

Utjecaj kakvoće mora na rast i preživljavanje lubina i orade u uzgajalištu Veli Bok, otok Cres

Novosel, Brigita

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:193893>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Brigita Novosel

**Utjecaj kakvoće mora na rast i
preživljavanje lubina i orade u
uzgajalištu Veli Bok, otok Cres**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Brigita Novosel

**Influence of sea water quality on the
growth and survival of sea bass and
gilthead sea bream in the mariculture Veli
Bok, island Cres**
Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Zavod za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Damira Kapetanovića, uz suvoditelja izv. prof. dr. sc. Petra Kružića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre ekologije i zaštite okoliša.

Zahvaljujem se mentoru, dr. sc. Damiru Kapetanoviću s Instituta Ruđer Bošković na nesebičnom pomaganju, strpljenju te na svim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada kao i na strpljenju, uloženom trudu te vremenu koje mi je posvetio.

Zahvaljujem se također mentoru izv. prof. dr. sc. Petru Kružiću na susretljivosti i pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ani Gavrilović koja me upozнала s mentorom, te pomogla sa stručnim savjetima prilikom pisanja ovog rada, kao i na strpljenju te vremenu koje mi je posvetila.

Želim se zahvaliti i svim djelatnicima Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama koji su mi uvijek bili spremni pomoći, a posebno dr. med. vet. Franu Baracu s kojim sam odrađivala dio terenskih uzorkovanja.

Zahvaljujem se direktorici firme Orada Adriatic d.o.o. Ivani Balenović koja mi je omogućila da se istraživanje provede te mi omogućila pristup potrebnim podacima.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene i uvijek mi davala podršku tijekom mog cjelokupnog školovanja u lijepim i teškim trenucima.

Ovaj rad je u potpunosti financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta IP-2018-01-3150: Prilagodba uzgoja bijele ribe klimatskim promjenama – AqADAPT

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj kakvoće mora na rast i preživljavanje lubina i orade u uzgajalištu Veli Bok, otok Cres

Brigita Novosel

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Istraživanje je provedeno u razdoblju svibanj 2020. - srpanj 2021. godine na uzgajalištu lubina (*Dicentrarchus labrax*) i orade (*Sparus aurata*) u uvali Veli Bok, Cres. Od faze nasađivanja mlađi u kaveze praćeni su relevantni pokazatelji rasta obje vrste. Temperatura, koncentracija kisika i postotak zasićenosti mora kisikom redovito su mjereni. Uzorkovanje mora za mikrobiološku analizu obavljano je na kontrolnoj postaji i uzgajalištu na četiri dubine. Tijekom perioda istraživanja lubin je dosegao 187 g, a orada 196 g. Faktor konverzije hrane kod lubina kretao se od 0,21 do 1,53, a kod orade od 0,41 do 1,38. Indeks kondicije lubina bio je u rasponu od 1,78 do 3,22, a orade 1,74 do 2,75. Do kraja razdoblja istraživanja preživljavanje lubina iznosilo je 98,27 %, dok je kod orade bilo 87,8 %. Tijekom istraživanja nije zabilježena bolest koja bi uzrokovala mortalitet. Utvrđene vrijednosti *E. coli* i enterokoka na obje postaje uzorkovanja bile su manje od 10 MPN/100mL. Od potencijalno patogenih bakterija iz roda *Vibrio*, na uzgajalištu i kontrolnoj točki utvrđen je *V. harveyi*, dok je *V. alginolyticus* utvrđen samo na uzgajalištu. Do pojave bolesti tijekom perioda istraživanja najvjerojatnije nije došlo zbog male koncentracije bakterija u uzorcima i uravnoteženog uzgoja bez stresa.

(55 stranica, 35 slika, 9 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: temperatura, mikrobiologija, rod *Vibrio*

Voditelj: dr. sc. Damir Kapetanović

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen: 10.2.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Influence of sea water quality on the growth and survival of sea bass and gilthead sea bream in the mariculture Veli Bok, island Cres Brigita Novosel

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The research was conducted in the period May 2020 - July 2021 at the cage farm of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) in the Veli Bok mariculture, Cres. Relevant growth indicators of both species were monitored since the settlement phase. Sea temperature, oxygen concentration and percentage of oxygen saturation were measured weekly. Sea water sampling for microbiological analysis was performed at the control station and farm at four depths. During the study period, sea bass reached 187 g, and gilthead sea bream 196 g. The food conversion factor in sea bass ranged from 0,21 to 1,53, and in sea bream from 0,41 to 1,38. The sea bass condition index ranged from 1,78 to 3,22, and sea bream from 1,74 to 2,75. By the end of the study period, the survival of sea bass was 98,27 %, while for sea bream it was 87,8 %. No disease was reported during the study that would cause mortality. Measured values of *E. coli* and enterococci at both sampling stations were lower than 10 MPN/100mL. Of the potentially pathogenic bacteria of the genus *Vibrio*, *V. harveyi* was identified at the farm and control site, while *V. alginolyticus* was identified only at the farm. Fish diseases during the study period did not occur most likely due to the low concentration of bacteria in the samples and balanced stress-free farming technology.

(55 pages, 35 figures, 9 tables, 77 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: temperature, microbiological, genus *Vibrio*

Supervisor: dr. Damir Kapetanović

Co-supervisor: dr. Petra Kružić, Assoc. Prof.

Reviewers:

Thesis accepted: 10.2.2022.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Uzgoj lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) i orade (<i>Sparus aurata</i>).....	3
1.2.	Mikroorganizmi u morskoj vodi	6
1.2.1.	Bakterije roda <i>Vibrio</i>	8
1.2.2.	Bakterije roda <i>Aeromonas</i>	10
1.2.3.	Bakterije roda <i>Pasteurella</i>	11
1.2.4.	Bakterije roda <i>Mycobacterium</i>	12
1.3.	Liječenje i profilaksa.....	13
1.4.	Utjecaj akvakulture na okoliš.....	14
2.	Cilj istraživanja	15
3.	Područje istraživanja	16
4.	Materijali i metode	18
4.1.	Praćenje rasta i preživljavanja.....	18
4.2.	Uzorkovanje morske vode	20
4.3.	Mikrobiološka analiza morske vode	22
4.4.	Izolacija bakterija	25
4.5.	Statistička analiza podataka.....	26
5.	Rezultati	27
5.1.	Temperatura mora.....	27
5.2.	Vrijednost otopljenog kisika i postotak zasićenja morske vode kisikom	28
5.3.	Rast jedinki lubina i orade.....	30
5.4.	Faktor konverzije hrane (FK) kod lubina i orade	32
5.5.	Indeks kondicije (IK) lubina i orade	35
5.6.	Preživljavanje lubina i orade	39
5.7.	Mikrobiološka analiza morske vode na uzgajalištu i kontrolnoj točki	40
5.8.	Mikrobiološka analiza vode iz bazena s mladi s transportnog kamiona.....	44
5.9.	Rezultati MALDI-TOF.....	45
6.	Rasprava.....	47
7.	Zaključak.....	51
8.	Literatura.....	52
9.	Životopis.....	60

1. Uvod

Akvakultura je jedna od najbrže rastućih grana gospodarstva u svijetu, te doprinosi s 30 % u ukupnoj potrošnji ribe (Hazari i sur., 2017), koja je u pojedinim dijelovima svijeta glavni izvor proteina (Cario i sur., 2017). Kako je ribolov uzrokovao pad riblje populacije za 80-90 % (Baum i sur., 2003; Mayers i sur., 2003) akvakulturi se pridaje sve veći značaj zbog potencijala očuvanja i obnove ekosustava (Lozano i sur., 2010). Ona predstavlja potencijalno održiv, jeftin te ekološki prihvatljiv izvor proteina za sve veću ljudsku populaciju (Culha i Karaduman, 2020).

Brzi rast ljudske populacije jedan je od glavnih uzroka globalnih promjena s kojim smo suočeni, što dovodi do promjena u prirodnom okolišu (Gingrande i sur., 2021). Sve veća potražnja za morskim plodovima na globalnoj razini uzrokuje da se akvakultura širi u dublje oceanske vode (Cario i sur., 2017). Posljedično dolazi do prekomjerne eksploatacije resursa te do degradacije okoliša (Gingrande i sur., 2021). Usporedno s brzim rastom proizvodnje širom svijeta, uzgoj ribe prate različite bolesti koje uzrokuju ozbiljne ekonomske gubitke (Kolda i sur., 2020).

U Kini, koja je ujedno i prva država na svijetu po proizvodnji vodenih organizama, odvija se 70 % svjetske akvakulturne proizvodnje (Li i sur., 2017). Posebna grana akvakulture je marikultura, koja se bavi uzgojem morskih organizama. Njenim naglim razvojem u prošlom stoljeću, svjetska je proizvodnja u 2020. godini dosegla 30 756 000 tona, (FAO, 2020). U Sredozemnom moru tijekom posljednjeg desetljeća došlo je do značajnog povećanja uzgoja riba (Ennouri i sur., 2021). Dvije najznačajnije vrste ribe uzgajane na području Mediterana su lubin, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) i orada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) (Ennouri i sur., 2021). To su također, dvije najznačajnije vrste koje se uz atlantsku plavoperajnu tunu (*Tunnus thynnus*, Linnaeus, 1758) uzgajaju u Hrvatskoj (MPS, 2022). Ukupna marikulturna proizvodnja u Hrvatskoj iznosila je u 2020. godini 18 986 tona, od čega na lubina otpada 6 754 tona, a na oradu 7 780 tona (Tablica 1).

Tablica 1. Proizvodnja u marikulturi za Hrvatsku izražena u tonama za razdoblje 2015.-2020.

(Izvor: <https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=14>)

Vrsta	2015.	2016.	2017.	2018.	2019.	2020.
Dagnja	746	699	920	882	947	496,8
Kamenica	52	64	62	54	61	14,4
Tuna	2,603	2934	2126	3227	2747	3323
Lubin	4,488	5310	5616	6220	6089	6754
Orada	4075	4101	4830	5591	6774	7780
Ostale vrste *	78	127	253	808	725	618
Total (t)	12043	13235	13843	16782	17343	

Ostale vrste * hama, romb, gof, jakovljeva kapica

Tradicionalna akvakultura uglavnom podrazumijeva uzgoj u ribnjacima, ograđenim lagunama i primitivnim kaveznim sustavima. U morskoj sredini tradicionalan tip uzgoja obavlja se u obalnom moru, dok se danas morski uzgojni sustavi premještaju na otvoreno more (Wei i sur., 2020). Kavezi su načinjeni od prirodnog materijala, a hranjenje je ručno. Tradicionalan tip uzgoja karakteriziraju intenzivan ljudski rad i nemogućnost kontrole uzgojnog prostora (Wei i sur., 2020). Uz navedeno, tradicionalna je akvakultura često ograničena prostorom što može dovesti do različitih problema poput pogoršanja kvalitete vode i pojave bolesti, a posljedično i do povećanog mortaliteta. U posljednje vrijeme odustaje se od tradicionalnog tipa uzgoja zbog visokog rizika, intenzivnog rada, te ozbiljnog zagađenja okoliša (Wei i sur., 2020).

