

AGRONOMSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VEDRANA NERLOVIĆ, dipl. ing.

**Utjecaj prehrane fitoplanktonom na razvoj ličinke  
kamenice *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 u  
laboratorijskim uvjetima uzgoja**

Magistarski rad

Zagreb, 2005.

AGRONOMSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VEDRANA NERLOVIĆ, dipl. ing.

**Utjecaj prehrane fitoplanktonom na razvoj ličinke  
kamenice *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 u  
laboratorijskim uvjetima uzgoja**

Magistarski rad

Voditelj: prof. dr. sc. Ivica Aničić

Zagreb, 2005.

Magistarski rad pod naslovom:

**Utjecaj prehrane fitoplanktonom na razvoj ličinke  
kamenice *Ostrea edulis* Linneaus, 1758 u  
laboratorijskim uvjetima uzgoja**

obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Agronomskom  
fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

prof. dr. sc. Tomislav Treer  
(predsjednik povjerenstva)

prof. dr. sc. Ivica Aničić  
(član povjerenstva)

prof. dr. sc. Roman Safner  
(član povjerenstva)

## ZAHVALA

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za ekologiju isistematiku (LES), u Centru za istraživanje mora, Institutu "Ruđer Bošković", u Rovinju i Institutu Ifremer (L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) La Tremblade, u Francuskoj.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Mirjani Hrs-Brenko na pruženoj pomoći i savjetima tijekom pisanja rada.

Također zahvaljujem prof.dr.sc. Ivici Aničiću na susretljivosti i razumijevanju pri realizaciji rukopisa.

Posebnu zahvalnost dugujem šefu stanice Ifremer, u La Trembladeu dr. sc. Philippe Gouletqueru i dr. sc. Edouard Bédieru koji me je primio u svoj laboratorij (LGP) i omogućio da se upoznam sa problematikom mrijesta i uzgoja školjkaša, posebno mrijesta kamenice *Ostrea edulis*.  
Zmijerno zahvaljujem: Pascal Phelipot, Frédéric Blouin, Karine Bouilly, Christophe Ledu, Christophe Arnaud, Stéphane i Maeva Robert, Patrick etchnik, Alexandra Leitao, Sylvie Lapegue, Serge Heurtebise, Helen ombie, Daniel Masson, Roger Kantin, Lionel Degremont i Delphine Rousic. Hvala vam na pruženoj pomoći i stečenom iskustvu.

*J'ai découvert un autre monde à deux pas de ma port. Une lumière, un univers de terre et mer, une façon de vivre"*

«emme de la côte» Simon-Gouletquer, 2000)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. SVRHA I CILJ RADA.....</b>	<b>2</b>
<b>3. POVIJEST ISTRAŽIVANJA UZGOJA LIČINKI ŠKOLJKAŠA U SVIJETU.....</b>	<b>3</b>
<b>4. EUROPSKA KAMENICA, <i>Ostrea edulis</i> Linnaeus, 1758.....</b>	<b>5</b>
4.1. Razmnožavanje i spolni život kamenice.....	8
4.2. Mrijest kamenica.....	10
4.3. Životni ciklus ličinki.....	11
<b>5. TEHNOLOGIJA UZGOJA ŠKOLJKAŠA U LABORATORIJU.....</b>	<b>16</b>
5.1. Priprema školjkaša za mrijest i metode stimulacije.....	16
5.2. Prehrana ličinki školjkaša jednostaničnim algama.....	17
5.3. Uzgoj izabranih jednostaničnih alga u monokulturi.....	20
<b>6. UZGOJ KAMENICA U FRANCUSKOJ.....</b>	<b>23</b>
6.1. Sukcesivnost vrsta	
6.2. Istraživački institut Ifremer (L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer).....	27
6.2.1. Istraživačka stanica u La Trembladeu.....	30
6.2.1.1. Laboratorij DRV / LGP za mrijest i uzgoj ličinki kamenica.....	32
<b>7. MATERIJAL I METODE RADA.....</b>	<b>39</b>
7.1. Postavljanje mrijestnih serija kamenice <i>Ostrea edulis</i> .....	39
7.1.1. Pokusni uzgoj ličinaka, praćenje preživljenja i rasta.....	40
7.2. Hranidba ličinki jednostaničnim algama iz monokultura.....	42
7.2.1. Zootehničke mjere u proizvodnji monokultura.....	45
7.2.2. Hranidbeni tretmani od 1. do 6. mrijestne serije.....	46
7.2.3. Hranidbeni tretmani 7. mrijestne serije.....	46
7.2.4. Procjena količine fitoplanktona za dnevnu prehranu ličinki.....	48
7.3. Statistička obrada podataka.....	48

<b>8. REZULTATI RADA.....</b>	<b>49</b>
8.1. Rast ličinki kamenica.....	49
8.1.1. Rast ličinki kamenica u funkciji pojedinih mrijestnih serija (1-6, 7T).....	49
8.1.2. Rast ličinki kamenica u funkciji hranidbenih tretmana (7. mrijestna serija).....	53
8.2. Preživljavanje ličinki kamenica.....	56
8.2.1. Preživljavanje ličinki kamenica u funkciji pojedinih mrijestnih serija (1-6; 7T).....	56
8.2.2. Preživljavanje ličinki kamenica u funkciji hranidbenih tretmana (7. mrijestna serija).....	59
<b>9. RASPRAVA.....</b>	<b>62</b>
<b>10. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>70</b>
<b>11. IZVORI.....</b>	<b>72</b>
<b>12. SAŽETAK.....</b>	<b>82</b>
<b>13. SUMMARY.....</b>	<b>83</b>
<b>14. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>84</b>
<b>15. PRILOZI</b>	

## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Uzgoj školjakaša u Jadranskom moru ima višestoljetnu tradiciju. Jedna od prvih uzgojnih vrsta bila je europska kamenica *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758. Najraniji zapis o skupljanju kamenica s prirodnih rastilišta i poluuzgoja u Malostonskom zaljevu potječe još iz godine 1573. S više ili manje uspijeha uzgoj kamenica poslije se je proširio na druge lokalitete duž istočne obale Jadrana (Basioli, 1981). Početka 20. stoljeća u Malostonskom se je zaljevu proizvodilo 260 000 komada kamenica, a godišnja proizvodnja godine 1960. u Lirskom je kanalu iznosila oko 20 tona (Basioli, 1981). Godine 1990. u Hrvatskoj su proizvedena 2 milijuna komada kamenica, a od toga je oko 60% proizvedeno u Malostonskom zaljevu (Benović, 1997). Proizvodnja je uglavnom tekla kontinuirano s blagim porastom, osim nakon Prvog i Drugog svjetskog rata, kao i Domovinskog rata, kada je zabilježeno znatano smanjenje proizvodnje (Basioli, 1981; Benović, 1997).

Gledano retrospektivno, sve do danas na ovim se prostorima primjenjuje klasičan, tradicionalan način proizvodnje školjakaša, koji podrazumjeva skupljanje mlađi s kolektora i uzgoj u prirodnoj sredini do konzumne veličine (Basioli, 1968, 1981; Skaramuca i Gjučić, 1981; Zavodnik i Hrs-Brenko, 1987; Benović, 1997). Kao važan problem uspješnog uzgoja pojavljuje se održavanje ravnoteže između količine školjakaša proizvedenih za tržište i mlađi koja dolazi na njihovo mjesto za sljedeći uzgojni ciklus. Budući da se količina prihvaćanja ličinki na kolektorima u svijetu i u nas posljednjih nekoliko godina stalno smanjuje, sve se više pojavljuje potreba za pronalaženjem mogućnosti mrijesta i uzgoja ličinki u mrjestilištima. Iako uzgoj ličinki u mrjestilištima u nas još nema primjene, u svijetu mrijest školjakaša dobiva sve veću važnost, dobro je proučen i ima opravdan trend ulaganja (La Borge, 1989).

Šestomjesečni boravak u Instituciji Ifremer (L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), La Tremblade, u Francuskoj<sup>1</sup>, omogućio mi je detaljnije upoznavanje biologije europske kamenice *Ostrea edulis*, tehnološkoga procesa uzgoja u laboratorijskim uvjetima, gdje su se obrađivali pojedini segmenti mrijesta, ličinačkih stadija s naglaskom na ishranu određenim fitoplanktonskim vrstama.

---

<sup>1</sup> Stipendija Ministarstva znanosti i tehnologije za godinu 2001/2002 u trajanju od 10 mjeseci



## **2. SVRHA I CILJ RADA**

## 2. SVRHA I CILJ RADA

Priobalna područja u svijetu i u nas sve više zauzima različita urbana infrastruktura, kao što su industrije, luke, marine, poljoprivredna dobra, kućanstva itd., koja štetnim otpadnim tvarima remeti prirodnu ravnotežu morske sredine ugrožavajući na taj način i prirodno obnavljanje populacija brojnih bentosnih vrsta, uključujući i europsku kamenicu *Ostrea edulis*. Pokazalo se je da su i one vrste školjkaša koje mogu biti indikatori onečišćenja određene sredine najosjetljivije u ličinačkim stadijima. Negativni čimbenici sredine utječu na oštećenje, usporavanje ili čak potpuno zaustavljanje razvoja ličinki, što u konačnici rezultira preuranjenim ili prekasnim prihvatom ili pak izostankom prihvata na kolektore u prirodnoj sredini, kao i u uzgajalištima.

Stoga je postavljeni zadatak bio u kontroliranim uvjetima pratiti pojedine mrijestne serije kamenica, razvoj ličinačkih stadija kvalitativno i kvantitativno, odrediti vrijeme prelaska ličinki na sesilni način života, ali i potvrditi važnost fitoplanktonske prehrane u tom osjetljivom periodu razvoja školjkaša. Glavni je cilj bio optimiziranje postojećega produkcijskog mrijestnog sustava i mogućnost primjene u nas.

Svrha je istraživanja proširenje spoznaje o pravilnom vrednovanju i procjeni proizvodnje europske kamenice *Ostrea edulis* s mogućnošću postavljanja optimalnih uvjeta uzgoja ličinki, kao i pronalaženje najpovoljnije prehrane na kvalitativnoj i zootehničkoj razini. Rad bi trebao dati odgovore na pitanja vezana uz mrijest kamenice, istaknuti najpovoljnije zootehničke uvjete uzgoja ličinki, njihove slabe točke i poteškoće za vrijeme razvoja pojedinih ličinačkih stadija, s posebnim osvrtom na određene vrste fitoplanktonskih organizama koji su važni za preživljavanje i rast ličinki europske kamenice.

### **3. POVIJEST ISTRAŽIVANJA UZGOJA LIČINKI ŠKOLJKAŠA U SVIJETU**

### 3. POVIJEST ISTRAŽIVANJA UZGOJA LIČINKI ŠKOLJKAŠA U SVIJETU

Još od grčkog i rimskog doba iskorištavanje prirodnih nalaziša jestivih školjkaša u priobalju ima višestoljetnu tradiciju (Gerlon, 1978; Héral, 1989; Gouletquer i Héral, 1997). Oko 1. stoljeća p. n. e. za vrijeme Rimljana na jadranskoj su obali zabilježeni prvi pokušaji skupljanja mlađi kamenica na svežnjevima od pruća (Basioli 1981; Gayu 1990; Benović 1997). Porastom potražnje za školjkašima u prehrambene svrhe na tržištu, pojavila se potreba za uzgojem, a primjenjivane metode razvijale su se i prilagođavale pojedinoj vrsti školjkaša. Količina proizvodnje nekog uzgajališta ovisila je o količini prikupljene mlađi iz prirodne sredine, a tehnološki procesi skupljanja mlađi i uzgoj školjkaša do tržišne veličine temeljio se je isključivo na iskustvima starijih uzgajivača. Stoga se pojavila potreba boljeg poznavanja biologije školjkaša, posebice ranih razvojnih stadija i kvalitete uzgojne sredine.

Pokušaji umjetnog uzgoja ličinki školjaka do stadija prelaska na sésilni način života poznati su već potkraj 19. stoljeća, najprije u prirodnim uvjetima, u ribnjacima, na otvorenom prostoru, a poslije u kontroliranim uvjetima, u laboratoriju, u bazenima određenih oblika i dimenzija.

Prema literaturnim podacima, među prvima u SAD-u navodi se Brooks (1880) koji je, nakon neuspjelih pokušaja uzgoja ličinki *Crassostrea* sp. u laboratoriju, zaključio da umjetni način uzgoja neće znatno utjecati na proizvodnju u prirodnoj sredini. Istog je mišljenja i Moore (1898), koji tek poslije, u ribnjacima uspijeva skupiti određenu količinu mlađi kamenica nakon zatvaranja odvodnog kanala manjeg ribnjaka jutenom tkaninom.

Walne (1974), u Velikoj Britaniji, navodi događaj iz 1918. kao početak mrijestnog uzgoja, kada je prigodom purifikacije dagnji, prije plasmana na tržište, u bazenima zaostalo nekoliko kamenica, koje su se izmrijestile, a mlađ se nedugo nakon toga prihvatila na zidove bazena.

Wells (1920; 1927) nakon brojnih pokušaja uspijeva umjetno uzgojiti ličinke *Crassostrea* sp., ali i ličinke drugih vrsta školjkaša, do stadija metamorfoze, a zahvaljujući čestoj izmjeni vode ličinke su kontinuirano dobivale dovoljne količine svježe fitoplanktonske hrane.

Prytherch (1924) primjenom poticanoga mrijesta, uz naglo povećanje temperature vode, dobiva ličinke kamenica koje smješta u bazene sa slabim protokom morske vode, bez dodatnog hranjenja. Pokusi su dali određene rezultate,

iako se cirkulacijom vode izgubila određena količina ličinki zbog loše zaštite odvodnih cijevi u uzgojnom sustavu.

Nekoliko godina poslije Hori i Kusakabe (1927) u Japanu također uspijevaju uzgojiti nekoliko kamenica *Crassostrea* sp. do završnoga stadija metamorfoze.

Cole (1937, 1939 i 1975) daje prve uspješne rezultate u pokusnom uzgoju ličinki kamenice *Ostrea edulis* do metamorfoze u bazenima izvan laboratorija.

Praćenjem radova brojnih autora ipak se smatra da je Bruce (1940) prvi razvio pouzdaniju i sigurniju metodu uzgoja školjkaša.

Iako su se uzgojne tehnike nakon tih pokušaja mijenjale, uspješniji uzgoji ličinki školjkaša u laboratorijskim uvjetima ostvareni su u Japanu (Hori i Kusakabe, 1927), Sjedinjenim Američkim Državama (Loosanoff i Davis, 1963) i u Velikoj Britaniji (Walne, 1964).

Prateći tehnološki napredak u uzgoju ličinki, u mnogim mrjestilištima školjkaša u svijetu osnovne tehnike uzgoja uz određena su se usavršavanja zadržale sve do danas. Nedugo nakon početnih uspješnih rezultata uzgoja u SAD-u je pokrenut multidisciplinarni istraživački program koji je omogućio u potpunosti usavršavanje tehnike uzgoja u kontroliranoj i reciklirajućoj vodenoj sredini. Takav intezivni uzgoj upravo je imao krajnji cilj potpunog zatvaranja uzgojnog ciklusa školjkaša, od mrijesta ličinki do jedinke spremne za plasman na tržište (Cook, 1975).

Premda reciklirajući sustavi omogućuju bolju kontrolu nad uzgojnim organizmima, uzgojnom sredinom i smanjuju troškove ulaganja tijekom tehnološkoga procesa uzgoja, ipak je potreban stalan nadzor zbog mogućih neželjenih popratnih pojava. Stalno recirkuliranje iste količine vode uz njezino pročišćavanje preko filtra, te obogaćivanje dijelom nove količine vode uz dodatak hrane povlači za sobom kontrolu kakvoće morske vode, pravilno doziranje fitoplanktonske hrane, uklanjanje produkata, metabolizma školjkaša, pseudofecesa i suzbijanje pojava mogućih bolesti. Bez obzira na pojavu mogućih poteškoća, reciklirajući sustavi su perspektivni u istraživačkom, ali i u komercijalnom pogledu tako da danas postoje brojni istraživački programi koji nastoje unaprijediti tehnologiju uzgoja radi dobivanja kvalitetnih i otpornih ličinki. Također, uzgoj u reciklirajućoj morskoj vodi pruža mogućnost postavljanja mrjestilišta u udaljenijim područjima od obale, a time i opskrbu tih područja kvalitetnim i svježim školjkašima.

**4. EUROPSKA KAMENICA, *Ostrea edulis* Linnaeus,  
1758**

#### 4. EUROPSKA KAMENICA, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758

##### Taksonomski položaj (Sabelli i sur. 1990)

Razred: Bivalvia Linnaeus, 1758  
Red: Ostreoida Férussac, 1822.  
Natporodica: Ostreoidea Rafinesque, 1815.  
Porodica: Ostreidae Rafinesque, 1815.  
Rod: *Ostrea* Linnaeus, 1758.  
Vrsta: *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758.

##### Nazivi:

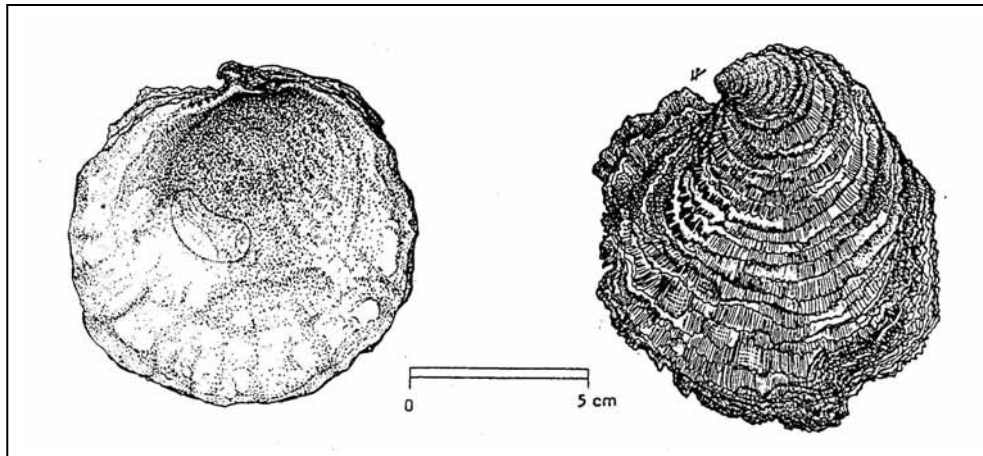
Hrvatski: europska plosnata kamenica;  
Ostali hrvatski narodni nazivi: oštriga, ostrega, ostriga, oštrga, loštriga, štroliga, i jestva kamenica (Vinja, 1986; Milišić, 1991; Marguš, 1998; Zavodnik i Šimunović, 1997), (Slika 1).  
Engleski: European flat oyster;  
Francuski: L'huître plate européenne, Pied de cheval, Marennes;  
Talijanski: Ostrega;  
Njemački: Essbare Auster;  
Španjolski: Ostra.



Slika 1. Europska plosnata kamenica *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758  
(foto: Edouard Bédier)

**Dimenzije.** Naraste do 20 cm, a najčešće se pojavljuju jedinke veličine od 6 do 9 cm (Poutiers, 1987; Eliziere-Papayanni, 1993).

**Morfologija kamenice.** Ljuštura su nepravilna, ovalnog do jajastog oblika, nepravilnih rubova, čvrste građe, katkada lomljive, nesimetrične i nejednake (Slika 1 i 2). Stijenke su ljuštura debele s koncentričnim lističavim prugama na površini. Lijeve (donja) ljuštura je dublja, ispupčenija, desna (gornja) je ravna i ulazi unutar lijeve. Lijeve je ljuštura žućkasto-smeđa ili žuto-zelena, često s crvenkastim, ljubičastim ili zelenim obojenjima. Periostrakum je tanak, tamnosmeđe boje. Kljunovi su neuočljivi, smješteni na središnjoj crti ljuštura. Skulptura lijeve ljuštura sastoji se od koncentričnih grebena, brazda i rebara, a desne od koncentričnih crta, brazda, lisnatih ljuskica ili krenula koje strše i preko rubova ljuštura. Desna ljuštura katkada ima radijalne brazde i rebra, ali zone rasta ljuštura nisu jasno vidljive. Ligament je unutarnji, tamnosmeđe boje, a smješten je u trokutastom udubljenju. Unutrašnjost je ljuštura bisernobijele boje, kadkad sa zelenim, crveno-smeđim ili plavo-sivim mrljama. Brava nema zubiće, a ožiljak mišića zatvarača dobro je vidljiv, blijed, katkad bijele boje. Obje strane kljunova i dio unutarnjeg ruba ljuštura su nazubljeni, a to je posebno naglašeno na rubu lijeve ljuštura, gdje završavaju radijalna rebra (Grubišić, 1982; Milišić 1991; Eliziere-Papayanni 1993; Marguš, 1998; Lindner, 2000; Poppe i Goto, 2000).



Slika 2. Crtež europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 (Poutiers, 1987)

**Geografska rasprostranjenost.** Europska je kamenica vrsta umjerenog pojasa, a pojavljuje se od Norveške (65° sjeverne geografske širine), sve do zaljeva Agadir u Maroku i u Sredozemlju (Nordsieck, 1969; Jaziri, 1985; Poutier 1987), (Slika 3).





Slika 3. Geografska rasprostranjenost europske kamenice *Ostrea edulis*  
(Jaziri, 1985; Poutier, 1987)

**Stanište.** Kamenica jednako naseljava pješčano-šljunkovita kao i kamenita dna. U Francuskoj i Engleskoj velike količine kamenica mogu oblikovati prostrane guste populacije, bankove na dubini između 0 i 40 m (Poutiers, 1987; Eliziere-Papayanni 1993). Osim navedenih staništa, kamenica naseljava plutače, plovne objekte, vezove kotvi i sve vrste krutog otpada, a nerijetko je epibiont na ljušturama kamenica i drugih sedentarnih organizama (Igić, 1981; 1986).

Prema Ransonu (1967), rasprostranjenost europske kamenice određuju salinitet i temperatura koji su ujedno limitirajući čimbenici njezina opstanka u periodu

embrionalnih i ličinačkih stadija. Priroda staništa, turbiditet i stopa sedimentiranja imaju manju važnost.

**Iskorištavnje i gospodarska vrijednost.** Kamenica je jestivi, hranjivi školjkaš, bogat bjelančevinama, ugljikohidratima i vitaminima (A, B, B<sub>2</sub>, C, D). Stoga je vrlo cijenjen prehrambeni proizvod. Kao uvriježeni kulinarski specijalitet poslužuje se kao predjelo, najčešće u svježemu stanju, iako postoje i drugi načini njezina pripremanja (Hrs-Brenko i Filić, 1975; Grubišić, 1982; Milišić, 1991).

#### 4.1. Razmnožavanje i spolni život kamenice

Radi održanja vrste, tijekom niza godina školjkaši su, kao i ostali organizmi razvili, specifične reproduktivne mehanizme, koje obuhvaćaju sezonu sazrijevanja gonada, način i učestalost mriješćenja, količinu izmriještenih ličinki, uspješnost njihova prihvata i dinamiku preživljavanja. Organi za razmnožavanje jesu gonade građene od reproduktivnog (gonadnog) i vezivnog tkiva. Reproductivno se tkivo sastoji od folikula i brojnih izvodnih kanalića, koji se spajaju u glavni gonodukt, s otvorom u plaštanoj šupljini. U folikulima gonadnoga tkiva razvijaju se spolne stanice, spermiji i jaja. Proces razvijanja muških i ženskih spolnih stanica teče kontinuirano tijekom godine, a izbacivanje spolnih produkata obavlja se sezonski pod utjecajem mehaničkih, termičkih i kemijskih podražaja nastalih u okolnoj sredini. Važan utjecaj u procesu sazrijevanja gonada ima raspoloživa hrana odnosno, obilje fitoplanktonskih organizama.

U skupini školjkaša susrećemo vrste razdvojenog spola i dvospolne vrste (hermafroditizam). Europska je kamenica, *Ostrea edulis*, hermafrodit s ritmičnom izmjenom spola. Promjena spola može nastupiti više puta unutar godišnje sezone mrijesta, ali bez mogućnosti samooplodnje (Coe, 1943). Općenito kamenicu možemo definirati kao protogenog hermafrodita, ona spolno sazrijeva najprije kao mužjak. (Davainu, 1853). Stvaranje muških gameta nastupa već početkom sljedeće godine, nakon prelaska na sesilni način života. U tom periodu spermatozoidi nisu u potpunosti izgrađeni te sposobni za oplodnju. Nakon toga slijedi inverzija spola, pa se pojavljuje razvojna faza ženke, vremenski u drugoj godini. Promjena spola iz mužjaka u ženku se teče mnogo sporije nego obratno, jer stvaranje jajnih stanica više iscrpljuje organizam kamenice nego proizvodnja spermija. Inverzija spola u

pojedine jedinke nastavlja se dalje tijekom život, a može nastupiti u vrlo kratkom vremenu, od samo nekoliko dana (Korringa 1940).

Ritam izmjene spola ovisi o više čimbenika. Prema Marteilu (1976), najvažniji čimbenici su temperatura i količina raspoloživih hranjivih tvari u moru. Reproductivna sezona nastupa povišenjem temperature morske vode tijekom proljeća, a napose ljeti (Cook, 1975; Hrs-Brenko, 1980). Pokazalo se je da je na području viših geografskih širina, kao u skandinavskim zemljama, reproductivni period kamenice kratak, sa samo jednom mrijestnom sezonom i samo jednom promjenom spola, a južnije u Velikoj Britaniji i uzduž francuske obale to se zbiva više puta u godini (Yonge, 1960).

Izravan utjecaj na promjenu spola imat će metabolizam jedinke koji je usko povezan s prisutnom količinom i kvalitetom fitoplanktona. Prema pojedinim autorima, promjena spola također može biti uvjetovana i nekim unutrašnjim čimbenicima kao radom živčanog sustava, što je utvrđeno kod dagnji (Lubet, 1991). No, niti jedna studija s tog područja vezana za europsku kamenicu nije objavljena.

Spolno sazrijevanja, tj. izgled pojedinih faza razvoja gonada u ciklusu spolnog sazrijevanja, za europsku je kamenicu dan prema Marteil (1976), u Tablici 1. Jedinica je spolno zrela kada pod pritiskom ispušta gamete iz jako zadebljanih gonada. Nakon prirodnog ispuštanja gameta jajne se stanice zadržavaju unutar plaštane šupljine ženke poput mliječne mase.

Tablica 1. Proces sazrijevanja i izgled gonada kod europske kamenice *Ostrea edulis* (Marteil, 1976)

Stadij gonada	procesi unutar gonada	Izgled gonada i ličinki
1	početak gametogeneze: umnožavanje gonija	slabo zadebljale gonade
2	dobro razvijene gonade, ali ne postoji disocijacija gameta	zadebljale gonade
3	maksimalno debljanje: hipertrofija gonada, razvijen deblji bijeli-kremasti sloj, obilnost gameta javlja se laganim pritiskom	vrlo zadebljale gonade
4	ispuštanje gameta, slijedi inkubacija kod ženki u plaštanoj šupljini	poluprozirne gonade
4a	plaštana šupljina ispunjena bijelom, mliječnom masom	mliječna masa
4b	inkubacija završena: ličinke školjkaša čine masu sivopiješčane boje	sivopješčana (bež) masa
5	stisnuti folikuli unutar sivkasto obojenoga mesnog tkiva	gonade potpuno prozirne

#### 4.2. Mrijest kamenica

Europska kamenica *Ostrea edulis* kao larviparni organizam pripada inkubacijskoj vrsti školjkaša, jer se oplodnja, te embrionalni i ličinački razvoj obavljaju u plaštanoj šupljini ženke. Ispuštanje muških spolnih stanica, spermatozoida, odvija se najprije u oslobađajuću komoricu u vanjskom dijelu plaštane šupljine, a ubrzo zatim izvan organizma, djelovanjem slijedne kloake, bez kontrakcije aduktornog mišića. Jajne stanice također se izbacuju u oslobađajuću, vanjsku komoricu, koja se potom zatvara i zadržava jajne stanice između unutarnjih listića plaštanog ruba.

