uz umjetnu rasvjetu u prostoriji. Period dnevnog svjetla i hranjenje u vrijeme pokusa je trajalo otprilike 10 sati. Koncentracija fitoplanktona u bazenima nije mjerena, ali su evidentirana opažanja „bistrenja“/promjene boje vode u bazenima koja su mogla biti posljedica filtracije ili/i taloženja fitoplanktona. Promjena u prozirnosti vode u bazenu na početku dnevnog hranjenja i na kraju hranjenja prikazana je na Slikama 6. i 7. Tijekom prvih deset dana hranidbe kamenica koncentracija živog planktona varirala je između 6 i 10 milijuna stanica/ml. Za svaki dan pokusa je izračunata potrebna količina dnevnog obroka koristeći navedeni izraz [4].



Slika 5. Aeriranje bazena u svrhu oksigenacije i ravnomjerne koncentracije fitoplanktona  
(Autor: Marija Brkić)



Slika 6. Uzgojni bazen u liniji 2 dva sata nakon hranidbe (lijevo) i deset sati nakon hranidbe (desno) (Autor: Marija Brkić)



Slika 7. Uzgojni bazen u liniji 1, dva sata nakon hranidbe (lijevo) i deset sati nakon hranidbe (desno) (Autor: Marija Brkić)

Nakon 10 dana hranidbe provedeno je drugo uzorkovanje. Iz svakog bazena uzorkovano je 7 kamenica, ukupno 42 kamenice. Količina dnevnog obroka prilagođena je smanjenom broju kamenica u bazenu na način da dnevni obrok po kamenici i dalje iznosi 3 % prosječne suhe

mase kamenice. U svakom bazenu nakon drugog uzorkovanja nalazilo se 7 kamenica. Ventilom na dnu bazena otpušteno je 10 l vode iz svakog bazena kako bi se uklonio talog na dnu. Ispuštena količina morske vode je nadomještena svježom umjetnom morskom vodom.

Na dan 25. travnja 2023. godine dogodila se kontaminacija kulture T-ISO u uzgoju u fotobioreaktoru. S obzirom da invazivna vrsta nije unesena iz čiste kulture nije moguće bilo precizno utvrditi vrstu. Na temelju mikroskopskog pregleda i na temelju činjenice da je početna kultura T-ISO donesena iz mrijestilišta za ribe u kojem se dominantno uzgaja alga *Nannochloropsi sp.* osnovano se može pretpostaviti da je početna kultura kontaminirana algom *Nannochloropsis sp.* Koncentracija T-ISO počela je padati ispod 5 milijuna stanica/ml. To je uzrokovalo problem jer je tijekom hranidbe bilo potrebno dodavati sve više litara fitoplanktona u bazen. Temperatura na kojoj se T-ISO uzgaja iznosila je 22 °C a temperatura vode u uzgojnim bazenima 20 °C. Budući da je protok vode kroz bazen zatvoren tijekom hranjenja, kamenice hranjene živim planktonom bile su izložene temperaturnom stresu za vrijeme hranjenja. Do kraja pokusa posebno se pazilo na prozračivanje bazena tijekom hranjenja.

Koncentracija alge *Nannochloropsis* u fotobioreaktoru na dan 1. svibnja 2023. godine prelazila je 700 000 stanica/ml. Koncentracija T-ISO iznosila je 2,4 milijuna stanica/ml. U izračunu koncentracije živog fitoplanktona uzimala se u obzir koncentracija T-ISO i ekvivalent koncentracije *Nannochloropsis* prema odnosu suhe tvari T-ISO i *Nannochloropsis* 2:1. Količina fitoplanktona koju je potrebno dati po bazenu računala se prema ekvivalentu koncentracije živog fitoplanktona (T-ISO + *Nannochloropsis*).

Zbog značajne kontaminacije kulture T-ISO pokus je prekinut 11 dana nakon drugog uzorkovanja. Provedeno je treće uzorkovanje u kojem je uzorkovano posljednjih 7 kamenica iz svakog bazena.

#### **4.2.4. Uzorkovanje i mjerenje**

Prvi uzorci kamenica uzeti su nakon provođenja aklimatizacije 3. travnja 2023. godine. Uzorkovano je po 7 kamenica iz svakog bazena, ukupno 42 kamenice. Za svaku jedinku zabilježen je redni broj, linija i bazen iz kojeg je uzorkovana. Za računanje indeksa kondicije kamenica korištena je suha masa tkiva i suha masa ljuštura prema izrazu [3] navedenom u pregledu literature.

Duljina i širina jedinke mjerena je pomičnim mjerilom, preciznosti 1 mm. Zatim je kamenica otvorena (Slika 8.). Ukupna masa jedinke izvagana je na način da je donja ljuštura s tkivom kamenice stavljena na gornju ljušturu, i zatim u petrijevu zdjelicu. Za vaganje je korištena



analitička vaga Symmetry proizvođača Cole-Parmer preciznosti 0,001 g. Analitička vaga prethodno je tarirana na masu korištene petrijeve zdjelice. Tkivo kamenice je zatim precizno sastrugano s ljuštire skalpelom i stavljeno na prethodno izvagani komad aluminijske folije na kojem je naznačena njegova masa. Masa folije zabilježena je u tablici s podacima uz odgovarajuću kamenicu. Tkivo kamenice izvagano je zajedno s folijom a zatim je dobiveni rezultat umanjen za masu folije. Masa ljuštire izvagana je na petrijevoj zdjelici na način da je donja ljuštura stavljena na gornju ljušturu i zatim na petrijevu zdjelicu. Analitička vaga prethodno je tarirana na masu korištene petrijeve zdjelice. Na tako složene ljuštire stavljena je aluminijska folija s tkivom kamenice uz redni broj kamenice zabilježen na manjem komadu folije, zatim je sve zajedno stavljeno na rešetku za sušenje. Ovaj postupak ponovljen je za sve uzorke. Rešetke s pripremljenim uzorcima (Slika 9.) stavljene su u sušilicu na temperaturu od 60 °C. Sušenje je trajalo 48 sati. Nakon sušenja uzorci su izvađeni, ohlađeni i ponovno izvagani. Masa suhog tkiva izvagana je zajedno s aluminijskom folijom na kojoj se nalazi a zatim je dobiveni rezultat umanjen za masu folije. Masa suhe ljuštire izvagana je samostalno. Prije vaganja uklonjen je mali komad folije s rednim brojem uzorka. Svi izmjereni podaci zabilježeni su u tablici.



Slika 8. Otvorena kamenica prije vaganja (Autor: Marija Brkić)



Slika 9. Rešetka s obrađenim uzorcima kamenica pripremljenim za sušenje (Autor: Marija Brkić)

Drugo uzorkovanje provedeno je 23. travnja 2023. godine nakon 10 dana hranjenja kamenica. Iz svakog bazena uzorkovano je 7 jedinki, ukupno 42 jedinke. Mjerenja su provedena na jednak način opisan u prvom uzorkovanju.

Treće uzorkovanje provedeno je na kraju pokusa 5. svibnja 2023. godine, nakon još 11 dana hranidbe kamenica dnevnim obrokom od 3 % suhe mase kamenice. Iz svakog bazena uzorkovano je 7 jedinki, ukupno 42 jedinke. Mjerenja su provedena na jednak način opisan u prvom uzorkovanju. Prilikom otvaranja kamenica slučajnim odabirom je uzeto nekoliko uzoraka sadržaja želuca odnosno probavne žlijezde radi pregleda pod optičkim mikroskopom.

#### **4.3. Pokus 2.**

Nakon poteškoća u uzgoju alge T-ISO u prvom pokusu i neplaniranog prekidanja pokusa napravljen je novi pokus u rujnu 2023. godine. Na temelju iskustava stečenih u pokusu 1. postavlja se pokus 2. U pokusu 2. sve kamenice hranjene su jednakom mješavinom živog

planktona T-ISO i komercijalnog koncentrata Shellfish diet 1800 ali različitim količinama dnevnog obroka s ciljem ispitivanja utjecaja količine dnevnog obroka na uspješnost hranidbe. Prije početka pokusa započeo je uzgoj fitoplanktona *Tisochrysis lutea* (T-ISO) u fotobioreaktoru PBR 1250 l proizvođača Industrial Plankton. T-ISO uzgajao se u batch kulturi u umjetnoj morskoj vodi pri temperaturi od 22 °C, pH vrijednosti 8,2 i jakosti svjetla od 50 %. Brzina dodavanja hranjivog medija bila je podešena na 1,0 ml/sat. Za „ishranu“ fitoplanktona korišten je F/2 hranjivi medij. Maksimalna gustoća T-ISO postignuta uzgojem u batch kulturi za vrijeme drugog pokusa bila je 30 milijuna stanica/ml. Za vrijeme trajanja pokusa nije zabilježena značajna kontaminacija kulture T-ISO kulturom *Nannochloropsis*.