Akvakultura na otvorenom moru odvija se u plutajućim ili u polu-potopivim kavezima. Plutajućim kavezima se lako manipulira, imaju niske troškove održavanja, ali su stalno izloženi različitim vremenskim utjecajima pa moraju biti pravilno dizajnirani i napravljeni od čvrstog materijala (Slika 1.). Polu-potopivi kavezi uglavnom se koriste na otvorenom moru na izloženim lokacijama (Li i Ong, 2017). Takvi kavezi se prilikom jakog vjetera ili oluje spuštaju na određenu dubinu pa je njima komplicirano rukovati. Lokacije na otvorenom moru omogućuju stabilnu kvalitetu vode što pogoduje brzom rastu ribe, ali i kvaliteti krajnjeg proizvoda (Wei i sur., 2020). Uzgoj na otvorenom moru ima prednost zbog veće dubine ispod kaveza, dobre izmjene vode, a posljedično većeg uzgojnog kapaciteta i veće proizvodnje. Osnovni problemi uzgoja na otvorenom moru su izloženost lošim vremenskim uvjetima (Shainee i sur., 2013) i visoka cijena uzgojnih postrojenja.



Slika 1. Plutajući kavezi u uvali Veli Bok

1.1. Uzgoj lubina (*Dicentrarchus labrax*) i orade (*Sparus aurata*)

Uzgoj lubina (*Dicentrarchus labrax*) i orade (*Sparus aurata*) ekonomski je izuzetno važan u Europi te zemljama Mediterana (Altan, 2020) (Slika 2. i 3.). Obje vrste su eurihaline i euritermne, odnosno tolerantne na promjenu saliniteta (3-35 ‰) i temperature, imaju slične karakteristike hranjenja i općenito slične biološke potrebe. Na rast i preživljavanje lubina i orade utječu brojni čimbenici okoliša, odnosno kakvoće morske vode (Cario i sur., 2017; Ng i sur., 2018). Temperatura mora ima važnu ulogu za metaboličke procese koji se odvijaju u vodenim organizmima, a određuje i razinu topivosti plinova u vodenom stupcu. Kisik je važan za sve životne funkcije te utječe na asimilaciju probavljene hrane. Ukoliko su vrijednosti ekoloških čimbenika iznad ili ispod optimalne vrijednosti za određenu uzgajanu vrstu dolazi do stresa, što rezultira smanjenim rastom, poremećajima u reprodukciji te slabijim imunitetom (Hazari i Rathod, 2017). Pored navedenih osnovnih ekoloških čimbenika i parametara kakvoće mora, veliki značaj na rast i preživljavanje morskih organizama ima i mikrobiološka kakvoća mora (Hazari i Rathod, 2017; Ng i sur., 2018). Lošija kakvoća vode uzrokuje stres kod organizama što rezultira invazijom oportunističkih uzročnika bolesti (Arulampam i sur., 1998).

Proces uzgoja započinje u mrjestilištu u kojem se drži matično jato koje može biti uzgojeno ili ulovljeno iz divljine. Osim mriješta u prirodnoj sezoni, u mrjestilištu je moguća manipulacija temperaturom i režimom svjetla, koji su dva osnovna čimbenika spolnog sazrijevanja, kako bi se postigao izvansezonski mriješt. Mriješt i inkubacija oplođenih jaja je prva faza u intenzivnom uzgoju. Nakon valjenja slijedi uzgoj ličinki u kojem je nužna kontrola svih

ekoloških čimbenika, od osnovnih parametara kvalitete morske vode do ishrane. Nakon što ličinke dosegnu dva ili više grama nasaduju se, u Jadranu najčešće tijekom proljeća, u morsku sredinu, u kavezne uzgojne sustave (Moretti i sur., 1999). Zbog nedostatne proizvodnje mlađi u Hrvatskoj, veliki dio se uvozi iz Francuske i Italije (Katavić, 2004). Jedinke se nasaduju u gustoći od 15-20 kg/m³, a maksimalno 30 kg/m³ (Marino i sur., 2012; Katavić, 2005). Riba se u kavezima u moru hrani peletiranom hranom do konzumne veličine (Slika 4.). Hranjenje je najvažniji varijabilni trošak koji čini 50-80 % ukupnih troškova uzgoja (Wei i sur., 2020). Utrošak hrane, stopa rasta i stopa konverzije hrane povezani su s uvjetima u okolišu i fiziološkim čimbenicima (Peck i sur., 2003). Obje vrste trebaju 48-52 % sirovih proteina, 14-16 % masti u fazi mlađi, a kasnijoj fazi uzgoja potrebno im je 43-45 % sirovih proteina te 18-20 % masti (Watanabe, 2002). Hidrološki parametri (visina valova, smjer i brzina morskih struja) te brzina i smjer vjetrova imaju veliki utjecaj na samo hranjenje (Wei i sur., 2020). Prilikom hranjenja riba se podiže prema površini, a manje skuplja na površini kad joj se apetit smanji (Blucock i sur., 2001). Dnevna doza hrane izračunava se prema fiziološkim potrebama ribe u kombinaciji s podacima o temperaturi mora, biomasi riba u kavezu te eventualnoj bolesti uzgojne populacije. Tijekom uzgoja važno je redovito čistiti mrežni teg kako bi se izbjegao prekomjerni obraštaj i naslage koje blokiraju izmjenu vode i ujedno povećavaju težinu kaveza. Osim navedenih čimbenika važna je i gustoća nasada u kavezima. Prevelika gustoća nasada može imati negativne posljedice na proizvodnju što obično za ishod ima smanjeni rast i lošiji zdravstveni status (Wong i sur., 2013).

Vrijeme postizanja konzumne veličine jedinki u uzgojnom ciklusu najviše ovisi o temperaturi mora. U uzgoju u Jadranskom moru za postizanje konzumne veličine lubina potrebno je 20-24 mjeseca, a za oradu 16-20 mjeseci (Moretti i sur., 1999). Nakon što jedinke u uzgoju postignu konzumnu veličinu one se izlovljavaju, te dostavljaju na tržište što je ujedno kraj uzgojnog ciklusa. Tijekom samog procesa uzgoja dolazi do mortaliteta, oko 20 % od ukupno broja nasadenih jedinki, zbog bolesti, kanibalizma, ali i štetnih utjecaja raznih ekoloških čimbenika iz okoliša. Mortalitet je izraženiji tijekom ljetnih mjeseci. Bolesti riba bakterijskog podrijetla jedan su od najvažnijih čimbenika ekonomskih gubitaka u uzgoju (Kapetanović i sur., 2019). Potencijalni bakterijski uzročnici bolesti kod riba obično su bakterije iz vodenog stupca i sedimenta, koje mogu postati patogene u stresnim uvjetima primjerice zbog velike gustoće organizama u uzgoju, povećanja količine organske tvari, povećane koncentracije amonijaka i sumporovodika te niske razine kisika (Kolda i sur., 2020).



Slika 2. Lubin (*Dicentrarchus labrax*)



Slika 3. Orada (*Sparis aurata*)



Slika 4. Hranjenje jedinki peletiranom hranom

1.2. Mikroorganizmi u morskoj vodi

Produktivnost sustava akvakulture ovisi o kakvoći vode. Svako pogoršanje kakvoće vode uzrokuje stres i pojavu bolesti kod riba. Mikroorganizmi imaju važnu ulogu u vodi, te utječu na razgradnju hranjivih tvari, parametre u vodi (koncentraciju otopljenih plinova – ugljikova dioksida, kisika, dušika) i kakvoću vode (Gorlach-Lira, 2013). U moru mogu biti prisutni različiti mikroorganizmi koji su uzročnici bolesti riba. Njihov broj također ovisi o ekološkim čimbenicima u vodenom okolišu, a ujedno ga potiče otpad iz akvakulture (Arulampalam i sur., 1998). Neki od mikroorganizama su obligatno patogeni, uvijek izazivaju bolest nakon što budu uneseni u vodeni okoliš i organizam dođe u kontakt s njima, dok su neki potencijalno (uvjetno) patogeni, te će uzrokovati infekciju nakon stresa, odnosno kada je imunitet uzgajanih organizama narušen (Kapetanović i sur., 2013). Sve veću prijetnju održivosti akvakulturne proizvodnje u priobalnom području predstavljaju klimatske promjene (Cario i sur., 2017), jer porast temperature i zakiseljavanje mora izravno utječu na fiziologiju, kondiciju, zdravstveno stanje, preživljavanje i ponašanje vodenih organizama (Yazdi i Shakouri, 2010). Stoga je nužno pratiti kakvoću mora na uzgajalištima morske ribe, kako bi se na vrijeme mogli poduzeti pravovremeni koraci za sprječavanje uginuća, ali i da se očuva zdravlje i sigurnost kako životinja tako i krajnjih potrošača ljudi. Važan alat u upravljanju akvakulturnom proizvodnjom

predstavlja i znanje iz mikrobiologije, osobito u proučavanju prijenosa bolesti i njihovoj kontroli (Kolda i sur., 2020).

Budući da se u vodenom okolišu nalazi veliki broj bakterija, kralježnjaci koji žive u vodi razvili su mehanizme za simbiotske bakterije. Površina sluznice kralježnjaka predstavlja mehaničku i kemijsku barijeru koja sprječava invaziju patogena, uz istovremenu kolonizaciju sluznice simbiotskim mikroorganizmima (Lowrey i sur., 2015). Mikroorganizmi su važni za razvoj, homeostazu te imunološke funkcije sluznice (Lee i Mazmanian, 2010). Razvoj akvakulture povećao je zanimanje za patologiju morskih vrsta riba. Veliki broj znanstvenika bavi se proučavanjem raznih bakterijskih bolesti koje utječu na jedinke u uzgoju, te pokušavaju pronaći nove metode dijagnostike i prevencije zaraznih bolesti (Strunjak-Perović i sur., 1997). Često se u uzgoju javljaju bakterijske bolesti poput vibrioze, pastereloze, mikobakterioze, bolesti uzrokovane rodom bakterija *Pseudomonas*, *Aeromonas* te *Streptococcus* (Strunjak-Perović i sur., 1997). Bakterije roda *Vibrio* poznati su uzročnici bolesti organizama, te dovode do velikih ekonomskih gubitaka u akvakulturi, što ih čini predmetom interesa znanstvenika. Osim toga, uzročnici su bolesti kod ljudi, poznatih kao zoonoze. Također, kako bi se pratila kakvoća vode na uzgajalištima određuju se mikrobiološki pokazatelji: ukupni koliformi, *Escherichia coli* i enterokoki za potrebe akvakulturne proizvodnje (Kapetanović i sur., 2013).