Jaja kamenice velika su oko 150  $\mu\text{m}$  u trenutku oslobađanja iz gonadnoga tkiva (Korringa, 1940; Yonge, 1960). Oplodnja se obavlja u plaštanoj šupljini ženke nakon što spermiji budu uneseni ulaznom strujom vode. Spolno zrela ženka kamenice proizvede oko 1 do 1,5 milijun jaja, ovisno o njezinoj veličini.

Budući da su rani embrionalni razvojni stadiji kamenice zaštićeni u organizmu majke praćenje njihova razvoja je otežano, iako se smatra da su embriogeneza, organogeneza i procesi mineralizacije ljuštura u svih školjkaša slični (Moor, 1983). Prema Korringa (1947), inkubacija oplođenih jaja unutar ženke traje 8 do 10 dana, ovisno o temperaturi vode ili 8 do 14 dana pri temperaturi od 18 do 20 °C (Martin i sur., 1995).

Minimalne temperature pri kojima dolazi do izbacivanja gameta prema različitim autorima navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Minimalna temperatura za ispuštanje gameta

<b>Autor</b>	<b>Područje</b>	<b>T (°C)</b>
Leenhardt 1924 prema Marteil (1976); Yonge (1960)	-	15
Walne (1974)	Conway	16
Marteil (1976)	francuska obala	14 - 16
Wilson i Simons (1985)	zapadna obala Irske	12,4 – 13,9

### 3.4. Životni ciklus ličinki

U završnoj fazi razvoja, ličinke budu izbačene iz plaštane šupljine i nastavljaju živjeti u slobodnoj vodi nošene strujama. Oslobođene su ličinke veličine između 160 do 200  $\mu\text{m}$  (Martin i sur., 1995). Kamenicu, kao i druge školjkaše, karakterizira kombinacija pelagičnog (planktonske ličinke) i bentosnog (odrasle jedinke) načina života. Pelagični način života školjkaša obuhvaća ličinačku fazu, prihvat zrelih ličinki i

njihovu metamorfozu, čime ujedno završava ličinački razvoj u planktonu te počinje pridneni način života jedinke u bentosnim zajednicama.

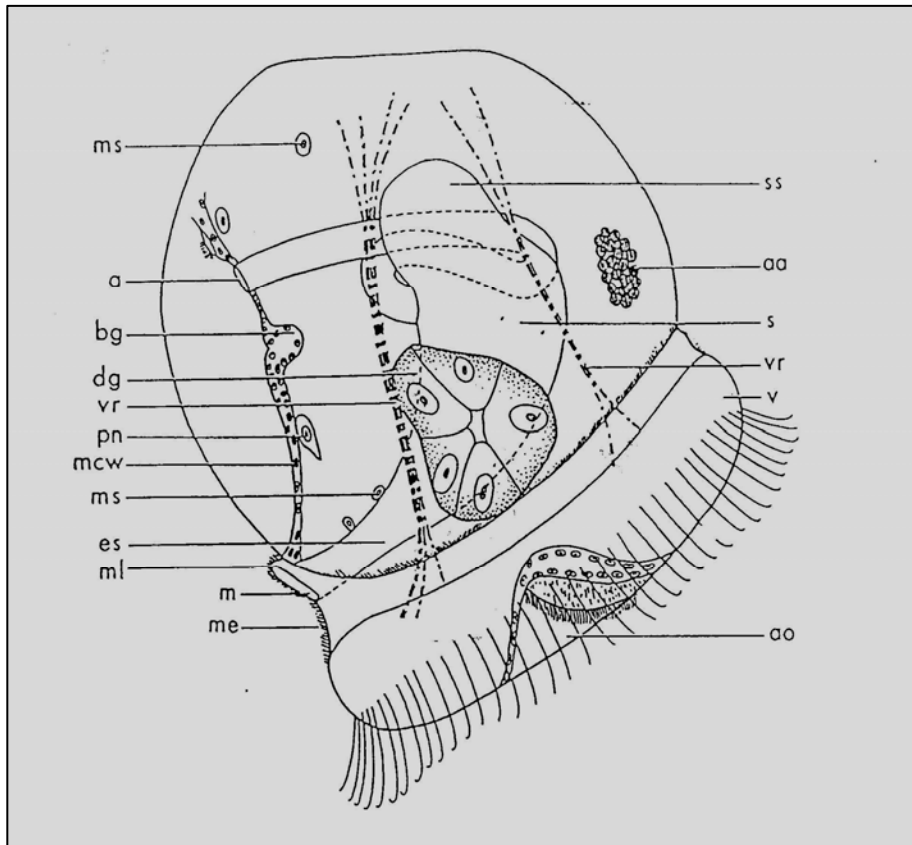
U embrionalnoj fazi nastupa najprije brazdanje, zatim gastrulacija (embriogeneza) do oblikovanja trohofore. Malena trepetljikava ličinka, trohofora, je obavijena sa izrazito tankim trepetljikama, prototroh, s pomoću kojih se kreće. Izduženi vrh trohofore ima čuperke bičastih stanica. Ličinku zbog njezina oblika u tom periodu nazivamo D-ličinkom ili stadijem veliger ličinke, kada nastupa stvaranje prve ljušture. Kod trohofore razvija se velum, organ odgovoran za plivanje, izmjenu plinova i apsorpciju otopljenih organskih tvari, koji ima oblik diska, a okružen je s 3 do 4 reda trepetljika U toj su fazi kroz poluprozirnu ljušturu dobro uočljivi unutrašnji organi (Erdmann, 1935; Manahan, 1983; Strathmann, 1987), (Slika 4).

Sljedeći razvojni stadij jest pediveliger ličinka, jedinka spremna za metamorfozu i stvaranje diskonh ljušture (Slika 5), (Erdmann, 1935; Raven, 1964). To je ujedno stadij kada ličinka može i plivati i puzati po podlozi. Sposobnost disanja, hranjenja, probava i izlučivanje metabolita ne razlikuje se bitno od razvijene veliger ličinke. Važne značajke ličinke tijekom ovoga procesa jesu razvoj dugačkog stopala za puzanje i pigmentirane očne pjegice, vidljive kroz ljušturu. U trenutku kada se ujedine ovi čimbenici, uključujući pritom i odgovarajuću veličinu jedinke, oko 300  $\mu\text{m}$ , možemo smatrati da je jedinka postigla sve preduvjete za sesilni način života (Hrs-Brenko, 1980; Héral, 1989).

Zrele ličinke kamenice negativno su fototaktične pa u procesu prelaska na bentosni život pužu po podlozi tražeći povoljno mjesto za prihvat. Ako se ne ostvari njihov prihvat, kamenice imaju mehanizme za privremenu odgodu prihvata, nastavljajući život u pelagijalu, ali ipak nakon određenog vremena slijedi degenerativna promjena veluma, ljušturica i jedinka ugiba (Cranfield, 1973; Kasyanov, 1984). U povoljnim uvjetima prihvatom za podlogu ličinka u kratkom vremenu, završava proces metamorfoze i započinje život sesilnog organizma. Tijekom metamorfoze dolazi do nestajanja stopala, veluma, lažnog plašta koji se resorbira ili odbacuje, nestaje pigmentirana očna pjega pa se jedinka cementira na podlogu (Cranfield, 1973; Harper, 1991).

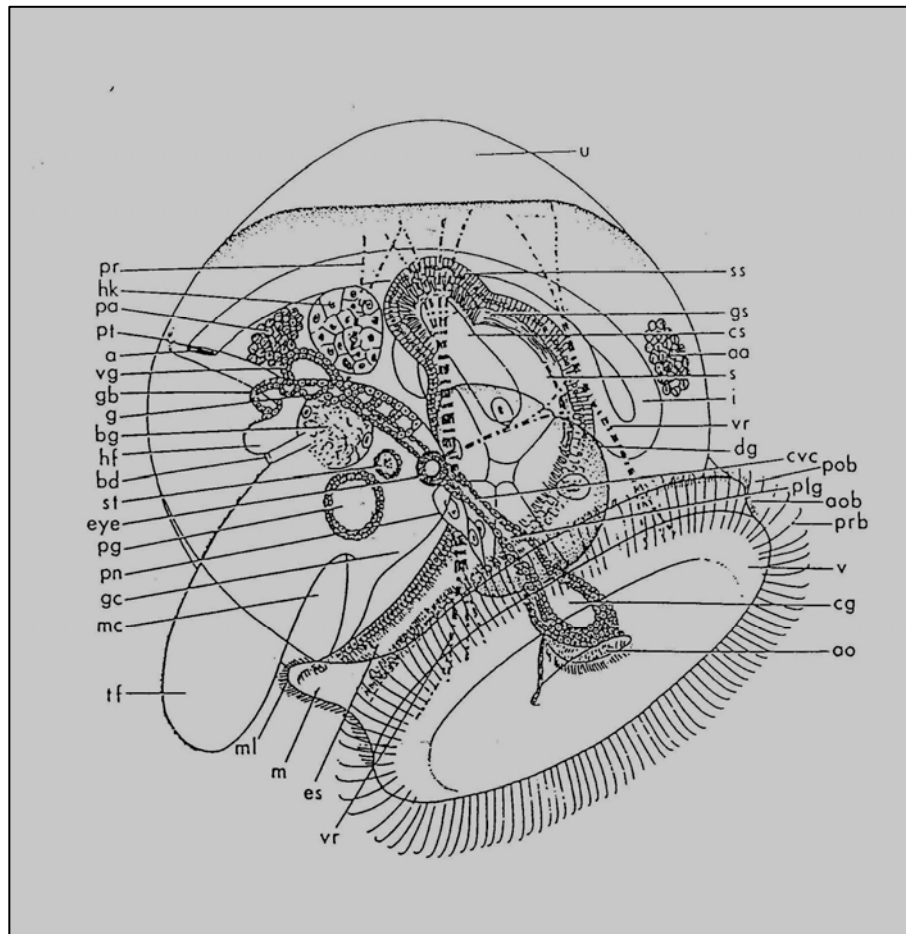
Planktonski način života ličinke, njezin prihvat i prelazak na sesilni način života prikazani su na Slici 6. prema Launey (1998).

Rast i preživljenje ličinki u planktonu ovise o dostupnoj količini i kvaliteti hrane, predatorima, važnim abiotskim čimbenicima kao što su temperatura, salinitet i zasićenost kisikom (Widdows, 1991).



Slika 4. Veliger ličinka kamenice *Ostrea edulis* u dobi od 6 dana (Erdmann 1935)

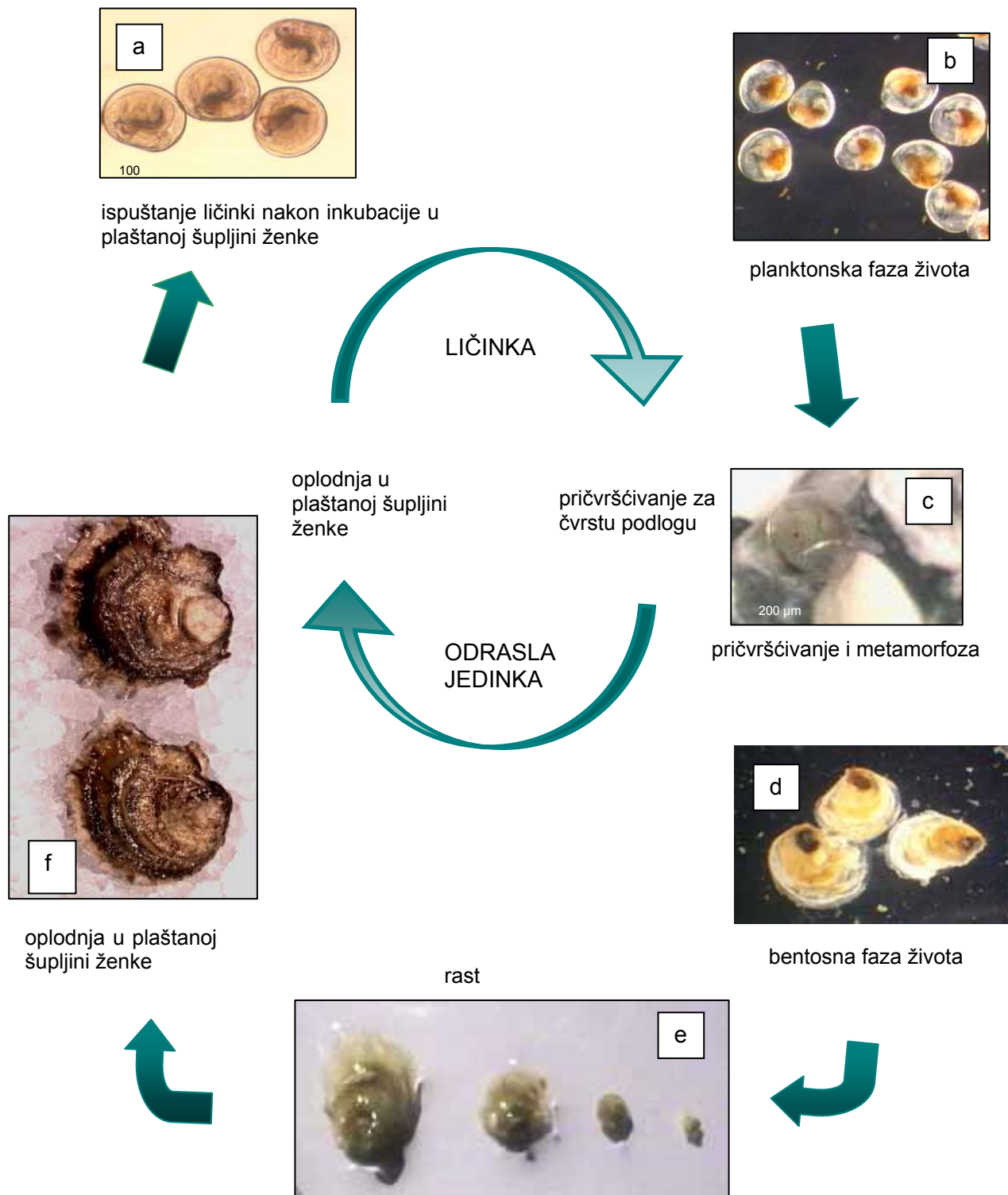
a) analni otvor, aa) prednji mišić zatvarač, ao) apikalni organ, bg) prvobitna bisusna žlijezda, dg) probavna žlijezda, es) ezofagus, m) usta, mcw) stijenka plaštane šupljine, me) početak usta, ml) usna resica, ms) slobodne mezenhimalne stanice, pn) protonefridij, s) želudac, ss) želučana vrećica, v) velum, vr) retraktor veluma.



Slika 5. Pediveliger ličinka kamenice *Ostrea edulis* (Erdmann, 1935)

a) analni otvor, aa) prednji mišić, ao) apikalni organ, aob) vijenac trepetljika, bd) kanal bisusne žlijezde, bg) bisusna žlijezda, cg) živčane stanice, cs) kristalna igla, cvc) vezivno tkivo, dg) probavna žlijezda, es) ezofagus, eye) očna pjega, g) prvobitne škrge, gb) škržni most, gc) škržna šupljina, gs) epiderma želuca, hf) stražnji dio stopala, hk) prvobitno srce i bubreg, i) crijevo, m) usta, mc) plaštana šupljina, ml) usna resica, pa) stražnji mišić zatvarač, pg) živčana vlakna stopala, plg) stražnja živčana vlakna, pn) protonefridij, pob) trepetljike stražnjeg dijela usta, pr) retraktor stopala, prb) trpetljike prednjeg dijela usta, pt) stražnji analni čuperak, s) želudac, ss) želučana vrećica, st) osjetilne stanice stopala, tf) vrh stopala, u) umbo, vg) vsceralna živčana vlakna, vr) retraktor veluma.





Slika 6. Shema životnog ciklusa kamenice *Ostrea edulis*: 1. ličinačka faza (a, b, c), 2. faza odrasle jedinice (d, e, f), (Launey, 1998)

## **5. TEHNOLOGIJA UZGOJA ŠKOLJKAŠA U LABORATORIJU**

## 5. TEHNOLOGIJA UZGOJA ŠKOLJKAŠA U LABORATORIJU

### 5.1. Priprema školjkaša za mrijest i metode stimulacije

Tehnologija uzgoja školjkaša u laboratorijskim uvjetima danas je u svijetu usavršena i dobro proučena, napose za vrste koje kao europska kamenica *Ostrea edulis* imaju veliku ekonomsku važnost. Adultne jedinke koje uzimamo iz prirodne sredine i smještamo u laboratorijske bazene potrebno je prethodno očistiti i isprati od mulja i epibionata, a potom prema potrebi pristupiti njihovom kondicioniranju. Postupak kondicioniranja podrazumijeva smještanje adultnih organizama u optimalne uvjete sredine ponajprije temperaturne uz odgovarajuću fitoplanktonsku hranu, što će omogućiti sazrijevanje njihovih gonada u vrijeme kada školjkaši promatrane vrste u prirodnoj sredini još nisu spolno zreli. Nakon provedenog postupka kondicioniranja, zreli se školjkaši mogu poticati na mrijest primjenom različitih metoda koje uzrokuju izbacivanje zrelih spolnih stanica ili ličinki školjkaša (Hrs- Brenko, 1979).

Od različitih poticajnih metoda za mrijest se primjenjuju: termički poticaj (Galstoff, 1932; Loosanoff, 1937); mehanički poticaj (Just, 1939; Loosanoff i Davis, 1963); spolni poticaj (Loosanoff i Davis, 1963); kemijski poticaj (Matsutani i Nomura, 1982; Gibbons i Castagna, 1984; Braley, 1985); električni poticaj (Sugiura 1962), ali i odgovarajuća gustoća algalne suspenzije (Smith i Strehlow, 1983).

Postupci stimulacije školjkaša nisu ostali samo na razini laboratorijskih istraživanja nego imaju sve veću primjenu u mrijestilištima gospodarske važnosti, napose u zemljama u kojima najprije zbog prelova, onečišćenja staništa ili bolesti školjkaša dolazi do smanjenja obnove prirodnih stokova i drugo, omogućuje kontinuiranu reproduktivnost tijekom cijele godine, sigurnu količinu mlađi za nasad u komercijalna uzgajališta (Baird, 1958).

Tijekom daljnjeg uzgoja izmriještenim ličinkama treba osigurati pravilnu prehranu glede kvalitativnog i kvantitativnog odabira jednostaničnih alga, održavati optimalne fizikalne, kemijske i biološke čimbenike te voditi računa o zootehničkim uvjetima.

## 5.2. Prehrana ličinki školjkaša

Fitoplanktonski organizmi, jednostanične alge, čine osnovnu hranu mnogim stanovnicima pelagijala i bentosa, ali i njihovim ličinkama. Kvalitativna i kvantitativna raspoloživost fitoplanktona u morskoj će sredini odrediti brzinu rasta i preživljavanja jedinki koje se njima koriste za prehranu. Pritom će jednostanične alge koje se mogu izolirati iz morskog planktona, a zatim uzgojiti u kontroliranim monokulturama, biti početak za postavljanje osnove tehnike u prehrani ranih razvojnih stadija morskih školjkaša u mrjestilištima. Među prvima je Cole (1937) istaknuo da jednostanične alge iz skupine flagellata mogu poslužiti kao vrlo povoljna hrana ličinkama kamenica u kontroliranim, laboratorijskim uvjetima. Recentniji podaci govore da među brojnim vrstama jednostaničnih alga u prirodnoj planktonskoj sredini samo neke imaju dobru primjenu u akvakulturi. Popis jednostaničnih alga upotrebljivanih za prehranu školjkaša u mrjestilištima prema različitim autorima naveden je u Tablici 3. Sheme najznačajnijih vrsta daje Trintignac (1996) na Slici 7., dok Chretiennot-Dinet i sur. (1986) daju klasifikaciju hranibene vrijednost jednostaničnih alga kao: vrlo dobra, dobra i osrednja (Tablica 4).

Tablica 3. Jednostanične alge upotrebljavane za prehranu školjkaša u mrjestilištima

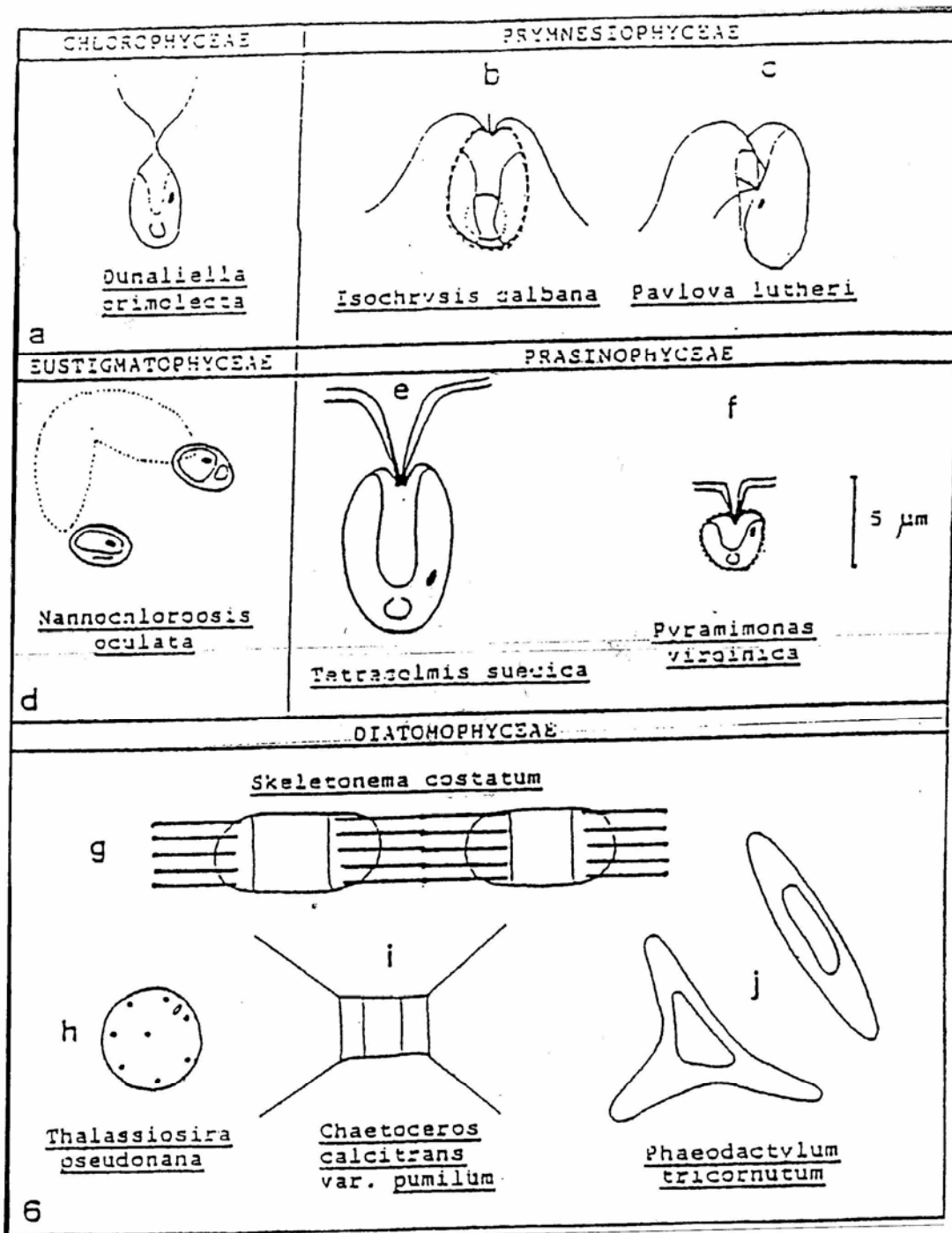
ALGE	Ukeles (1973)	Walne (1978)	Lucas (1980)	Chrétiennot- Dinet, (1990)	Coutteau (1992)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	-	+	+	+	+
<i>Chaetoceros calcitrans "tenuissimus"</i>	-	-	-	-	
<i>Chaetoceros gracilis</i>	-	-	-	-	+
<i>Dunaliella sp.</i>	+	-	+	-	+
<i>Chlorella sp</i>	+	-	-	-	-
<i>Nanochloris sp.</i>	+	-	-	-	-
<i>Isochrysis galbana</i>	+	+	+	-	+
<i>Isochrysis aff. galbana "Tahiti"</i>	-	+	-	+	+
<i>Nannochaloropsis oculata</i>	-	-	+	-	-
<i>Pavlova lutheri</i>	-	+	+	+	+
<i>Monochrysis luteri</i>	+	-	-	-	-
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	+	+	+	-	+
<i>Pyramimonas virginica</i>	-	-	+	-	-
<i>Pseudoisochrysis virginica</i>	+	-	-	-	-
<i>Skeletonema costatum</i>		+	+	+	+
<i>Tetraselmis suecica</i>	+	+	+	+	+
<i>Tetraselmis striata</i>	+	-	-	-	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	+	+	-	+

Tablica 4. Hranidbena vrijednost jednostaničnih alga u prehrani školjkaša (Chretiennot-Dinet i sur., 1986)

ALGE	Hranidbena vrijednost
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	+++
<i>Dunaliella primolecta</i>	+
<i>Isochrysis galbana</i>	+++
<i>Isochrysis aff. galbana "Tahiti"</i>	++
<i>Nannochloropsis oculata</i>	+
<i>Pavlova luteri</i>	+++
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	+
<i>Pseudoisochrysis paradox</i>	++
<i>Pyramimonas virginica</i>	+
<i>Skeletonema costatum</i>	++
<i>Tetraselmis suecica</i>	+++
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	+++
Hranidbena vrijednost: vrlo dobra +++; dobra ++; osrednja +	

Prednost navedenih vrsta jednostaničnih alga jesu: veličine stanica, mekana opna, netoksični metaboliti, ali i njihova dobra homogenost raspršivanja u uzgojnom mediju.

U pokusnim istraživanjima pojedinih vrsta jednostaničnih alga u prehrani kamenice *Ostrea edulis* utvrđeno je da se ukupno 7 smeđih i zelenih jednostaničnih alga, koje pripadaju trima sistematskim porodicama upotrebljavaju u uzgoju. Također je zamjena *Isochrysis galbana* s *Isochrysis aff. galbana* »Tahiti« sve učestalija zbog jednostavnosti održavanja kulture (Chrétiennot-Dinet, 1990).



Slika 7. Sheme najznačajnijih alga za prehranu ličinki školjkaša (Trintignac, 1996).

### 5.3. Uzgoj odabranih jednostaničnih alga u monokulturi

Za pravilan uzgoj jednostaničnih alga, osim kontinuiranog održavanja matičnoga stoka, važno je održavati optimalnima sljedeće fizikalne, kemijske i biološke čimbenike medija, i to:

1. hranjivost,
2. temperaturu,
3. svjetlost,
4. slanost,
5. pH,
6. prozračivanje i miješanje,
7. sterilizaciju.

Za normalan rast algi u monokulturi upotrebljavaju se **hranjivi mediji** koji sadrže dušik, fosfor, metale u tragovima i vitamine (Walne, 1966; Chrétiennot-Dinet, 1990). Još od početka uzgoja jednostaničnih alga na tržištu su se mogli naći razni gotovi hranjivi mediji kao: Conway otopina (Walne, 1956), ES medij (Provasoli, 1958); F2 medij (Guillard i Ryther, 1962) i druge hranjive otopine. Godine 1974. Stutz preporučuje modificirani medij F2 zbog onečišćenja medija bakterijama i drugim organizmima.