#### **4.3.1. Postavljanje pokusa**

Korištena su dva recirkulacijska sustava, u svakom sustavu nalazila su se dva cilindrična polietilenska (PE 100) uzgojna bazena s konusnim dnom i ventilom za otpuštanje vode, biofilar System 1000 proizvođača Biosystems i sustav polietilenskih cijevi s ventilima za upravljanje protokom vode. Ukupni volumen uzgojnih bazena iznosio je 150 l a u svakom bazenu tijekom provođenja pokusa nalazilo se 130 l umjetne morske vode. Biofilar System 1000 opisan je u prvom pokusu. Umjetna morska voda u kojoj je proveden pokus je pripravljena dodavanjem mješavine soli za pripremu umjetne morske vode „Tropic Marine Sea salt“ u RO vodu, odnosno vodovodnu vodu koja je prethodno pročišćena pomoću uređaja za reverzibilnu osmozu V2 Pure 100 RO System tvrtke Tropical Marine Centre. Slanost umjetne morske vode u pokusu je iznosila 35 ‰. U svakom bazenu je postavljen kamen za prozračivanje preko kojeg je pumpanjem zraka osigurano stalno prozračivanje morske vode. Cijeli sustav za provođenje pokusa je pokrenut 22. rujna 2023. godine s ciljem uspostavljanja biofiltracije, prvenstveno biofiltracije amonijaka. U svrhu brže uspostave rada biofiltra u bazene je dodana otopina EasyStart proizvođača EasyLife koja sadrži aktivne kulture bakterija za pokretanje biofiltara u akvarijima s morskom vodom. Prostorija u kojoj se nalaze recirkulacijski sustavi je klimatizirana na temperaturu što bližu temperaturi vode za vrijeme provođenja pokusa. Temperatura umjetne morske vode u recirkulacijskom sustavu je održavana pomoću uređaja za grijanje/hlađenje morske vode TECO TK2000 G2 R290 kroz koji je prolazila voda u recirkulaciji.

Kamenice za pokus su izlovljene 6. listopada 2023. godine na uzgajalištu PLATFORMA 22 d.o.o u Šibenskom zaljevu gdje je temperatura mora iznosila 22 °C. Očišćene su od organizama koji su obrasli ljuštare (obraštaj) kako bi se smanjio unos stranih organizama u



sustav recirkulacije te osigurano preciznije mjerenje vaganjem. Istovremeno su uklonjene iznimno male i velike jedinice s ciljem postizanja ujednačenog uzorka.

Kamenice su položene u četiri bazena označena slovima A, B, C, i D. U dva bazena (B i D) položeno je 50 kamenica te predstavljaju skupinu s visokom gustoćom kamenica, a u druga dva bazena (A i C) položene su 32 kamenice i predstavljaju skupinu s niskom gustoćom kamenica. U svakoj liniji nalazi se jedan bazen s 32 kamenice i jedan bazen s 50 kamenica. Dvije linije predstavljaju ponavljanje pokusa.

#### **4.3.2. Aklimatizacija**

Temperatura bazena u trenutku postavljanja kamenica iznosila je 18°C. Ciljana temperatura u pokusu je bila 21 °C. Kako pokusu ne bi prethodio temperaturni stres kamenice su aklimatizirane kroz sedam dana, postupnim povećanjem temperature od 0,5 °C po danu. Tijekom prva tri dana aklimatizacije kamenice nisu hranjene kako bi se umanjio mogući stres. Trećeg dana započinje postupno privikavanje kamenica na prisutnost hrane u vodi i traje narednih tjedan dana uz daljnje postupno povećanje temperature (0,5 °C/dan). Trećeg dana aklimatizacije u svaki bazen dodano je 0,3 l živog planktona T-ISO koncentracije 20 milijuna stanica/ml. Četvrtog dana aklimatizacije u svaki bazen dodano je 0,5 l živog planktona, petog dana 1 l, a šestog dana 1,5 l. Hranjenje tijekom aklimatizacije odvijalo se tijekom kasnih jutarnjih i ranih popodnevni sati u trajanju od najviše 3 sata prilikom kojih je zatvoren protok vode kroz bazene i biofiltrar.

#### **4.3.3. Provođenje pokusa**

Nakon provedene aklimatizacije provedeno je prvo uzorkovanje na dan 11. listopada 2023. Iz svakog bazena uzorkovano je 14 kamenica. Nakon prvog uzorkovanja u bazenima s visokom gustoćom kamenica (B i D) nalazilo se 36 jedinki a u bazenima s niskom gustoćom kamenica (A i C) nalazilo se 18 jedinki. Na temelju prvog uzorkovanja izračunata je prosječna masa suhog tkiva kamenice.

Još 4 dana nastavljeno je privikavanje kamenica na veću prisutnost hrane u vodi na način da se količina T-ISO koja se dodaje u bazen povećavala za 0.5 l po danu do količine od 3 l po bazenu. Hranidba živim planktonom u fazi prilagodbe kamenica na uzgojne uvjete se provodila za dnevnog svjetla. Promatranjem je uočeno slabo „razrijeđenje“ planktona u bazenima i neznatno otvaranje kamenica. Praćenjem stanja u bazenima je primijećeno da se kamenice otvaraju 2 do 3 sata nakon zalaska sunca i da se tada koncentracija fitoplanktona

očigledno i brzo smanjuje. Na temelju opažanja vremena aktivne hranidbe kamenica postavlja se vrijeme hranidbe od 19 sati na večer do 9 sati ujutro.

Hranidba kamenica ciljanom količinom hrane započela je 16. listopada 2023. godine. Provođena je na način da su svi uzgojni bazeni hranjeni jednakom količinom fitoplanktona po danu. U bazenima s visokom gustoćom jedinki, bazeni B i D, kamenice su hranjene dnevnim obrokom po jedinki od približno 3 % prosječne mase suhe tvari kamenice (Helm i sur. 2004.). U bazenima A i C nalazilo se dvostruko manje kamenica pa je dnevni obrok po jedinki iznosio 6 % prosječne mase suhe tvari kamenice. Dnevni obrok je izračunat na temelju prosječne mase suhe tvari kamenica iz prvog uzorkovanja prema autorima Helm i sur. (2004.). Sastojao se od približno 30 % komercijalne koncentrirane hrane za školjkaše Shellfish diet 1800 i približno 70 % živog planktona T-ISO. Količina od 4 ml Shellfish diet 1800 je rastopljena u odgovarajućoj količini živog planktona. Količina živog planktona u dnevnom obroku ovisi o koncentraciji stanica T-ISO koja je podložna dnevnim promjenama. Za svaki dan izračunata je potrebna količina planktona u dnevnom obroku koristeći navedeni izraz [4]. Pri koncentraciji stanica T-ISO od 10 milijuna stanica/ml dnevni obrok sadrži 3,6 l fitoplanktona. Zbog jednostavnosti količina planktona se zaokruživala na veći cijeli broj, u ovom slučaju 4 l. Iskustva stečena u prvom pokusu podupiru tu odluku.

Za vrijeme hranidbe kamenica je zatvoren protok vode kroz biofiltrar. Održavanje ravnomjerne koncentracije fitoplanktona u bazenima za vrijeme zatvorenog protoka je postignuto prozračivanjem bazena, čime je istovremeno osigurana i oksigenacija mora u bazenima. Nakon hranidbe se uključuje protok vode kroz bazene i biofiltrar radi mehaničke i biološke filtracije morske vode u bazenima.

Tijekom hranidbe su mjereni parametri u uzgojnim bazenima. Parametri tijekom hranjenja bili su u prihvatljivom rasponu vrijednosti. Nakon 10 dana hranidbe ispušteno je 10 l vode iz svakog bazena i nadomješteno svježom umjetnom morskom vodom. Hranidba kamenica trajala je 21 dan. Nakon provedene hranidbe obavljeno je drugo uzorkovanje. Uzorkovano je 14 jedinki iz svakog bazena. Preostale 52 kamenice su višak i nisu uzorkovane.

#### **4.3.4. Uzorkovanje i mjerenje**

Nakon provedene aklimatizacije provedeno je prvo uzorkovanje na dan 11. listopada 2023. godine. Iz svakog bazena je uzorkovano 14 kamenica, od čega je sedam kamenica uzorkovano za analizu indeksa kondicije. Drugo uzorkovanje provedeno je dana 6. studenog 2023. godine nakon završenog pokusa. Uzorkovano je 14 jedinki iz svakog bazena, od čega je sedam kamenica uzorkovano za analizu indeksa kondicije. Na Slici 10. prikazane su otvorene

kamenice uzorkovane na kraju pokusa prije vaganja i pripreme uzoraka za sušenje. Uzorci za analizu indeksa kondicije obrađeni su jednakim postupkom opisanim u prvom pokusu. Mjerena je duljina i širina kamenice, ukupna masa, masa tkiva, suha masa tkiva i suha masa ljuštire.



Slika 10. Otvorene kamenice u drugom uzorkovanju prije vaganja (Autor: Marija Brkić)

#### **4.3.5. Praćenje fizikalno kemijskih parametara**

Tijekom drugog pokusa mjereni su sljedeći parametri vode u bazenima: temperatura, koncentracija otopljenog kisika, zasićenost kisikom, pH vrijednost i salinitet. Navedeni parametri mjereni su SmartOxy prijenosnim oksimetrom s optičkom sondom za kisik i sondom za mjerenje pH vrijednosti (Slika 11.). Mjerenje se provodilo svaki dan u jutarnjim satima nakon hranjenja kamenica.



Slika 11. SmartyOxy prijenosni oksimetar s priključenom sondom za pH (Autor: Marija Brkić)

Koncentracija amonijaka u vodi određena je salicilat-hipoklorit metodom za određivanje amonijaka u morskoj vodi (Bower et Holm-Hansen, 1980.). Ukupni amonijak ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) u umjetnoj morskoj vodi određen je spektrofotometrijskom metodom u kojoj se indofenol modriilo proizvodi reakcijom amonijaka sa salicilatom i hipokloritom, u prisutnosti natrijeva

nitroprusida (Bower et Holm-Hansen, 1980.). Za analizu amonijaka u vodi svakodnevno je uzorkovana voda u bazenu i voda koja je prošla kroz biofiltrar u jutarnjim satima nakon hranjenja kamenica.