1.2.1. Bakterije roda *Vibrio*

Ribe dijele svoju životnu sredinu s bakterijama i drugim organizmima u vodi pa tako mogu doći u kontakt s patogenim bakterijama, koje se nalaze u kontaminiranoj vodi. Neke bakterije uključene su u bolesti koje se prenose hranom na ljude, kao što su *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp. te *Shigella* spp. (Kim i Lee, 2017). Riba se ne može zaraziti bakterijama roda *Vibrio*, ako se nalaze u vodi u malim koncentracijama (Kim i Lee, 2017). *Vibrio* su gram-negativne, halofilne bakterije (Iwamoto i sur., 2010) koje su autohtone u morskom okolišu. Podnose širok raspon saliniteta, te lako mogu preživjeti i razmnožavati se u okolišu. Imaju važnu ulogu u razgradnji organske tvari, te prijenosu otopljenog organskog ugljika na više trofičke razine (Kapetanović i sur., 2013). Rod *Vibrio* obuhvaća 63 vrste (Kapetanović i sur., 2013). Pripadnici roda su oportunistički patogeni koji su povezani s infekcijama kod ljudi, ali i kod morskih organizama. *Vibrio* je među najbrojnijim bakterijama u morskom okolišu. Na njegovu brojnost utječu faktori iz okoliša, pa im je brojnost veća u toplijim morima, a ujedno je njihova koncentracija najveća tijekom ljetnih mjeseci. Do varijacija u njihovoj brojnosti dolazi i na područjima gdje su hidrografski parametri (izmjena plime i oseke, morske struje, valovi) stabilni (Gavrilović i sur., 2018). Najveća učestalost ovih bakterija je u organski onečišćenoj vodi pri visokom salinitetu (Kapetanović i sur., 2013). Bolest uzrokovana bakterijom iz roda *Vibrio* prvi put je opisana kod jegulje kao „crvena kuga“, a uzročnika je opisao Canestrini 1893. godine (Strunjak-Perović i sur., 1997). Prvotno uzročnik je nazvan *Bacillus anguillarum*, te je 1909. godine preimenovan u *Vibrio anguillarum*. Tijekom 18. i 19. stoljeća bolest uzrokovana bakterijom roda *Vibrio* bila je veliki problem u morskim uzgajalištima i lagunama diljem Italije. Infekcija kod lubina prvi put je prepoznata 2009. godine, a njeno izbijanje bilo je povezano sa stresom zbog transporta i manipulacije od mrjestilišta do bazena za uzgoj (Gavrilović i sur., 2012). U posljednje vrijeme infekcije koje uzrokuju bakterije iz roda *Vibrio* sve su učestalije. Većina infekcija se javlja tijekom ljetnih mjeseci i rane jeseni, što je povezano s povećanom temperaturom mora. Bakterije roda *Vibrio* u organizam mogu dospjeti preko oštećene kože, škrga te probavnog sustava. Zaraza se može prepoznati tako što jedinke imaju manji apetit, konstantno je prisutan nizak mortalitet, a po trbuhu, na perajama te škrgama i jetri vidljiva su točkasta krvarenja (Strunjak-Perović i sur., 1997). *Vibrio* se najbolje može identificirati na selektivnom mediju kao što je Tiosulfat – citrat žučne soli – saharoze tj. TCBS agar (Iwamoto i sur., 2010). Poznato je da se kod riba može izolirati iz škrga, sluzi kože te sadržaja crijeva (Kapetanović i sur., 2013).

Vibrioza je također jedna od najčešćih bakterijskih bolesti lubina (Gavrilović i sur., 2018). Učestalost bolesti i glavni bakterijski patogeni u uzgoju, u Hrvatskoj dobro su dokumentirani (Kapetanović i sur., 2019). Veliki broj riba pogađa infekcija s *V. anguillarum*, koji izaziva bolest vibriozu, te dovodi do ekonomskih gubitaka u akvakulturi (Kim i Lee, 2017). Ova vrsta može biti sastavni dio bakterijske flore nekih morskih vrsta riba, beskralježnjaka, a nalazi se i u bentosu (Strunjak-Perović i sur., 1997). U posljednje vrijeme uočeno je da i *V. harveyi* predstavlja problem kod lubina u uzgoju. *V. alginolyticus* je uvjetno patogeni mikroorganizam, jer može uzrokovati infekciju kod riba s visokom stopom smrtnosti, ako im je imunost oslabljena. Javno zdravstvo prati infekcije kod riba u akvakulturi. *V. alginolyticus* je dominantna vrsta, a slijede ga *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* te *V. vulnificus* (Kapetanović i sur., 2013).

Liječenje vibrioze pravilnim odabirom kemoterapeutika doprinijelo bi značajnom smanjenju ekonomskih gubitaka, te bi se spriječilo stjecanje rezistencije na kemoterapeutike, te ujedno doprinijelo boljoj kondiciji i kvaliteti mlađi za daljnji uzgoj (Gavrilović i sur., 2012). Vibrioza se liječi kombinacijom formalinskih kupki koncentracije 100 ppm i peroralnom primjenom komercijalnog preparata Timetosul u dozi od 0,125 ml/kg ribe (Gavrilović i sur., 2012).

Bakterijama roda *Vibrio* mogu se zaraziti ljudi koji konzumiraju sirovu ili nedovoljno termički obrađenu ribu (Iwamoto i sur., 2010). U SAD-u najčešća vrsta iz roda *Vibrio* je *V. parahaemolyticus*, dok i druge vrste iz roda *Vibrio* mogu uzrokovati akutni gastroenteritis (Scallan i sur., 2011).

1.2.2. Bakterije roda *Aeromonas*

Bakterije roda *Aeromonas* su ubikvitarne u vodenom okolišu i rasprostranjene su u čistim, ali i organski onečišćenim slatkim i bočatim vodama (Strunjak-Perović i sur., 1997). Njihovo prisustvo u moru ovisi o salinitetu, ako je salinitet visok smanjen im je rast i razmnožavanje. Rod *Aeromonas* obuhvaća oko 14 vrsta (Smyrli i Katharios, 2020). Bakterije ovog roda sastavni su dio crijevne mikroflore kod zdravih riba (Strunjak-Perović i sur., 1997). *A. hydrophila* predstavlja konstantnu opasnost za pojavu bolesti kod riba. Bolest se javlja kada je jedinkama narušeno zdravlje npr. zbog drugih bolesti, nagle promjene temperature vode, pada koncentracije kisika, veće količine organske tvari, velike nasadne gustoće te povećane koncentracije amonijaka (Strunjak-Perović i sur., 1997). Zaražene jedinke imaju slabiji apetit, tamniju kožu te dolazi do iznenadnog uginuća, dok se u kasnijim stadijima javljaju krvarenja po tijelu (Strunjak-Perović i sur., 1997). U Mediteranu se bakterije ovog roda mogu izolirati u obalnim morskim vodama, bočatoj vodi i sedimentu, ali i iz naizgled zdravih morskih riba (Scarano i sur., 2018; Martinez i sur., 2010). Često se kod jedinki lubina i orade izolira u niskoj koncentraciji te obično s drugim bakterijama poput onih iz rodova *Vibrio* i *Pseudomonas* (Yardimci i Timur, 2015; Martino i sur., 2011). Kod lubina patogeni iz roda *Aeromonas* su *A. hydrophila*, *A. veronii* *bv. sobria* i *A. salmonicida* (Smyrli i Katharios, 2020). Sve veću pažnju kako u akvakulturi tako i u slatkim vodama posvećuje se *A. veronii* *bv. sobria* koji je potencijalni patogen. U posljednjih nekoliko godina taj uzročnik stvara velike probleme prilikom uzgoja lubina u Grčkoj i u Crnom moru. Bolest uzrokovana ovim uzročnikom prvi put se pojavila 2008. godine u Grčkoj i to kod jedinki lubina komercijalne veličine, a u posljednje vrijeme javlja se i kod jedinki do 50 grama. Smrtnost može biti i do 80 % ako se jedinke ne liječe antibioticima (Smyrli i Katharios, 2020).

1.2.3. Bakterije roda *Pasterela*

Pastereloza ili fotobakterioza je bolest koja je utvrđena kod lubina i kod orade. Bolest je poznata i kao pseudo-tuberkuloza zbog procesa sličnih onima kod tuberkuloze (Miccoli i sur., 2019). U intenzivnom uzgoju lubina smatra se primarnim uzročnikom uginuća zajedno s vibriozom (Gravningen i sur., 1998). Uzročnik je halofilna, gram-negativna bakterija *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (ranije *Pasteurella piscicida*) (Miccoli i sur., 2019). Za uspješno liječenje je važno da se bolest brzo dijagnosticira, jer nisu prisutni vanjski znakovi bolesti poput tamnije boje tijela niti površinske lezije. Bakterija se prenosi izravno s jedinke na jedinku, a uvjeti u uzgoju koji tome doprinose su: povećana gustoća jedinki u kavezu, temperatura mora veća od 23 °C, salinitet između 20 i 30 ‰ te niska koncentracija kisika (Hawk i sur., 1987). Bolest se javlja kao epizootija tijekom ljetnih mjeseci kada je temperatura mora viša. Prilikom pojave bolesti prisutne su bijele kvržice na površini unutarnjih organa, osobito na bubregu i slezeni (Casarano i sur., 2021). Uzročnik pastereloze bio je izoliran 1963. godine tijekom velike epizootije u zaljevu Chesapeake, SAD iz prirodne populacije bijelog grgeča (Toranzo i sur., 1991). U Japanu ova bolest stvara značajne ekonomske gubitke. Standardni mikrobiološki dijagnostički postupci mogu biti ometani sporim rastom ove bakterijske vrste, pa su razvijene dijagnostičke tehnike koje se temelje na specifičnim antitijelima (Miccoli i sur., 2019).

1.2.4. Bakterije roda *Mycobacterium*

Mikobakterioza je bakterijska bolest koju uzrokuje bakterija iz roda *Mycobacterium*. Rod *Mycobacterium* sadrži 188 vrsta, te obuhvaća nekoliko vrsta koje uzrokuju mikobakteriozu (Davidovich i sur., 2020). Uzročnik *Mycobacterium marinum* je prvi put izoliran 1926. godine. Ova bolest pogađa slatkovodne i morske vrste riba. U Izraelu je ovaj uzročnik opisan prvi put 1990. godine, kao uzročnik infekcije kod uzgajanog lubina (Davidovich i sur., 2020; Cascarano i sur., 2021). Izvor zaraze mogu biti uginule jedinke, hrana proizvedena od kontaminiranih otpadaka tvornički prerađene ribe (Strunjak-Perović i sur., 1997). Jedinke se zaraze preko probavnog sustava, a oboljele ribe mršave, gube boju i sekundarne spolne značajke (Strunjak-Perović i sur., 1997). Također javljaju se kronične i subkronične infekcije kože i unutarnjih organa koje rezultiraju lezijama i granulomima (Cascarano i sur., 2021). Postoje dokazi da se mikobakterioza pod određenim okolnostima može povući, ali oporavljene jedinke su nositelji latentne infekcije (Davidovich i sur., 2020). Vodene mikobakterije izazivaju zoonotske bolesti koje se s ribe prenose na ljude. Na uzgajalištima u južnom Jadranu te u Tirenskom priobalju zabilježena je mikobakterioza kod lubina, nekoliko puta pri temperaturama od 19 °C i 21 °C. Također, zabilježena je duž obale Turske u Egejskom moru pri istim temperaturama. Uzročnik bolesti teško se iskorjenjuje jer može godinama preživjeti u vodenom okolišu (Davidovich i sur., 2020). *M. marinum* jedna je od najčešćih atipičnih mikobakterija koje potencijalno uzrokuju infekcije kod ljudi (Rallis i Koumantaki-Mathioudaki, 2007). Kod ljudi s oslabljenim imunitetom infekcije se mogu proširiti u dublje tkivo, te tako uzrokovati artritis te tendinitis (Holden i sur., 2018). Liječenje kod ljudi je dugotrajan proces liječenja s antibioticima, te su u pojedinim slučajevima neophodni i operativni zahvati (Holden i sur., 2013). Tijekom posljednjih nekoliko godina razvijeni su brzi testovi za određivanje *Mycobacterium* vrsta. Jedan od načina identifikacije uzročnika je upotreba MALDI sustava (Kurokova i sur., 2013).