**Temperatura** je važan čimbenik u razmnožavanju alga u monokulturama. Iako svaka vrsta postiže maksimalnu gustoću stanica pri točno određenoj temperaturi, prema La Borgne (1989), optimalne temperature za pravilan razvoj kultura algi kreću se između 18 i 22 °C. Ispod ovih temperaturnih vrijednosti alge usporeno rastu, a iznad postaju slabe, neotporne i propadaju. Tako primjerice alge *Phaeodactylum tricornutum* i *Skeletonema costatum* imaju optimalan rast pri 20 °C, a *Chlorella saccharophila* pokazuje optimum pri 23 °C (De Pauw i sur., 1980). Prema Li i Morris (1982) *P. tricornutum* uspješno se razvija do 25 °C, a *Tetraselmis suecica* pri temperaturi od 15 °C (Fabregasu i sur., 1984).

Uzgajane jednostanične alge trebaju **svjetlosnu energiju** za obavljanje procesa fotosinteze i pravilnu diobu. Smayda (1971) navodi da matični stokovi alga moraju biti izloženi dnevnoj svjetlosti ili slabom umjetnom osvjetljenju, dok je za uzgoj većih količina alga potrebna stalna osvjetljenost (Persoone i sur., 1980). Naravno,

podešena jačina svjetla ovisiti će o vrsti alga i njezinoj brzini razmnožavanja. Osim toga, treba voditi računa o tome da podešena jačina svjetla u slučaju veće gustoće alga, čije stanice često prijanjaju uz stijenku posude, omoguće dobar prodor svjetla u dubinu kako bi se sve stanice alga mogle koristiti svjetlom i kontinuirano se obnavljati. Tako se primjerice za uzgoj alge *Tetraselmis suecica* rabi fluorescentna svjetiljka od 80 W kojom se postiže optimalna jačina osvjetljenja od  $2,5 \times 10^4$  do  $3,5 \times 10^4$  luksa (Laing i Helm, 1981). Alga *Chlorella* sp. za pravilan rast treba jačinu svjetla od  $3,0 \times 10^3$  luksa, što se postiže svjetiljkama od 40 W (Persoone, 1980). Osim jačine osvjetljenja, za uzgoj alga veoma je bitan i fotoperiod. Tako Cosper (1982) za uzgoj alge *Skeletonema costatum* primjenjuje naizmjenično 12-satne periode svjetlosti i tame. Ostgaard i Jensen (1982) smatraju da se uspješan rast alga postiže pri 14 sati svjetlosti i 10 sati tame, dok Fabregas i sur. (1984) navode optimalan uzgoj *Tetraselmis suecica* pri fotoperiodu od po 12 sati svjetlosti i tame.

Iako **slanost i pH** uzgojnog medija nisu ograničavajući čimbenici rasta alga, ipak utječu na njihov razvoj. Walne (1966) navodi optimalan raspon pH vrijednosti od 7,5 do 8,0 za uzgoj različitih jednostaničnih alga. Za uzgoj alge *Tetraselmis suecica* optimalna se gustoća postiže pri pH vrijednosti od 6 do 6,2 (Wegman i Metzner, 1971). Fabregas i sur. (1984) za istu algu rabe salinitet u rasponu od 0 do 35, a optimalnu gustoću od  $1,5 \times 10^6$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  dobivaju pri salinitetu od 25 do 35. Za uzgoj *Dunaliella tertiolecta* u monokulturi Spectorova i sur. (1981) navode najpovoljniji salinitet između 20 i 23.

Budući da mnoge jednostanične alge imaju tendenciju taloženja na dno posude, potrebno je neprestano **miješanje** medija putem izvora za **prozračivanje**, čime se uspostavlja homogenost raspodjele alga unutar medija, napose kod većih uzgojnih volumena. Uobičajena je pojava da se uzgojni mediji uz prozračivanje mjehurićima zraka, obogaćuju i ugljikovim dioksidom, čime se osigurava bolji rast alga (Heral, 1989).

Uspješan uzgoj monokultura se može osigurati filtracijom i centrifugiranjem morske vode kojima se uklanjaju razne čestice i zooplankton. Nakon toga se pročišćena voda pušta u čiste bazene, gdje se razvijaju alge uz kontinuirano prozračivanje i djelovanje prirodnog ili umjetnog svjetla. Daljnji tijek rasta fitoplanktonskih organizama ovisiti će o optimalnim abiotičkim čimbenicima kao što su temperatura, svjetlost, količina hranjivih soli i raspoloživih vitamina. Iako je ovakav uzgoj jeftin, on krije mnogo nedostataka, jer alge rastu u velikim bazenima pa se



zbog velike kontaktne površine sa zrakom uzgojna monokultura izlaže djelovanju nepoželjnih organizama koji svojim djelovanjem mogu izazvati njezin usporen rast ili je u potpunosti uništiti. Godine 1937. Gross preporučuje metodu uzgoja algi u monokulturi, koja se u osnovi i danas primjenjuje.

Da bismo omogućili pravilnu proizvodnju alge u monokulturi, u kontroliranim uvjetima, u posudama manjeg volumena potrebno je osigurati sterilne uvjete. **Sterilizacijom** se uklanjaju štetni organizmi, tj. druge vrste alga, zooplanktonski fitofagi ili pak bakterije prisutne u vodi koje mogu biti kompetitori ili činiti osnovu za razvoj neželjenih bolesti. Količina prisutnih bakterija može se smanjiti upotrebom antibiotika, no njihova se uporaba treba izbjegavati kako se ne bi stvorili sojevi bakterija otpornih na antibiotike (Loosanoff i Davis, 1963).

Proizvodnja jednostaničnih alga započinje stvaranjem matičnog soja (franc. *souch*) kulture. Nakon mikroskopskoga pregleda uzorka morske vode iz prirodne sredine pristupa se izolaciji željene vrste alge s pomoću mikropipete tako da jednu kap u kojoj su željene jednostanične alge stavimo na čvrstu hranjivu podlogu agar-agar. Radi lakšeg, kontinuiranog čuvanja kulture, jedan se njezin dio drži u malom volumenu, dok se drugi dio obnavlja pravilnom diobom te dolazi do povećanja uzgojnog volumena. Proces razmnožavanja jednostaničnih alga u kulturi teče eksponencijalno, a kultura svoj maksimum postiže treći dan, nakon čega se rast usporava i na kraju potpuno propada (Trintignac, 1966 ).

## **6. UZGOJ KAMENICA U FRANCUSKOJ**

## 6. UZGOJ KAMENICA U FRANCUSKOJ

### 6.1. Sukcesivnost vrsta

U usporedbi sa mnogo ranijim počecima uzgoja školjkaša u svijetu, uzgoj školjkaša u Francuskoj pojavljuje se na atlantskoj obali kasnije, tek u 17. stoljeću. No, danas je Francuska vodeća europska zemlja u pogledu tehnologije uzgoja ličinki raznih vrsta školjkaša, napose kamenica (Eliziere-Papayanni, 1993). Da bi se što bolje razumjela potreba razvoja uzgoja školjkaša kratko ćemo se osvrnuti na sukcesivnost nekih vrsta školjkaša u Francuskoj.

Znatniji napredak u uzgoju kamenica podudara se s napuštanjem bazena za sakupljanje soli na području Marennes-Olérona u 18 stoljeću (Grelon, 1978; Lemonnier, 1980). Grelon kao početak uzgoja navodi, prvi prihvat ličinki kamenica u bazenu Arcachon godine 1856. No, ipak se kraj 19. stoljeća, kada je razrađena tehnologija uzgoja, tj. prihvat ličinki kamenica, njihov rast i preživljenje, smatra pravim početkom naprednijeg uzgoja kamenica u Francuskoj (Héral, 1989; Elizièere-Papayanni, 1993).

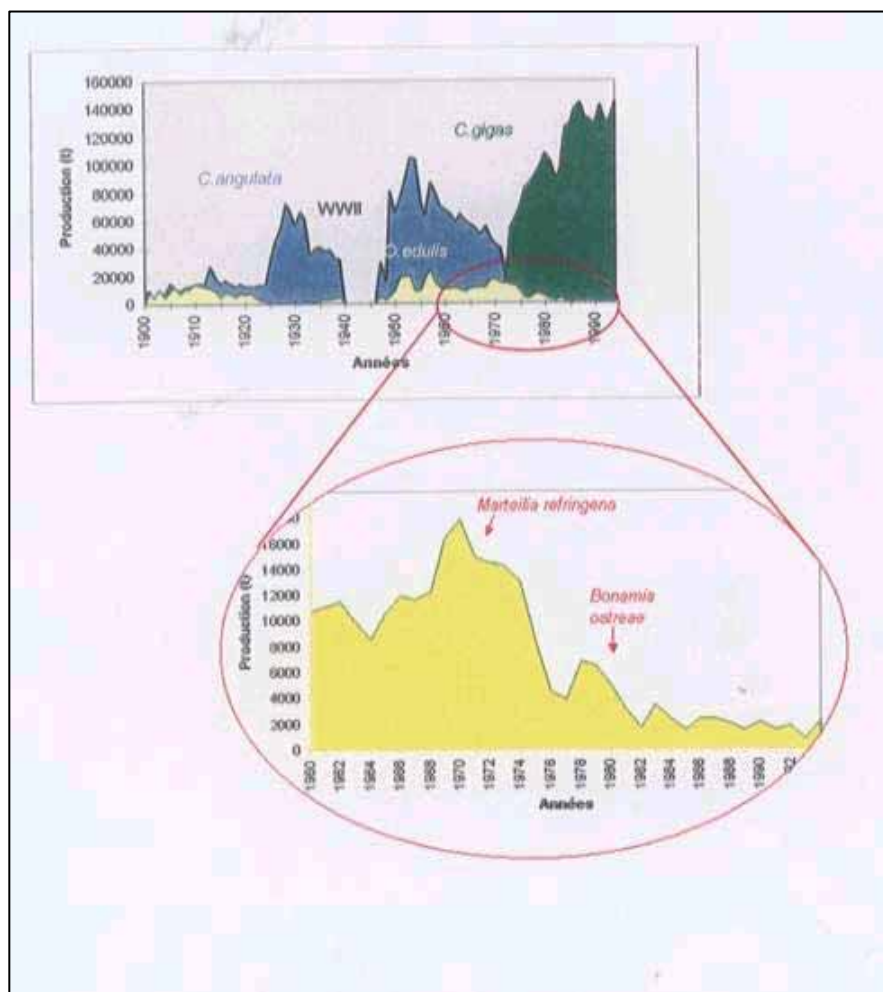
Od tada do danas uz francusku se obalu u prehrani stanovništva uspješno upotrebljavalo više vrsta kamenica, a ponajviše europska kamenica *Ostrea edulis*, autohtona vrsta područja. No godine 1860. u Arcachonski je zaljev iz Portugala uvezena kamenica *Crassostrea angulata*. Kao pridošlica portugalska se je kamenica vrlo brzo prilagodila novoj sredini i proširila u staništa europske kamenice. Tako je godine 1883. u područjima Marennes, Oléron i ušća rijeke Charente zabilježen veći prihvat mlađi portugalske (2/3) u odnosu prema europskoj kamenici (1/3) (Héral, 1989).

Od godine 1920. do 1922. nastupa prva kriza u uzgoju europske kamenice, uzrokovana masovnim ugibanjima koja su prema Hinardu i Lambertu (1928) pripisana pojavi nepoznate bolesti ili termičkom šoku. Poslije, između godine 1960. i 1969., ponovno masovno ugibanje zahvatilo je sada portugalsku kamenicu, a bilo je uzrokovano epizootijom, uzročnikom Iridovirusom. Potpuno nestajanje portugalske kamenice na francuskoj obali nastupa novim masovnim ugibanjem od godine 1970. do 1973. (Elizièere-Papayanni, 1993).

Zbog toga je godine 1972. uvezena japanska kamenica, *Crassostrea gigas*, porijeklom s Tihog oceana koja je omogućila obnovu proizvodnje do znatnijih

razmjera (Gouletquer i Héral, 1997). Istodobno se je proizvodnja europske kamenice znatno smanjila pojavom novih bolesti. Ranije, na području Bretagne pojavljuje se 1968. martelioza (haplospora *Marteilia refringens*), a 1979. bonamioza (paramyxa *Bonamia ostrea*), (Kinne, 1983). Bonamioza je u kratkom periodu uzrokovala veliko smanjenje proizvodnje s 20 000 na 1 500 t, te je dovela u pitanje opstanak uzgoja europske kamenice (Gouletquer i Héral, 1997), (Slika 8).

Na sreću je porastao uzgoj japanske kamenice, tako da je godine 1984. njezina proizvodnja dosegla čak 98% od ukupne godišnje proizvodnje kamenica (100 000 t) na uzgojnoj površini od 20 000 ha (Héral, 1989), (Slika 8).



Slika 8. Proizvodnja kamenica u Francuskoj, u razdoblju od godine 1900. do 1990. (Gouletquer i Héral, 1997)

U opisu sukcesivnosti pojedinih vrsta kamenica treba istaknuti da su se japanska i portugalska kamenica dugo smatrale dvjema odvojenim vrstama, koje su

na morfološkoj i fiziološkoj razini u potpunosti jednake. Sabelli i sur. (1990) navode portugalsku kamenicu *Crassostrea angulata* kao sinonim vrste *C. gigas*. Najnovija genetska istraživanja genetskim markerima i analizom DNA potvrdila su njihovu razliku (Arnaud i sur., 2000), čime se mogu protumačiti razlike u osjetljivosti prema patogenim organizmima (Meuriot i Grizel, 1983).

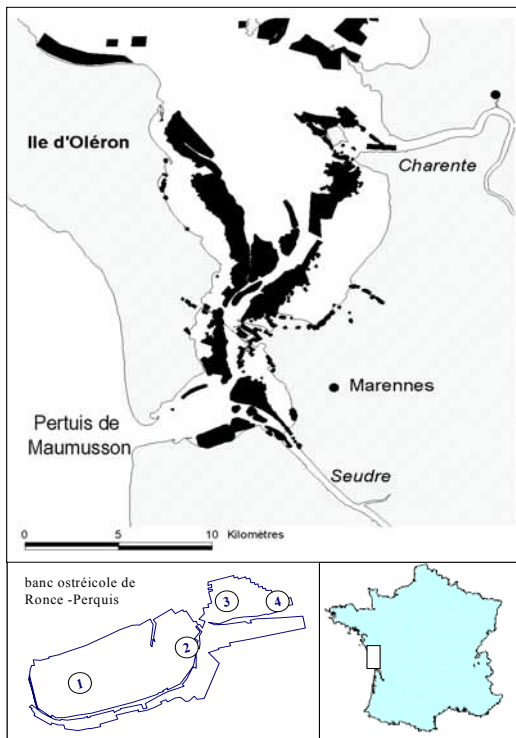
Proizvodnja europske kamenice danas iznosi 1 600 t, a odnosi se na područje Bretagne i Sredozemlja (Gouletquer i Héral, 1997). Iz ekonomskih razloga, zbog ukusnijeg mesa, a time i veće cijene europske kamenice na tržištu francuski su uzgajivači skloniji uzgoju europske negoli japanske kamenice (FIOM, 1991).

Prema zadnjim dostupnim podacima CNC-a (*Centre National des Coquillages*), Nacionalnog centra za školjkaše, u Francuskoj je u godini 2003. proizvedeno 128 000 t kamenica pacifičke kamenice *Crassostrea gigas* i 1 300 t *Ostrea edulis* (Bretagna).

Po proizvodnji kamenica najproduktivniji uzgojni bazen u Francuskoj danas je Marennes-Oléron, smješten između otoka Oléron i obalnog, kontinentalnog dijela, u regiji Poitou-Charentes (Slika 9), s godišnjom proizvodnjom oko 35 000 do 40 000 t, što čini 25% nacionalne proizvodnje (Gouletquer i Héral, 1997).



Slika 9. Uzgojni bazen Marennes – Oléron (foto: Ifremer)



Slika 10. Uzgoj kamenica u području Ronce-Perquis unutar bazena Marennnes-Oléron (Stoletchnik i sur., 2000)

Posebnu važnost na jugu bazena Marennnes-Oléron čini uzgojni bank sa središtem u Ronce-Perquis, koji sa ukupno 1 600 koncesija ostvaruje godišnju proizvodnju od 8 000 do 10 000 tona (Stoletchnik i sur., 2000), (Slika 10).

Drugo područje uspješnog uzgoja kamenica na atlantskoj obali jest Arcachonski bazen, poznat kao prirodno rastilište mlađi. Oba su centra važna za distribuciju mlađi u ostale krajeve Francuske koji imaju dostatan prostorni kapacitet za daljnje etape uzgoja do tržišta.

Cjelokupno područje Ronce-Perquis sa 150 km<sup>2</sup> koje se na sjeveru proteže od Pertuis d'Antioche sve do Maumusson (Le Moine i sur., 2000.), odlikuje se vrlo povoljnom lokacijom, zbog utjecaja oceanskih voda.

Zbog povoljnog položaja bazen Marennnes-Oléron, je osim po uzgoju odraslih kamenica i distribuciji mlađi u druge bazene uzgoja (Bretagne, Normandie), poznat je po tehnici dohranjivanja odraslih kamenica prije slanja na tržište. Dohrana kamenica obavlja se u namjenskim bazenima veličine 300 do 500 m<sup>2</sup> (Slika 11). Postupak poznat pod nazivom *affinage en clairs* je posebnost bazena, a prehrana jednostaničnom algom *Navicula ostrearia* omogućuje da u kraćem razdoblju meso kamenica zadeblja i dobije zelenkastu boju. Tako uzgojene jedinice posebno su cijenjene i postižu veću prodajnu cijenu (Eliziere-Papayanni, 1993).



Slika 11. Područje Marennes-Oléron, uzgoj kamenica u bazenima (foto: Ifremer)

## 6.2. Istraživački institut Ifremer (L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer)

Ifremer je najveći istraživački institut za iskorištavanje mora u Francuskoj, znanstvenog, industrijskog i komercijalnog karaktera. Osnovan je 5. lipnja 1984. ujedinjavanjem dviju institucija: CNEXO (Centre National d'Exploitation pour les Océans = Nacionalni Centar za iskorištavanje oceana) i ISTPM (l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes = Instituta znanosti i tehnike ribarstva). U složenu organizaciju Ifremera je uključeno više od pet velikih operativnih središta u Boulogne-sur-mer, Brestu, Nantesu, Toulonu i Tahitiju (Slika 12). Ifremer je pod zajedničkom upravom Ministarstava za znanost, društvenu djelatnost, promet i stanovanje, poljoprivredu i ribarstvo sa sjedištem u Parizu. Institucija ukupno obuhvaća 24 stanice i 72 laboratorija u priobalju Francuske i u frankofonskim zemljama, u kojima radi oko 1 700 zaposlenih znanstvenika, stručnih suradnika, inženjera, tehničara, pomoraca i službenika s godišnjim prihodom oko blizu 150 mil € (milijardu kuna). Ifremer ostvaruje brojnu međunarodnu suradnju i sudjeluje u

mnogim programima istraživanja Europske unije. Uključen je u programe za zaštitu okoliša, bioraznolikost, proučavanje klimatskih promjena i brojnu bilateralnu suradnju s drugim zemljama (SAD-om, Kanadom, Japanom i europskim zemljama).

Pod znanstvenom upravom Ifremera nalaze se četiri upravljačka tima:

**1. DEL** (Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral = Upravljanje okolišem i iskorištavanje priobalja). Glavna je aktivnost tima usmjerena na praćenje promjena u priobalnom području, koristeći se najnovijim programima koji su sukladno prirodnim promjenama prilagodljivi uz primjenjive istraživačke metode i tehnike.

**2. DRV** (Direction des Ressources Vivantes = Upravljanje živim resursima) ima za zadatak pridonijeti razvoju akvatične proizvodnje, njezinim transformacijama preradom do komercijalnog proizvoda i vrednovanju kvalitete morskih plodova. Usto nadzire i provodi procjenu raspoloživoga jestivog stoka uz stalno praćenje biomase interesnih područja za ribolov, s posebnim naglaskom na praćenje uzgojne problematike školjkaša.

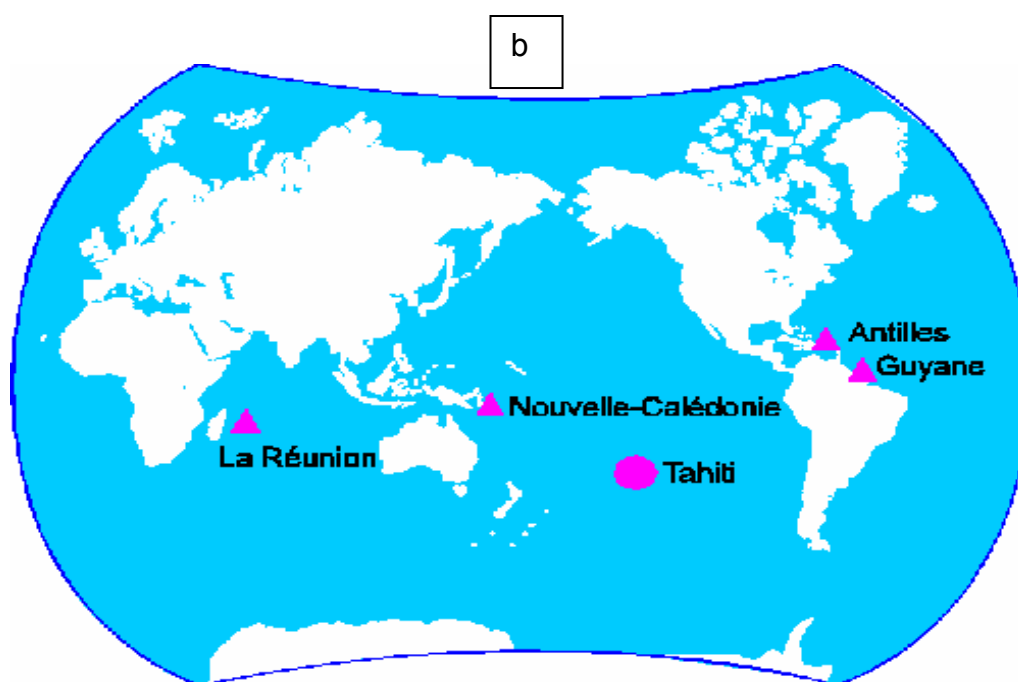
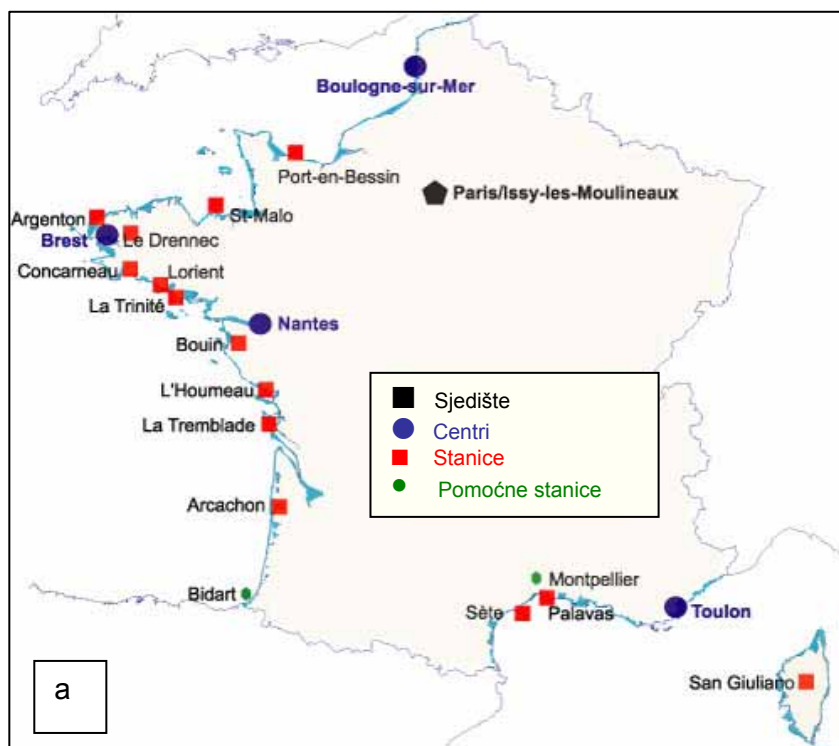
Ciljevi se ostvaruju preko triju odjela i jedne službe:

- DRV/RH (Ressource Halieutiques = Ribarstveni izvori)
- DRV/RA (Ressource Aquacoles = Uzgojni izvori)
- DRV/VP (Valorisations des produits = Vrednovanje proizvoda)
- DRV/SEM (Service d'économie maritime = Služba pomorske ekonomije)

**3. DRO** (Direction des Recherches Océaniques = Upravljanje oceanskim izvorima) svojim istraživačkim projektima pridonosi znanju na području iskorištavanja bentosa oceana te tumačenju oceanskih strujanja.

**4. TMSI** (Direction des navires océanographiques et l'intervention sous-marine = Upravljanje oceanografskim brodovima i podmorskim aktivnostima) svojim aktivnostima pokriva glavninu francuske oceanografske flote koja uključuje brodove i podmornice, također organizira razne akcije na moru nakon havarija naftnih brodova i druge izvanredne intervencije.