#### **4.4. Statistička obrada podataka u pokusima 1 i 2**

Srednje vrijednosti i standardna devijacija mjerenih parametara i indeksa kondicije izračunati su koristeći statistički program MS Excel.

Statistička obrada srednjih vrijednosti i standardnih devijacija mjerenih parametara i indeksa kondicije provedeni su u programu za statističku obradu podataka Statistica verzija 14.

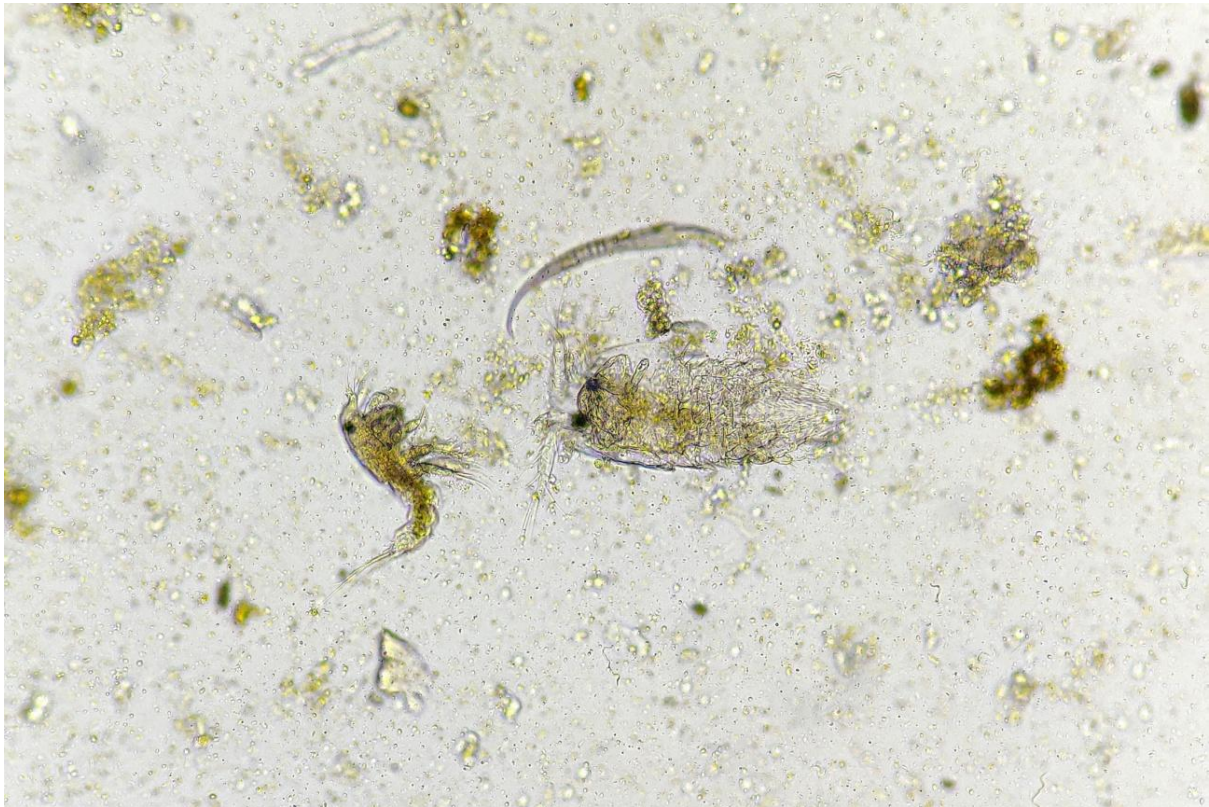
Prije testiranja razlika izmjerenih i izračunatih vrijednosti parametrijskim testom proveden je Levenov test za homogenost varijance i Kolmogorov-Smirnov Test za normalnu distribuciju podataka. Za parametre u kojima je utvrđena homogenost varijance i normalna distribucija provedene su testovi jednosmjerne i dvosmjerne analize varijance ( $p < 0,05$ ). Za parametre kojima je varijanca nehomogena provedeno je testiranje razlika srednjih vrijednosti neparametrijskim (Kruskal-Wallis) testom, a statistička značajnost pojedinih prosječnih vrijednosti je testirana pomoću višestruke usporedbe P vrijednosti. Za testiranje značajnosti razlika indeksa kondicije po kriteriju gustoće uzgoja u drugom pokusu napravljen je t-test.



## 5. REZULTATI

### 5.1. Pokus 1.

Mjerenja amonijaka u vodi tijekom provođenja pokusa maksimalno su iznosila 0.15 µg/l. Temperatura vode u bazenima tijekom provođenja pokusa se kretala između 19°C i 21°C. Tijekom uzrokovanja je napravljen mikroskopski pregled sadržaja probavne žlijezde radi provjere prisutnosti hrane prikazan na Slici 12.



Slika 12. Mikroskopski pregled uzorka sadržaja probavne žlijezde. U sadržaju je vidljiva i prisutnost „račića“ koji je vjerojatno unesen u recirkulacijski sustav s kamenicama (Autor: Marija Brkić)

Rezultati mjerenja duljine, širine, ukupne mase, mase tkiva, mase suhog tkiva, mase suhe ljuštore i indeks kondicije koji su izračunati na temelju mjerenja na datum 3. travnja, 23. travnja i 5. svibnja 2023. godine su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz rezultata mjerenja i indeks kondicije kamenica uzgajanih u recirkulacijskom sustavu u pokusu 1

	Linija 1			Linija 2		
	3. travnja	23. travnja	5. svibnja	3. travnja	23. travnja	5. svibnja
Duljina (cm)	6,94 ± 0,74	7,52 ± 1,01	7,19 ± 0,73	7,25 ± 0,98	6,86 ± 0,89	7,21 ± 0,76
Širina (cm)	6,16 ± 0,60	5,77 ± 0,50	5,98 ± 0,63	6,44 ± 0,54	6,18 ± 0,67	5,90 ± 0,69
Ukupna masa (g)	49,74±10,49	48,42±10,12	51,26±16,80	56,86±14,49	46,86±13,60	52,02±17,46
Masa tkiva (g)	6,94 ± 1,99	5,63 ± 1,17	6,52 ± 2,39	8,11 ± 2,36	5,64 ± 1,89	5,82 ± 1,57
Masa suhog tkiva (g)	1,13 ± 0,50	0,82 ± 0,25	0,92 ± 0,36	1,15 ± 0,54	0,69 ± 0,36	0,75 ± 0,27
Masa suhe ljuštore (g)	27,62± 6,47	26,91± 7,17	28,89± 9,51	32,21± 8,90	26,58± 8,09	28,38±10,92
Indeks kondicije	3,96 ± 1,37	3,15 ± 0,86	3,22 ± 0,69	3,66 ± 1,68	2,66 ± 1,16	2,77 ± 0,88

Tijekom pokusa nisu utvrđene značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između duljina (Tablica 2.) i ukupne mase kamenica (Tablica 4.) po kriterijima datuma mjerenja i uzgojnog bazena u kojem je proveden pokus. Srednje vrijednosti širine kamenica po kriteriju datuma su bile značajno različite ( $p = 0,016$ ) (Tablica 3.).

Indeks kondicije (IK) kamenica razvrstan po kriteriju datuma uzorkovanja je bio značajno različit ( $p = 0,0045$ ) (Kruskal-Wallis test; Tablica 5.). Post hoc analiza (Tablica 6.) pokazuje značajnu razliku između IK u prvom uzorkovanju i indeksa kondicije u drugom i trećem uzorkovanju. U prvom uzorkovanju IK je znatno veći nego u druga dva uzorkovanja. Indeks kondicije u drugom uzorkovanju se ne razlikuje značajno od indeksa kondicije u trećem uzorkovanju. Indeks kondicije kamenica razvrstan po kriteriju uzgojnih bazena nije bio značajno različit.

Indeks kondicije kamenica razvrstan po kriteriju različite hranidbe (linija 1 i linija 2) bio je značajno različit (Kruskal-Wallis test; Tablica 7.). Utvrđena je značajna razlika ( $p = 0,0154$ ) između IK u liniji 1 i liniji 2. Rezultati post hoc analize nalaze se u Tablici 8.