1.3. Liječenje i profilaksa

U veterinarskoj medicini kod kopnenih životinja pa tako i u akvakulturi potrebno je prvo identificirati uzročnika bolesti koji je odgovoran za izazivanje bolesti. Ako se radi o bakterijskom patogenu ili bakterijskim patogenima potrebno je odrediti njihovu antibakterijsku osjetljivost (Rigos i sur., 2021). Idealno je da se antibiotici primjenjuju u uzgoju oralno tj. da se oni nalaze u hrani. Preko hrane unose se lijekovi u organizam riba, te je za izračunavanje doze lijekova potrebno znati kolika je temperatura mora jer o njoj ovisi hranjenje (Tort i sur., 2004). U slučajevima kada se kod lubina i orade vibrioza i pastereloza razvijaju brzo, antibakterijski tretmani su neuspješni, ako se ne primjene odmah nakon prvih znakova bolesti (Rigos i sur., 2021). Lijek koji će se primjenjivati treba odabrati u skladu sa specifičnim karakteristikama bolesti. U zemljama Europske unije upotreba antibiotika podliježe strogim propisima EU, kao i nacionalnim propisima.

Za prevenciju pojave bolesti uzrokovanih bakterijskim patogenima u akvakulturi u posljednje se vrijeme sve više koriste cjepiva. Iako je broj komercijalnih cjepiva još uvijek ograničen, ona su razvijena za većinu uzročnika bakterijskih bolesti riba. Primjerice, jedinke lubina se u mrjestilištima u današnje vrijeme redovito cijepe protiv vibrioze i pastereloze, pri čemu se vakcina aplicira kupkom. Kod mlađi u kavezima se primjena kupki ne preporuča zbog utjecaja na povećanje otpornosti bakterija, te zbog utjecaja na okoliš (Rigos i sur., 2021), ali se zato provodi revakcinacija mlađi injektiranjem (Kayansamruaj i sur., 2020). Osim injektiranje, određene vaccine je moguće aplicirati sprej metodom. (Subasinghe, 2009).

1.4. Utjecaj akvakulture na okoliš

Potencijalni učinci akvakulture na okoliš su raznoliki, od estetskih aspekata do izravnih pojava onečišćenja (Vukić Lušić i sur., 2019). Akvakulturom se u okoliš unose produkti metabolizma riba (izmet, izlučevine) te nepojedena hrana. Količina i sastav hranjivih tvari koje se ispuštaju u vodu ovisi o intenzitetu proizvodnje te o konverziji hrane kao i o sadržaju fosfora i dušika u hrani (Teodorowicz, 2013). Sve veća pažnja u svijetu posvećuje se metabolitima uzgajanih organizama, poput amonijakalnog dušika te ureje, zajedno s nepojedenom hranom jer se na taj način uništavaju prirodna staništa i nastaju promjene u strukturi i dinamici lokalnih zajednica organizama u moru (Gorlach-Lira i sur., 2013). Uzgoj u marikulturi ima slične učinke na bentos kao i ostali izvori organskog onečišćenja, koji uzrokuju nedostatak kisika, a posljedično dolazi i do promjena u raznolikosti bentosa (Sanz- Lázaro i Marín, 2011). Osim što akvakultura utječe na okoliš, također i na akvakulturu utječu brojni čimbenici iz okoliša na koje treba obratiti pažnju. Svi navedeni učinci razlog su zašto je potrebno provoditi redoviti monitoring u marikulturi, koji uglavnom obuhvaća hidrološke pokazatelje te one o kakvoći morske vode, a koji uključuju temperaturu morske vode, pH, otopljeni kisik, nitrite, amonijak, klorofil te druge pokazatelje (Devi i sur., 2017). Na osnovu rezultata monitoringa određuju se tehnološke mjere koje je potrebno poduzeti. Primjerice, niža konverzija se postiže primjenom pravilnih tehnoloških mjera kojima se spriječava prekomjerno rasipanje hrane koja će negativno utjecati na okoliš. Pored toga, moguće je radi bolje iskoristivosti dnevnu količinu hrane podijeliti u nekoliko obroka ili pak gustoću nasada prilagoditi kvaliteti mora na uzgojnom području (Ennouri i sur., 2021; Devi i sur., 2017).

Iako se marikultura brzo povećava diljem svijeta, najkontroverznije pitanje je vezano za posljedice obogaćivanja organskom tvari morske vode i sedimenta (Culha i Karduman, 2020). Primjenom dobre proizvodne prakse negativni učinci su svedeni na minimum, te se promjene u morskom okolišu ne mogu detektirati na udaljenosti većoj od 100 metara od kaveza (Vukić Lušić i sur., 2019).

2. Cilj istraživanja

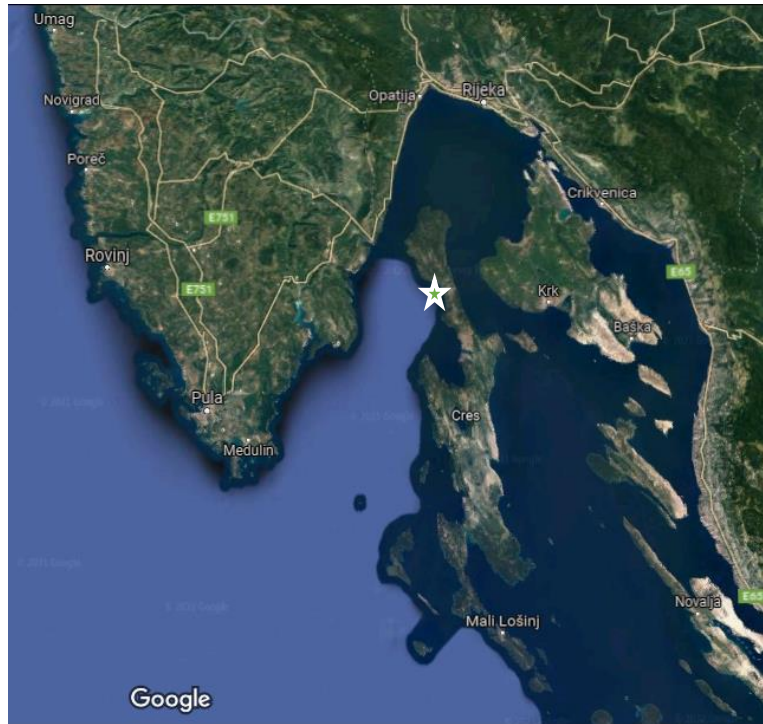
Cilj rada je utvrditi brzinu rasta i postotak preživljavanja lubina (*Dicentrarchus labrax*) i orade (*Sparus aurata*), morskih vrsta riba uzgajanih u uvali Veli Bok na otoku Cresu tijekom uzgojnog procesa, te utvrditi eventualni utjecaj čimbenika kakvoće mora na rast jedinki u uzgoju. Pored toga istražiti će se mikrobiološka kakvoća mora na uzgajalištu lubina i orade zbog mogućeg utjecaja na preživljavanje jedinki u uzgoju, osobito kod pojave povećanog mortaliteta.

3. Područje istraživanja

Područje istraživanja nalazi se u sjevernom dijelu Jadranskog mora, kod otoka Cresa. Jadransko more je dio Sredozemnog mora, kojeg karakteriziraju jedinstvene značajke okoliša poput: temperature vodenog stupca (zimi oko 18 °C, a ljeti oko 26 °C), mikrotidalnog režima, olifotofnih uvjeta s niskom primarnom produkcijom, niske razine biomase fitoplanktona, male količine čestica organske tvari, visoke razine kisika (Giangrande i sur., 2021). Takvi uvjeti pogoduju uzgoju riba i školjkaša. Sredozemno more možemo podijeliti na zapadni i istočni bazen koji su povezani plitkim Sicilijanskim kanalom (Casarano i sur., 2021). Razlike u temperaturi su neznatne, što ukazuje na blage zime s površinskom temperaturom 16-20 °C, iako su temperature u sjevernijim regijama niže. Tijekom ljeta temperature su 24-28 °C, a istočni bazen je topliji za 2 °C u odnosu na zapadni. Zbog svoje zatvorenosti Sredozemno more je osjetljivo na globalno zagrijavanje na što ukazuju i podatci o zagrijavanju tijekom posljednjih 50 godina.

Jadransko more je ogranak Sredozemnog mora, a čini samo 4,6 % njegove ukupne veličine (Viličić, 2014). Od Jonskog mora odvojeno je Otrantskim vratim. Većina Jadrana je plića od 200 metara dubine, a najveća dubina izmjerena je u Južnojadranskoj kotlini (1 228 m). Sjeverni dio Jadrana je pod velikim utjecajem rijeke Po, koja je važan izvor hranjivih tvari (Viličić, 2014).

Uzorci su prikupljeni u uvali Veli Bok otoka Cresa u kojoj je smješteno uzgajalište lubina i orade tvrtke Orada Adriatic d.o.o. (Slika 5. i 6.). Uvala je smještena na sjevero-zapadnoj obali otoka, te je pristup uzgajalištu moguć samo morskim putem. Uzgajalište se prostire na 120 hektara, te je izvan zaštićenog obalnog područja (Oikon, 2012). Uzgajalište se sastoji od kaveza promjera 22 i 25 m, a dubina ispod kaveza je 50 metara. Poziciju uzgajališta odlikuju jake morske struje te iznimna čistoća mora (<https://www.royal-adriatic.com/>).