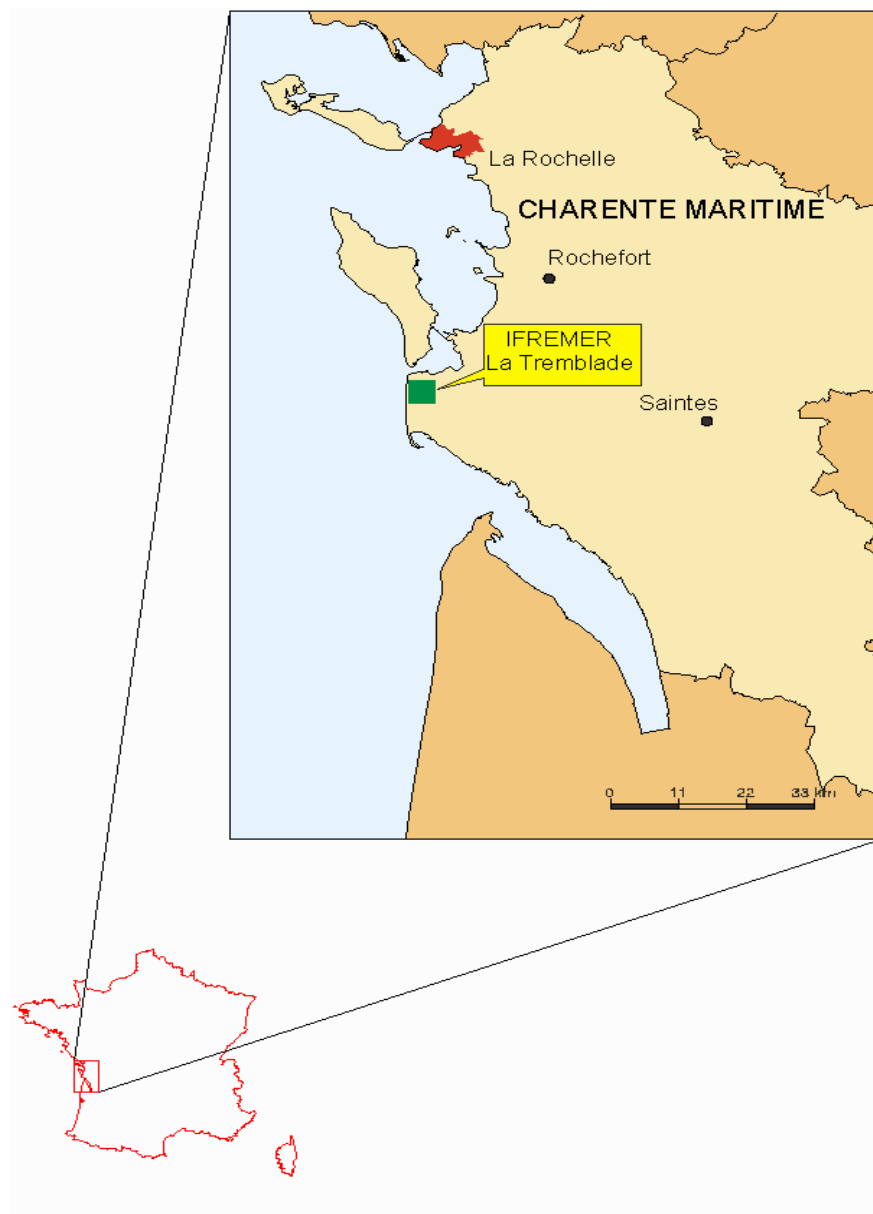


Slika 12. Glavni istraživački centri i stanice Ifremera u Francuskoj (a) i u frankofonskim zemljama (b) ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))

### 6.2.1. Istraživačka stanica u La Trembladeu

U središtu uzgojnog bazena Marennes-Oléron nalazi se znanstvena stanica La Tremblade specijalizirana za istraživanje aktualnih problema iz područja školjkarstva, a posebice unaprjeđivanja tehnologija uzgoja školjkaša i monitoriranja litoralnog područja (Slike 13 i 14). Stanica se sastoji od tri laboratorija:

1. DEL (Direction Environnement et Aménagement du Littoral = Upravljanje okolišem i iskorištavanje priobalja). Djelokrug laboratorija pokriva litoralno područje od desne obale Charenta pa do Gironde, unutar bazena Marennes-Oléron. Rad je laboratorija usmjeren na tri područja istraživanja:
  - REMI (Réseau de contrôle microbiologie = područje mikrobiološke kontrole)
  - REPHY (Réseau de suivi du phytoplancton = područje kontrole fitoplanktona)
  - RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin = područje praćenja kvalitete morskog okoliša).
2. DRV/LCPC (Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes = Laboratorij za školjkaše područja Poitou-Charentes). Regionalni laboratorij na području Poitou-Charentes usmjeren je na monitoring školjaka radi poboljšanja produktivnosti bazena i na unaprjeđenje novih uzgojnih tehnologija, a trenutačno je najaktualnija primjena *off-shore* tehnologije uzgoja.
- 3) DRV/LGP (Laboratoire de Génétique et de Pathologie des mollusques = Laboratorij genetike i patologije školjkaša). Na području genetike laboratorij obuhvaća rad na genetskim karakteristikama školjkaša radi poboljšanja kvalitete populacija školjkaša u uzgojnom bazenu, ispitivanje hibrida i selekciju europske kamenice *Ostrea edulis*. Na području patologije obuhvaćena je kontrola daljnjeg širenja bolesti bonamioze i martelioze, zatim patološke promjene izazvane virusom herpesa, te bakterijama. Patološki laboratorij ujedno ima priznanje referentnog laboratorija na međunarodnoj razini.



Slika 13. Geografski položaj Ifremerove istraživačke stanice u La Trembladeu ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))



Slika 14. Ifremerova stanica u La Trembladeu ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))

### 6.2.1.1. Laboratorij DRV / LGP za mrijest i uzgoj ličinki kamenica

U Ifremerovoj stanici u La Trembladeu, u laboratoriju DRV/LGP, odjelu za genetiku obrađuju se problemi vezani za mrijest i uzgoj ličinki, kao i za proizvodnju fitoplanktona radi opskrbe hranom cijeloga uzgojnog sustava.

U instalacijskom, pokusnom dijelu laboratorija nalazi se više prostorija posebnih namjena potrebnih za uzgoj i istraživanje ličinki kamenica.

Prostorije i aktivnosti pokusnog dijela laboratorija jesu:

#### **1. Prostorija za izolaciju odraslih kamenica (karantena), (Slika 15).**

Postoje dvije zasebne prostorije, jedna za organizme koji se poslije proučavaju u patološkom laboratoriju, a druga služi za čuvanje uvezenih, alohtonih organizama, predviđenih za iduće pokuse.



Slika 15. Prostorija za izolaciju odraslih kamenica (karantena), (foto: Pascal Phelipot)

## 2. Prostorija za stokiranje i kondicioniranje roditeljskih organizama (Slika 16)

Prostorija za kondicioniranje uglavnom služi za stokiranje, kondicioniranje i maturaciju odraslih kamenica. Pravilnim kondicioniranjem kamenica osigurava se mrijest većim dijelom godine, ponajprije u razdoblju izvan prirodnoga reproduktivnog ciklusa školjkaša.



Slika 16. Bazeni s kamenicama u prostoriji za kondicioniranje i održavanje roditeljskih organizama (foto: Pascal Phelipot)

## 3. Prostorija za selekciju roditeljskih linija europske kamenice (Slika 17)

Jedan od načina borbe protiv bolesti i štetnih ekoloških utjecaja jest formiranje zdravih roditeljskih linija koje će dati kvalitetan genetski materijal, tj. otporne ličinke i mlađ. Radi poboljšanja i lakšega praćenja matičnih i genski zdravih organizama, znansvena ekipa u laboratoriju za genetiku i patologiju radi na selekciji roditeljskih linija europske kamenice otporne na bonamiozu (Ifremer, 2000). Program selekcije na toleranciju prema bolesti realiziran je najprije masovnom, a potom intrafamilijarnom selekcijom (Bédier i sur., 2001).



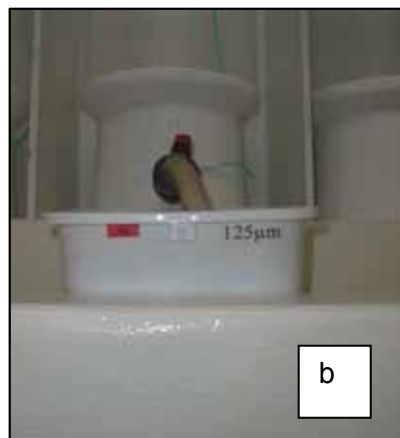
Slika 17. Mali instalacijski bazeni na policama u prostoriji za selekciju europske kamenice *Ostrea edulis* (foto: Edouard Bédier)



Slika 18. Bazeni s kamenicama uoči mrijesta (foto: Andre Gérard)

#### 4. Prostorija za mrijest i uzgoj ličinki kamenica (Slike 18, 19)

Postupak mrijesta provodi se u bazenima volumena 150 L (Slika 18), a izmriještene se ličinke smještaju u dvije prostorije (Slika 19). Iako se u objema prostorijama obavlja klasičan uzgoj ličinki, strogo se vodi računa o tome da iskorištena voda prije ipuštanja u prirodnu sredinu bude tretirana ozonom. Dijelovanjem ozonom sprječava se mogućnost da uzgojeni organizmi, alohtonih vrsta, dospiju živi u prirodnu sredinu putem cirkuliranja vode u instalacijskom sustavu.



Slika 19. Prostorija za održavanje i rast ličinki (a), filtracija ličinki na situ veličine oko 125 µm (D5/D6) (b)

##### **5. Prostorija za cementiranje ličinki kamenica, mikrohranilište (Slika 20)**

Zbog automatske prehrane kamenica prostorija je nazvana mikrohranilištem. Opremljena je s 20-ak pravokutnih bazena kapaciteta 150 L. Odmah nakon mrijesta ličinke kamenice u fazi pediveligera smještaju se u plastična sita u vremenu od 10 ili 15 dana, a ličinke japanske kamenice do tri tjedna. Za prihvrat zrelih ličinki kamenica kao podloga na dno sita stavljaju se usitnjene ljuštore školjkaša. U određenim vremenskim razmacima provodi se kontrola uspješnosti cementiranja kamenica.

##### **6. Prostorija za proizvodnja fitoplanktona (Slike 21 i 22)**

Prostorija za proizvodnju alga središnja je prostorija u laboratoriju, a namijenjena je za raspodjelu hrane u sve prostorije za uzgoj školjkaša. Osim te prostorije, u vanjskom dijelu stanice postavljena su još četiri bazena za održavanje fitoplanktona, radi pojačane prehrane kamenica.

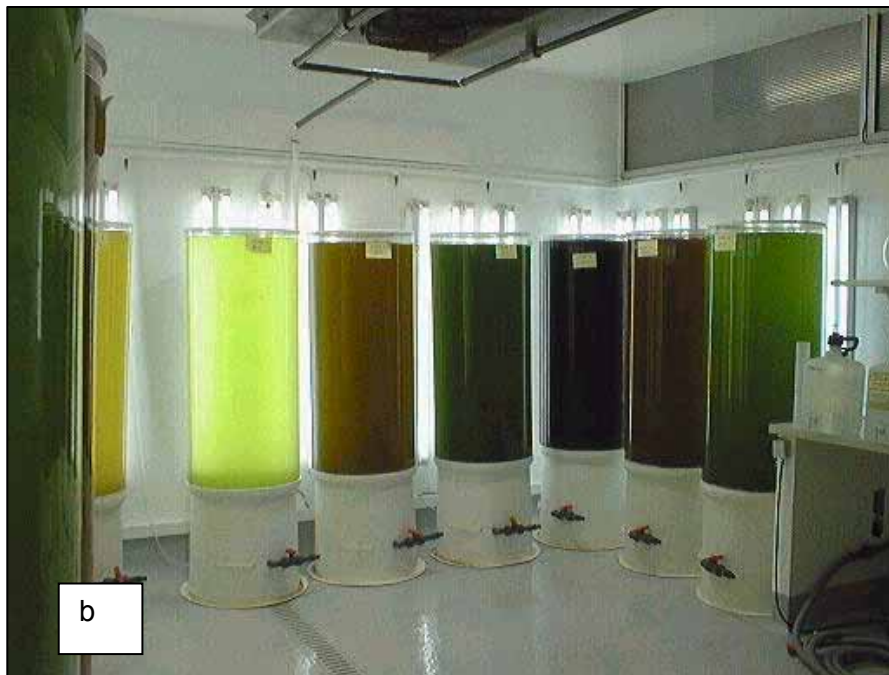


Slika 20. Mikrohranilište, bazeni za prhvat ličinki



Slika 21. Vanjski bazeni za uzgoj alga (foto: Pascal Phelipot)





Slika 22. Prostorije za održavanje monokultura jednostaničnih alga: monokulture alga u staklenim balonima od 2 i 10 L (a); konusni bazeni od 300 L (b)

## 7. Prostorija za čišćenje pribora i sterilizaciju posuđa (Slika 23)

Radi uklanjanja štetnih organizama, kao što su nepoželjne vrste alga zooplanktonski fitofagi ili bakterije primjenjuje se sterilizacija staklenih balona stavljanjem u autoklav na temperaturu od 121 °C u vremenu od 20 minuta pri atmosferi od 1 bara. Tim smo postupkom izbjegli pojavu mogućih kompetitora ili konatminaciju uzgajane alge.



Slika 23. Prostorija za čišćenje i sterilizaciju pribora i posuđa  
(foto: Pascal Phelipot)

## **7. MATERIЈAL I METODE RADA**

## 7. MATERIJAL I METODE RADA

### 7.1. Postavljanje mrijestnih serija kamenice *Ostrea edulis*

Materijal su bile odrasle kamenice skupljane iz prirodne sredine na području Bretagne, donesene u stanicu La Tremblade i smještene u četvrtaste bazene volumena 800 L, u prostoriju za izolaciju odraslih kamenica (karantena), (Slika 15). Prije polaganja kamenica u bazene sa stalnim protokom vode, s ljuštura je pažljivo ispran mulj i odstranjeni su svi epibionti. Neposredno prije mrijesta kamenice su prebačene u prostoriju za mrijest, u bazene četvrtasta oblika kapaciteta 150 L, radi lakšeg praćenja izbacivanja ličinki (Slika 18). Redovnim dnevnim praćenjem izbačene su ličinke skupljanje s pomoću sita s mrežom veličine oka od 100 µm, koje se je nalazilo neposredno iza izlaza odvodne cijevi iz bazena. U daljnjem postupku skupljene ličinke pojedinih mrijestnih serija, koje čine skup kamenica čije su izbačene ličinke upotrebljavane u pokusu, stavljane su u bazene od 150 L (Slika 19). Nakon toga su ličinke pojedine mrijestne serije smještane u konusne bazene odgovarajućeg volumena u prostoriju za održavanje i razvoj ličinki (Slika 19).

Tijekom rada postavljeno je 7 mrijestnih serija s podserijama, ovisno o količini skupljenih ličinki. Tako je za 1., 2. i 4. mrijestnu seriju postavljena samo jedna podserija, a za 3., 5., 6. i 7. više podserija (Tablica 5). Samo su u 7. mrijestnoj seriji, zbog brojnosti ličinaka, provedeni hranidbeni tretmani.

Tablica 5. Mrijestne serije, podserije i datum postavljanja pokusa (D1 = dan ispuštanja ličinki iz kamenica)

D1	Mrijestna serija	Broj podserija
17.3. 02.	1	1
22.3. 02.	2	1
23.3. 02.	3	4
1.4. 02.	4	1
8.4. 02.	5	6
10.4. 02.	6	2
21.4. 02.	7	9

U svim mrijestnim serijama (1-6) raspoređeni broj ličinki po pokusnim bazenima iznosio je 300 000 jedinki, osim 1. s 350 000 jedinki i 7. mrijestne serije s 225 000. Tijekom pokusa ličinke koje su pri filtraciji vode iz bazena ostale na situ, veličine oka od 220  $\mu\text{m}$ , zrele su jedinke koje su svojom veličinom zadovoljile kriterij za prelazak na sjedilački način života. Ličinke pak koje su prošle kroz sito, dakle bile su manje od 220  $\mu\text{m}$ , vraćene su u bazene i održavane do trenutka spremnosti "traženja" čvrste podloge.

Zrele su ličinke premještane u bazene sa sitima veličine oka od 150  $\mu\text{m}$ , unutar kojih su bile fino usitnjene ljuštore školjkaša, kao podloga za prihvat (Slika 20).

#### 7.1.1. Pokusni uzgoj ličinaka, praćenje preživljenja i rasta

Pokusni uzgoj ličinki proveden je u dvjema prostorijama s instalacijskim postrojenjima podešenima za praćenje preživljenja i rasta. Skupljene ličinke iz pojedinih mrijestnih serija smještane su u konusne bazene volumena 150 L, u optimalne medije (Slika 19.a).

Prije ulaska u bazene s ličinkama morska voda, temperature 22 °C (+/- 1 °C), filtrirana je prolaskom kroz 2 filtarske kartuše, najprije 5  $\mu\text{m}$ , a zatim 1  $\mu\text{m}$  veličine. Također je u svakom bazenu postavljena cjevčica s kamenom za raspršivanje zraka. Kompletna izmjena vode u bazenima provedena je triput na tjedan, kada su se prigodom filtracije vode ličinke zadržavale na sitima odgovarajućih veličina oka (Slika 19.b). U sve je bazene svakog dana dodavana mješavina jednostaničnih alga iz monokultura u istom omjeru, osim u 7. mrijestnoj seriji, gdje su provedeni hranidbeni tretmani. Zdravstveno stanje, te količina i veličina ličinki provjeravani su nakon filtracije svakoga pojedinog bazena.

Procjena smrtnosti, tj. **preživljavanje ličinki** tijekom pokusa, rađena je redovito nakon filtracije vode. Ličinke zaostale na situ vraćene su u bazen kako bi se dalje razvijale. Rabljena su sita s mrežama raznih veličina oka. Sita su se mijenjala tijekom pokusa, na temelju minimalnog promjera ličinki. No, prije vraćanja ličinki u svježju vodu stijenke uzgojnog bazena redovito su bile temeljito isprane.

Postupak procjene preživljenja i rasta ličinki provodio se je ovako.

Iz menzure od 1 000 mL sa skupljenim ličinkama, uz konstantno miješanje štapićem s pločicom kojim je postizana ravnomjerna raspršenost ličinki u mediju i tako sprječavano taloženje, pipetom od 100 µl uzimane su po 3 kapljice mješavine voda-ličinke koje su položene na predmetno stakalce. Ličinke iz svake kapljice fiksirane su 2,5%-tnim formalinom. Pri brojenju ličinki na predmetnom stakalcu, organoleptički i s pomoću mikroskopa, obavljena je provjera zdravog izgleda jedinki, te broj uginulih prema prisutnosti praznih ili oštećenih ljuštura. Ako su ličinke slabo rasle ili preživljavale, izdvojio bi se poseban uzorak za detaljniju analizu u patolološkom laboratoriju.

**Određivanje rasta** je također provođeno u uzetom uzorku nakon filtracije vode iz pokusnih bazena. Tom prigodom se je uzorak za određivanje rasta ličinki analizirao s pomoću mikroskopa. Iz menzure od 1 000 mL uzet je uzorak za procjenu veličine ličinki na isti način kao i za procjenu preživljavanja. S pomoću pipete 1,5 mL uzeta je mješavina voda-ličinke i stavljena u ependorf-epruvetu, volumena 2 mL. S 3 kapljice 2,5 %-tnog formalina ličinke su se trenutačno taložile na dnu. Tako fiksirane i koncentrirane ličinke pipetom su stavljene na predmetno stakalce, a radi lakšeg mikroskopiranja preparata odabrana je ne prevelika gustoća. Naime, velika gustoća ličinki otežala bi računalnu obradbu uzorka, a mala brojnost zahtijevala bi višekratno ponavljanje obradbe.

Uzorci za određivanje rasta analizirani su s pomoću računalnog programa "Morfometrija", čitača slike SAMBA<sup>®</sup> («Morphometrie de l'analyseur d'image SAMBA<sup>®</sup>»), koji omogućuje da se dobiju maksimalni i minimalni promjer, te površina i opseg ličinke (Slika 24). Izabran kriterij za procjenu rasta bio je maksimalni promjer. Za analizu uzorka rabio se je okular 1,67, a za određivanje početne duljine ličinki tijekom prvih nekoliko dana pokusa okular 3,3. Pri radu s programom bilo je važno nadomjestiti uzorak kako bi se dobila što egzaktnija procjena prirasta.

Naime, s pomoću naredbi računalnog programa bilo je potrebno ukloniti one ličinke koje su se međusobno dodirivale kako ne bi bile obračunane kao jedna jedinka. Pri njihovom uklanjanju trebalo je obratiti pažnju na to da se ne utječe na promjenu veličine razdvojenih jedinki. Također je trebalo voditi računa o tome da se uklone eventualne nečistoće, ali i jedinke koje nisu u horizontalnom položaju jer u konačni obračun ulazi sve što je vidljivo na slici ekrana. Tako uređeno polje s pomoću računalnoga programa je očitano i automatski je procjenjivan najveći promjer svih jedinki na ekranu. Opetovanje u traženju novih polja s ličinkama

potvrđeno je do iznosa očitavanja od 100 jedinki po preparatu, što se smatra prihvatljivim i dovoljno preciznim za ovakvu vrstu analize.

Redovito nakon filtracije vode određivana je duljina ličinki triput na tjedan, osim u 7. mrijestnoj seriji za koju su mjerenja provođena svaki dan kako bi se što egzaktnije zabilježili napredovanje i promjene u rastu ličinki.



Slika 24. Tehnički pribor za određivanje duljine ličinki

## 7.2. Hranidba ličinki jednostaničnim algama iz monokultura

Ličinke iz mrijestnih serija tijekom pokusa hranjene su jednostaničnim algama uzgojenima u monokulturama. Proces pravilnog rasta i održavanja monokultura bio je kontinuiran *a priori* pravilnim tehničkim i zootehničkim mjerama.

U prostoriji za proizvodnju fitoplanktona za prehranu ličinki održavane su 4 vrste alga u monokulturi (*Isochrysis aff. galbana* »Tahiti«, *Pavlova lutheri*,

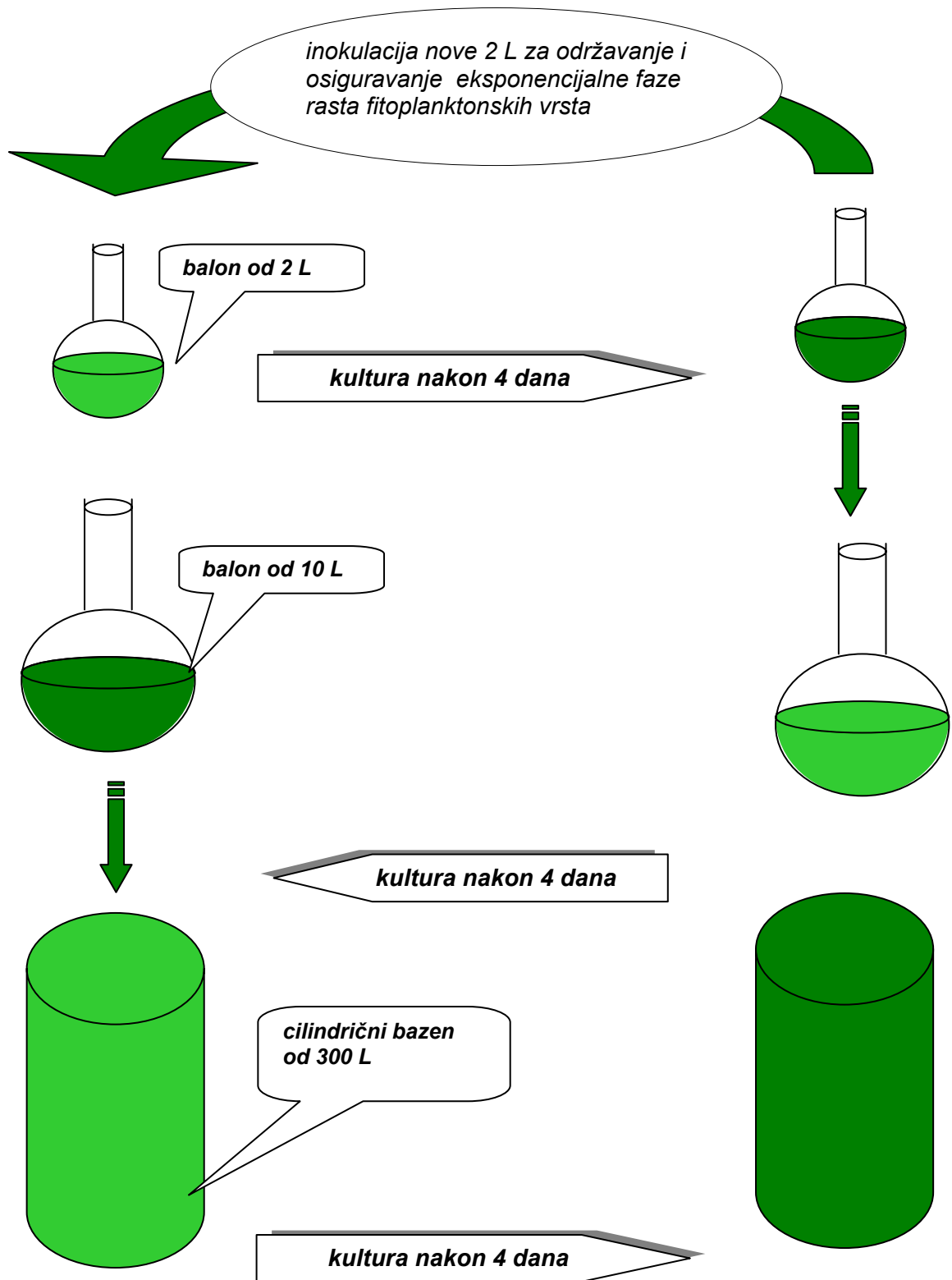
*Chaetoceros calcitrans* oblik *pumilum* ili *Chaetoceros calcitrans* i *Tetraselmis suecica*).

Budući da je rast alga u monokulturama eksponencijalan, algalne su kulture obnavljane dvaput tjedno. Uhodana je metoda da se svaki treći dan alge zbog brzog rasta preraspoređuju po odgovarajućim volumenima. Za opskrbu pokusnoga ličinačkog uzgoja fitoplanktonske alge su držane u staklenim balonima volumena od 2 i 10 L (Slike 22 i 25).

Najprije u balonima od 2 L postavljena početna faza rasta kulture, odnosno inokulacija kulture alga, koja će dati nove 2 L kulture, što će opet svojom gustoćom osigurati daljnji nastavak eksponencijalnog rasta. Preostali je dio prebačen u 10-litarske balone (Slika 22.a).

Baloni od 10 L činili su krajnji volumen uzgoja iz kojeg su izdvajane potrebne dnevne količine alga za prehranu ličinki u pokusnim bazenima. Inače volumen alga od 10 L osnova je za inokulaciju cilindričnog bazena od 300 L (Slika 22.b). Ovo je ujedno krajnja faza u kontroliranoj proizvodnji alga, a iz spomenutog volumena izravnim se dotokom opskrbljuju svi bazeni s odraslim školjkašima, uključujući i postličinačke stadije.





Slika 25. Shema uzgoja jednostaničnih alga u monokulturama u stanici Ifremer u La Trembladeu

### 7.2.1. Zootehničke mjere u proizvodnji monokultura

Prostorija za uzgoj fitoplanktona osvijetljena je kontinuiranim osvijetljenjem jačine 1 000 luksa, a kvaliteta svjetla dodatno je pojačana halogenim lampama. Temperatura u prostoriji kretala se je između 18 i 20 °C. Za pravilan razvoj alga upotrebljavani su najpovoljniji kemijski sastav medija (Tablica 6.a) i hranjivi medij Conway obogaćen vitaminima (Tablica 6.b). Potrebna količina hranjivog medija bila je u funkciji početne biomase inokuliranih alga. Za pripremu pogodne uzgojne sredine služila je voda iz bušotine, koja je omogućila stalnost temperature od 17 °C, saliniteta 33, a uz to je bila relativno neonečišćena i imala je dovoljno mineralnih tvari.

Zbog tendencije taloženja alga na dno posude, neprestano miješanje medija omogućeno je mjehurićima zraka iz izvora za prozračivanje. Prednost je postupka što se istim dovodom u uzgojne volumene osiguravao i unos ugljikova dioksida koji obogaćuje kulturu i omogućuje bolji rast.