Tablica 2. Rezultati testiranja značajnosti razlika između duljina kamenica po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	0,24671	2	0,123355	0,157772	0,854228
Bazen	1,86328	5	0,372655	0,476629	0,793067
Error	90,69527	116	0,781856		

Tablica 3. Rezultati testiranja značajnosti razlika između širina kamenica po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	3,26	2,00	1,63	4,27	0,02
Bazen	2,19	5,00	0,44	1,15	0,34
Error	44,26	116,00	0,38		

Tablica 4. Rezultati testiranja značajnosti razlika između ukupne mase kamenica po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	709,81	2	354,9048	1,758342	0,176892
Bazen	730,11	5	146,0219	0,723452	0,607155
Error	23413,51	116	201,8406		

Tablica 5. Rezultati Kruskal-Wallis testa za IK za nezavisnu varijablu datuma

Kruskal-Wallis ANOVA; IK  
nezavisna (grupirajuća) varijabla: datum      p =0,0045

Zavisna varijabla:IK	Code	Valid	Sum of	Mean
3. travnja	45019	40	3062,000	76,55000
23. travnja	45039	41	2187,000	53,34146
5. svibnja	45051	41	2254,000	54,97561

Tablica 6. Rezultati višestruke usporedbe P vrijednosti za razlike u prosječnim vrijednostima IK po kriteriju datuma (Kruskal-Wallis test, p =0,0045)

	3. travnja	23. travnja	5. svibnja
3. travnja		0,009437	0,018141
23. travnja	0,009437		1,000000
5. svibnja	0,018141	1,000000	



Tablica 7. Rezultati Kruskal-Wallis testa za IK za nezavisnu varijablu linije

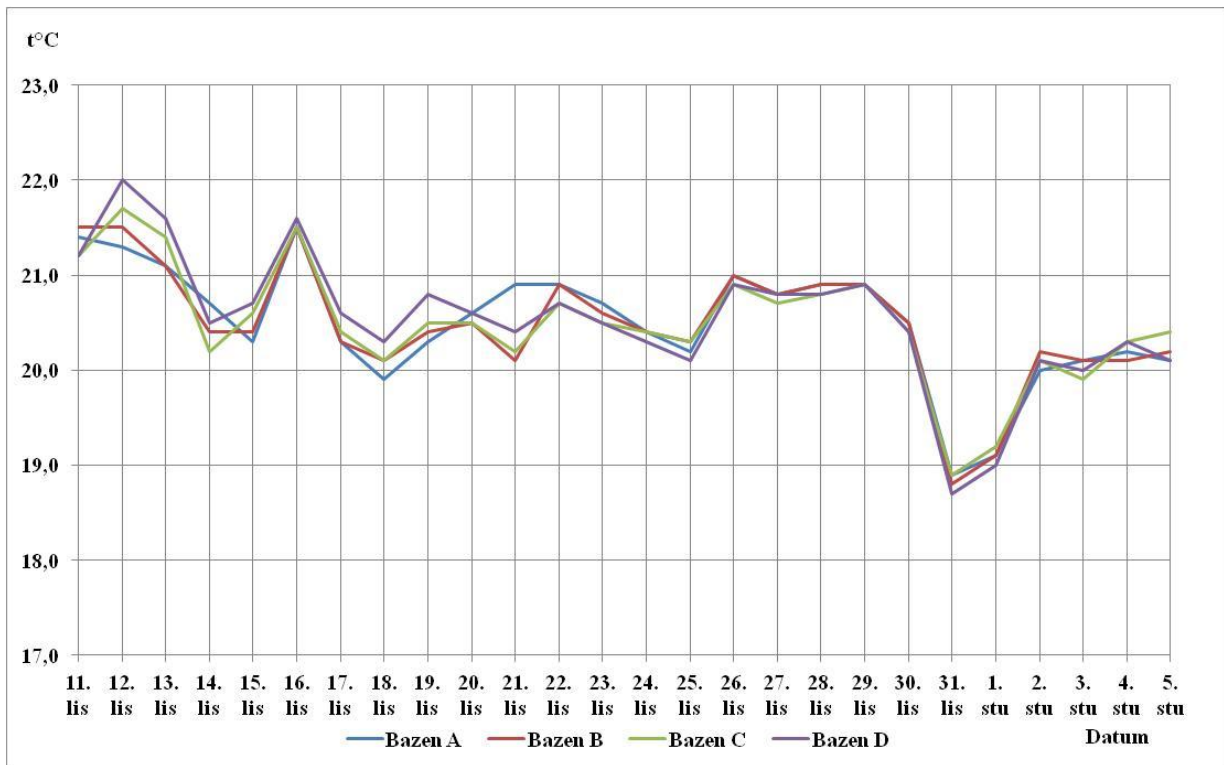
Kruskal-Wallis ANOVA; IK				
nezavisna (grupirajuća) varijabla: linija p =0,0154				
Zavisna varijabla:IK	Code	Valid	Sum of	Mean
Linija 1	1	62	4286,000	69,12903
Linija 2	2	60	3217,000	53,61667

Tablica 8. Rezultati višestruke usporedbe P vrijednosti za razlike u prosječnim vrijednostima IK po kriteriju linije (Kruskal-Wallis test, p =0,0154)

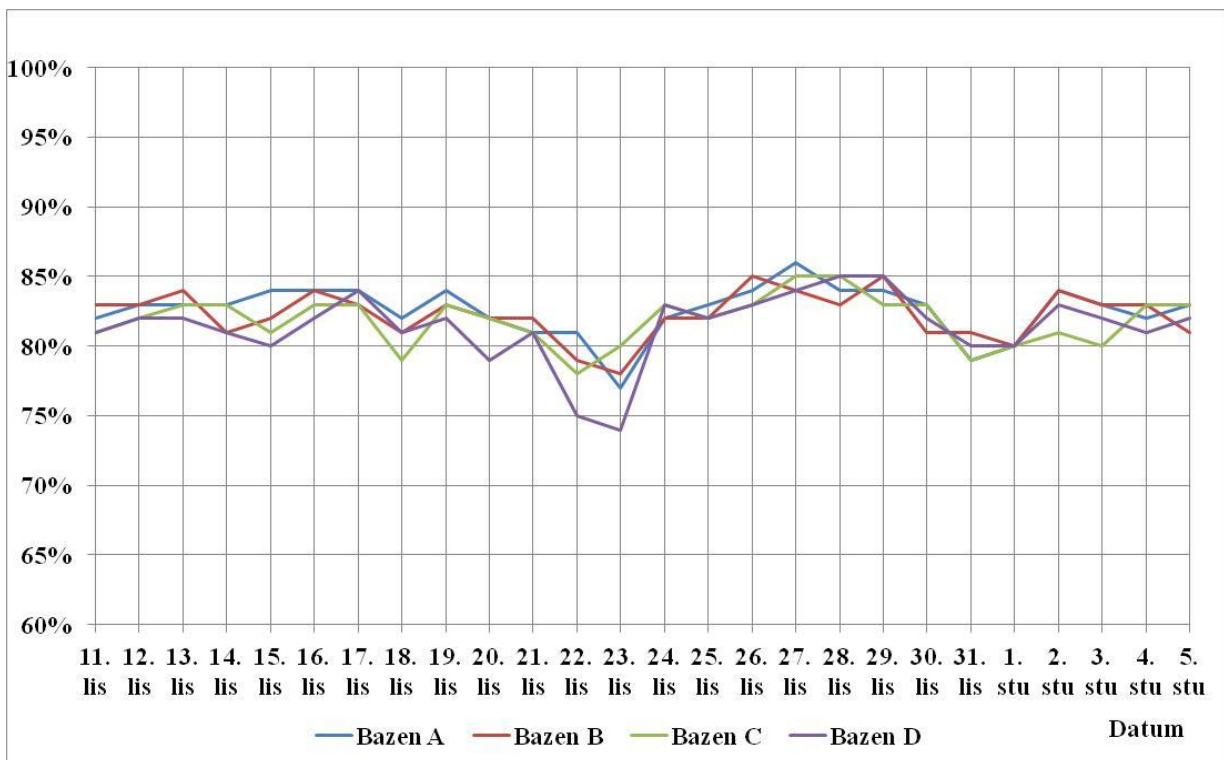
	Linija 1	Linija 2
Linija 1		0,015423
Linija 2	0,015423	

## 5.2. Pokus 2.

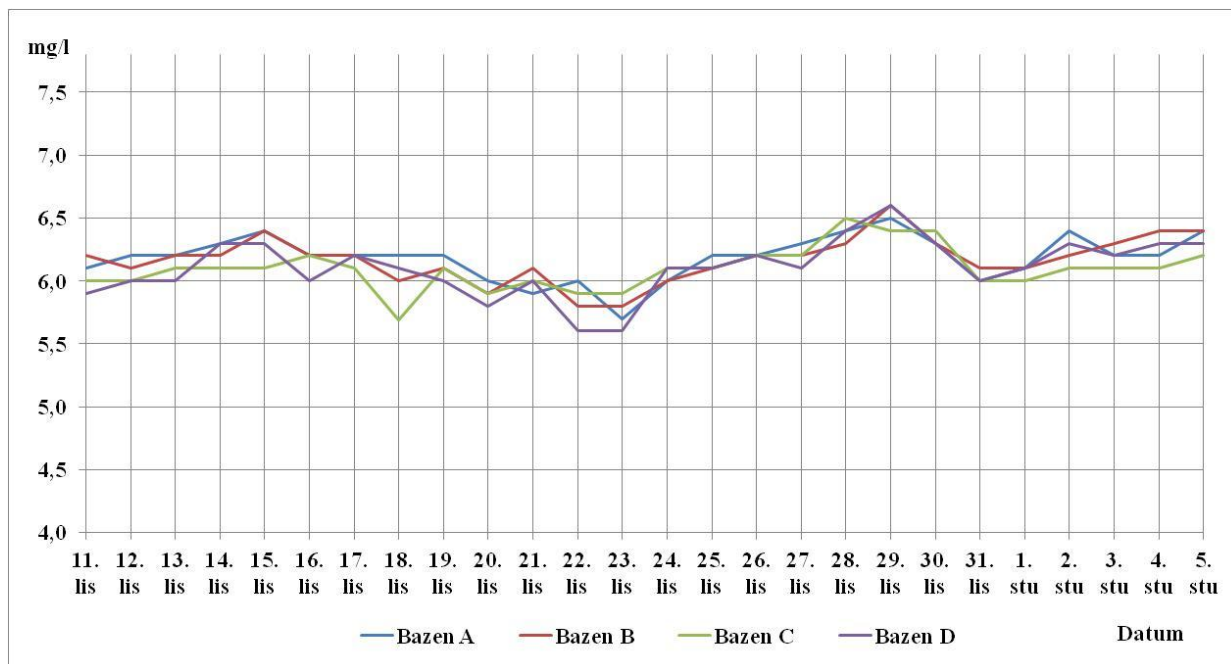
Rezultati mjerenja parametara vode tijekom pokusa prikazani su grafički. Salinitet umjetne morske vode u uzgojnim bazenima je bio nepromijenjen tijekom pokusa i iznosi 35 %. Temperatura vode kretala se u rasponu od 19,5 °C do 21,5 °C (Slika 13.). Saturacija vode kisikom uglavnom zauzima vrijednosti od 80 % do 84 % (Slika 14.), a koncentracija otopljenog kisika u vodi od 5,8 mg/l do 6,4 mg/l (Slika 15.). pH vrijednost vode tijekom provođenja pokusa prosječno je iznosila 7,9 (Slika 16.). Koncentracija amonijaka u vodi u uzgojnim bazenima iznosila je maksimalno 0,72 µg/l, a minimalno 0,05 µg/l (Slika 17.).