Slika 5. Uvala Veli Bok, otok Cres
(Izvor: www.google.com/maps)



Slika 6. Uzgajalište u uvali Veli Bok, Cres

4. Materijali i metode

4.1. Praćenje rasta i preživljavanja

Istraživanje smo proveli u razdoblju od svibnja 2020. godine do srpnja 2021. godine na uzgajalištu Veli Bok, na otoku Cresu. Provedeno je na jednom uzgojnom kavezu lubina i jednom orade. U svaki kavez zaposleni uzgajališta nasadili su 130 000 jedinki (Slika 7.). Jedinke su nasadene tijekom svibnja 2020. godine. Pratila sam rast i preživljavanje mlađi lubina i orade, a smrtnost sam bilježila dnevno. Biometrija jedinki tj. parametre rasta (maseni i dužinski) mjerila sam prva tri mjeseca svakih 15 dana, a potom jednom mjesečno. Po uzorku koristila sam po 30 jedinki mlađi svake vrste. Za biometrijsku analizu koristila sam vagu i ihtiometar (Slika 8.). Mjerila sam standardnu te ukupnu dužinu jedinki kako bi bilo moguće usporediti dobivene podatke s onima koji se koriste na sličnim uzgajalištima. Standardna dužina jedinki mjeri se od vrha glave do korijena repne peraje, dok se ukupna dužina jedinki mjeri od vrha glave do kraja repne peraje. Sve podatke koje sam prikupila tijekom istraživanja upisala sam u Excel tablice, te sam posebno obrađivala za lubina, a posebno za oradu. Microsoft Excel koristila sam za izradu tablica i grafikona. Na kraju istraživanja, za svaki mjesec uzorkovanja, izračunala sam:

- broj jedinki u kavezu (vrijednosti su umanjene za broj uginulih jedinki u tom razdoblju),
- prosječnu masu jedinki u kilogramima,
- ukupnu masu jedinki u kilogramima,
- ukupno utrošenu količinu hrane (kg) tijekom jednog mjeseca po kavezu,
- prosječnu dnevnu količinu hrane po jedinki (kg),
- faktor konverzije (FK),
- indeks kondicije (IK) računat sa standardnom dužinom jedinki,
- indeks kondicije (IK) računat s ukupnom dužinom jedinki,
- postotak preživljavanja tijekom svakog mjeseca, kao i na kraju istraživanog razdoblja.

Faktor konverzije (FK) ukazuje koliko su jedinke narasle obzirom na utrošenu hranu, a računa se na temelju formule (Havasi i sur., 2015):

$$FK = I (g) / WD$$

FK je faktor konverzije, I je ukupna količina hrane za jedan mjesec, a WD je ukupna masa ribe. Indeks kondicije (IK) opisuje fiziološko stanje riba, te se izračunava pomoću Fulton-ovog koeficijenta na temelju formule (Bavčević, 2014):

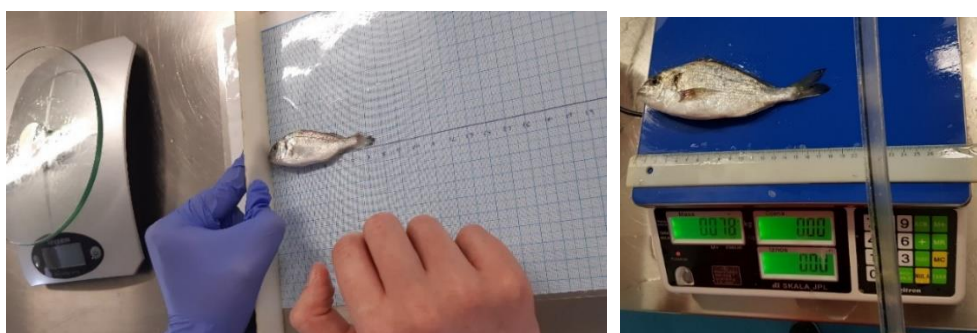
$$IK = (W/L^3) \cdot 100$$

IK je indeks kondicije, W je masa u gramima, L je dužina jedinke u centimetrima koja se kubira, množi se sa 100 kako bi se izjednačile mjerne jedinice.

Kako se u literaturi za izračun indeksa kondicije najčešće koristi ukupna dužina jedinki, a na većini uzgajališta standardna, izračunavana su oba indeksa kako bi se podatci mogli potpunije usporediti s onima iz literature.



Slika 7. Uzorak mlađi orade i lubina za biometriju



Slika 8. Mjerenje duljine jedinki te vaganje mase ribe

4.2. Uzorkovanje morske vode

Jednom tjedno, tijekom cijelog razdoblja istraživanja, ručnom sondom (YSI pro DSS) na srednjoj dubini kaveza mjerila sam temperaturu, koncentraciju kisika te postotak zasićenosti mora kisikom (Slika 9.).

Morsku vodu za mikrobiološku analizu uzrokovala sam zajedno s timom projekta AqADAPT, na uzgajalištu i kontrolnoj točki. Uzorke morske vode prikupili smo u sterilne boce (0,5L) pomoću Niskinovog crpca (Slika 10.). Uzorkovanje mora obavljano je kvartalno s četiri dubine: 0,5 m, 6 m i 12 m ispod površine te 0,5 m iznad dna (na dubini od 50 metara).

Uzorke mora sam također prikupila i iz transportnih bazena pri prispijeću pošiljki mlađi lubina i orade iz mrijestilišta na uzgajalište. Uzorak morske vode uzela sam iz transportnih tankova u sterilne boce (0,5L) kako bi se utvrdila eventualna prisutnost patogenih mikroorganizama koji se mogu unijeti na područje uzgajališta tijekom nasađivanja mlađi iz mrijestilišta u kaveze (Slika 11.). Nakon uzorkovanja boce s uzorcima prenesene su u hladnjacima do laboratorija na daljnju analizu.



Slika 9. Ručna sonda za mjerenje temperature te koncentracije i postotka zasićenja mora kisikom



Slika 10. Uzorkovanje pomoću Niskinovog crpca na različitim dubinama

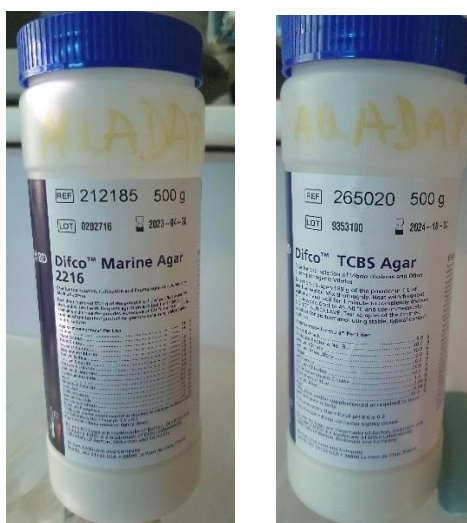


Slika 11. Transportni tankovi na kamionu, te unutrašnjost tanka

4.3. Mikrobiološka analiza morske vode

Prikupljene uzorke morske vode analizirala sam u Laboratoriju za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Uzorke morske vode s četiri različite dubine na dvije postoje (uzgajalište i kontrola) serijski sam razrijedila sa sterilnom 0.9 % NaCl B. Braun 9 mg/ml otopinom (Pliva). Hranjive podloge za mikrobiološku analizu napravila sam tako što je agar otopljen u Mili-Q vodi, te sam podloge pripremila na odgovarajućoj temperaturi prema uputama proizvođača (Slike 12. i 13.). Serijski razrijeđene uzorke morske vode (1 mL), inokulirala sam metodom širenja na Difco™ Marine Agar 2216 (BD) podlozi i inkubirala na 22 °C kroz 3-5 dana, za određivanje ukupnog broja heterotrofnih bakterija (eng. *Heterotrophic Plate Count, HPC*). Za izolaciju bakterija roda *Vibrio* koristila sam metodu širenja po selektivnoj podlozi (1 mL) Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose – TCBS (Difco™, BD) (Slika 14.) (Kapetanović i sur., 2013). Podloge sam inkubirala na 22 °C tijekom 24 sata, a dobivene rezultate sam izrazila kao broj izraslih kolonija (eng. *Colony-forming unit, CFU*) u 1 mL uzorka (Slika 15. i 16.).

Mikroorganizmi koji su pokazatelji fekalnog onečišćenja odredila sam uporabom definirane supstrat tehnologije. Za određivanje broja ukupnih koliformnih bakterija (UKB) i *E. coli* (EC) koristila sam Colilert-18™, a za određivanje broja enterokoka (ENT) Enterolert-E™ test prema uputama proizvođača (IDEXX). Uzorci vode s Colilert-18 testom inkubirala sam kroz 18 sati na 35 °C (Slika 17.). Nakon inkubacije, na prisutnost ukupnih koliforma ukazivale su žute komorice. Prisutnost *E. coli* utvrđena je fluorescencijom pod UV svjetlom prethodno pozitivnih, žutih komorica (Slika 18.).



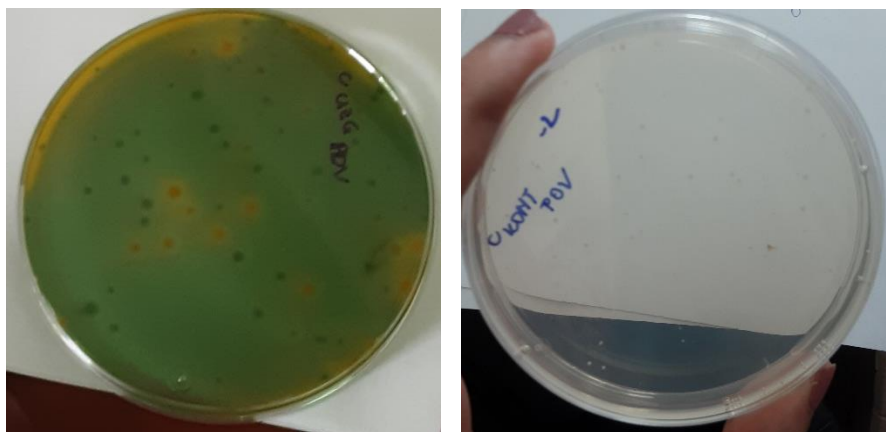
Slika 12. Praškasta smjesta za izradu hranjivih podloga



Slika 13. Autoklav i autoklaviranje Difco™ Marine Agar 2216 hranjivih podloga



Slika 14. Skuhane TCBS podloge, te izlivenne u Petrijeve zdjelice u kojima se suše pod UV svjetlom



Slika 15. Izrasle kolonije na inokuliranim podlogama



Slika 16. Brojanje izraslih bakterijskih kolonija



Slika 17. Uzorci u komoricama pripremljeni za inkubaciju te njihova inkubacija u inkubatoru na 35 °C



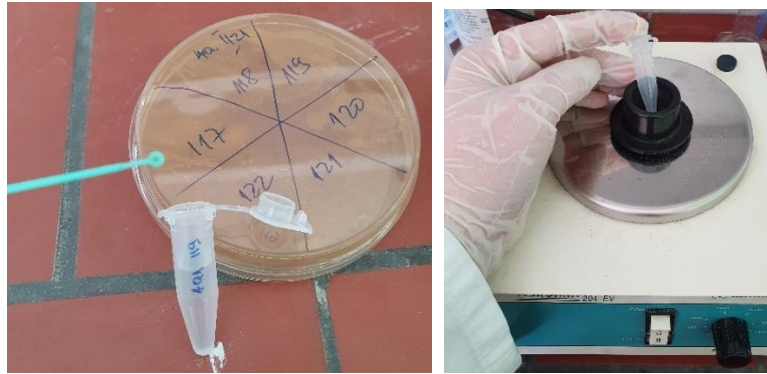
Slika 18. Colilert-18 test: žute komorice ukazuju na ukupne koliforme, a fluorescentne komorice pod UV svjetlom ukazuju na *E. coli*