Tablica 6.a. Kemijski sastav medija za uzgoj monokultura izoliranih jednostaničnih alga (prilagođeno na pH 7,4)

a)

Spojevi	g/10 L destilirane vode
Na Cl	200,0
MgCl <sub>2</sub>	87,0
Na SO <sub>4</sub>	32,4
CaCl <sub>2</sub>	18,0
KCl	5,5
NaHCO <sub>3</sub>	1,6
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,88
KBr	0,80
SrCl <sub>2</sub>	0,50
H BO	0,33
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,21
FeCl <sub>3</sub>	0,069
NaF	0,027
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,024
MnSO <sub>4</sub>	0,016

Tablica 6.b. Hranjivi medij Conway i vitamini

<b>CONWAY</b>	g/10 L
NaNO <sub>3</sub>	1 000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> ·2h <sub>2</sub> O	450
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	336
Fe	13
Cl Mg	3,6
<b>VITAMINI</b>	-
Tiamin	50
B 12	0,2
Biotin	0,1

### 7.2.2. Hranidbeni tretmani od 1. do 6. mrijestne serije

Mješavina jednostaničnih alga za uravnoteženu dnevnu prehranu ranih razvojnih stadija ličinki određivana je na osnovi broja stanica po  $\mu\text{l}$  pojedine algalne monokulture. Tako je pojedini hranidbeni tretman kod svih serija (1-6) sadržavao isti sastav alga, odnosno 4 vrste s ukupno  $62 \text{ stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$ :

- |  |  |
|--|--|
| - <i>Isochrysis aff. galbana</i> (kultura Tahiti):   | 25 $\text{stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$ ("Aiso")   |
| - <i>Chaetoceros calcitrans</i> oblik <i>pumilum</i> | 25 $\text{stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$ ("Extubo") |
| - <i>Pavlova lutheri</i> :                           | 10 $\text{stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$ ("Pavlo")  |
| - <i>Tetraselmis suecica</i> :                       | 2 $\text{stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$ ("Tetra")   |

---

62  $\text{stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$  u dnevnoj prehrani

### 7.2.3. Hranidbeni tretmani 7. mrijestne serije

U prehrani ličinki 7. mrijestne serije primjenjena su tri različita hranidbena tretmana, a svaki je pojedini tretman imao tri podserije. Svaki je hranidbeni tretman uključivao jednaku količinu algalnih stanica ( $62 \text{ stanice} \times \mu\text{l}^{-1}$ ). Radi lakšeg rada i

daljnijega praćenja primijenjeni su tretmani imali kratice T, ST i SP, a svaki je od njih sadržavao ove vrste alga:

1. T tretman kao u prethodnim mrijestnim serijama (1-6) sadržavao je vrste:

- <i>Isochrysis aff. galbana</i> (kultura <i>Tahiti</i> ) .....	25 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	25 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Pavlova lutheri</i> .....	10 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Tetraselmis suecica</i> .....	2 stanice $\times\mu\text{l}^{-1}$

2) ST tretman, bez fitoplanktonske vrste *T. suecica*, sadržavao je vrste:

- <i>Isochrysis aff. galbana</i> (kultura <i>Tahiti</i> ) .....	25,8 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	25,8 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Pavlova lutheri</i> .....	10,4 stanice $\times\mu\text{l}^{-1}$

3) SP tretman, bez fitoplanktonske vrste *P. lutheri*, sadržavao je vrste:

- <i>Isochrysis aff. galbana</i> (kultura <i>Tahiti</i> ) .....	30 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	30 stanica $\times\mu\text{l}^{-1}$
- <i>Tetraselmis suecica</i> .....	2 stanice $\times\mu\text{l}^{-1}$

Za sve tretmane 7. mrijestne serije u odnosu prema drugima (1-6), uključujući i kontrolni tretman (T), rabljene su alge iz istih sojeva, osim vrste *Chaetoceros calcitrans* oblik *pumilum*, koja je zamijenjena algom *Chaetoceros calcitrans*.

Budući da raspoloživa količina ličinki za treći tretman (SP) nije bila dovoljna da se izdvoji treća podserija, ukupna je gustoća u preostalim dvjema podserijama smanjena na 225 000 jedinki. Ujednačavanje gustoće u svim bazenima obavljeno je treći dan, kada se može s većom točnošću govoriti o broju jedinki obuhvaćenih pokusom. Radi bolje usporedbe rezultata pokusa morali su se osigurati jednaki uvjeti, tj. jednaka gustoća ličinki po pojedinom bazenu te je u svim preostalim bazenima (ST i T) količina smanjena na 225 000 jedinki.

Za procjenu preživljavanja 7. mrijestne serije nije uzeta u analizu jedna podserija (SP), (Dodatak 2, Tablica 2), a isključene vrijednosti imaju sljedeće opravdanje. Odstupanje s obzirom na ostale podserije pripisuje se ljudskom faktoru, izostanku nekog zootehničkog čimbenika ili možda tehničkoj manjkavosti instalacijskog bazena u sustavu.

#### 7.2.4. Procjena količine fitoplanktona za dnevnu prehranu ličinki

S pomoću računalnog programa SAMBA<sup>®</sup> («Morphometrie de l'analyseur d'image SAMBA<sup>®</sup>») procijenjena je količina pojedine algalne vrste prebrojavanjem prisutnih stanica na predmetnom stakalcu tvrtke Mallassez, površine od 5 mm<sup>2</sup> s izgraviranom linijom.

Za pravilno prebrojavanje stanica alga pojedine monokulture očitavalo se je 10 različitih polja svakoga preparata. Pri promjeni pozicije i odabira pojedinih polja u uzorku vodilo se je računa o slici koja se očitavala na ekranu. Prednost računalnoga programa pri očitavanju, osim površinskoga brojenja, jest i dubinska analiza preparata. Na kraju, je očitani rezultat izražen kao broj stanica po mililitru monokulture uz vrijednost standardne pogreške. Koeficijent varijabilnosti izračunan je sumarno za pojedine radnje (uzorkovanja, razrjeđenja, polaganje uzorka na predmetno stakalce), a brojčano je u ovom postupku je bio manji od 6 %.

#### 7.2.5. Statistička obradba podataka

Tijekom istraživanja obavljena je statistička obradba između mrijestnih serija kao pojedinih skupina podataka i hranidbenih tretmana (7), s pomoću analize varijance (ANOVA) i post-hoc Tukey Multiple Comparasion testa. Za sve mrijestne serije (1-7) analizirani su rezultati rasta i preživljavanja, za svaki pojedini dan istraživanog razdoblja.

Kod 7. mrijestne serije također su analizirani rast i preživljavanje između kontrolnog tretmana (T) i ostalih tretmana (ST i SP) s pomoću ANOVE i post-hoc Tukey Multiple Comparasion testa. Sve statističke analize obavljene su s pomoću programskog paketa Systat 10 (SPSS Inc, Chicago, SAD)

Rast ličinki prikazan je pravcima linearne regresije, a svi su grafički prikazi rađeni u Graferu 3(2) (GS, Grapher).

## **8. REZULTATI RADA**

## 8. REZULTATI RADA

### 8.1. Rast ličinki kamenica

#### 8.1.1. Rast ličinki kamenica u funkciji pojedinih mrijestnih serija (1-6, 7T)

Procijenjena duljina ličinki prvoga dana nakon mrijesta nije uzeta za sve mrijestne serije, iako se u 5. mrijestnoj seriji njihova izmjerena vrijednost kretala između 174 i 178  $\mu\text{m}$ , sa srednjom duljinom  $175\pm 1,51$   $\mu\text{m}$ . Analiza varijance (ANOVA) provedena je za dobivene vrijednosti duljina kod 3., 5. i 7. mrijestne serije za 3. i 12. dan života ličinki.

Kod 7. mrijestne serije u analizu su uzete duljine ličinke samo kontrolnog tretmana (7T) za 3., 12. i 13. dan, kako bi se provjerila homogenost rasta u usporedbi s drugim mrijestnim serijama (1-6) te da bi se poslije rezultati mogli usporediti s drugim tretmanima (SP i ST). U analizu usporedbe duljina ličinki 7. mrijestne serije uzimale su se smo one jedinice koje su skupljene sa sita veličine oka od 220  $\mu\text{m}$ , kao i kod ostalih mrijestnih serija (1-6).

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike u variranju duljine ličinki kod 3., 5. i 7. mrijestne serije (Tablica 7). Duljina ličinki trećeg dana u 3. mrijestnoj seriji bila je statistički značajno veća od ostalih mrijestnih serija  $p < 0,05$  ( $F=10,29$ ). Iz analize za usporedbu duljine ličinki za spomenute dane izuzete su mrijestne serije s jednom podserijom (1., 2. i 4.).

Pri usporedbi srednjih vrijednosti duljina ličinki trećeg dana svih mrijestnih serija veličinom od 200 i 211  $\mu\text{m}$  izdvajaju se prve dvije mrijestne serije, dok se kod ostalih mrijestnih serija duljina kretala unutar vrijednosti 179 i 199  $\mu\text{m}$ , sa srednjom vrijednošću  $189\pm 6,70$   $\mu\text{m}$ . Posebna analiza duljina ličinki koje su završile ličinački život 12. dan bila je statistički značajno veća kod 3. mrijestne serije u usporedbi sa 7. serijom,  $p < 0,05$  ( $F=10,29$ ), dok je nije bilo između 5. i 7. mrijestne serije. Vrijednosti duljina ličinki 12. dan kretale su se u rasponu između 278 i 322  $\mu\text{m}$ , a srednja je duljina bila  $297\pm 16,50$   $\mu\text{m}$ .

Tablica 7. Analiza varijance provedena za mrijestne serije 3., 5. i 7. za 3. i 12. dan

Izvor varijacija	SS	df	MS	F
3. DAN				
Između uzoraka	409,556	2	204,778	
Unutar uzorka	10	6	1,667	122,8667(*)
Ukupno	419,556		206,445	
12. DAN				
Između uzoraka	1 866,889	2	933,444	
Unutar uzorka	399,333	6	66,556	14,025(*)
Ukupno	2 266,222		1 000	

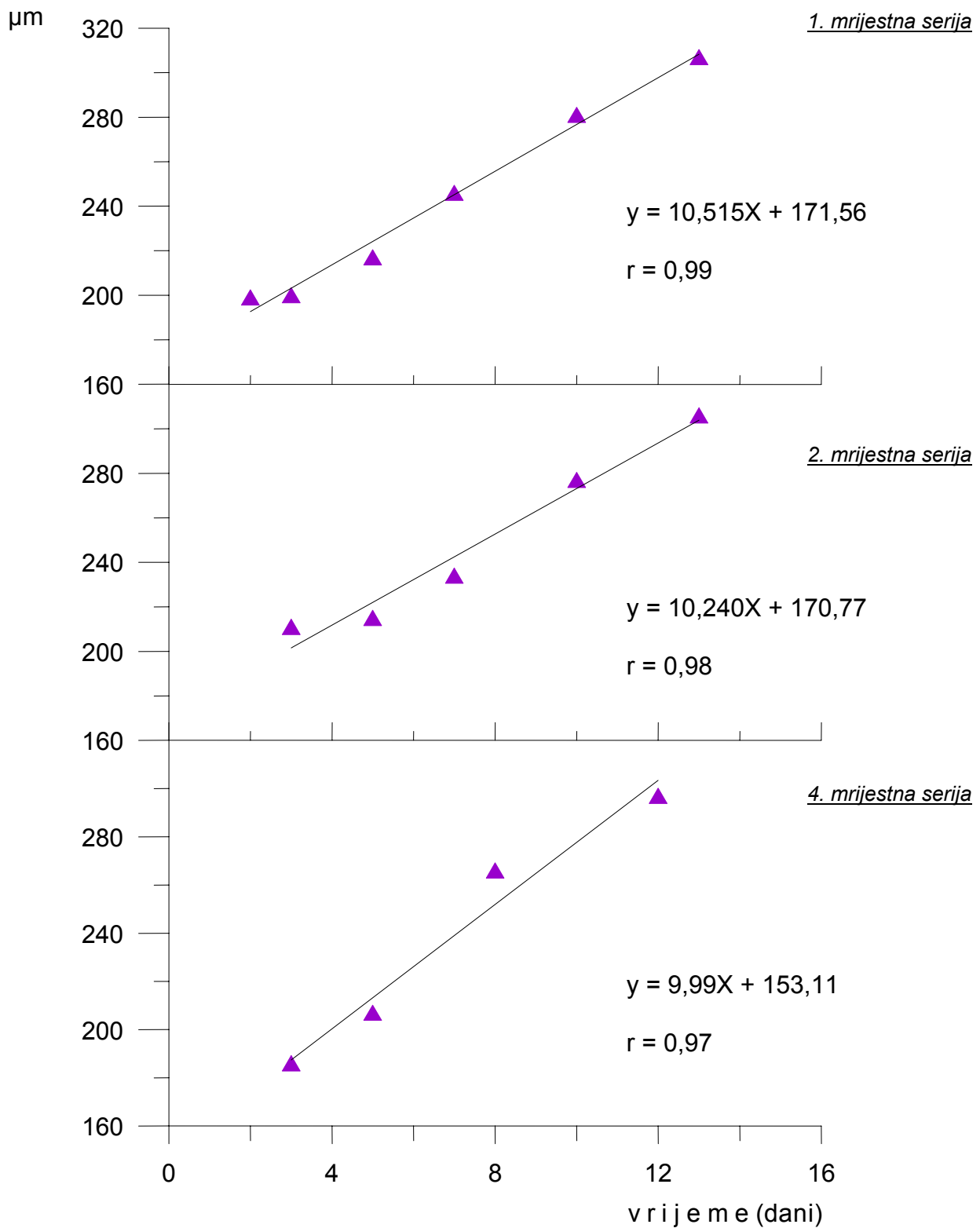
\*( $p < 0,05$ )

SS – suma kvadrata; df – stupnjevi slobode; MS – srednji kvadrat; F – omjer varijance između grupa i varijance unutar grupa

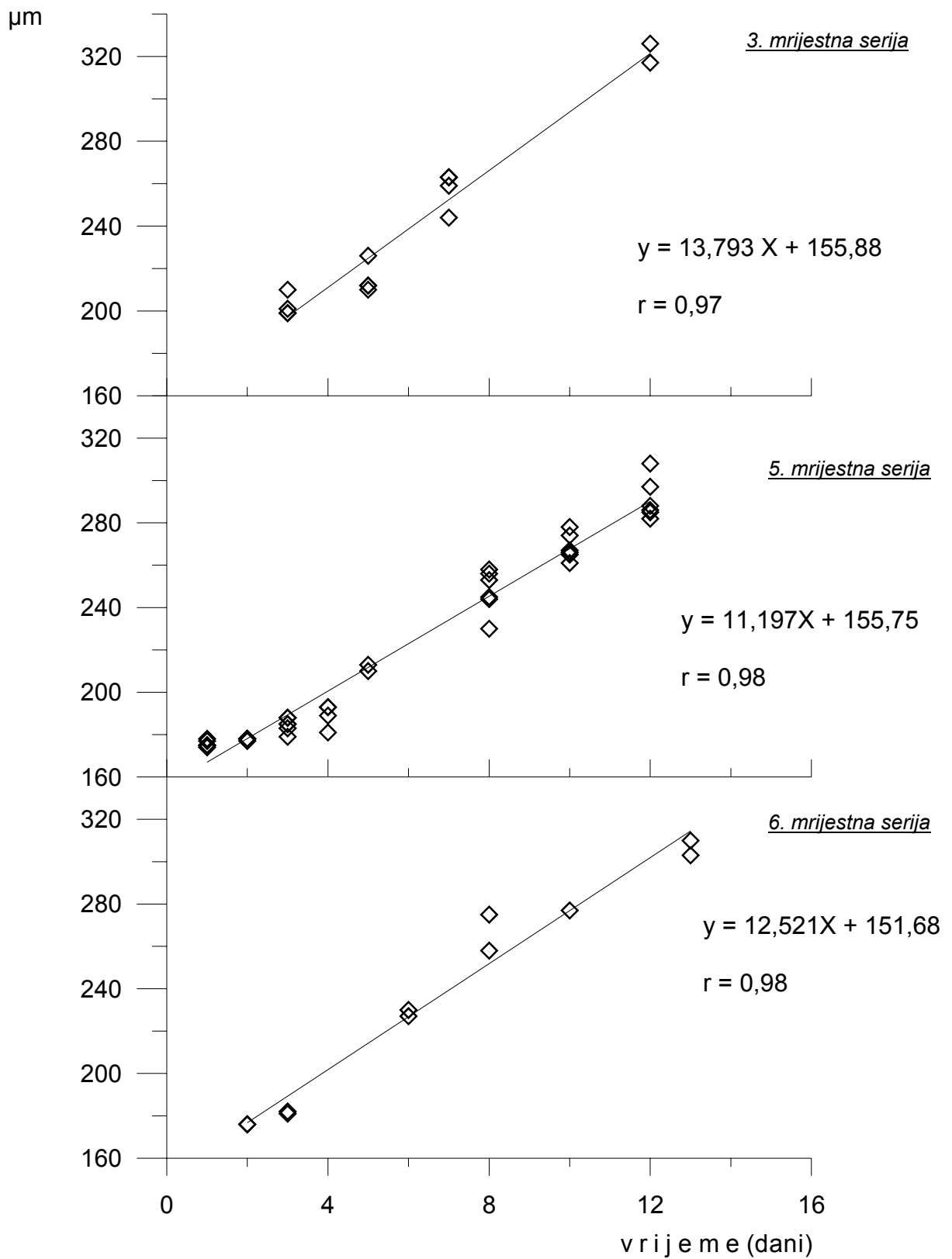
Usporedbom duljina ličinki 6. i 7. mrijestne serije koje su završile ličinački život 13. dana također je utvrđena statički značajna razlika ( $t=3,21$ ;  $p < 0,05$ ). Ako se uzmu u obzir mrijestne serije s jednom podserijom, srednja vrijednost duljine ličinki zadnjeg dana života u planktonu je bila  $306 \pm 0,7 \mu\text{m}$ .

Rast ličinki koje su hranjene istim mješavinama jednostaničnih alga grafički je prikazan linearnom regresijom, a koeficijenti korelacije ( $r$ ) upućivali su na visoku pozitivnu povezanost. Za mrijestne serije bez podserija rast je ličinki prikazan na Slici 27, a za mrijestne serije s podserijama na Slici 28. Izvorni rezultati duljina ličinki kamenice po pojedinim danima dani su u Prilogu A1.





Slika 27. Rast ličinki u funkciji vremena za mrijestne serije 1., 2. i 4., koje nisu imale podserije



Slika 28. Rast ličinki kamenica u funkciji vremena za mrijestne serije 3., 5. i 6., koje su imale podserije

### 8.1.2. Rast ličinki kamenica u funkciji hranidbenih tretmana 7. mrijestne serije

Analiza varijance provedena je za duljine praćenih hranidbenih tretmana (SP, T i ST), i to za 3. i 13. dan života ličinki. Vrijednosti duljina ličinki 7. mrijestne seije 3. dana nisu se statistički značajno razlikovale s obzirom na primjenu hranidbenih tretmana (SP, T i ST) (Tablica 8). Duljine ličinki 13. dana statistički su se značajno razlikovale, uz napomenu da su te razlike kod tretmana ST i T bile znatno izraženije ( $F=10,29$ ;  $p=0,008$ ) u usporedbi s hranidbenim tretmanima SP i T ( $F=10,29$ ;  $p=0,034$ ), dok ih između tretmana SP i ST nije bilo (Tablica 8).

Srednja je duljina ličinki hranidbenog tretmana (T) za 13. dan iznosila:  $T=296\pm 2,64 \mu\text{m}$ ,  $SP=286\pm 3,05 \mu\text{m}$ , a  $ST=282\pm 5,03 \mu\text{m}$ .

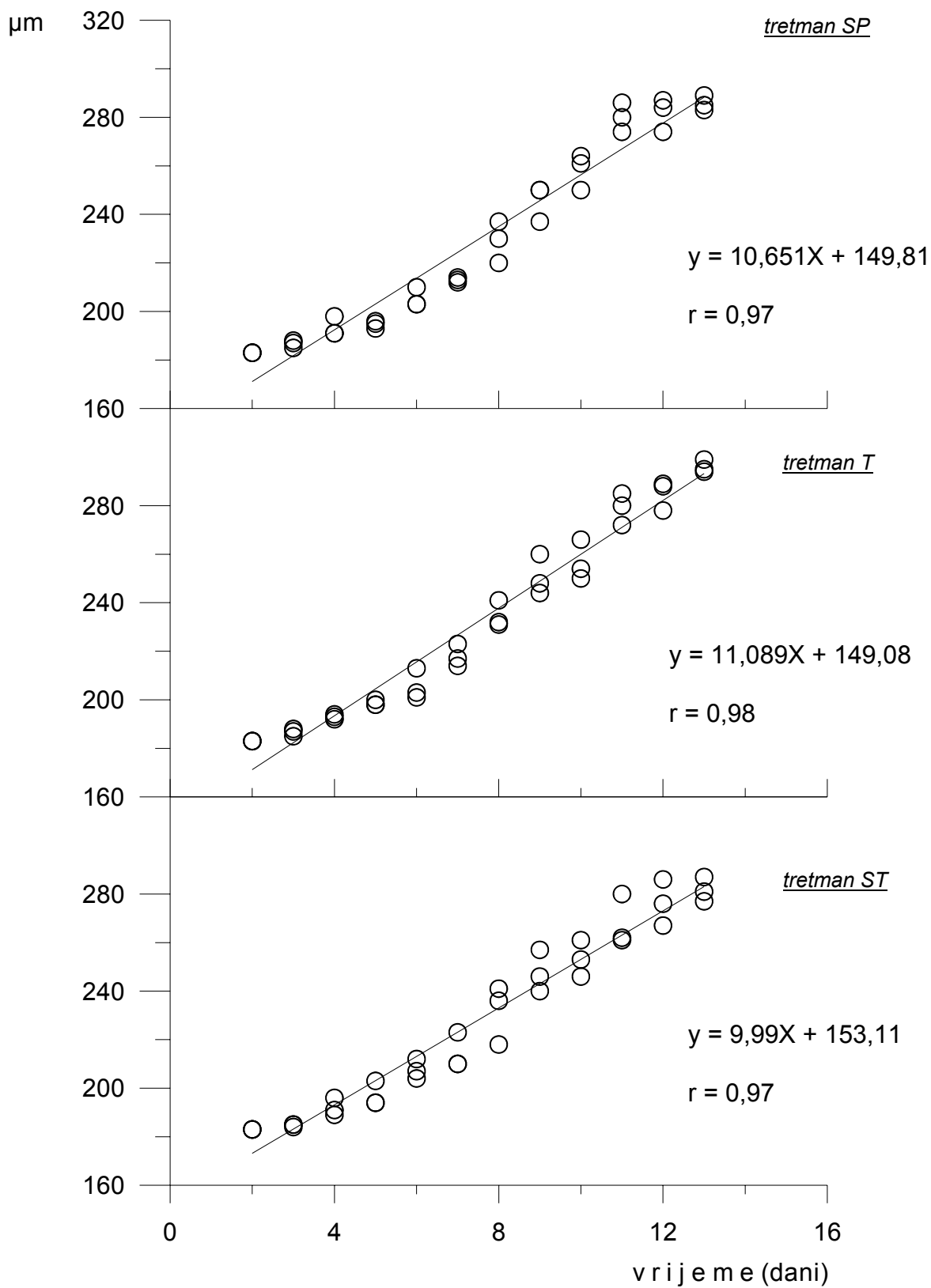
Tablica 8. Analiza varijance provedena za hranidbene tretmane (SP, T, ST), za 3. i 12. dan

Izvor varijacija	SS	df	MS	F
3. DAN				
Između uzoraka	8	2	4	
Unutar uzorka	10	6	1,667	2,4
Ukupno	18		5,667	
13. DAN				
Između uzoraka	328,222	2	164,111	
Unutar uzorka	83,333	6	13,889	11,816(*)
Ukupno	411,555		178	

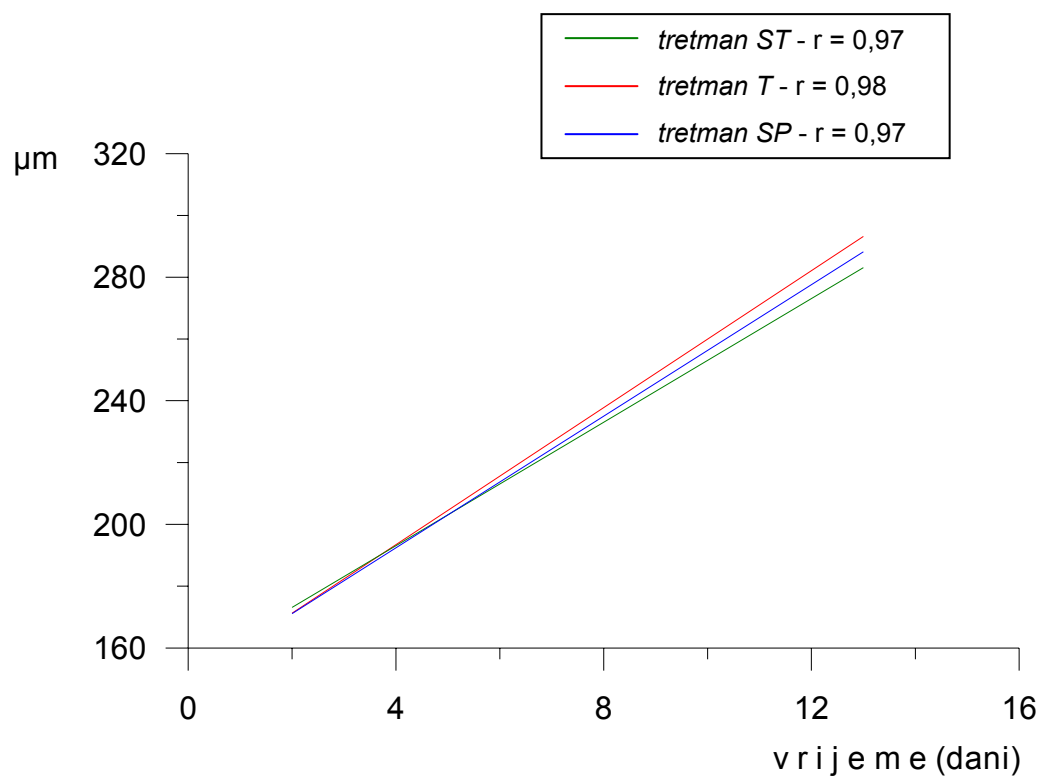
\*( $p < 0,05$ )

SS – suma kvadrata; df – stupnjevi slobode; MS – srednji kvadrat; F – omjer varijance između grupa i varijance unutar grupa

Rasta ličinki u funkciji pojedinoga tretmana grafički je prikazan linearnom regresijom na Slici 29. Linearne regresije pojedinih tretmana prikazane su zajedno na Slici 30. Izvorni rezultati duljina ličinki kamenice po pojedinim danima za svaki hranidbeni tretman izneseni su u Prilogu A2.



Slika 29. Rast ličinki pojedinih tretmana u funkciji vremena (SP, T, ST)



Slika 30. Pravci regresije za pojedine hranidbene tretmane (7. mrijestne serije)

## 8.2. Preživljavanje ličinki kamenica

### 8.2.1. Preživljavanje ličinki kamenica u funkciji pojedinih mrijestnih serija (1.- 6.; 7.T)

Analiza varijance (ANOVA) je provedena za preživjele ličinke 3., 5. i 7. mrijestne serije. Kod 7. mrijestne serije u analizu su uzete preživjele ličinke samo kontrolnog tretmana (7.T) kako bi se i prigodom preživljavanja provjerila homogenost rasta u usporedbi s drugim mrijestnim serijama (1.-6.) te kako bi se mogla izvršiti usporedba s drugim tretmanima (SP i ST).