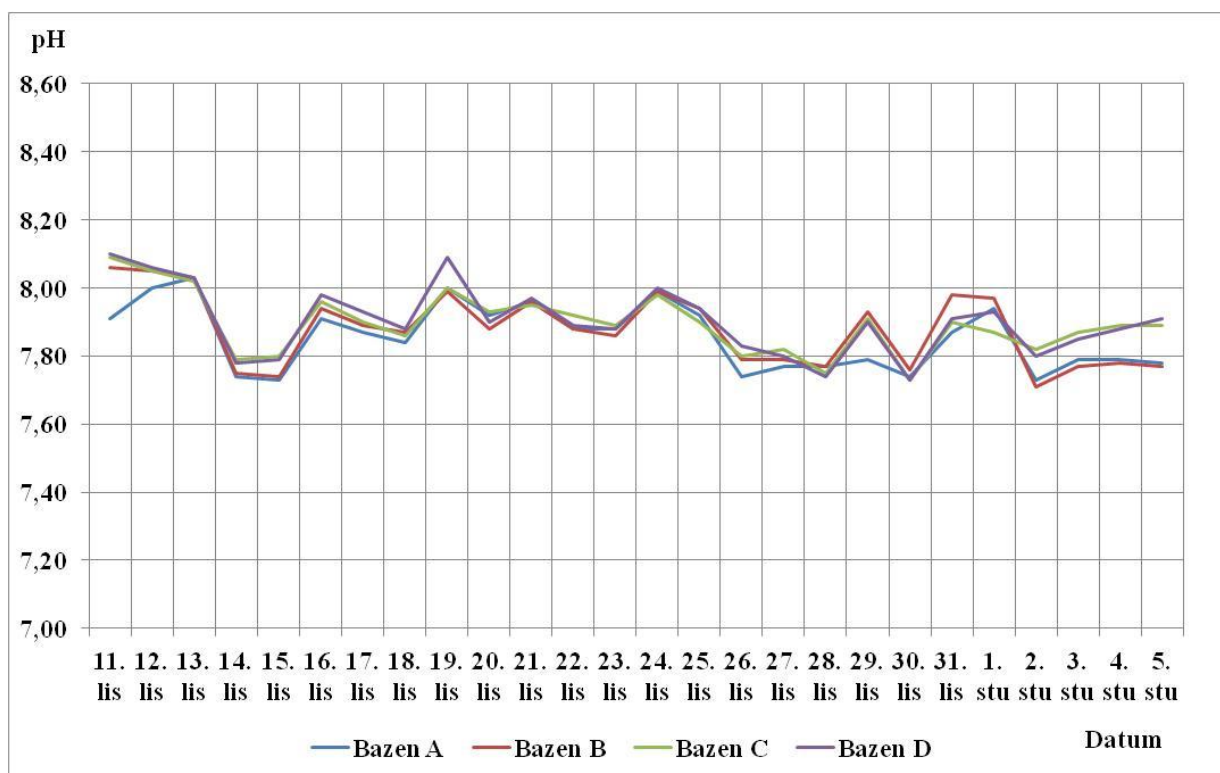
Slika 2. Temperatura vode u uzgojnim bazenima tijekom pokusa (Autor: Marija Brkić)



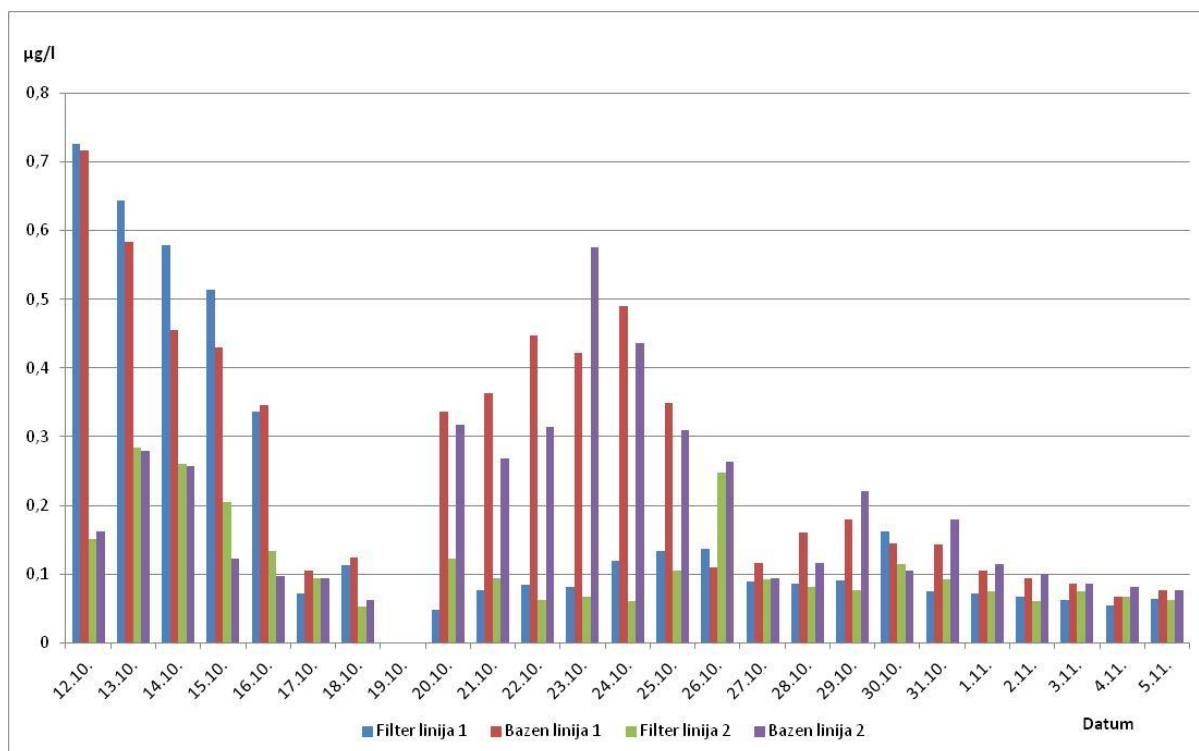
Slika 3. Saturacija vode kisikom tijekom pokusa (Autor: Marija Brkić)



Slika 4. Koncentracija otopljenog kisika u vodi tijekom pokusa (Autor: Marija Brkić)



Slika 5. Vrijednosti pH vode tijekom pokusa (Autor: Marija Brkić)



Slika 17. Koncentracija amonijaka u vodi tijekom pokusa (Autor: Marija Brkić)

Rezultati mjerenja duljine, širine, ukupne mase, mase tkiva, mase suhog tkiva, mase suhe ljuštore i indeks kondicije koji su izračunati na temelju mjerenja na datum 11. listopada i 6. studenog su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Prikaz rezultata mjerenja i IK kamenica uzgajanih u recirkulacijskom sustavu u pokusu 2

	Gustoća 1		Gustoća 2	
	11. listopada	6. studenog	11. listopada	6. studenog
Duljina (cm)	8,89 ± 0,72	8,83 ± 0,54	8,69 ± 0,44	8,73 ± 1,08
Širina (cm)	6,69 ± 0,39	6,81 ± 0,60	6,61 ± 0,38	6,81 ± 0,29
Ukupna masa (g)	73,14 ± 12,88	64,22 ± 8,83	71,11 ± 8,57	58,29 ± 7,48
Masa tkiva (g)	7,23 ± 1,57	6,91 ± 1,30	8,14 ± 0,80	6,65 ± 1,32
Masa suhog tkiva (g)	0,94 ± 0,29	1,01 ± 0,27	1,09 ± 0,22	0,94 ± 0,21
Masa suhe ljuštore (g)	38,01 ± 8,04	41,45 ± 7,09	37,18 ± 5,66	37,27 ± 5,03
Suha ukupna masa (g)	38,95 ± 8,14	42,46 ± 7,18	38,27 ± 5,65	38,21 ± 5,14
Indeks kondicije	2,52 ± 0,73	2,47 ± 0,66	2,98 ± 0,69	2,53 ± 0,50

U ovom pokusu nisu utvrđene značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između duljina (Tablica 10.) i širina (Tablica 11.) kamenica po kriterijima datuma mjerenja i bazena u kojem je proveden pokus. Nisu utvrđene značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između IK kamenica po kriterijima datuma mjerenja, bazena u kojem je proveden pokus i gustoće (broj komada po bazenu). Rezultati testiranja razlika za IK u odnosu na nezavisne varijable datuma i uzgojnog bazena prikazane su u Tablici 14.