4.4. Izolacija bakterija

Nakon što su kolonije bakterija izrasle na neselektivnoj podlozi Difco™ Marine agaru i na selektivnoj TCBS podlozi, bakterijske kolonije različitih morfologija odabrala sam za pročišćavanje i identifikaciju. Važno je bilo uzeti što više različitih kolonija kako bih dobila reprezentativnu sliku. Sterilnom ušicom (ezom) prenijela sam svaku koloniju posebno na podlogu Tryptic soy agar (BD BBL™) s dodatkom 1 % NaCl-a (Kemika), te sam razmazala po podlozi kako bi uzgojila čiste kolonije (Slika 19.). Izrasle čiste kolonije potom sam dala na identifikaciju s uporabom MALDI-TOF-a (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight; matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja-analizator masa s vremenom leta) za spektrometriju masa (MS) u Laboratorij za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku Instituta Ruđer Bošković. MALDI-TOF MS je automatizirana analitička tehnika u kojoj se čestice bakterija ioniziraju, odvajaju prema njihovom omjeru mase i naboja, te mjere određivanjem vremena potrebnog ionima da putuju do detektora. Nastali maseni spektar generira poseban profil za određeni bakterijski uzorak. Jedinstvenost masenog spektra se koristi u svrhu identifikacije bakterija temeljem usporedbe s dostupnim usporednim referentnim spektrom. Uspješna identifikacija bakterija pomoću MALDI-TOF MS se oslanja na bazu podataka koja sadrži spektre poznatih bakterija. Također, dobivene čiste kolonije izoliranih bakterija spremila sam u kriotubice tako što sam ezom prenijela bakterije u kriotubicu u koju sam prethodno stavila 1 mL fiziološke otopine te potom dodala 0,5 mL glicerola. Nakon toga, kriotubice sam stavila na miješalicu (VIBROMIX 204 EV) kako bi se sadržaj promiješao, a na koncu sam ih spremila u hladnjak na -20 °C, kako bi se mogle u budućnosti koristiti za daljnje molekularne analize (Slika 20.).



Slika 19. Čiste kolonije bakterija



Slika 20. Spremanje čistih kolonija bakterija za daljnju molekularnu analizu

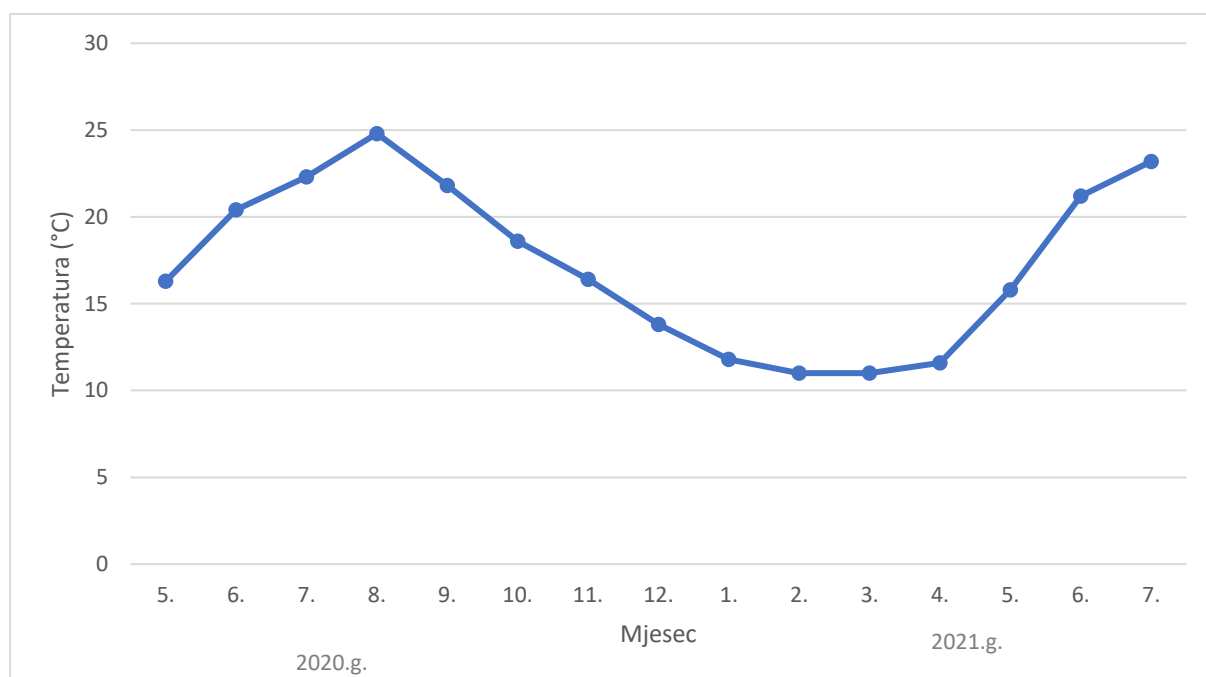
4.5. Statistička analiza podataka

Spearmanovu korelaciju koristila sam za analizu odnosa između srednjih mjesečnih vrijednosti (vremenskih nizova) rasta i mortaliteta riba za svaku vrstu posebno, s temperaturom i koncentracijom otopljenog kisika. Za svaki mikrobiološki pokazatelj izračunala sam srednju vrijednost te standardnu devijaciju. Za usporedbu broja mikroorganizama na različitim dubinama koristila sam deskriptivnu statistiku, kao i Mann-Witney i Kruskal-Wallis test koji su napravljeni s pomoću statističkog paketa SigmaPlot 11. Zbog provedbe statističke analize, utvrđena vrijednost <10 MPN/100mL za fekalne pokazatelje (ukupne koliforme, *E. coli* i enterokoke) sam umanjila za koeficijent 0,1 i vrijednosti su analizirane kao 9,9 MPN/100mL.

5. Rezultati

5.1. Temperatura mora

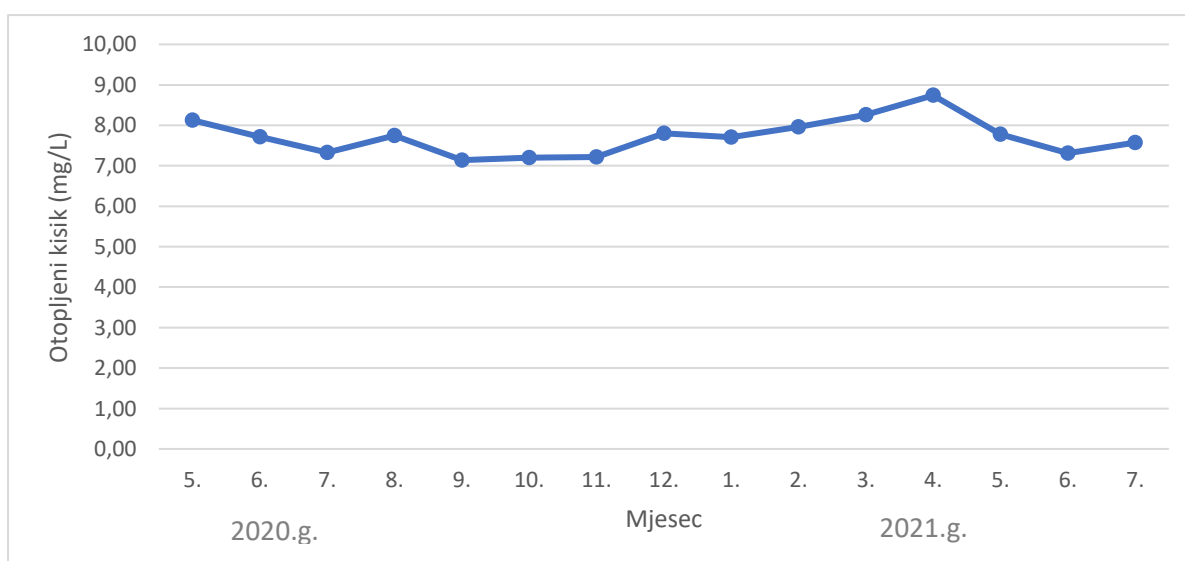
Prilikom nasađivanja mlađi lubina i orade u kaveze prosječna temperatura mora je bila 16 °C, te je rasla tijekom ljetnih mjeseci, dok je početkom jeseni počela padati (Slika 21.). U istraživanju, najviša prosječna temperatura mora zabilježena je u kolovozu 2020. godine, te je iznosila 24.8 °C. Najmanja prosječna vrijednost zabilježena je tijekom veljače i ožujka 2021. godine kada je iznosila svega 11 °C. Tijekom cijelog istraživanja najviša zabilježena temperatura iznosila je 26 °C u srpnju 2021. godine, dok je najniža temperatura zabilježena 10,5 °C tijekom veljače i ožujka 2021. godine. Spermanovom korelacijom uočena je statistički značajna korelacija temperature mora sa sadržajem kisika ($r=-0,64$; $P=0,0093$).



Slika 21. Prosječne mjesečne temperature tijekom uzgojnog ciklusa lubina (*D. labrax*) i orade (*S. aurata*)

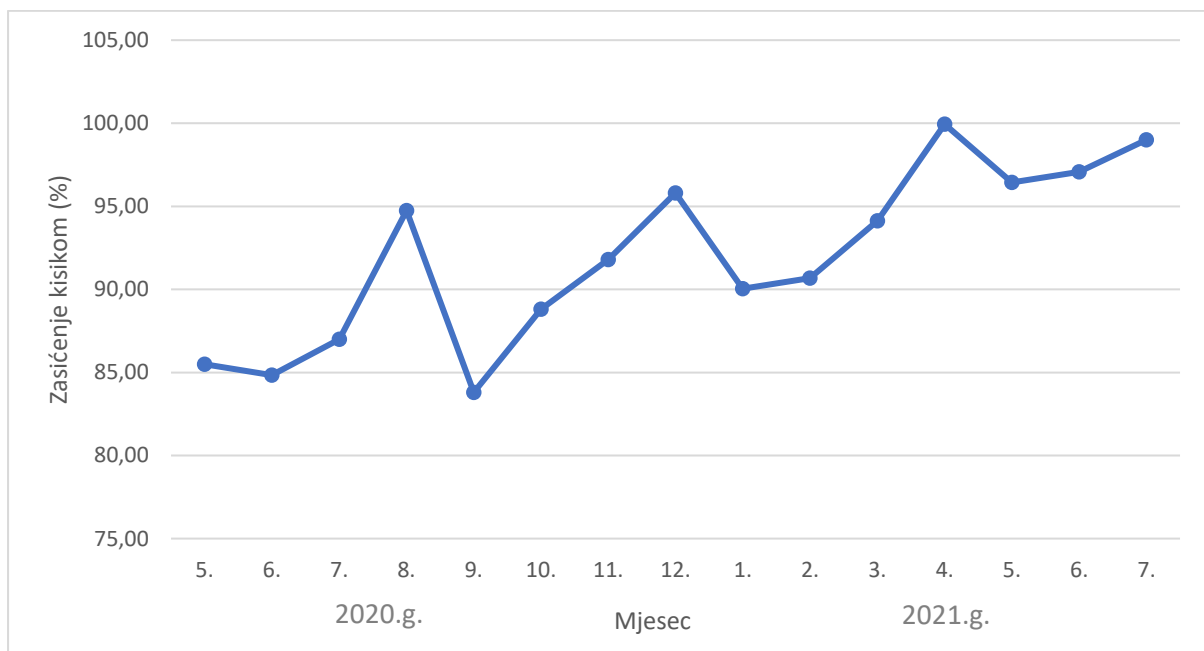
5.2. Vrijednost otopljenog kisika i postotak zasićenja morske vode kisikom