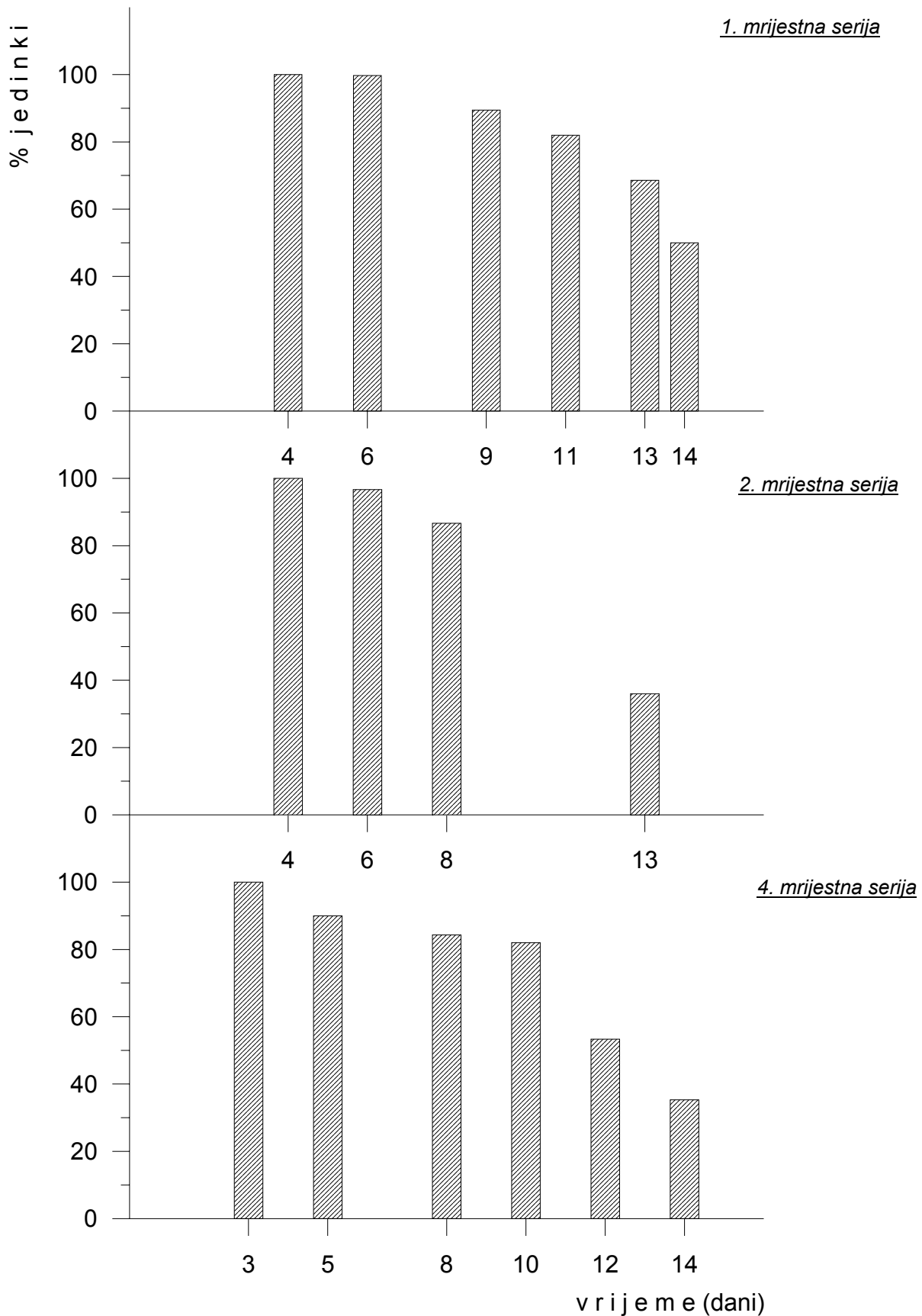
Analizom varijance za praćene mrijesne serije nisu utvrđene statistički značajne razlike u variranju preživjelih ličinki ( $F=10,29$ ;  $p=0,094$ ), (Tablica 9). Postotak preživljavanja ličinki po mrijestnim serijama kretao se je u rasponu od 55 do 27%. Najveći postotak preživjelih ličinki zabilježen je u prvoj i sedmoj mrijestnoj seriji (7.T), (1.= 50%, a 7.T= 55%).

Grafički prikaz postotka preživljavanja jedinki tijekom ličinačkog razvoja u mrijestnim serijama bez podserija dan je na Slici 31, a mrijestnih serija s podserijama na Slici 32. Izvorni rezultati preživljavanja ličinki po danima za pojedine mrijestne serije prikazani su u Prilogu B1.

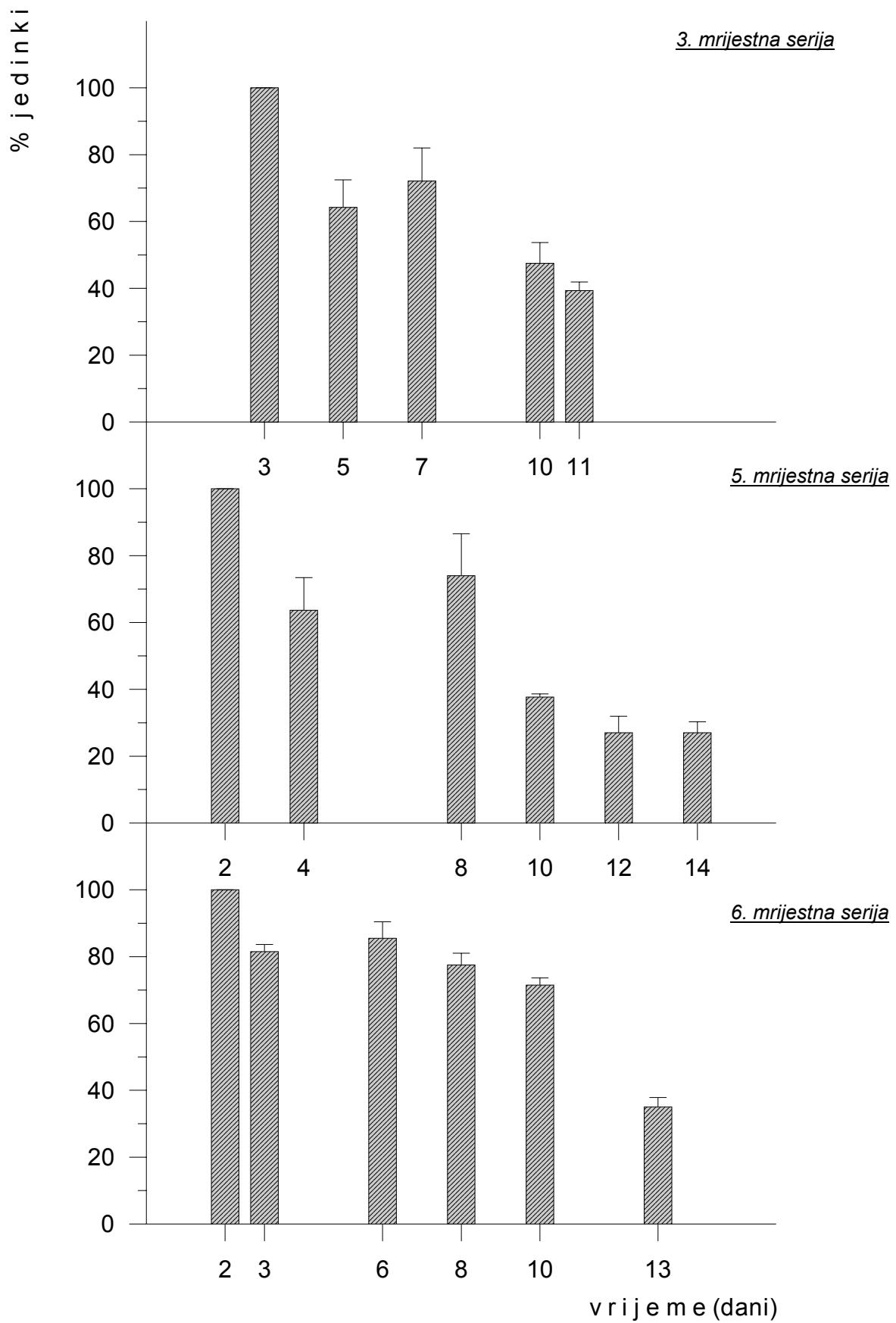
Tablica 9. Analiza varijance provedene za broj preživjelih ličinki u 3., 5. i 7. mrijestnoj seriji

Izvor varijacija	SS	df	MS	F
preživljavanje				
Između uzoraka	0,305	2	0,153	
Unutar uzorka	0,254	6	0,042	3,607
Ukupno	0,559		0,195	

SS – suma kvadrata; df – stupnjevi slobode; MS – srednji kvadrat; F – omjer varijance između grupa i varijance unutar grupa



Slika 31. Postotak preživljavanja ličinki kamenica u funkciji vremena za mrijestne serije 1., 2. i 4., koje nisu imale podserije



Slika 32. Postotak preživljavanja ličinki kamenica u funkciji vremena, za mrijestne serije 3., 5. i 6., koje su imale podserije



## 8.2.2. Preživljavanje ličinki kamenica u funkciji hranidbenih tretmana (7. mrijestna serija)

Analizom varijance unutar hranidbenih tretmana 7. mrijestne serije nisu utvrđene statistički značajne razlike u variranju preživjelih ličinki, koje su se zadržale na situ veličine oka 220  $\mu\text{m}$  (Tablica 10). No, u analizu su uzete posebno ličinke koje su prošle kroz sito 220  $\mu\text{m}$ . Ličinke koje su prošle kroz sito veličine oka 220  $\mu\text{m}$  bile su statistički značajno različite unutar tretmana ( $F=11,58$ ;  $p < 0,05$ ) i između hranidbenih tretmana ST i T ( $p=0,002$ ), dok kod hranidbenih tretmana SP i T razlika nije bila izražena (Tablica 10).

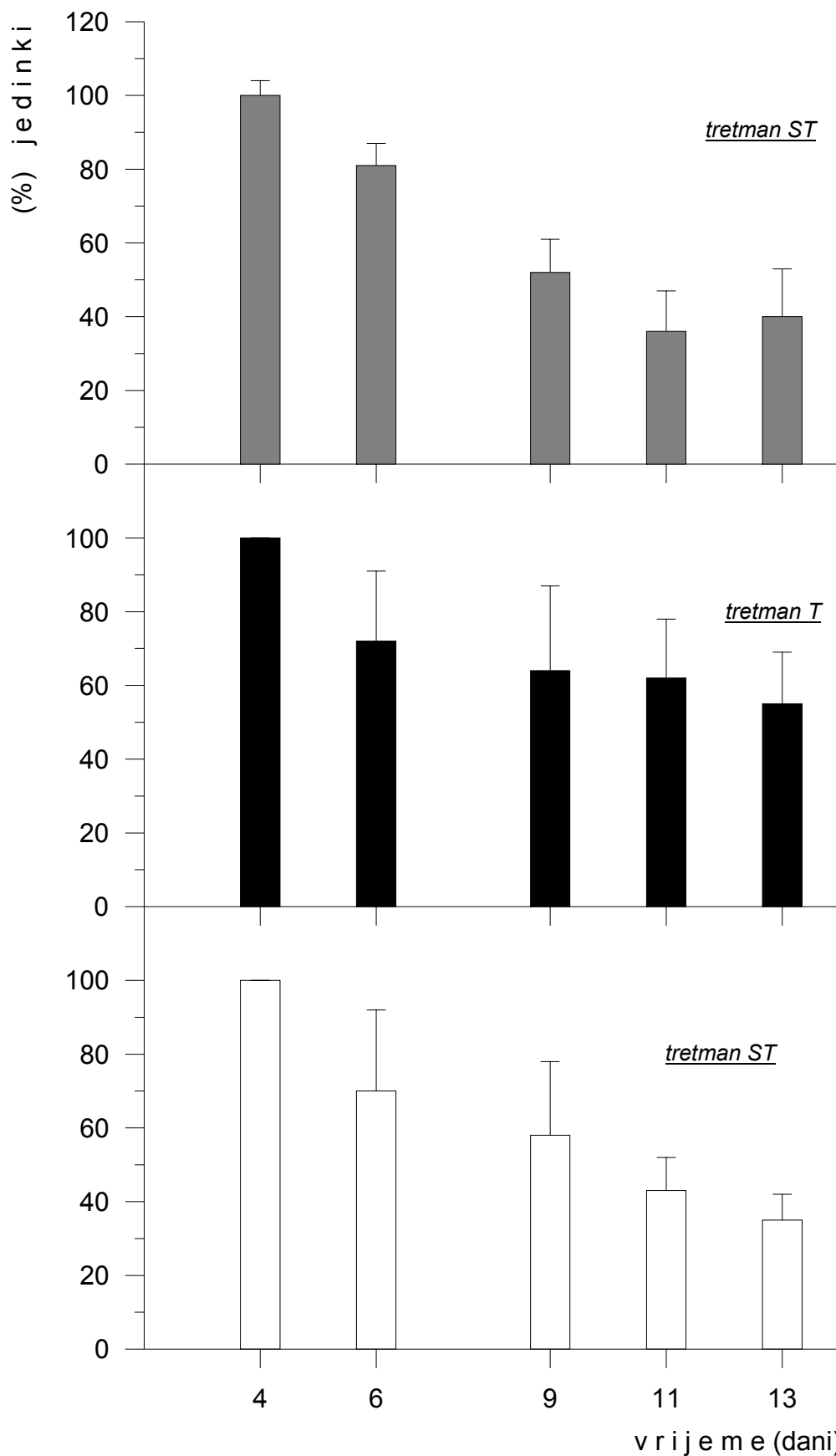
Grafički prikazi preživjelih ličinki u pojedinom tretmanu prikazani su na Slici 33, njihova usporedba na Slici 34, a izvorni rezultati preživljavanja ličinki po danima za sve tretmane prikazani su u Prilogu B2.

Tablica 10. Analiza varijance provedena za preživljavanje unutar hranidbenih tretmana (SP, T, ST).

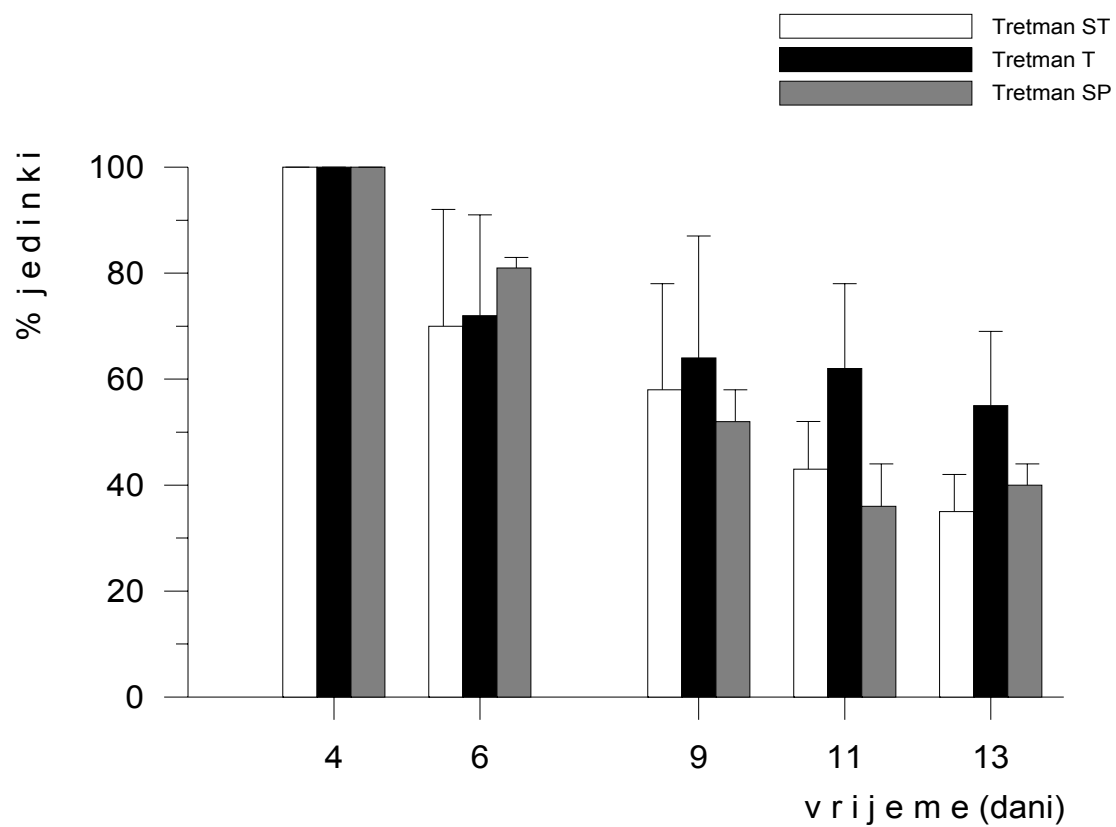
Izvor varijacija	SS	df	MS	F
preživljavanje				
Između uzoraka	3,213	2	1,606	2,96
Unutar uzorka	2,709	5	5,418	
Ukupno	5,922		7,024	
> 220 $\mu\text{m}$				
Između uzoraka	2,227	2	1,113	31,319(*)
Unutar uzorka	0,178	5	0,036	
Ukupno	2,405		1,149	
<220 $\mu\text{m}$				
Između uzoraka	0,259	2	0,129	0,997
Unutar uzorka	0,648	5	0,130	
Ukupno	0,907		0,259	

\*( $p < 0,05$ )

SS – suma kvadrata; df – stupnjevi slobode; MS – srednji kvadrat; F – omjer varijance između grupa i varijance unutar grupa



Slika 33. Postotak preživljavanja ličinki kamenica u pojedinim tretmanima (SP, T, ST) 7. mrijestne serije u funkciji vremena



Slika 34. Usporedba preživljavanja ličinki kamenica 7. mrijestne serije s tretmanima (SP, T, ST) u funkciji vremena

## **9. RASPRAVA**

## 9. RASPRAVA

Mrijest europske kamenice *Ostrea edulis*, poznatog komercijalnog školjkaša, uvijek je bilo popraćen posebnim interesom. Još od samih početaka uspješnog mrijesta školjkaša, najprije u prirodnoj sredini (Moore 1898; Wells 1920; 1927), u bazenima izvan laboratorija (Cole, 1937, 1939. i 1975), u laboratoriju (Hori Kusakabe, 1927; Bruce, 1940; Loosanoff i Davis, 1963), a zatim u zatvorenim sustavima (Cook, 1975), uvijek se je posebno nametala potreba za praćenjem razvoja ličinki školjkaša. Tijek razvoja ličinačkih stadija od mrijesta, ispuštanja ličinki do spuštanja na čvrstu podlogu i cementiranje, najosjetljiviji je period u životnom ciklusu europske kamenice.

Posebno važna dva čimbenika u procesu razvoja ličinki jesu rast i preživljavanje, što će biti uvjetovano njihovom otpornošću na postojeće uvjete u tom, najosjetljivijem životnom razdoblju.

Tijekom obradbe rezultata u analizu su uzeti podaci praćenja rasta i preživljavanja ličinki kamenice, pokusa, postavljenog u laboratoriju La Tremblade za sezonu u godini 2002. U zajedničku obradbu svih mrijestnih serija od 1. do 6. uključen je i kontrolni hranidbeni tretman 7. mrijestne serije (7.T). Budući da je prehrana ličinki u 7.T tretmanu 7. mrijestne serije bila ista kao i u mrijestnim serijama 1. do 6. željelo se je provjeriti može li se taj tretman smatrati kontrolnim u usporedbi s preostalim dvama tretmanima. Jedina razlika između kontrolnog tretmana (7.T) 7. mrijestne serije i ostalih mrijestnih serija (1.-6.) jest zamjena jednostanične alge *Chaetoceros calcitrans* oblik *pumilum* («Extubo») vrstom *Chaetoceros calcitrans*. Spomenutu zamjenu možemo smatrati opravdanom, jer su Liang i Millican (1986) ustanovili da, u usporedbi s drugim jednostaničnim algama, vrsta *Chaetoceros calcitrans* daje najbolje rezultate kao vrsta za prehranu ličinki školjkaša u monokulturi. U promatranom pokusu zamjena jednostanične alge u 7. mrijestnoj seriji nije pokazala bitna odstupanja u odnosu prema ostalim mrijestnim serijama (1.-6.).

Praćenjem promjena vrijednosti duljina ličinki, odnosno njihova rasta tijekom pokusa, kod svih je mrijestnih serija (1.-6.) dobivena vrlo visoka pozitivna korelacija s vrijednostima; 1.r = 0,99; 2.r = 0,98; 3.r = 0,97; 4.r = 0,98; 5.r = 0,98; 6.r = 0,98 (Slika 28. i 29.).

Posebna je pažnja posvećena na duljini ličinki 3. dan nakon mrijesta i neposredno uoči cementiranja jedinki.

Tijekom pokusa duljina ličinki prvog dana nakon mrijesta uzeta je samo u 5. mrijestnoj seriji, a kretala se je između 174 i 178  $\mu\text{m}$ , sa srednjom duljinom  $175 \pm 1,51$   $\mu\text{m}$ , što se uklapa u zabilježene vrijednosti Marteila (1976), i to između 160 i 200  $\mu\text{m}$ . Za međusobnu usporedbu početnih duljina ličinki u pokusu kod 3., 5. i 7. mrijestne serije posebno je razmatran 3. dan (Tablica 7). Duljina ličinki 3. dana od mrijesta potvrdila je statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između mrijestnih serija. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) ustanovljena je i za veličinu ličinki 12. dan, a zabilježena je za 3. mrijestnu seriju, dok je na 5%-tnoj razini signifikantnosti nije bilo između 5. i 7. mrijestne serije. Međusobna usporedba duljine ličinki dviju mrijestnih serija (6. i 7.) koje su imale prihvat 13. dan također je pokazala statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ). Iako je riječ o ličinkama koje su imale iste hranidbene i zootehničke uvjete, dobivene razlike između pojedinih mrijestnih serija mogle bi se protumačiti datumom mrijesta, odnosno njegovim pomakom. Dakle, ličinke su tijekom pokusa bile spremne za prihvat 12., odnosno 13. dan, ovisno o mrijestnim serijama, i to, 1., 2., 6., 7. trinaesti dan, a serije 3., 4., 5. dvanaesti dan.

Duljina ličinki na dan zapaženog početka prihvata za čvrstu podlogu (12., odnosno 13. dan) kretale su se u rasponu između 278 i 322  $\mu\text{m}$ , a srednja je duljina bila  $297 \pm 16,50$   $\mu\text{m}$ , kod ličinki zadržanih na situ veličine oka od 220  $\mu\text{m}$ . Prema Marteilu (1976), za isti stadij, tj. dan prihvata, vrijednosti duljina ličinki *Ostrea edulis* kretale su se između 260 i 290  $\mu\text{m}$ . Razlike u duljini ličinki mogu se pripisati različitim uzgojnim uvjetima, ponajprije dostupnosti hrane i održavanoj temperaturi tijekom pokusa. Prema Walneu (1964), najveći je duljinski raspon jedinki od početka razvoja prihvata, između 180 i 300  $\mu\text{m}$  za vrijeme od 10 dana, što je mnogo bliže dobivenim vrijednostima pokusa.

Dobiveni se rezultati također mogu usporediti s rezultatima Lainga (1994) koji je ustanovio da se vrijednosti duljina ličinki kreću u rasponu od 262 do 325  $\mu\text{m}$ , nakon 8. do 12. dana u pokusu. Kao što je već spomenuto, kombinacija jednostaničnih vrsta alga ima važnu ulogu za rast i preživljavanje ličinki, a napose je bitna tijekom metamorfoze (Beiras i Perez Camacho, 1994), što se može smatrati razlogom nekih odstupanja kod prije spomenutih autora.

Zbog važnosti prehrane, prije odabira povoljne mješavine monokultura alga, u provedenim istraživanjima u 7. mrijestnoj seriji primjenjeni su hranidbeni tretmani. Ličinke 7. mrijestne serije također su dobro napredovale bez obzira na razlike u sastavu hrane. Tijek rasta jedinki kod svih triju hranidbenih tretmana 7 (ST, T, SP)

očitovao je dobru, pozitivnu korelaciju. Pojedinačno, visok koeficijent korelacije unutar svakoga pojedinog tretmana iznosio je:  $SP_r = 0,97$ ;  $Tr = 0,98$  i  $STr = 0,97$  (Slika 29. i 30.). Usporedba duljina ličinki unutar 7. mrijestne serije nije pokazala statistički značajnu razliku na početku, 3. dana, što nam potvrđuje činjenicu da su ličinke iz iste mrijestne serije i da su jednako i uporedo startale u razvoju. Osim toga, ovaj rezultat može biti potvrda ranijeg tumačenja dobivene statističke razlike 3. dana između različitih mrijestnih serija, kao vremenskog odmaka svake pojedine. No, rezultat dobiven za 13. dan unutar 7. mrijestne serije između praćenih hranidbenih tretmana bio je izravno povezan s hranidbenim mješavinama monokultura za prehranu ličinki. Na dan prihvata, 13. dan, dobivena je statistički značajna razlika između ispitivanih tretmana ( $p < 0,05$ ). Znatno lošiji utjecaj na prirast ličinki imao je hranidbeni tretman u kojem je izuzeta jednostanična alga *Tetraselmis suecica* (7.ST). Naime, statistički značajna razlika u veličini ličinki za 13. dan bila je između kontrolnog tretmana (7.T) i tretmana koji u dnevnoj hranidbenoj mješavini nije uključivao jednostaničnu algu *Pavlovu lutheri* ( $p = 0,034$ ), dok je razlika bila izraženija u usporedbi s tretmanom koji nije uključio jednostaničnu algu *Tetraselmis suecica* ( $p = 0,008$ ). Kod hranidbenog tretmana bez vrste *Pavlove lutheri* (7.SP) vrijednosti duljina ličinki uvijek su se nalazile između kontrolnog tretmana (7.T) i tretmana bez vrste *Tetraselmis suecica* (7.ST).

Liang i Millican (1986), glede prehrane ličinki *Ostrea edulis*, postavili su skalu po vrijednostima pojedinih jednostaničnih alga: *Chaetoceros calcitrans* > *Chroomos salina* > *Isochrysis galbana* > *Skeletonema costatum* > *Tetraselmis suecica*. Prema navedenom popisu, jednostanična alga *Tetraselmis suecica* nije se pokazala kao vrsta važne hranidbene vrijednosti, a njezin izostanak u prehrani nije imao važnu ulogu.

No, Walne (1970) i Helm (1977) ustanovili su da je *Tetraselmis suecica* vrlo visoke hranidbene vrijednosti i ima veliku ulogu u razvoju ličinke kamenice *Ostrea edulis*. Nadalje, Montaini i sur. (1995) potvrdili su da se efikasnost uporabe *T. suecica* može pripisati dobrom preživljavanju stanica i biokemijskom sastavu. Važnost je aminokiselina koje se mogu iskoristiti iz *T. suecica* bitna, napose za razvoj jedinki u ranim razvojnim stadijima (Walne, 1970; Hollander i Spencer, 1973; Webb i Chu, 1981).

Vrsta *Tetraselmis suecica* u kombinaciji s *Isochrysis galbana* pokazala je dobre rezultate u prehrani ličinki *Ostrea edulis*, dok je za kamenicu *Crassostrea*

*gigas* ustanovljena dobra kombinacija s algama *Isochrysis galbana* i *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (Helm i Millican, 1977; Utting i Spencer, 1991). S druge strane, Skejermo i sur. (2000) u svojoj su studiji o utjecaju 6 vrsta alga na prehranu vrste *Pecten maximus* ustanovili da vrste *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros mülleri* i *Pavlova lutheri* sprječavaju razvoj mikroorganizama tijekom uzgoja. Tako je koncentracija *Vibrio pectenecida* bila i do dvaput veća u bazenima kada alge nisu bile prisutne. Također su zabilježili i do deset puta manju koncentraciju *Vibrio pectenecida* u vremenu od 24 do 72 sata nakon dodatka alge *Tetraselmis* sp. Povezanost povećanja stope bakterija s padom koncentracije *Tetraselmis* sp. opisao je i Salvesen i sur. (2000). Znači da jednostanična alga *Tetraselmis* sp. u uzgoju ličinki školjkaša pokazuje važniju ulogu svojim antibiotskim utjecajem na razvoj bakterija, nego što je njezina hranidbena vrijednost.

Nadalje, Laing i Millican (1986) navode da, iako su vrste *Tetraselmis suecica* i *Skeletonema costatum* niske hranidbene vrijednosti, ipak su pogodne za održavanje u monokulturi i u mješavini s drugim algama, jer pridonose jednakom prirastu ličinki, isto kao vrste koje imaju veću hranidbenu vrijednost, a koje se teže održavaju u kulturama, kao npr. vrsta *Chaetoceros calcitrans*.