Prosječna ukupna masa kamenica značajno se razlikuje po datumu ( $p = 0,0001$ ) (Tablica 12.). Prosječna ukupna masa kamenica u uzgojnim bazenima visoke gustoće (gustoća 2) na dan 6. studenog značajno je manja od prosječne ukupne mase kamenica u bazenima visoke gustoće na dan 11. listopada (Tablica 13.). U bazenima niske gustoće na dan 6. studenog prosječna ukupna masa je manja nego na dan 11. listopada ali razlika nije značajna. Nisu utvrđene značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u prosječnoj suhoj ukupnoj masi (suho tkiva + suha ljuštura) (Tablica 17.).

Za testiranje razlika IK po gustoćama proveden je t-test. Napravljen je t-test za indeks kondicije za gustoću 1 po datumu prikazan u Tablici 15. koji nije pokazao značajnu razliku ( $p = 0,7$ ), i t-test za indeks kondicije za gustoću 2 po datumu prikazan u Tablici 16. koji također nije pokazao značajnu razliku ( $p = 0,25$ ). U gustoći 1 i gustoći 2 IK je manji na dan 6. studenog u usporedbi s IK na dan 11. listopada. Rezultati nisu bili značajni ( $p < 0,05$ ), ali u gustoći 2 ( $p = 0,24$ ) je razlika bila veća nego u gustoći 1 ( $p = 0,7$ ) (Tablice 15. i 16.)

Tablica 10. Rezultati testiranja značajnosti razlika za duljinu po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	0,00161	1	0,001607	0,002932	0,957031
Bazen	0,47625	3	0,158750	0,289589	0,832705
Error	27,95768	51	0,548190		

Tablica 11. Rezultati testiranja značajnosti razlika za širinu po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	0,345714	1	0,345714	1,866889	0,177826
Bazen	0,232143	3	0,077381	0,417864	0,740931
Error	9,444286	51	0,185182		

Tablica 12. Rezultati testiranja značajnosti razlika za prosječnu ukupnu masu po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	1652,501	1	1652,501	17,79498	0,000101
Bazen	392,839	3	130,946	1,41010	0,250530
Error	4736,032	51	92,863		

Tablica 13. Post hoc testiranje ukupne mase po kriteriju gustoće kamenica u bazenu. Niska gustoća – NG, visoka gustoća - VG

	NG 11. lis	VG 11. lis	NG 6. stu	VG 6. stu
	73,136	71,11	64,223	58,295
NG 11. lis		0,944907	0,082003	0,00104
VG 11. lis	0,944907		0,246614	0,005136
NG 6. stu	0,082003	0,246614		0,374831
VG 6. stu	0,00104	0,005136	0,374831	

Tablica 14. Rezultati testiranja značajnosti razlika za IK po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	0,88924	1	0,889242	2,081217	0,155235
Bazen	1,66197	3	0,553990	1,296579	0,285663
Error	21,79079	51	0,427270		

Tablica 15. T-test razlika IK po datumu za nisku gustoću (1), IKn – indeks kondicije - niska

T-tests; grupiranje: datum Grupa 1: 11. Listopada Grupa 2: 6. studenog											
varijabla	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
IKn	2,522	2,475	0,180	26	0,858	14	14	0,729	0,656	1,237	0,708

Tablica 16. T-test razlika IK po datumu za visoku gustoću (2), IKv – indeks kondicije - visoka

T-tests; grupiranje: datum Grupa 1: 11. Listopada Grupa 2: 6. studenog											
varijabla	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev	Std.Dev.	F-ratio	p
IKv	2,983	2,526	2,005	26	0,055	14	14	0,692	0,498	1,928	0,250

Tablica 17. Rezultati testiranja značajnosti razlika suhe ukupne mase po kriterijima datuma i bazena (Dvosmjerna analiza varijance)

Zavisna varijabla	SS	Degr. of	MS	F	p
Datum	41,88	1	41,876	0,024350	0,876602
Bazen	250,92	3	83,639	0,048634	0,985642
Error	89427,58	52	1719,761		

## 6. RASPRAVA

Cilj ovog rada bilo je utvrditi mogućnost povećanja indeksa kondicije kamenice intenzivnom hranidbom u recirkulaciji. Hranidba se temeljila na podacima o hranidbi koji su utvrđeni za kondicioniranje matičnog stoka u mrjestilištima (Millican i Helm, 1994., Helm i sur., 2004.). Imajući u vidu da kondicioniranje uključuje pripremu jajnih stanica za ishranu embrija i ličinke dok ne započne sa samostalnom hranidbom, pretpostavlja se da bi količina hrane predviđena za kondicioniranje kamenica trebala utjecati i na povećanje indeksa kondicije.

Istraživanje u ovom radu je provedeno kroz dva pokusa. U prvom pokusu očekivalo se dobiti jasan rezultat, no pokus je prekinut ranije zbog nedostatka adekvatne hrane. Budući da rezultati prvog pokusa nisu bili sasvim jasni postavljen je i drugi pokus.

U prvom pokusu mjereni su parametri duljine, širine, ukupne mase, mase tkiva, mase suhog tkiva, mase ljuštore i indeks kondicije u tri uzorkovanja. Značajna razlika uočena je između prosječnih širina kamenica u tri uzorkovanja ( $p=0,016$ ) (Tablica 3.). Ovaj parametar nije dalje testiran unatoč značajnoj razlici jer se pretpostavlja kako se ljuštura kamenice nije mogla smanjiti ovisno o hranidbi tijekom tri tjedna nego se vjerojatno radi o slučajnom odabiru jedinki šire ljuštore u prvom uzorku.

Indeks kondicije kamenica razvrstan po kriteriju datuma uzorkovanja je bio značajno različit ( $p=0,0045$ ) (Tablica 5.). Indeks kondicije u prvom uzorkovanju bio je značajno veći u usporedbi s druga dva uzorkovanja između kojih nema značajne razlike (Tablica 6.). Iako je ova količina hranidbe navedena kao dostatna za kondicioniranje matica, što podrazumijeva energetski zahtjevan rast gonada, prosječna masa tkiva kamenica znatno se smanjila tijekom tri tjedna trajanja pokusa. Rezultati su nejasni jer je IK drastično pao između prvog i drugog uzorkovanja, a zatim se nije značajno promijenio između drugog i trećeg uzorkovanja. Hranidba na preporučenoj razini količine dnevnog obroka za kondicioniranje matica nije dala očekivani rezultat odnosno nije došlo do povećanja IK.

Indeks kondicije između grupa koje su hranjene različitim sastavom hrane je bio značajno ( $p=0,0154$ ) veći u grupi koja je hranjena s živim fitoplanktonom (Tablica 7.). Odnosno, IK kod kamenica koje su hranjene komercijalnim koncentratom hrane za školjkaše (linija 2), je pao značajno više nego kod kamenica koje su hranjene živim fitoplanktonom (linija 1).

Tijekom pokusa nije mjereno pad koncentracije fitoplanktona u bazenima s kamenicama jer na koncentraciju mogu djelovati filtracija školjkaša i taloženje fitoplanktona u bazenima. Ipak treba spomenuti da je promatranjem uočeno brže „razrjeđenje“ planktona u uzgojnim bazenima hranjenim živim fitoplanktonom za kojeg se može utemeljeno pretpostaviti da je



taloženje sporije jer su stanice pokretne, odnosno koncentrirani fitoplankton u komercijalnoj hrani nije živ stoga se ne može održati u suspenziji samostalno. Turbulencije u uzgojnim bazenima radi resuspenzije fitoplanktona osigurane su aeracijom što dodatno upućuje na veću filtracijsku aktivnost kamenica kojima je ponuđen živi plankton, ali je moguće i da turbulencija nije bila dostatna te da se neživi plankton brže taložio na dno bazena i tako postajao nedostupan kamenicama za hranidbu. Prilikom otpuštanja taloga sa dna bazena primijećena je veća količina taloga u uzgojnim bazenima hranjenim komercijalnom hranom, kao i veća količina naslaga algi na stjenkama.

Prilikom mikroskopskog pregleda sadržaja probavne žlijezde kamenica na kraju prvog pokusa uočena je prisutnost hrane odnosno fitoplanktona te drugih organizama kao što su račići jednakoonošci i nematode kod kamenica u obje linije (Slika 12.). Prisutnost ovih organizama može se objasniti jedino tako da su u sustav doneseni na ljušturama kamenica. Kamenice su očišćene relativno nježno kako se ne bi izazvao prevelik stres zato je vjerojatno da su ličinke ili odrasle jedinke tim putem unesene u sustav ispunjen čistom umjetnom morskom vodom.

Rezultati prvog pokusa ukazuju na to da su kamenice filtrirale i uzimala za hranu i živi i neživi fitoplankton. Na temelju izračuna indeksa kondicije kamenica u prvom pokusa može se zaključiti da ponuđena količina hrane nije bila dovoljna za povećanje indeksa kondicije te da je ovaj manjak bio izraženiji u grupi koja je hranjena s koncentriranim fitoplanktonom.

Drugi pokus temeljio se na hranidbi jednakom hranom ali različitom količinom dnevnog obroka po jedinki. Različita količina ponuđene hrane po jedinki se temeljila na jednakoj koncentraciji planktona u bazenima u kojima je bio različit broj kamenica. Rezultati mjerenja fizikalno kemijskih parametara pokazali su relativno stabilne uvjete u uzgojnim bazenima tijekom provođenja pokusa, dobrobit kamenica nije mogla biti ugrožena ovim uvjetima (Postma i sur., 2002.). Temperatura vode u uzgojnim bazenima kretala se od 18,7 °C do 22 °C (Slika 14.). Saturacija vode kisikom minimalno je iznosila 74 % te maksimalno 86 % (Slika 15.), a koncentracija otopljenog kisika u vodi iznosila je minimalno 5,6 mg/L (Slika 16.). Najniža pH vrijednost zabilježena je 7,7 a najviša 8,1 (Slika 17.). Najniža koncentracija amonijaka u vodi iznosila je 0,05 µg/L, najviša koncentracija iznosila je 0,72 µg/L (Slika 18.). Količine amonijaka iznad 3,2 mg/l toksične su za kamenice (Postma i sur., 2002.)