Na slici 22. vidljive su varijacije otopljenog kisika u moru tijekom istraživanja. Prosječna vrijednost koncentracije otopljenog kisika u moru na uzgajalištu tijekom cijelog razdoblja iznosila je 7,71 mg/L. Najviše otopljenog kisika je bilo u travnju 2021. godine (8,74 mg/L), dok je najmanje otopljenog kisika bilo u rujnu 2020. godine (7,14 mg/L). Kod jedinki lubina Spermanovom korelacijom nije uočena statistička značajna korelacija između koncentracije otopljenog kisika u moru na uzgajalištu i mase lubina u uzgoju, koncentracije otopljenog kisika i broja uginulih jedinki tijekom uzgoja te koncentracije otopljenog kisika i indeksa kondicije lubina u uzgoju. Jednaki su rezultati statističke analize Spermanove korelacije i za jedinke orade u uzgoju. Statističkom analizom uočena je vrlo visoka, statistički značajna ($P < 0,05$) pozitivna korelacija između zasićenosti morske vode na uzgajalištu s kisikom i mase uzgajanih lubina ($r = 0,793$, $P = 0,0000$), standardne dužine lubina ($r = 0,836$, $P = 0,0000$), kao i ukupne dužine uzgajanih lubina ($r = 0,836$, $P = 0,0000$). Istovremeno, uočena je visoka statistički značajna ($P < 0,05$) pozitivna korelacija između zasićenosti morske vode na uzgajalištu s kisikom i mase uzgajanih orada ($r = 0,829$, $P = 0,0000$), indeksa kondicije uzgajanih orada ($r = 0,668$, $P = 0,0061$), standardne dužine orada ($r = 0,739$, $P = 0,0011$), kao i ukupne dužine uzgajanih orada ($r = 0,789$, $P = 0,0000$). S druge strane, utvrđena je visoka negativna korelacija zasićenosti morske vode na uzgajalištu s kisikom u odnosu na broj uginulih orada (mortaliteta) $r = -0,713$, $P = 0,0035$.



Slika 22. Prosječne mjesečne vrijednosti otopljenog kisika u morskoj vodi, izražene u mg/L, tijekom uzgojnog ciklusa lubina (*D. labrax*) i orade (*S. aurata*)

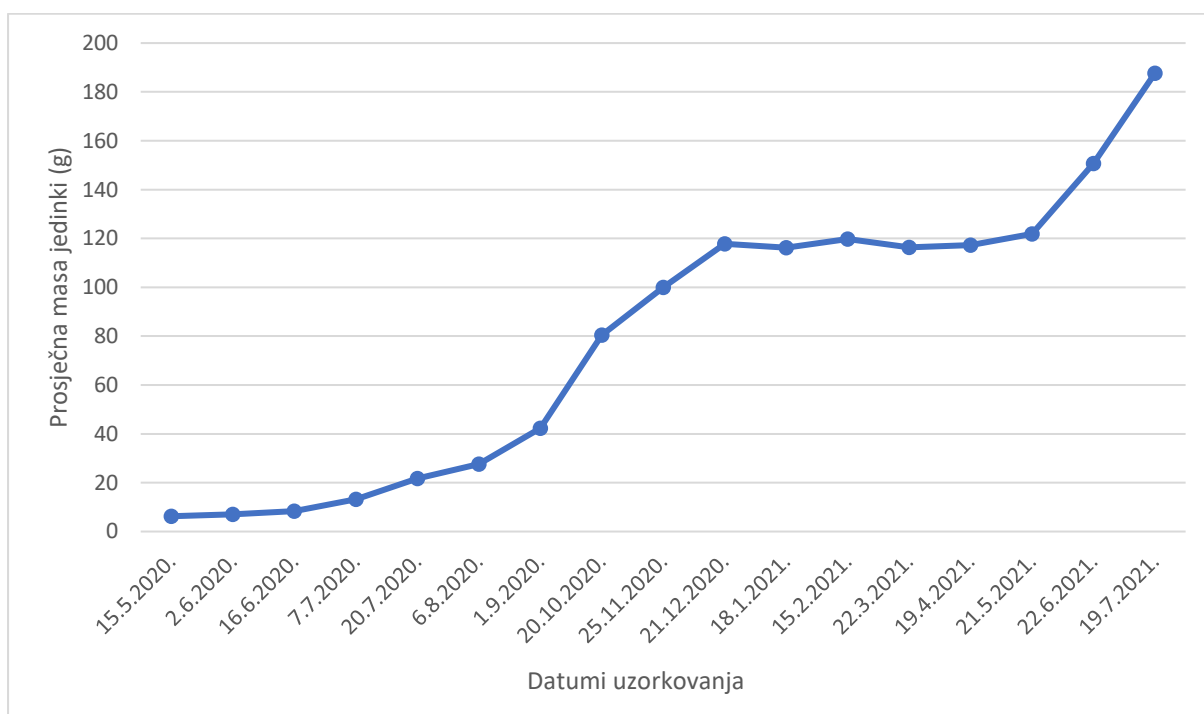
Na slici 23. prikazane su vrijednosti prosječnog mjesečnog zasićenja morske vode kisikom u postocima (%). Ovdje su vidljive izraženije varijacije prosječnog mjesečnog zasićenja morske vode (%), koje su u skladu s varijacijama koncentracije otopljenog kisika u morskoj vodi (mg/L), prikazanima na slici 22. Raspon zasićenja morske vode s kisikom je od 83,8 % do 99,94 %. U istraživanom razdoblju ukupno prosječno zasićenje iznosilo je 91,97 %. Najmanje zasićenje kisikom zabilježeno je u rujnu 2020. godine, dok je najveće zabilježeno travnju 2021. godine.



Slika 23. Prosječno mjesečno zasićenje morske vode s kisikom u % tijekom uzgojnog ciklusa lubina (*D. labrax*) i orade (*S. aurata*)

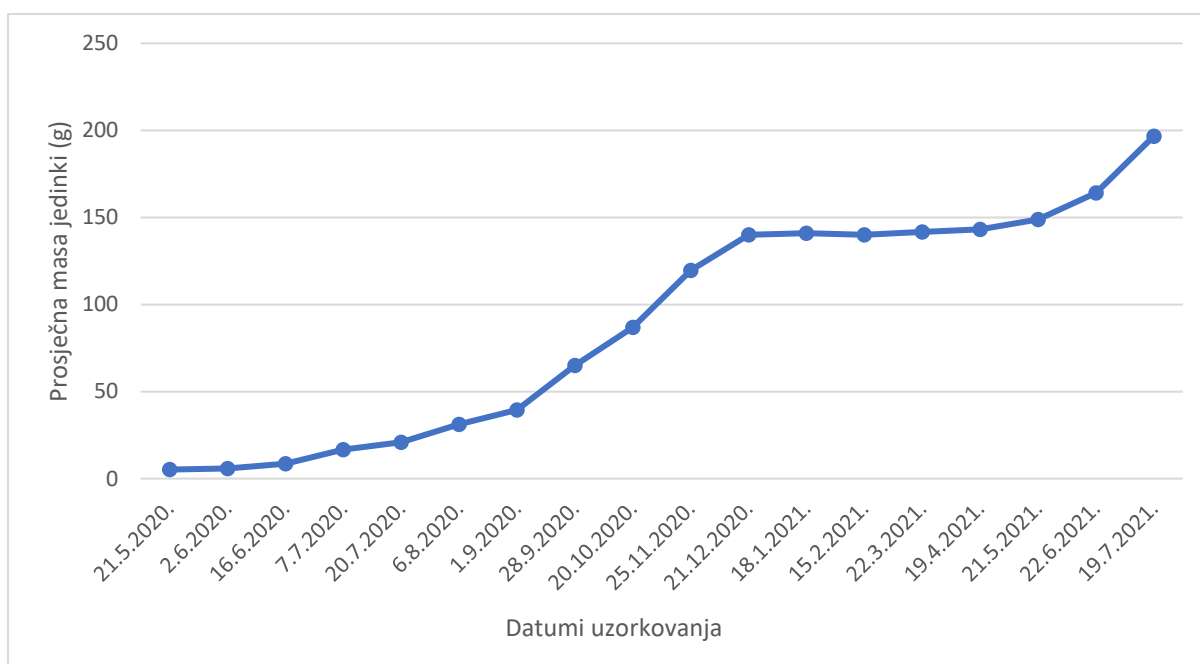
5.3. Rast jedinki lubina i orade

Jedinke mlađi lubina prosječne mase 6,2 g nasadene su u kaveze u svibnju 2020. godine. Do kraja istraživanja jedinke lubina dosegle su masu od 187 g, te su time postigle konzumnu masu (150-200 g). Vidljivo je da jedinke tijekom zimskih mjeseci gotovo stagniraju u rastu jer je tada temperatura mora 11-13 °C (prosinca do travnja) (Slika 24.). Jedinke ponovo počinju dobivati na masi kada poraste temperatura mora (15 °C, svibanj). Unatoč navedenom, nije utvrđena statistički značajna korelacija između temperature mora na uzgajalištu i mase jedinki lubina u uzgoju ($P > 0,05$).



Slika 24. Promjene prosječne tjelesne mase jedinki lubina (*D. labrax*) tijekom uzgojnog ciklusa od vremena nasađivanja