Naime, uloga alge *Tetraselmis suecica* kao monovrste u prehrani ličinki kamenice *Crassostrea gigas* utječe na smanjenje prirasta, ali i na preživljenje (> 60 %) za razliku od njezine uporabe u kombinaciji s još jednom jednostaničnom, a još bolje ako je u mješavini triju alga *Pavlova lutheri*, *Isochrysis affinis galbana* i *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (Robert i sur., 2001).

U svakom slučaju, vrsta *Tetraselmis suecica* ima malu do umjerenu važnost u prehrani vrsta *Ostrea edulis*, *Saccostrea commercialis* i *Venerupis pullasatra* (Laing i Millican, 1986; Nell i O'Connor, 1991; O'Connor i sur., 1992; Albentosa i sur., 1993), ali je dobra hrana za *O. edulis*, *Carossestrea gigas*, *Ruditapes decussatus* i *Mytilus* sp., napose u kombinaciji s drugim jednostaničnim algama (Walme, 1970; Helm, 1977, Helm i Millican, 1977; Langdon i Waldock, 1981; Utting i Spencer, 1991; Albentosa i sur., 1996). Oba se navoda mogu opravdati činjenicom različitih potreba za pojedine hranidbene komponente s obzirom na stupanj razvoja (ličinka ili postličinka). Pritom, trebamo naglasiti i činjenicu različitih sojeva upotrebljivanih jednostaničnih alga. Iako postoje brojna istraživanja glede djelovanja hranidbene vrijednosti vrste *Tetraselmis* spp. u prehrani školjkaša, ipak je uporaba njezine



ograničavajuće i opravdane količine ispitana i dana samo za vrstu *S. commercialis* (Nell i O'Connor, 1991).

Bez obzira na učestalost uporabe pojedinih vrsta jednostaničnih alga u prehrani školjkaša u komercijalnim uzgajalištima, Chretiennot-Dinet i sur. (1986) jednostanične alge prema hranibenoj vrijednosti klasificiraju kao: vrlo dobra, dobra i osrednja (Tablica 4).

Iako je hranidbena vrijenost jedne vrste jednostanične alge za prehranu školjkaša važna, ipak će ograničavajući čimbenik u odabiru pojedine alge biti uvjetovan veličinom stanice i prilagodljivošću njezina održavanja u monokulturi. Da bi ličinka školjkaša mogla iskoristiti jednostaničnu algu, veličina alge u promjeru ne bi smjela iznositi više od 10  $\mu\text{m}$  (Thorson, 1950; Fritz i sur., 1984).

Veličine stanica alga iskorištenih za prehranu ličinki *Ostrea edulis* u našem pokusu su u skladu s Thorsonovim i Fritzovim navodima, premda za vrstu *Chaetoceros calcitrans* nailazimo podatak da se njezina veličina kreće od 5 do 16  $\mu\text{m}$ , što je još uvijek dostupno, dok veličina jednostanične alge *Tetraselmis suecica* ima granično opravdanu veličinu, od 10 do 20  $\mu\text{m}$  (Chretiennot-Dinet i sur., 1986).

Loosanoff i Davis (1963) utvrdili su različite stupnjeve otpornosti i stabilnosti pojedinih vrsta ličinki s obzirom na hranu. Kamenica *Crassostrea* posebno je zahtjevna i tek se manjim brojem alga može koristiti u prehrani. *Mytilus edulis* i *Merceranaria mercenaria* pokazuju veću toleranciju u prihvaćanju različitih vrsta jednostaničnih alga, čime ostvaruju mogućnost da njihov ličinački razvoj bude uspješniji. Ličinke kamenice *Ostrea edulis* pripadaju takozvanoj međugrupi, tolerantnije su od vrste *Crassostrea*, ali ipak zahtjenije od školjkaša *Mytilus edulis* i *Merceranaria mercenaria*. Za razliku od prvih dana ličinačkog života, kada je kamenica naglašene osjetljivosti u prihvaćanju raznovrsne hrane, u daljnjem rastu ona povećava tolerantnost spram različitih vrsta alga u prehrani. (Babinachak i Ukeles, 1979).

U vrednovanju pojedinih jednostaničnih alga u prehrani, pojedine hipoteze pokazuju povoljniji učinak. Naime, Cole (1937) i Walne (1963) ustanovili su da je napredovanje u razvoju veliger ličinke *Ostrea edulis* uvjetovano prisutnošću, odnosno odsutnošću i debljinom staničnih stijenki jednostaničnih alga. Loosanoff i Davis (1963) odbacili su ovo stajalište, a ono nije potvrđeno ni tijekom ovog istraživanja. Naime, izostanak alge *Tetraselmis suecica* u hranidbenom tretmanu 7.ST pokazalo

se je kao negativno, iako je riječ o vrsti koja ima deblju i slojevitiju stijenku, za razliku od vrsta *Isochrysis galbana* i *Pavlova lutheri* (Chretiennot-Dinet i sur., 1986).

Općenito, upotreba hranidbenog tretmana (7.T), s mješavinom monokultura alga, dala je bolje rezultate pokusa, izraženije pri dužinskom prirastu, nego pri preživljavanju. Miješavine monokultura utječu ne samo na brzinu rasta nego i na kvalitetu organizma (Helm, 1969; Calabrese i Davis, 1970; Walddock i Nascimento, 1979). Kvaliteta ličinki odražava se na njihovo premještanje i prilagodbu na prirodne uzgojne uvjete (Laing i Millican, 1986). Helm je (1977) potvrdio da je prehrana dvjema vrstama alga (*Tetrasemis* i *Isochrysis*) za ličinke kamenice *Ostrea edulis* mnogo kvalitetnija (40,2%) od tretmana svakom pojedinačnom monokulturom (*Tetrasemis* - 21,9% i *Isochrysis* - 18,3%).

Preživljavanje ličinki, kao drugi aspekt koji je praćen tijekom pokusa posebno je izdvojio 1. mrijestnu seriju s ukupno 50% preživjelih, dok je kod svih ostalih preživljavanje bilo znatno lošije, a kretalo se je od 39% kod 3. mrijesne serije do 27% kod 5. mrijesne serije (Slike 31. i 32.). Razlike u preživljavanju ličinki između pojedinih mrijestnih serija nisu dobivene ako uzmemo u obzir jedinice koje su bile spremne za prelazak na bentosni način života. Naravno, 1. mrijestnu seriju, koja se je posebno izdvojila, ne možemo smatrati reprezentativnom jer nije uključivala podserije.

Kod hranidbenih tretmana 7. mrijestne serije također nije zabilježena statistički značajna razlika u broju preživjelih jedinki, a najveći postotak preživjelih imao je kontrolni hranidbeni tretman (7.T), s ukupno 55 % jedinki (Slika 33 i 34). Iako nije bila izražena razlika u preživljavanju među hranidbenim tretmanima, ipak je kao i kod rasta, tretman bez *Tetraselmis suecica* (7.ST) imao najmanji broj jedinki za prihvata, 35 %, dok je tretman bez vrste *Pavlova lutheri* (7.SP) bio između kontrolnog (7.T) i 7.ST sa 40 % preživjelih ličinki. Ovdje je možda zamjena jednostanične alge *Chaetoceros calcitrans* oblik *pumilum* («Extubo») vrstom *Chaetoceros calcitrans* imala veći utjecaj nego kod rasta ličinki, jer su tretmani (7.ST i 7.SP) s izostavljenim jednostaničnim algama imali dobar postotak preživljenja u usporedbi s ostalim mrijestnim serijama (1-6).

No, unutar 7. mrijestne serije dobivena je statistički značajna razlika između pojedinih tretmana ako u razmatranje uzmemo postotak preživjelih jedinki koje su prošle kroz sito veličine oka 220 µm (SP = 27,7%; T = 26,4%; ST = 14,5%).

Statistički značajna razlika bila je zabilježena između hranidbenog tretmana 7.ST i 7.T, ( $p < 0,05$ ), a nije postojala između tretmana SP i T.

Nadalje, količinski udio jednostaničnih alga u mješavini, također je važan tijekom razvoja ličinki *Ostrea edulis*. Povećanje količine alge *Isohrysis galbana* pokazalo je dobre rezultate. Stoga Beiras i Pérez (1994) u prehrani ličinki *O. edulis* preporučuju sljedeći tretman (50, 100 i 200 stanica/ $\mu$ l za dane 0., 5. i 10.).

Danas se na tržištu nameće potreba testiranja drugih hranidbenih izvora kao što je kvasac ili mlijeko od soje. Dobre rezultate rasta i preživljavanja ličinki *Mytilus edulis* otkrili su Nie i Ji (1980) u hranidbenim istraživanjima sa sojom.

Općenito gledano, praćenjem mrijesta kamenice *Ostrea edulis* za godinu 2002. u laboratoriju La Tremblade bilo je znatno lošije u usporedbi sa sezonom mrijesta tijekom godine 2001. (usmeno Edouard Bédier). Godine 2001. ličinke su stavljene 13. dan na prihvat, a imale su duljinu oko 300  $\mu$ m. U sezoni mrijesta godine 2002. zabilježene su iste duljine ličinki, iako se je proces prelaska na čvrstu podlogu u mrijestnim serijama 1., 2., 6. i 7. zbio jedan dan ranije, 12. dan. Osim toga, postotak preživljavanja bio je mnogo viši u godini 2001. (52,9%) za razliku od 2002. godine (34%). Tijekom praćenog pokusa u godini 2002. primjećeno je smanjenje duljine ličinki s odmakom datuma mrijestnih serija, što vrijedi i za godinu 2001. Za razliku od sezone mrijesta 2002. godine, tijekom godine 2001. vremenski je pomak mrijestnih serija imao manju važnost pri rastu i duljini jedinki, a dobiven je i veći broj preživjelih ličinki.

Tijekom praćenja ličinki školjkaša kamenice *Ostrea edulis* za vrijeme sezone mrijesta u godini 2002. možemo primijetiti da pojedine vrste alga imaju važan utjecaj na rast i preživljavanje. Rezultati su pokazali da je utjecaj izraženiji kod rasta, a manje važan prigodom preživljavanja. Postavlja se, međutim, pitanje, bismo li dobili značajnije razlike i glede preživljenja da je utjecaj različitih vrsta alga kroz hranidbene tretmane primijenjen kod prve ili druge mrijestne seije.

Nadalje, razlog lošijih rezultata rasta i preživljavanja ličinki tijekom 2002. godine u odnosu prema godini na 2001. (isključujući prve tri mrijestne serije) može biti različit. Kao opravdane hipoteze mogu se navesti:

- Razlika povezana s asinkronom maturacijom mužijaka i/ili ženki ili nešto lošijom kvalitetom bilo muških bilo ženskih spolnih stanica.

- Moguće sniženje temperature morske vode u bazenima, jer nagla promjena od 2 °C može biti teško podnošljiva za ličinke kamenice *O. edulis*.

- Svakodnevno uzorkovanje koje nije bilo jedinstveno, odnosno obavljeno u jednakim uvjetima. Kao prvo, to se odnosi na način rukovanja štapićem za raspoređivanje ličinki u vodenom stupcu menzure, kao i na rezanje vrha plastičnog konusa koji se stavlja na automatsku pipetu (da bi se zbog veličine ličinki izbjeglo njihovo lijepljenje za vrh plastičnog konusa).

## **10. ZAKLJUČCI**

## 10. ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenih istraživanja rasta i preživljavanja ličinki europske kamenice, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758, za mrijestnu sezonu 2002., mogu se izvesti ovi zaključci:

- Ličinke svih mrijestnih serija (1.-7.) glede rasta, imale su vrlo visoku povezanost, tj. koeficijent korelacije bio je  $r = 0,97 - 0,99$ .

- Srednja duljina ličinki prvog dana nakon mrijesta izmjerena u 5. mrijestnoj seriji, iznosila je  $175 \pm 1,51 \mu\text{m}$  i uzeta je kao baza za početak rasta u ostalima.

- Razvoj ličinki pod pokusom, nakon mrijesta, trajao je 12, odnosno 13 dana, kada su jedinke bile duljine između 287 i 322  $\mu\text{m}$  i spremne za prihvata.

- Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između duljina ličinki praćenih mrijestnih serija (1.-6.) dobivena je za 3. i 12. dan, ali također i 13. dan kod 6. i 7. mrijestne serije.

- Kod 7. mrijestne serije, ako uzmemo u obzir da su abiotski uzgojni uvjeti za ličinke kamenice *Ostrea edulis* bili jednaki, nisu se znatno razlikovali od ostalih mrijestnih serija (1.-6.). No, unutar 7. mrijestne serije dobivena je statistički značajna razlika u duljini ličinki za 13. dan ( $p < 0,05$ ). Ona je bila znatno veća kod hranidbenog tretmana bez jednostanične alge *Tetraselmis suecica* (ST) ( $p = 0,008$ ), a manja kod tretmana bez vrste *Pavlova lutheri* (SP) ( $p = 0,034$ ) u usporedbi s kontrolnim tretmanom (T) s uobičajnim mješavinama alga.

- Postotak preživjelih ličinki kamenica kod pojedinih mrijestnih serija (1.-6.) bio je slab, izuzvši 1. mrijestnu seriju, a iznosio je: 1.= 50 %; 2.=36 %; 3.= 39 %; 4.= 35 %; 5.= 27 %; 6.= 35 %.

- Utjecaj različitih hranidbenih tretmana 7. mrijestne serije bio je znatniji na rast negoli na preživljenje ličinki, a postotak preživjelih bio je u ovisnosti o pojedinom tretmanu (SP = 40 %; T = 55 %; ST = 35 %).

- Također valja zaključiti da vrsta *T. suecica*, bez obzira na kombinaciju alga u hranidbenoj mješavini, ne bi smjela biti isključena iz prehrane kamenice *Ostrea edulis*.

- Utjecaj prehrane različitim vrstama alga na rast i preživljenje ličinki kamenice bilo bi poželjno ispitati već na početku mrijestne sezone, jer je primjećeno smanjenje, tj. opadanje u rastu jedinki s vremenskim pomakom mrijestnih serija.

- U idućim se istraživanjima preporučuje:

1. Provjeriti kakav bi utjecaj imala količinska promjena u dnevnoj raspodjeli pojedinih jednostaničnih alga, ponajprije vrste *Tetraselmis suecica*. Usto, bilo bi poželjno pratiti uspješnost cementiranja zrelih ličinki jer se mješavina jednostaničnih alga u prehrani može još bolje očitovati na njihovu kvalitetu i količinu nakon prihvata o čvrstu podlogu.

2. Da bi se zootehničke pogreške i mogući propusti tijekom uzorkovanja sveli na minimum, bilo bi poželjno napraviti radni protokol i tako osigurati jednake uvjete rada pri svakodnevnom, pojedinačnom uzorkovanju (rezanje vrha plastičnog konusa i osiguravanje pravilne raspodjele ličinki u menzuri).

3. Iako jednostanične alge uzgajane u monokulturi imaju još uvijek prednost u prehrani ličinki kamenice *Ostrea edulis*, bilo bi poželjno provesti istraživanja u smjeru uporabe alternativne hrane (sojino mlijeko, kvasac, konzervirane alge) kako bi se možda postigli isti rezultati, a smanjili visoki troškovi proizvodnje.

## **11. IZVORI**



## 11. IZVORI

**Albentosa M., Pérez-Camacho A., Labarta U. i Fernandez-Reiriz M. J., 1993.** Nutritional value of algal diets to clam *Venerupis pullastra*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 97, 261 – 269.

**Albentosa M., Pérez-Camacho A., Labarta U. i Fernandez-Reiriz M. J., 1996.** Evaluation of live microalgal diets for seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological parameters. Aquaculture 148: 11-23

**Andrews J.D., 1979.** Pelecypoda: ostreidae. Reproduction of Marine Invertebrates, A.C.Giese et J. S. Pearse, eds., Academic Press. Vol V: 293-341

**Arnaud H., Lapègue S., Magoulas A. i Boudry P., 2000.** Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe, Conservation Genetics 1: 251-262

**Babinachak J. i Ukeles R., 1979.** Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding in *Crassostrea virginica* veliger larvae. Mar. Biol., 51, 69 – 76.

**Baird R. H., 1958.** Measurement of Condition in Musels and Oysrers. J. Cons.Int. Explor.Mer., 23; 249-257.

**Basioli J., 1968.** Uzgoj školjkaša na istočnim obalama Jadrana. Pmorski zbornik6: 179-216

**Basioli J., 1981.** Uzgoj školjkaša na istočnoj obali Jadranskog mora s posebnim osvrtom na Malostonski zaljev. Zbornik radova savjetovanja “ Malostonski zaljev prirodna podloga i društveno valoriziranje” JAZU, Znanstveni savijet za zaštitu prirode. Dubrovnik, 268-281

**Bacher C., 1989.** Capacité trophique du bassin de Marennes-Oléron: couplage d'un modèle de transport particulier et d'un modèle de croissance de l'huître *Crassostrea gigas*. Aquat. Living Resour., 2: 199-214

**Bédier E., Cochenec N., Langlade A., Goyard E. i Gérard A., 2001.** Recovery of the European flat Oyster *Ostrea edulis* (L.) farming: EAS. New developments New species. New Technologies Special publication no. 29 June 2001

**Beiras R. i Pérez Camacho A., 1994.** Influence of food concentration on the physiological energetics and growth of *Ostrea edulis* larvae. Mar Bio 120: pp. 139-153

**Benović A., 1997.** The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of Croatia. The History, present condition, and future of the molluscan fisheries of north and central America and Europe. Volume 3, Europe. US Dept Commer, NOAA Tech Rep 129, 217-226

- Braley R. D., 1985.** Serotonoin-induced spawning in giant clams (Bivalvia:Tridacnidae). *Aquaculture* 47; 321-325.
- Brooks, W.K. 1880.** The developement of the American Oyster. *Stud. Biol. Lab., Johns Hopkins Univ.* IV, 1-104
- Bruce, J.R. i sur. (1940).** The rearing of oyster larvea on an algal diet. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 24, 337-374
- Calabrese A. i Davis H. C., 1970.** Tolerance and requirement of embroyn and larvae of bivalve molluscs. *Helg W Meer* 20: 553-564
- Chrétiennot-Dinet M. J., 1990.** Atlas du phytoplancon marin. Volume 1,2,3. Edition du CNRS.
- Chrétiennot-Dinet M. J., Robert R. i His E., 1986.** Utilisation des algues – fourrages en aquaculture. *Ann. Biol. – T. 25, FASC. 2:* 97 – 119
- Coe W. E., 1943.** Sexual differentiation in Mollusks I. – pelecypods. *Quart. Rev. Biol.*, 18-2: 154-164
- Cole H. A., 1937.** Experiments on the breeding of oysters (*Ostrea edulis*) in tanks, with special reference to the food of the larvae and spat. *Fish. Invest., Lond., Ser. 2,* Vol 15 (4).
- Cole H. A., 1939.** Further experiments in the breeding of oysters (*Ostrea edulis*) in tanks. *Fish. Invest., Min. Agric. Fish., Ser. 11,15,* 1-28
- Cook A.K., 1975.** Shellfish factory of the future. *NOAA Magazine,* 5 (2), 1-4.
- Cosper E., 1982.** Influence of light intensity on diel variations in rates of growth, respiration and organic release of marine diatom: comparison of diurnally constant and fluctuating light. *j. of Plankt. Res.* 4(3); 705-724
- Couttea P. i Sorgeloos P., 1992.** The use of algal substitutes and the requirements for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research,* 11: 467-476
- Cranfield H. J., 1973.** A study of Morphology, Ultrastructure, and histocemistry of the pediveliger of *Ostrea edulis*. *Mar Biol.* 22; 187-202
- De Pauw N., Verlet H., De Leenheer L Jr., 1980.** Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure. *Algae Biomass;* 315-341. Shelef G, Soeder C. J., (Eds). North-Holland, Biomedical Press.
- Elizière-Papayanni P., 1993.** Coquillages. Informations techniques des services vétérinaires français, éditeur: I.T.S.V.F.: 522 p.
- 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

**FIOM, 1991.** Le marché français de l'ostréiculture, publication FIOM. 39 p.

**Fabregas J., Abalde J., Herrero C., Cabezas B., Viega M., 1984.** Rowth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch culture with different salinities and nutrien concentrations. *Aquaculture* 42; 207-215

**Filić Ž., 1975.** Quelques resultats experimentaux sur la tehnologie de l'ostreiculture dans l'Adriatique septentrional. *HGaliotis* Vol. 5 1975 (1976)

**Galtstoff P. S., 1936.** Spawning reactions of three species of oysters. *J. Wash. Acad.Sci.* 22 ;65-69.

**Gamulin-Brida H, 1974.** Biocenoses benthique de la Mer Adriatique.*Acta Adriat* 15 (9) :1 -102

**Gesser F., 1936.** Untersuchung über den Nährstoffgehalt und die Planktonproduktion in den Küstengewässern von Rovigno. *Note Inst. Biol. Rovigno*, No. 20. Jena.

**Gibbons M. C. i Castagna M., 1984.** Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40; 189-191.

**Gouletquer P. i Héral M., 1997.** Marine molluscan production Trends in France: From fisheries to aquaculture, p. 137-164. In U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 129

**Grelon M., 1978.** Saintonge, pays des huîtres vertes. La Rochelle, Edit. Rupella, 364 p.

**Gross F., 1937.** Note on the culture of some marine plankton organisms. *J. Marine Biol. assoc. U.K.* 21, 753-768

**Grubišić F., 1982.** Ribe, rakovi i školjke Jadrana, ITRO "Naprijed" Zagreb i GRO "Liburnija" Rijeka

**Gay L., 1990.** Eloge de l'huître. *Gentlemen* (éd.), Paris, 95 p.

**Guillard R. R. i Ryther J. H., 1962.** Studies of marine planctonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *can. J.Microbiol.* 8 ; 229-239.

**Harper E. M., 1991.** Post-larval cementation in the Ostreidae and its implications for other cementing bivalvia. *J. Moll.Stud:* 58; 37-47.

**Helm M. M., 1969.** The effect of diet on the culture of the larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *I.C.E.S. Fish. Improv. Comm., C.M., E:* 7

**Helm M. M., 1977.** Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* with *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 57: 1019-1029

- Helm M. M. i Millican P.F., 1977.** Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11, 1-12.
- Héral M., 1989.** L'ostréiculture française traditionnelle. In «Aquaculture», Barnabé, Ed. Lavoisier Technique et Documentation Publisher, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, vol. 1: 347-369
- Hinard G. i Lambert L., 1928.** Tableau de l'ostréiculture française (2<sup>ème</sup> partie). *Rev. Trav. Off. Pêches Marit.*, 1 (4): 61-127
- Hoek P.P.C., 1884.** Les organes de la generation de l'huître. contributions à la connaissance de leur structure et de leurs fonctions. *Tijdschr. Ned. Dierk. Ver. Suppl. Deel.*, pg.113-225.
- Holland D. L. i Spencer B. E., 1973.** Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early growth. *J. Mar. Bio. assoc. U.K.* 53: 287-298
- Hori, J i Kusakabe, D. 1927.** On the artificial culture of oyster larvae (II). *J. Imp. Fish. Inst.*, 23-79.
- Hrs-Brenko M., 1969.** Observations sur l'huître (*Ostrea edulis*) du canal Lim Adriatique du nord). *Rapp. Comm. int. Mer Medit.*, 19(5), 855-857.
- Hrs-Brenko M., 1974.** Stanje naselja školjkaša na obalama Jadrana. *Acta Adriat.* 16 (7), 125-136.
- Hrs-Brenko M. i Filić, Z., 1973.** Croissance de l'huître (*Ostrea edulis* L.) et de la moule (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) dans les parcs de culture de l'Adriatique Nord. *Etud. Rev. CGPM*, (52), 35 –45.
- Hrs-Brenko M. i Filić, Z., 1975.** Značaj i mogućnost školjkarstva na Jadranu. *SIT, Proizvodnja i prerada ribe*, Beograd, 165-173.
- Hrs-Brenko M., 1979.** III konferencija SITH o tehnološkom razvoju; 1-16
- Hrs-Brenko M., 1980.** The settlement of mussels and oysters in the norther Adriatic Sea. *Nova Thalassia* 4, Suppl. 67-85.
- Hrs-Brenko M., 1990.** Skupljanje mlađi ekonomski važnih školjkaša u Jadranu. *Pomorski zbornik* 28, 643 – 653.
- Igić Lj., 1981.** The biomass of fouling communities on edible shellfish: oyster (*Ostrea edulis* L.), and mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) in the Northern Adriatic. *Thalassia Jugosl.*, 17, 17-29.
- Igić Lj., 1986.** Biološka valorizacija Raškog zaljeva. Obraštaj kao biološka kontrola kod uzgoja školjkaša. *Pomorski zbornik*, 24, 555-556.
- Jaziri H., 1985.** Biogeographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. 1758, DEA Université P. VALÉRY – Montpellier III 65 p.

- Just E. E., 1939.** Basic methods for experiments on eggs of marine animals. P. Blakiston's Son and Co., Inc Philadelphia
- Kasyanov V. L., 1984.** Planktotrophic larvae of bivalve mollusks: morphology, physiology and behavior. Biol.Morya 10(3); 117-128.
- Korringa P., 1940.** Experiments and observations on swarming, setting and pelagic life in the oyster *Ostrea edulis*. Arc.Neerl.Zool., Vol. 5, pg. 1-249.
- Korringa P., 1947.** Relations between the moon and periodicity in breeding throughout the geographical ranges of *Ostrea edulis*. Ann Bio 33: pp. 1-17
- Laing I., 1995.** Effect of food supply on oyster spatfall. Aquaculture 131: pp. 315-324.
- Laing J. i Helm M. M., 1981.** Factor affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kylin). Aquaculture 22 (1-2); 137-149.
- Laing I. i Millican, P. F., 1986.** Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. Aquaculture 54, 245-262
- Langdon C. J. i Waldock, M.J., 1981.** The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. J. mar. Biol. assoc. U.K. 61, 431-448
- Le Moine O., Gearon P., Soletchnik P., Faury N., Gouletquer P., Robert S., Razet D., Heurtebise S. i Taillade S., 2002.** Réseau de surveillance de la croissance et production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* le bassin de Marennes-Oléron: bilan de 12 années de suivi (1986-1998). R.INT.DRV/RA/LCPC 2002-02, 45 p.
- Le Borgne Y., 1989.** Reproduction contrôlée des mollusques bivalves. In Aquaculture, Barnabé G. (éd.), Lavoisier, Paris, 1: 275-286
- Li W. K. i Morris i., 1982.** Temperature adaption in *Phaeodactylum tricornatum* Bohlin: Photosyntetic rate compensation and capacity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 58; 135-150.
- Lindner G., 2000.** Guide des coquillages marins, 5<sup>ème</sup> édition revue et augmentée, Delachaux & Niestlé S. A., Lausanne (Switzerland) – Paris, 319 p.
- Loosanoff V. L., 1937.** Seasonal gonadal changes of adult clams, *Venus mercenaria* (L.). Biol. Bull. 72; 406-416.
- Loosanoff V. L. i Davis H.C., 1950.** Conditioning *Venus mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. Biol.Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 98, 60 - 65.
- Loosanoff V. L. i Davis H.C., 1951.** Delaying of spawning of lamellibranchs by low temperature. J. mar. Res. 10, 197 – 202.

**Loosanoff V. L. i Davis H.C., 1963.** Rearing of bivalve mollusks, pp. 1-136. – In : F.S. Russel, Ed., Advances in marine biology, Vol. 1. Academic Press Inc., London i New York.

**Lubet P., 1956.** Cycle sexuel de *Mytilus edulis* L. et de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. dans le bassin d'Arcachon (Gironde). Union Internationale des Science Biologiques, Serie B No. 24, pg. 19.