Mjereni su parametri duljine, širine, ukupne mase, mase tkiva, mase suhog tkiva, mase suhe ljuštare i indeks kondicije koji s izračunat na temelju mjerenja na dan 11. listopada i 6. studenog. Prosječna ukupna masa kamenica značajno se razlikovala ( $p=0,0001$ ) na početku i na kraju pokusa (Tablica 12.). Daljnjim testiranjem utvrđeno je da je prosječna ukupna masa u

uzgojnim bazenima visoke gustoće (B i D) na kraju pokusa značajno manja nego u istim bazenima na početku pokusa, dok razlika među bazenima niske gustoće nije značajna ali postoji (Tablica 13.). Uočeno je da se promjena prosječne ukupne mase od oko 20 g tijekom pokusa ne može objasniti promjenom mase tkiva kamenice od oko 1 g. Iz postojećih parametara izračunata je ukupna suha masa kamenice (masa suhog tkiva + masa suhe ljuštore) za koju testiranja nisu pokazala značajnu razliku (Tablica 17.). Iz navedenog slijedi da je u mjerenju ukupne mase kamenice voda značajno utjecala na rezultat mjerenja, te je utvrđena razlika zanemarena u analizi rezultata.

Indeks kondicije u drugom pokusu nije bio značajno različit između kamenica koje su mjerene na početku i na kraju pokusa neovisno u gustoći kamenica u uzgojnom bazenu (Tablica 14.). Smanjeni indeks kondicije (-0,019 %) u grupi s manjom gustoćom kamenica u bazenu (dnevni obrok 6 % suhe tvari kamenice) bio je različit na razini  $p=0,7$ , dok je kod kamenica u grupi s većom gustoćom (dnevni obrok 3 % suhe tvari kamenice) pad indeksa kondicije (-15,3 %) bio različit na razini  $p=0,25$ . Iz navedenog se ne može sa sigurnošću tvrditi da je više dostupne hrane utjecalo na relativno manje smanjenje IK, ali različite razine vjerojatnosti ukazuju da bi takva hipoteza mogla biti dokazana da je u uzorcima bio veći broj jedinki. Ostaje otvoreno pitanje je li moguće povećati IK u potpunoj recirkulaciji uz dodatno povećanje dnevnog obroka.

Temperatura vode koja je tijekom pokusa postepeno padala prema 19,5 °C mogla bi djelomično biti razlog slabog hranjenja kamenica. Filippova i Vasechkina (2023.) navode kako je maksimalna stopa filtracije *O. edulis* uočena na temperaturi 23 °C. Međutim također navode kako je najveća asimilacija energije uočena na temperaturama od 22°C do 24 °C što je vrlo blizu temperaturnog raspona ovog istraživanja. Metabolizam školjkaša ubrzava se povećanjem temperature (Filippova i Vasechkina, 2023.). Nije pronađen rad koji navodi utjecaj temperature i intenziteta hranidbe na IK *O. edulis*. Harbach i Palm (2020.) utvrdili su smanjenje IK dagnji *Mytilus edulis* pri povećanju temperature vode u uzgojnom bazenu (od 5 °C do 25 °C) uz jednaku količinu hrane u popuno zatvorenom recirkulacijskom sustavu. Dokazali su smanjenje IK pri povećanju temperature čak i uz dvostruko veću količinu hrane po danu. Razlog smanjenja IK u ovom istraživanju mogao bi biti nedostatak hrane pri temperaturi na kojoj se metabolički procesi odvijaju relativno brzo odnosno kamenica troši više energije nego što unosi hranom.

Relativno nizak broj kamenica u uzgojnom bazenu također bi mogao biti razlog slabog hranjenja. U drugom dijelu pokusa nalazi se samo 7 jedinki u 130 l vode. Činjenica je da

kamenice troše energiju filtracijom, a u ovom slučaju moraju filtrirati velike količine vode kako bi unijele dovoljnu količinu hrane. Pri tom se dodatno smanjuje gustoća hrane u bazenu te je potreban još veći utrošak energije kako bi se filtracijom unijela preostala hrana u organizam.

Nielsen i sur. (2017.) navode kako gladovanje školjkaša može uzrokovati sporiju reakciju na hranu, odnosno sporije „razrjeđenje“ fitoplanktona. Također navode kako iznimno visoke koncentracije mogu usporiti unošenje hrane filtracijom (clearance rate). Nielsen i sur. (2017.) u istraživanju hrane kamenice koncentracijama fitoplanktona od oko 4000 stanica/ml što je znatno manje od koncentracija u ovom istraživanju (oko 180 000 stanica/ml u uzgojnom bazenu u trenutku hranjenja). Gladovanje tijekom dana i iznenadna visoka koncentracija fitoplanktona mogli bi biti razlog slabog hranjenja.

Kuhn i sur. (2013.) u pokusu relativno dugog trajanja od 12 tjedna hranili su kamenice u recirkulaciji s minimalno 300 milijuna stanica/kamenici. Ekvivalent ovog pokusa je 1 milijarda stanica po kamenici. Kuhn i sur. (2013.) nisu proučavali IK kamenica nego prirast mase i duljine ljuštore. Ovo istraživanje nije trajalo dovoljno dugo za rast školjaka, a u navedenom radu ne navodi se promjena IK.

Maneiro i sur. (2017.) u istraživanju kondicioniranja matica navode kako su dobili bolje rezultate u brojnosti i preživljavanju ličinki hranidbom od 6 % i 9 % nego uobičajenom hranidbom od 3 % suhe tvari kamenice. To bi bila podrška hipotezi da se kamenice mogu hraniti više od standardne preporuke za kondicioniranje matica što bi svakako trebalo ispitati u jednom od budućih pokusa.

U provedenim pokusima nije postignuto očekivano povećanje IK, ali se na temelju opažanja i prikupljenih podataka iz pokusa i literature može pretpostaviti da bi povećanjem obroka ciljani rezultat bilo moguće postići. U tu svrhu je potrebno je provesti još istraživanja jer su se dostupni podaci o hranidbenim navikama kamenice pokazali kao nedostatni. U budućim pokusima tovljenja kamenica važno osigurati veći broj jedinki u uzorku kako bi rezultati bili jasniji. Istraživanje rezultata hranidbom znatno većim količinama hrane po kamenici treba biti cilj budućih pokusa. Potrebno je osmisliti sustav s kontinuiranim protokom morske vode koja će donositi prirodnu hranu kamenicama i uz to osigurati intenzivnu dohranu s ciljem povećanja indeksa kondicije. Također je važno provoditi pokus uz precizno mjerenje svih parametara, a po mogućnosti uz različite temperature vode i salinitet kako bi se definirale optimalne vrijednosti za povećanje indeksa kondicije.

## 7. ZAKLJUČAK

Europska plosnata kamenica *O. edulis* od velikog je značaja za akvakulturu Hrvatske jer je Jadransko more jedno od rijetkih preostalih prirodnih staništa ove vrste. Duga tradicija uzgoja, čist i očuvan ekosustav te ogromna potražnja tijekom turističke sezone vrhunska su prilika za razvoj ekološki certificiranog delikatesnog proizvoda.

*O. edulis* je iznimno povezana s ekosustavom u kojem živi i sve buduće promjene u okolišu utjecat će na ovu vrstu. Istraživanje mogućnosti hranidbe kamenice u recirkulacijskim sustavima moglo bi ublažiti negativne promjene u ekosustavu. Također bi moglo osigurati dostupnost iznimno kvalitetnog proizvoda tijekom cijele godine, pogotovo u turističkoj sezoni kad je kamenica najtraženija. Iako su neke vrste kamenica do danas detaljno istražene, o hranidbenim navikama *O. edulis* zna se relativno malo. Potrebno je još znanstvenih istraživanja o uvjetima hranidbe potrebnim za postizanje željenog rasta indeksa kondicije *O. edulis*. U budućim istraživanjima potrebno je osigurati veći broj jedinki i uzoraka kako bi rezultati bili jasniji. Također je potrebno provesti istraživanja dužeg trajanja u kojima se može promatrati rast ljuštura jedinki. Jedno od mogućih istraživanja je intenzivna dohrana u protočnom sustavu s prirodnom morskom vodom. Tehnološka rješenja i razvoj recirkulacijskih sustava su neophodni kako bi tovljenje kamenica postalo dostupno i komercijalno isplativo.