**Lubet P., 1991.** Reproduction des mollusques. Bases biologiques de l'aquaculture, coord. Barnabé, Techniques et documentation (Lavoisier), (3): 168-204.

**Manahan D. T., 1983.** The uptake and metabolisam of dissolved amino acids by bivalve larvae. Biol. Bull. 164; 236-250

**Marinković M. i Nikolić M., 1963.** La croissance de l'huitres *Ostrea edulis* L. avant et pendant la fertilisation de la mer à Limski kanal (Istrie, Yougoslavie) depuis 1957 jusqu'en 1961. Thalassia Jugosl., 2(4), 5 – 25.

**Marteil L., 1976.** La conchyliculture française. II – Biologie de l'huître et de la moule. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 15-2: 153-346

**Martin A. G., Littaye-Mariette A., Langlade A. i Allenou J.-P., 1995.** Cycle de reproduction naturelle de l'huître plate *Ostrea edulis*. Groupe de Travail sur la Reproduction des Mollusques Bivalves d'Aquaculture Marine. 21-33

**Marguš D., 1998.** Školjkaši ušća rijeke Krke. Nacionalni park Krka. pp 168.

**Mason J., 1958.** The breeding of scallop, *Pecten maximus*, (L.) in Manx waters. Journ. Mar. Biol. Ass. U. K., 1958. 37, pg. 653 - 671.

**Meuriot E. i Grizel H., 1984.** Note sur l'impact économique des maladies de l'huître plate en Bretagne. Rapp. tech. ISTPM V 12: 19 p.

**Mihailinović M., 1954.** Experience de rationalisation et de perfectionnement de la technique de l'ostreiculture en Yougoslavie. Fao, Doc. techn. 42.

**Milišić N., 1991.** Školjke i puževi Jadrana. 302 Logos, Split

**Moebius K., 1871.** Untersuchung über die Fortpflanzungsverhältnisse der Schleswigschen Austern. Nachr. Malak. Gesellsch. 111, pg. 131 – 134

**Montaini E., Chini Zittelli G., Tredici M. R., Molina Grima E., Fernandez Sevilla J. M., i Sanchez Pérez J. A., 1995.** Long term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of stronge on viability and fatty acid profile. Aquaculture 134: 81 - 90

**Moor B., 1983.** Organogenesis. In the mollusca, Vol 3, Development, Verdonk N H, Van den Biggelaar J AM, Tompa A S, (Eds). Academic Press, New York, 123-177.

**Moore H. F., 1898.** Oysters and methods of oysterculture. Rep. U. S. Comm. Fish. for 1897., 23, 263 – 338

- Nell J. A., O'Connor W. A., 1991.** The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostra commercialis*, larvae. *Aquaculture* 99, 277 – 284.
- Nie Z. K. i Ji F. M., 1980.** Studies on food for *Mytilus edulis* larvae. *mar. Fish. Res.*, 1: 85-96
- Nikolić M., 1963.** Nylon rops in shellfish culture. *Proc.gen.Fish.Con.Medit.*,(7), 247 – 249.
- Nikolić M., 1964.** Shellfishculture and the productivity of our rearing places. *Acta Adriat.*, 11(32), 239-242.
- Nikolić M. i Stojnić I., 1962.** A system of oyster culture on floating shellfish parks. *Stud. Rev. GFCM*, (18), 1-8.
- Nümann W., 1941.** Der Nährstoffgehalt in der nordöstlichen Adria, *Thalassia*, Vol. V, Hft. 2, Bolzano.
- O'Connor W. A., Nell J. A., Diemar J.A., 1992.** The evaluation of twelve algal species as a food for juvenile Sydney rock oyster, *Saccostra commercialis* (Iredale i Roughley). *Aquaculture* 108, 277 – 283.
- Orton J.H., 1927.** Researches on the sex-change in the European oyster. *Nature*, Vol. 69.
- Persoone G., Claus C., 1980.** Mass culture of algae: a bottle-neck in the nursery culturing of molluscs. *Algae Biomass*, ShelefG., Soeder C. J., (Eds), North-Holland Biomedical Press, Amsterdam; 265-285
- Peruško G.H., 1964.** Studies on the Relations between the varying Ekological conditions, Size and the Sexual Cycle of the Native Oyster (*Ostrea edulis* L.) in the North Adriatic. Manuscript.
- Peruško G.H., 1967.** A study of the gonads of *Ostrea edulis* L. in relation to its spawning cycle in the Nord Adriatic. *Thalassia jugosl.*, 3 1-6, pp. 5 -10. Korringa, P.
- Petz B., 1985.** Osnove statističke metode za nematematičare, Sveučilišna naklada liber, Zagreb, 409 p.
- Poutiers J.M., 1987.** Bivalves (Acephales, Lamellibranches, Pelecypodes). *Mediterranee et Noir Mer*, Vol. 1 FAO – ECEE: 371 – 512
- Provasoli L., 1958.** Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Ann.Rev.Microbiol.* 12; 279-308.
- Prytherch H. F., 1924.** Experiments in the artificial propagation of oysters. U. S. Bur. Fish. App. 11 to Rep. U. S. Comm. Fish., Fiscal year 1923., 1-14
- Ranson G., 1943.** La vie des huîtres. *Histoires Naturelles* – 1.

**Ranson G., 1967.** Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde définies par leurs coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude de quelques-une des grands musées d'Histoire Naturelle. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 31(2): pp. 127-199. et 31(5): 205-279

**Robert R., Parisi G., Rodolfi L., Poli B. M. i Tredici M. R., 2001.** Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. Aquaculture 192: 333-346

**Raven C. P., 1964.** Development. In: Physiology of Mollusca, Vol I, Chapter 5; 65 – 195. Wilbur K M, Yonge CM, (Eds.), Academic Press, New York and London

**Sabelli B., Giannuzzi-Savelli R. i Bedulli D., 1990.** Catalogo annotato dei molluschi marini del Mediterraneo. – Ed. Libreria Naturalistica Bolognese 1

**Salvesen I., Reitan K. I., Skjermo J. i Oie G., 2000.** Microbial environments in marine larviculture: Impact of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. aquaculture International 8: 275-287.

**Simon-Gouletquer C., 2000.** «Femme de la côte» Dépôt légal: 2<sup>ème</sup> trimestre. Geste Editions. 227 p.

**Skaramuca B. i Gjukić M., 1981.** Sadašnja proizvodnja i perspektive uzgoja školjkaša (dagnji i kamenica) u Malostonskom Zaljevu. U: Roglić J., Meštrov M. (eds) Zbornik radova savjetovanja "Malostonski zaljev Prirodna podloga i društveno valoriziranje". JAZU, Znanstveni savjet za zaštitu prirode. Dubrovnik, 300-308

**Skjermo J., Bergh O., Lambert C., Reitan K. I., Salvesen I., Torkildsen L. i Oie G., 2000.** The growth of scallop pathogenic *Vibrio pectenicida* in cultures of different microalgae. WAS, Aqua, Nice, eas special publication n°. 28

**Smith J. R. i Strehlow D. R., 1983.** Algal-induced spawning in the marine mussel *Mytilus californianus*. Int. J. Invert. Reprod. 6; 129-133.

**Soletchnik P., Faury N., Razet D. i Gouletquer P., 1998.** Hydrobiology of the Marennes-Oléron bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. Hydrobiologie, 386:131-146

**Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Gearion P., Robert S., Gouletquer P. i Taillade S., 2000.** R.INT.DRV/RA/LCPC 2000-04. Mortalité et croissance de l'huître creuse *C. gigas* dans le Bassin de Marennes Oléron. LCPC – Charentes. 83 p.

**Spectorova L. V., Goronkova O. I., Nosova L.P., Albitskaya O. N., 1981.** High-density culture of marine microalgae-promising items for Mriculture. I. Mineral feeding regime and instalations for culturing *Dunalliella tertiolecta* Butch. Aquaculture 26; 289-302.

**Starr M., Himmelman J. H., Therriault J.C., 1990.** Direct coupling of marine invertebrate spawning with phytoplankton blooms. Science 247; 1071-1074.



- Starr M., Himmelman J. H., Therriault J.C., 1990.** Coupling of nauplii release in brances with phytoplankton bloom: a parallel startegy to that of spawning in urchinus and mussels. J. Plankt. Res. 13(3); 561-571.
- Strathmann M.F., 1987.** Phylum Mollusca, Class Bivalvia. Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast; 309-353. University of Washington Press, Seattle and London.
- Stutz J. C., 1974.** General laboratory procedures and media recipes. t.J. Smayda (ed).
- Sugiura Y., 1962.** Electrical induction of sprawning in two marine invertebrates (*Urechis uncinctus*, hermaphroditic *Mytilus edulis*). Biol. Bull. 123; 203-206
- Trintignac P., 1996.** Critères d'utilisation de microalgues pour le nourrissage de *Crassostrea gigas* et d'*Ostrea edulis* en écloserie . IBBA-AGEMA EPP. 51 p.
- Utting S.D. i Spencer B., 1991.** The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Lab. Laefl., MAFF Fish. Res., Lowestoft 68, 31 p.
- Vinja A., 1986.** Jadranska fauna – etimologija i struktura naziva II. Split
- Zavodnik D. i Hrs-Brenko M., 1987.** Allevamento di organismi attreaverso i secoli sulle sponde dell'Adriatico orientale. Atti Mus civ Stor nat Trieste 40(1): 25-53
- Zavodnik D. i Šimunović A., 1997.** Beskralješnjaci morskog dna. I izdanje, IP "Svjetlost", D.D. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo
- Waldock M. J. i Nascimento I. A., 1979.** The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. N.E.R.C. Unite of Marine Invertebrate Biology. 1: 77-86
- Walne P. R., 1963.** Observations on food value of seven species of algae to the larvae od *Ostrea edulis* L. Feeding experiments. J. mar. biol. ass. UK, 43, 767 – 784.
- Walne P. R., 1956.** Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* L. in the laboratory. Fish. Investigations, (II), 20(9).
- Walne P. R., 1964.** Observations on the fertility of the oyster (*Ostrea edulis*) J. Mar. Biol. Ass. U.K. 44: 293-310
- Walne P. R., 1970.** Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. Fish. Invest. XXVI (5), 62, Series II.
- Walne P. R., 1974.** Culture of Bivalve Molluscs. 50 years experience at Conway. West Byfleet: Fishing News (Books) LTD, 173 p.
- Webb K. L. i Chu F. L., 1981.** Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: G. D. Pruder, C. Langdon and D. Conklin, Proceedings of the Second International

Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 272 –291.

**Wegman K. i Metzener H., 1971.** Synchronization of *Dunaliell* cultures. Arch. Microbiol. 78; 360-367.

**Wells W. F., 1920.** Growing oysters artifically. Conservations, 3, 151, New York Conserv. Com.

**Wells W. F., 1927.** Report of the experimental shellfish station. N.Y. St. Conserv. Dep., Rep. No. 16, 1-22.

**Widdows J., 1991.** Physiological ecology of mussel larvae. Aquaculture 94; 147-163.

**Wilson J. H. i Simons J., 1985.** Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west of Ireland. Aquaculture; 46: 307-321

**Yonge C. M., 1960.** Oysters. Londres, Collins edit. 209 p.

**IFREMER, 2000.** Rapport annuel. 67 p.

## **12. SAŽETAK**

## 12. SAŽETAK

Istraživanje tehnološkog postupka uzgoja ličinki školjkaša pravilnim kvalitativnim i kvantitativnim odabirom fitoplanktonskih alga ima veliku važnost i može pridonijeti poboljšanju proizvodnje kamenice *Ostrea edulis*. Istraživani je pokus obuhvatio praćenje sedam mrijestnih serija vrste *Ostrea edulis*, s posebnim osvrtom na utjecaj prehrane tijekom rasta i preživljavanja ličinki. Praćeni rast ličinki kod svih je sedam mrijestnih serija imao visoku pozitivnu korelaciju ( $r=0,97-0,99$ ), dok je stopa preživljavanja bila slaba (36%). Duljina ličinki trećeg dana u 3. je mrijestnoj seriji bila statistički značajnije veća nego u ostalim mrijestnim serijama ( $p<0,05$ ). Na dan prihvata (12., odnosno 13. dan), duljina ličinki kretala se je između 285 i 321  $\mu\text{m}$ , a bila je statistički značajnije veća u 3. nego u 7. mrijestnoj seriji ( $p<0,05$ ). Ličinke koje su završile život u planktonu 13. dan bile su statistički znatno veće u 6. nego u 7. mrijestnoj seriji ( $t=3,21$ ;  $p<0,05$ ). Primijećeno je smanjenje duljine ličinki s vremenskim pomakom praćenih mrijestnih serija. Kod hranidbenih tretmana u 7. mrijestnoj seriji (ST, T, SP) dobivena je statistički značajna razlika u duljini ličinki za 13. dan. Ona je bila znatno veća kod hranidbenog tretmana bez jednostanične alge *Tetraselmis suecica* (ST) ( $p=0,008$ ), a manja kod tretmana bez vrste *Pavlova lutheri* (SP) ( $p=0,034$ ) u usporedbi s kontrolnim tretmanom (T-*Isochrysis aff.galbana* (Tahiti), *Cohaetoceros calcitrans*, *Pavlova luteri* i *Tetraselmis suecica*) uobičajnim mješavinama alga (1-6). Preporučuje se ispitati povećavanje udjela dnevne koncentracije jednostanične alge *Tetraselmis suecica* tijekom ličinačkog života ili druge izvore hrane kako bismo unaprijedili rast i preživljavanje ličinki *Ostrea edulis*.

## **13. SUMMARY**

### 13. SUMMARY

Research of larval rearing technology through right choice of the quality and quantity of nutrition in the form of phytoplankton is very important and fundamental in the improvement of hatchery production of *Ostre edulis*. The 7 clutches at the larval stage of *Ostre edulis* was observed with special emphasized of the influence of nutrition during the growth and the survival of larvae. All clutches had a high positive correlation ( $r = 0,97-0,99$ ), while the survival rate was low (36%). The larvae on 3<sup>rd</sup> day for 3<sup>rd</sup> clutch was significant higher in growth to the all other clutches ( $p < 0,05$ ). At fixation (12<sup>th</sup> or 13<sup>th</sup> day) larvae were between 285 and 321  $\mu\text{m}$  in size. On 12<sup>th</sup> day higher significant difference between the larvae in growth was noted for 3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> clutch. Between the larvae in growth which finished their planctonic phase on 13<sup>th</sup> day higher significant difference was noted for 6<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> clutch ( $t=3,21$ ;  $p < 0,05$ ). A decrease in size with date of laying was observed. Among the treatments (ST, T, SP) significant differences in growth were observed; a tendency for poorer growth appeared in larvae not given *Tetraselmis suecica* (ST) and significant differences was higher ( $p=0,008$ ) than in larvae not given *Pavlova lutheri* (SP) ( $p=0,034$ ) compared with the control feed (T-a mix of *Isochrysis aff.galbana* (Tahiti), *Cohaetoceros calcitrans*, *Pavlova luteri* and *Tetraselmis suecica*); the standard mixture for all clutches (1-6). It would be interesting to test rations that «evolve», increasing quantities of *Tetraselmis suecica* during larval rearing and other sources of nutrition to improve larval growth and survival in *Ostrea edulis*.

## **14. ŽIVOTOPIS**

## 14. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20. ožujka 1973. u Splitu, gdje sam završila osnovnu školu i opću gimnaziju »Natko Nodilo«, nakon čega sam upisala Pomorski fakultet – Dubrovnik, studij u Splitu, smjer pomorsko–ribarske tehnologije. Diplomski rad iz područja ribarstvene biologije pod nazivom »Morfologija, neki aspekti biologije i gospodarska važnost vrsta roda *Mustelus* (Chondrichthyes: Triakidae) u Jadranskom moru« izradila sam u Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod voditeljstvom prof.dr.sc. Ivana Jardasa. Od 1997. do 1999. radila sam za tvrtku »Agrimar«, u mrjestilištu IOR-a na mrijestu i uzgoju mlađi lubina (*Dicentrarchus labrax*). Nakon toga, od godine 1999. do 2000. sam radila pri Ministarstvu poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, Uprava ribarstva, u Puli. Od godine 2001. zaposlena sam kao znanstveni novak u Laboratoriju za ekologiju i sistematiku Zavoda za istraživanje mora u Rovinju, a poslijediplomski studij upisala sam na Agronomskom fakultetu, smjer ribarstvo. Godine 2002. dobila sam stipendiju Vlade Francuske Republike, u okviru koje sam i odradila praktični dio za magistarski rad. Tijekom 2004. sam počela raditi na programu SOSPECO (*Valutazione della sostenibilità di nuove strategie co – gestionali di pesca mediante un approccio ecosistemico*).

Popis radova:

Jardas I. i Nerlović V. (1999): »Preliminary data on feeding of *Mustelus mustelus* (L.) and *Mustelus punctulatus* Risso (Chondrichthyes: Triakidae) in Adriatic Sea«, Proceeding, First Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation. Tome 1, p.235-245, Macedonian Ecological Society, Skoplje

Botter L., Nerlović V., Franceschini G., Da Ponte F., Pranovi F., Giovanardi O. i Raicevich S. (2004): »Valutazione comparativa dello scarto degli attrezzi da pesca in Adriatico settentrionale« (u pripremi)

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

Nerlović V. (2003): »Uzgoj školjaka u Francuskoj«, XXXVIII. Znanstveni skup hrvatskih agronoma s međunarodnim sudjelovanjem (Opatija); Priopćenja: Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, 441-442

Nerlović, V. (2004): »Izlavljanje jakovske kapice *Pecten jacobaeus* (Linneaus, 1758) na ribolovnim područjima sjeverno-zapadne obale Istre«, XXXIX. Znanstveni skup hrvatskih agronoma s međunarodnim sudjelovanjem (Opatija); Priopćenja: Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, 603-605



## Usavršavanje i izobrazba

Formation professionnel: »Aquaculture, pathologie aquacole et environnement« (ENVN – Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes; Diplôme d'Etablissement »Aquaculture, Pathologie Aquacole et Environnement«), Nantes, France, 11.2001. - 3.2002. (\*)

Praktični dio tečaja (\*): Mrijest i razvoj ličinki kamenice *Ostrea edulis* te hranidbeni utjecaj različitih vrsta jednostaničnih alga na njihov razvoj (LGP, Laboratoire de Génétique et Pathologie); IFREMER, La Tremblade, France 1.3. – 30.6.2002.

Praktični dio tečaja (\*): Procjena pojavljivanja različitih stadija ličinki kamenice *Crassostrea gigas* u prirodnoj sredini područja Marennes-Oléron (DEL, Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral), IFREMER, La Tremblade, France 1.7. – 29.8. 2002.

Advanced course: »Design and management of bivalve mollusc hatcheries« (CIHEAM - International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies; FAO - Food and Agriculture Organization, Zaragoza, Spain), 14.-19.2.2005.

**15. PRILOZI**

## Prilog A

Tablica 1. Duljina ličinki ( $\mu\text{m}$ ) po pojedinim danima za mrijestne serije 1.-6., 7.T

dvorana uzgoja	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
dani	1.MS	2.MS	3.MSa	b	c	d	4.MS	5.MSa	b	c	d	e	f	6.MSa	b	7.MSd	e	f
1								175	177	175	178	174	175					
2	199							177	178	178			178	176	176	183	183	183
3	200	211	199	199	199	210	186	185	183	185	188	188	179	181	182	185	187	188
4								193	189	193			181			194	192	193
5	217	215	212	210	212	226	207				213	210				198	198	200
6														230	227	213	201	203
7	246	234	244	263	259	263										217	214	223
8							266	245	244	253	258	256	230	275	258	232	231	241
9																248	244	260
10	281	277						261	265	278	274	266	267	277		254	250	266
11																285	272	280
12			322	317	326		297	308	285	297	288	282	286			288	278	289
13	307	306												310	303	294	295	299

Tablica 2. Duljina ličinki ( $\mu\text{m}$ ) po pojedinim danima kod 7. mrijestne serije (ST, T, SP)

dvorana uzgoja	1			1			1		
	ST			T			SP		
	7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7h	7i
1									
2	183	183	183	183	183	183	183	183	183
3	184	185	185	185	187	188	187	188	185
4	191	189	196	194	192	193	191	198	191
5	194	194	203	198	198	200	193	195	196
6	204	207	212	213	201	203	203	203	210
7	210	210	223	217	214	223	212	213	214
8	218	236	241	232	231	241	220	230	237
9	240	246	257	248	244	260	237	250	250
10	246	253	261	254	250	266	250	264	261
11	261	262	280	285	272	280	274	280	286
12	267	276	286	288	278	289	274	284	287
13	277	281	287	294	295	299	283	285	289

## Prilog B

Tablica 1. Broj preživjelih ličinki po pojedinim danima za mrijestne serije 1.-6., 7.T

dvorana uzgoja	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
dani	1.MS	2.MS	3.MSa	b	c	d	4.MS	5.MSa	b	c	6.Msa	b	7.MSd	e	f
1								400000	400000	400000					
2			300000	300000	300000	300000		300000	300000	300000	300000	300000	300000	300000	300000
3							300000				246000	226000			
4	350000	300000						163000	230000	180000			225000	225000	225000
5			210000	220600	180000	160000	270000								
6	349000	300000									250000	240000	123000	207000	157000
7			245000	240000	210000	170000									
8		260000					253000	170000	233000	260000	240000	266000			
9	313000												104000	203000	123000
10			173300	136700	130000	130000	246000	110000	110000	116000	220000	210000			
11	287000												100000	170000	147000
12			106600	130000	120000	115000	160000	73333	70000	103000					
13	240000	108000									110000	100000	90000	153000	127000
14							106000	80000	70000	94000					

Tablica 2. Broj preživjelih ličinki po pojedinim danima za 7. mrijestnu seriju (ST, T, SP)

dvorana uzgoja	1			1			1		
	ST			T			SP		
	7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7h	7i
1									
2	300000	300000	300000	300000	300000	300000	300000	300000	300000
3									
4	225000	225000	225000	225000	225000	225000	225000	225000	225000
5									
6	103000	167000	243000	123000	207000	157000	257000	177000	187000
7									
8									
9	83000	137000	170000	104000	203000	123000	260000	130000	103000
10									
11	73000	103000	113000	100000	170000	147000	217000	63000	100000
12									
13	60000	87000	88000	90000	153000	127000	240000	100000	80000

## Popis Slika i Tablica:

### Slike

- Slika 1. Europska plosnata kamenica *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 (foto: Edouard Bédier)
- Slika 2. Crtež kamenice, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 (Poutiers, 1987)
- Slika 3. Geografska rasprostranjenost europske kamenice *Ostrea edulis* (Jaziri, 1985; Poutier, 1987)
- Slika 4. Veliger ličinka kamenice *Ostrea edulis* u dobi od 6 dana (Erdmann 1935)
- Slika 5. Pediveliger ličinka kamenice *Ostrea edulis* (Erdmann 1935)
- Slika 6. Shema životnog ciklusa kamenice *Ostrea edulis*: 1. ličinačka faza (a, b, c), 2. faza odrasle jedinke (d, e, f), (Launey, 1998)
- Slika 7. Sheme najznačajnijih alga za ishranu ličinki školjkaša (Trintignac, 1996)
- Slika 8. Proizvodnja kamenica u Francuskoj, u periodu od godine 1900. do 1990. (Gouletquer i Héral, 1997)
- Slika 9. Uzgojni bazen Marennes – Oléron (foto: Ifremer)
- Slika 10. Uzgoj kamenica u području Ronce-Perquis unutar bazena Marennes-Oléron (Stoletchnik i sur., 2000)
- Slika 11. Područje Marennes-Oléron, uzgoj kamenica u bazenima (foto: Ifremer)
- Slika 12. Glavni istraživački centri i stanice Ifremera u Francuskoj (a) i frankofonskim zemljama (b) ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))
- Slika 13. Geografski položaj Ifremerove istraživačke stanice, u La Trembladeu ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))
- Slika 14. Ifremerova stanica u La Trembladeu ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))
- Slika 15. Prostorija za izolaciju odraslih kamenica (karantena), (foto: Pascal Phelipot)
- Slika 16. Bazeni s kamenicama u prostoriji za kondicioniranje i održavanje roditeljskih organizama (foto: Pascal Phelipot)
- Slika 17. Mali instalacijski bazeni na policama u prostoriji za selekciju europske kamenice *Ostrea edulis* (foto: Edouard Bédier)
- Slika 18. Bazeni s kamenicama uoči mrijesta (foto: Andre Gérard)
- Slika 19. Prostorija za održavanje i rast ličinki (a), filtracija ličinki na situ veličine oka 125 µm (D5 / D6) (b)
- Slika 20. Mikrohranilište, bazeni za prhvat ličinki
- Slika 21. Vanjski bazeni za uzgoj alga (foto: Pascal Phelipot)
- Slika 22. Prostorije za održavanje monokultura jednostaničnih alga: monokulture alga u staklenim balonima od 2 i 10 L (a); konusni bazeni od 300 L (b)
- Slika 23. Prostorija za čišćenje i sterilizaciju pribora i posuđa (foto: Pascal Phelipot)
- Slika 24. Tehnički pribor za određivanje duljine ličinki
- Slika 25. Shema uzgoja jednostaničnih alga u monokulturama u stanici Ifremer u La Trembladeu
- Slika 26. Prostorija za čišćenje pribora i sterilizaciju posuđa u proizvodnji fitoplanktona
- Slika 27. Rast ličinki u funkciji vremena za mrijestne serije 1., 2. i 4., koje nisu imale podserije
- Slika 28. Rast ličinki kamenica u funkciji vremena za mrijestne serije 3., 5. i 6., koje su imale podserije
- Slika 29. Rast ličinki pojedinih tretmana u funkciji vremena (SP, T, ST)
- Slika 30. Pravci regresije za pojedine hranidbene tretmane (7. mrijestne serije)
- Slika 31. Postotak preživljavanja ličinki kamenica u funkciji vremena, za mrijestne serije 1., 2. i 4., koje nisu imale podserije

Slika 32. Postotak preživljavanja ličinki kamenica u funkciji vremena, za mrijestne serije 3., 5. i 6., koje su imale podserije

Slika 33. Postotak preživljavanja ličinki kamenica u pojedinim tretmanima (SP, T, ST) 7. mrijestne serije u funkciji vremena

Slika 34. Usporedba preživljavanja ličinki kamenica 7. mrijestne serije s tretmanima (SP, T, ST) u funkciji vremena

## Tablice

Tablica 1. Proces sazrijevanja i izgled gonada kod europske kamenice *Ostrea edulis* (Marteil 1976)

Tablica 2. Minimalna temperatura za ispuštanje gameta

Tablica 3. Jednostanične alge upotrebljavane za prehranu školjkaša u mrjestilištima

Tablica 4. Hranidbena vrijednost jednostaničnih alga u prehrani školjkaša (Chretiennot-Dinet i sur., 1986)

Tablica 5. Mrijestne serije, podserije i datum postavljanja pokusa (D1 = dan ispuštanja ličinki iz kamenica)

Tablica 6.a. Kemijski sastav medija za uzgoj monokultura izoliranih jednostaničnih alga (prilagođeno na pH 7,4)

Tablica 6.b. Hranjivi medij Conway i vitamini

Tablica 7. Analiza varijance provedena za mrijestne serije 3., 5. i 7. za 3. i 12. dan

Tablica 8. Analiza varijance provedena za hranidbene tretmane (SP, T, ST) 3. i 12. dan

Tablica 9. Analiza varijance provedene za broj preživjelih ličinki u 3., 5. i 7. mrijestnoj seriji

Tablica 10. Analiza varijance provedena za preživljavanje unutar hranidbenih tretmana (SP, T, ST).