## 8. POPIS LITERATURE

- 1) Acarli, S., Lok, A., Kucukdermenci, A., Yildiz, H. i Serdar, S., (2011.) Comparative growth, survival and condition index of flat oyster, *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758.) in Mersin Bay, Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(2).
- 2) Ahmad, A., Abdullah, S.R.S., Hasan, H.A., Othman, A.R. i Ismail, N.I., (2021.) Aquaculture industry: Supply and demand, best practices, effluent and its current issues and treatment technology. *Journal of Environmental Management*, 287, p.112271.
- 3) Arapov, J., Ezgeta–Balić, D., Peharda, M. i Ninčević Gladan, Ž., (2010.) Bivalve feeding—how and what they eat?. *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 68(3), pp.105-116.
- 4) Barange, M., Bahri, T., Beveridge, M.C., Cochrane, K.L., Funge-Smith, S. i Poulain, F., (2018.) Impacts of climate change on fisheries and aquaculture. United Nations' Food and Agriculture Organization, 12(4), pp.628-635.
- 5) Bolotin, J., (2022.) Školjkaši Malostonskog zaljeva s posebnim osvrtom na dragulj bentoske faune malostonsku kamenicu. U: *Malostonski zaljev – Kraljevstvo kamenice* (Kunica, V., Ipšić, I. ured.). Monografija, 137-182
- 6) Bower, C.E., i Holm-Hansen, T., (1980.) A salicylate–hypochlorite method for determining ammonia in seawater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(5), pp.794-798.
- 7) Bratoš Cetinić, A., i Bolotin, J., (2016.) Uzgoj školjkaša u Malostonskom zaljevu, *More hrvatsko blago*; Word Press, str. 891- 894.
- 8) Cole, H., (1942.) Primary sex-phases in *Ostrea edulis*. *Journal of cell science*, 2(331), pp.317-356.
- 9) Eagling, L.E., Ashton, E.C., Jensen, A.C., Sigwart, J.D., Murray, D., i Roberts, D., (2018.) Spatial and temporal differences in gonad development, sex ratios and reproductive output, influence the sustainability of exploited populations of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(2), pp.270-281.

- 10) Erdmann, W., (1935.) Untersuchung über die Lebensgeschichte der Auster. *Wiss. Meeruntersuch. Komm. Wiss. Untersuch. Dtsch. Meere in Kiel und der Biol. Anstalt Helgoland*, 19(16): 1-25
- 11) FAO, (2022.) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO.
- 12) Filippova, T.A., i Vasechkina, E.F., (2023.) A Simulation Growth Model for the Cultured Oyster *Ostrea edulis* L. *Ecological Safety of Coastal and Shelf Zones of Sea*, (4), pp. 87–100.
- 13) Gosling, E., (2008.) *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons.
- 14) Guillard, R.R., (1975.) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals: proceedings—1st conference on culture of marine invertebrate animals greenport* (pp. 29-60). Boston, MA: Springer US.
- 15) Guillard, R.R., i Ryther, J.H., (1962.) Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), pp.229-239
- 16) Hallmann, A., i Rampelotto, P.H., (2019.) *Grand Challenges in Algae Biotechnology*. Springer International Publishing.
- 17) Harbach, H., i Palm, H., (2020.) Fully controlled experimental recirculating aquaculture system (RAS) for experimental studies with mussels (*Mytilus edulis*-like), focusing on temperature and salinity regimes. *AAAL Bioflux*, 13(5), pp.2694-2704.
- 18) Harper, E.M., (1991.) Post-larval cementation in the Ostreidae and its implications for other cementing bivalvia. *J. Moll.Stud*, 58: 37-47.
- 19) Helm, M.M., Bourne, N., i Lovatelli, A., (2004.) *Hatchery culture of bivalves. A practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 2004. 177p.
- 20) Kamermans, P., Blanco, A., Joaquim, S., Matias, D., Magnesen, T., Nicolas, J.L., Petton, B., i Robert, R., (2016.) Recirculation nursery systems for bivalves. *Aquaculture international*, 24, pp.827-842.
- 21) Kamermans, P., i Saurel, C., (2022.) Interacting climate change effects on mussels (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) and oysters (*Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*): experiments for bivalve individual growth models. *Aquatic Living Resources*, 35, p.1.

- 22) Kuhn, D.D., Angier, M.W., Barbour, S.L., Smith, S.A., i Flick Jr, G.J., (2013.) Culture feasibility of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in zero-water exchange recirculating aquaculture systems using synthetically derived seawater and live feeds. *Aquacultural engineering*, 54, pp.45-48.
- 23) Lapegue, S., Beaumont, A., Boudry, P. i Gouletquer, P., (2006.) European flat oyster- *Ostrea edulis*. In GENINPACT-Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native population. A European network, WP1 workshop Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish.
- 24) Leal, E., de Beyer, L., O'Connor, W., Dove, M., Ralph, P.J. i Pernice, M., (2021.) Production optimisation of *Tisochrysis lutea* as a live feed for juvenile Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*, using large-scale photobioreactors. *Aquaculture*, 533, p.736077.
- 25) MacKenzie, C.L., (1997.) The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe (Vol. 127). US Department of Commerce.
- 26) Maneiro, V., Pérez-Parallé, M.L., Silva, A., Sánchez, J.L. i Pazos, A.J., (2017.) Conditioning of the European flat oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758): effect of food ration. *Aquaculture Research*, 48(8), pp.4363-4370.
- 27) Martin, A. G., Littaye-Mariette, A., Langlade, A. i Allenou, J.P. (1995.) Cycle de reproduction naturelle de l'huitre plate *Ostrea edulis*. Groupe de Travail sur la Reproduction des Mollusques Bivalves d'Aquaculture Marine, str. 21-33
- 28) Millican, P.F., i Helm, M.M., (1994.) Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 123(1-2), pp.83-94.
- 29) Nielsen, M., Hansen, B.W. i Vismann, B., (2017.) Feeding traits of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, and the invasive Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine biology*, 164, pp.1-10.
- 30) Pinn, E.H., i Le Vay, L., (2023.) Interpretation of the European legal framework for the microbiological classification of bivalve mollusc production areas. *Marine Policy*, 148, p.105479.
- 31) Pleadin, J., Kvirgić, K., Zrnčić, S., Lešić, T., Koprivnjak, O., Vulić, A., Džafić, N., Oraić, D. i Krešić, G., (2019.) Variations in nutritive composition of three shellfish species. *Italian journal of food sciences*, 31(4), pp.716-730.

- 32) Postma, J.F., De Valk, S., Dubbeldam, M., Maas, J.L., Tonkes, M., Schipper, C.A. i Kater, B.J., (2002.) Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(2), pp.226-237.
- 33) Prasetya, F.S., (2015.) Greening phenomenon in bivalve by marennine produced from *Haslea ostrearia* and its consequences on bivalve's integrated response (Doctoral dissertation, Universite du Maine).
- 34) Robert, R., Vignier, J., i Petton, B., (2017.) Influence of feeding regime and temperature on development and settlement of oyster *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) larvae. *Aquaculture Research*, Wiley, 48 (9), pp.4756-4773. 10.1111/are.13297. hal-01510344
- 35) Roberts, C., Smith, C., Tillin, H.M. i Tyler-Walters, H., (2010.) Review of existing approaches to evaluate marine habitat vulnerability to commercial fishing activities.
- 36) Ronquillo, J.D., Fraser, J. i McConkey, A.J., (2012.) Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of Europe
- 37) Ruano, F., Ramos, P., Quaresma, M., Bandarra, N.M. i Da Fonseca, I.P., (2012.) Evolution of fatty acid profile and condition index in mollusc bivalves submitted to different depuration periods. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 107(581-582), pp.75-84.
- 38) Stojčević, K., (2016.) Marketinška studija malostonske kamenice za FLAG Južni Jadran, Finalno izvješće 1. 11. 2016.
- 39) Šarić, I., Barilo, M., Gavrilović, A. i Jug-Dujaković, J., (2010.) Biofiltars in aquaculture. *Croatian Journal of Fisheries*, 68(3), pp.117-132.
- 40) Šimunović, A. (2004.) Malostonski zaljev - biser Jadrana. *Naše more*, 51(1-2): 12-16
- 41) The EU Aquaculture Sector – Economic report 2022 (STECF-22-17)
- 42) Tomšić, S. i Lovrić, J., (2004.) Povijesni pregled uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu. *Naše more: znanstveni časopis za more i pomorstvo*, 51(1-2), pp.17-23.
- 43) Treer T, Safner R, Aničić I, i Lovrinov M. (1995.) *Ribarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 453 str.
- 44) Walne, P.R., (1972.) The influence of current speed, body size and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 52(2), pp.345-374.
- 45) Yonge, C.M., (1960.) *Oysters*. London: Collins.



- 46) Zapata-Restrepo, L.M., Hauton, C., Williams, I.D., Jensen, A.C. i Hudson, M.D., (2019.) Effects of the interaction between temperature and steroid hormones on gametogenesis and sex ratio in the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 236, p.110523.
- 47) Župan, I. i Šarić, T., (2014.) Prirast i indeks kondicije-dva važna čimbenika u uzgoju dagnji. *Meso*, 16(3).

Internetski izvor:

- 48) Ministarstvo poljoprivrede <https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=14> (pristupljeno 13.12.2023)
- 49) MolluscaBase eds. (2024). MolluscaBase. *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758. World Register of Marine Species na stranici: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140658> (pristupljeno 29.1.2024.)
- 50) MolluscaBase eds. (2024). MolluscaBase. *Magallana gigas* (Thunberg, 1793). World Register of Marine Species na stranici: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=836033> (pristupljeno 15.3.2024.)
- 51) Nacionalni plan razvoja akvakulture (2022): [https://ribarstvo.mps.hr/UserDocsImages/akvakultura/NPRA/NPRA%202027\\_fin\\_10112022.pdf](https://ribarstvo.mps.hr/UserDocsImages/akvakultura/NPRA/NPRA%202027_fin_10112022.pdf) (pristupljeno 18.1.2024)
- 52) Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota: Modificirani F/2 medij [https://ncma.bigelow.org/PDF%20Files/NCMA%20algal%20medium%20f\\_2.pdf](https://ncma.bigelow.org/PDF%20Files/NCMA%20algal%20medium%20f_2.pdf) (pristupljeno 22.1.2024)
- 53) Anonimus, n.d.: Instant Algae Shellfish diet 1800 Reed Mariculture <https://reedmariculture.com/products/shellfish-diet> (pristupljeno 26.1.2024)