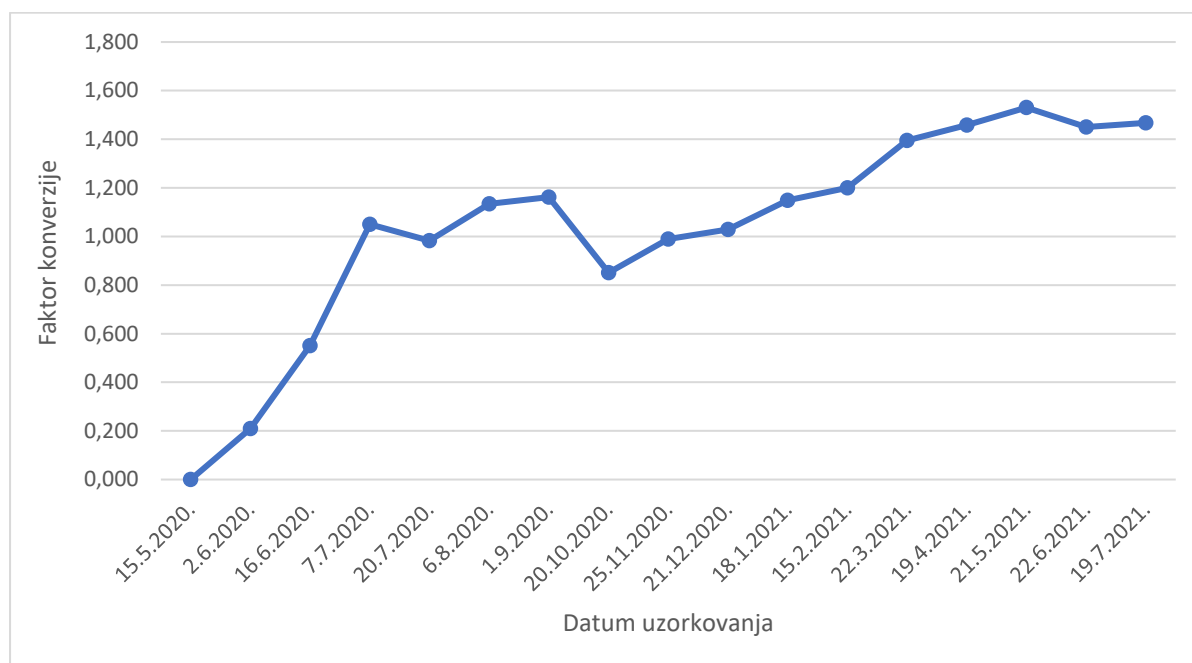
Jedinke mlađi orade nasađene su u kaveze također u svibnju 2020. godine. Prosječna im je masa bila 5,2 g. Do kraja istraživanog razdoblja (srpanj 2021. godine) jedinke su dosegle masu od 196 g i time dosegle konzumnu veličinu, koja je bila nešto veća u odnosu na masu lubina. Na temelju slike 25. vidljivo je da jedinke orade prestaju rasti kada temperatura mora padne ispod 13 °C (prosina do travnja), te ponovo počinju rasti kada je temperatura mora iznad 15 °C (svibanj). Kao i jedinke lubina, jedinke orade su tijekom zimskih mjeseci stagnirale u rastu. Sbermanovom koralcijom nije uočena statistička značajna korelacija između temperature mora i mase jedinki orade te količine otopljenog kisika u moru i mase jedinki.



Slika 25. Promjene prosječne tjelesne mase jedinki orade (*S. aurata*) tijekom uzgojnog ciklusa od vremena nasađivanja

5.4. Faktor konverzije hrane (FK) kod lubina i orade

Tijekom uzgojnog ciklusa, raspon faktora konverzije kod lubina (Slika 26.) bio je od 0,21 do 1,53. Na kraju istraživanog razdoblja za jedinke lubina faktor konverzije iznosio je 1,47.



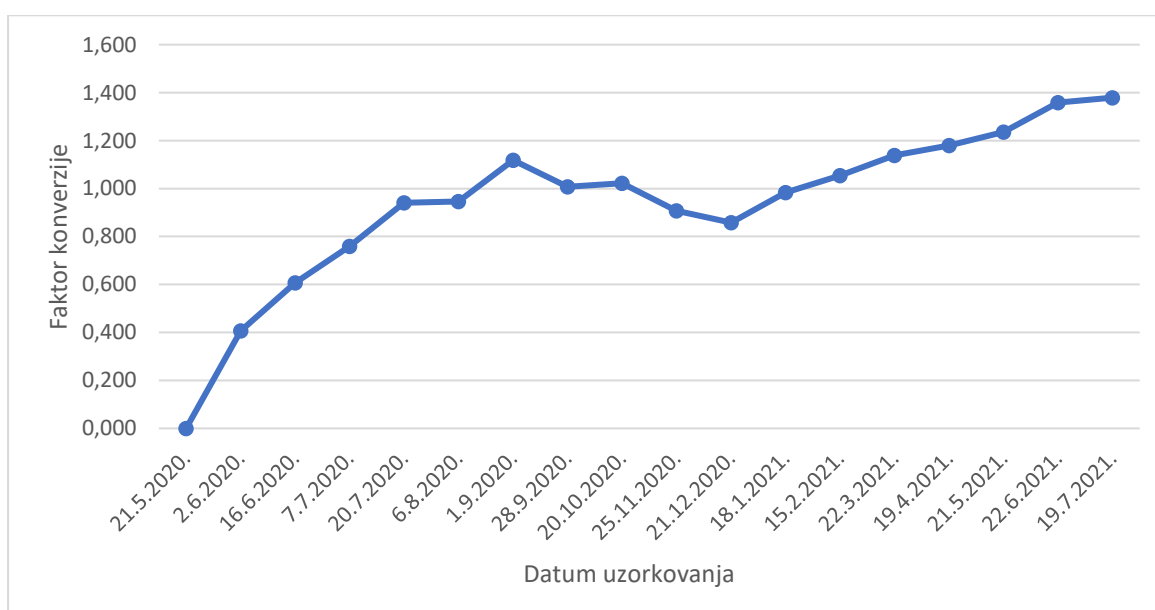
Slika 26. Prosječni faktor konverzije kod jedinka lubina (*D. labrax*) tijekom istraživanja

Raspon prosječnog faktora konverzije kod lubina (Slika 27.) kretao se od 0,07 do 0,70. Najmanji faktor konverzije bio je u travnju 2021. godine (0,075), dok je najveći bio u srpnju 2021. godine (0,698).



Slika 27. Prosječni faktor konverzije kod lubina (*D. labrax*) tijekom uzgojnog ciklusa

Istovremeno, raspon faktora konverzije kod orade (Slika 28.) bio je od 0,41 do 1,38. Na kraju istraživanog razdoblja za jedinke orade faktor konverzije iznosio je 1,38.



Slika 28. Prosječni faktor konverzije kod jedinka orade (*S. aurata*) tijekom istraživanja

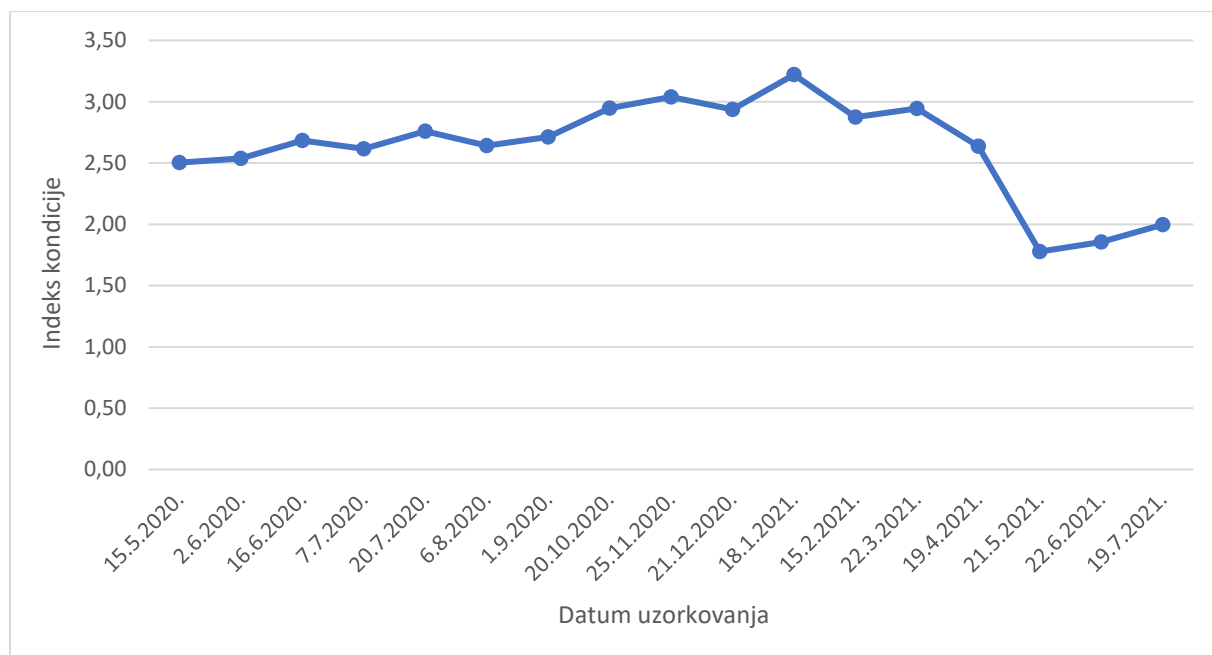
Raspon prosječnog faktora konverzije kod orade po pojedinim razdobljima bio je u rasponu od 0,07 do 0,70 (Slika 29.). Najmanji faktor konverzije bio je u veljači 2021. godine, dok je najveći bio u srpnju 2020. godine.



Slika 29. Prosječni faktor konverzije kod orade (*S. aurata*) tijekom istraživanja

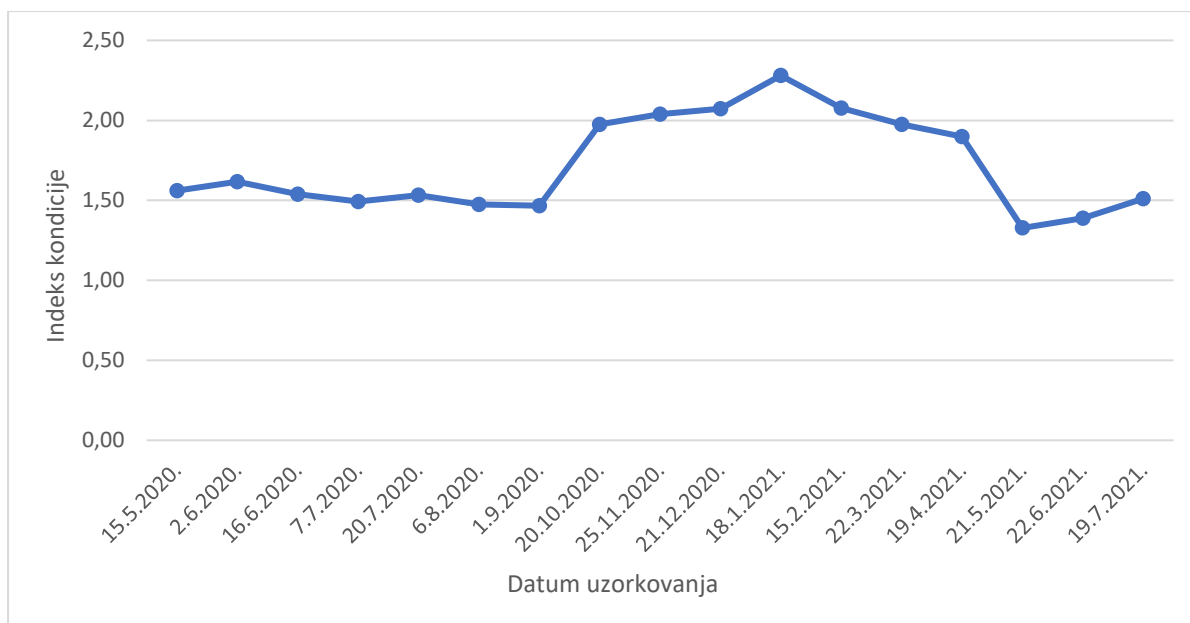
5.5. Indeks kondicije (IK) lubina i orade

Indeks kondicije lubina računat iz odnosa mase sa standardnom duljinom jedinki lubina tijekom istraživanog razdoblja kretao se u rasponu od 1,78 do 3,22 (Slika 30.). Prilikom nasađivanja mlađi u kaveze iznosio je 2,5. Najmanji indeks kondicije zabilježen je u svibnju 2021. godine dok je najveći zabilježen u siječnju 2021. godine.



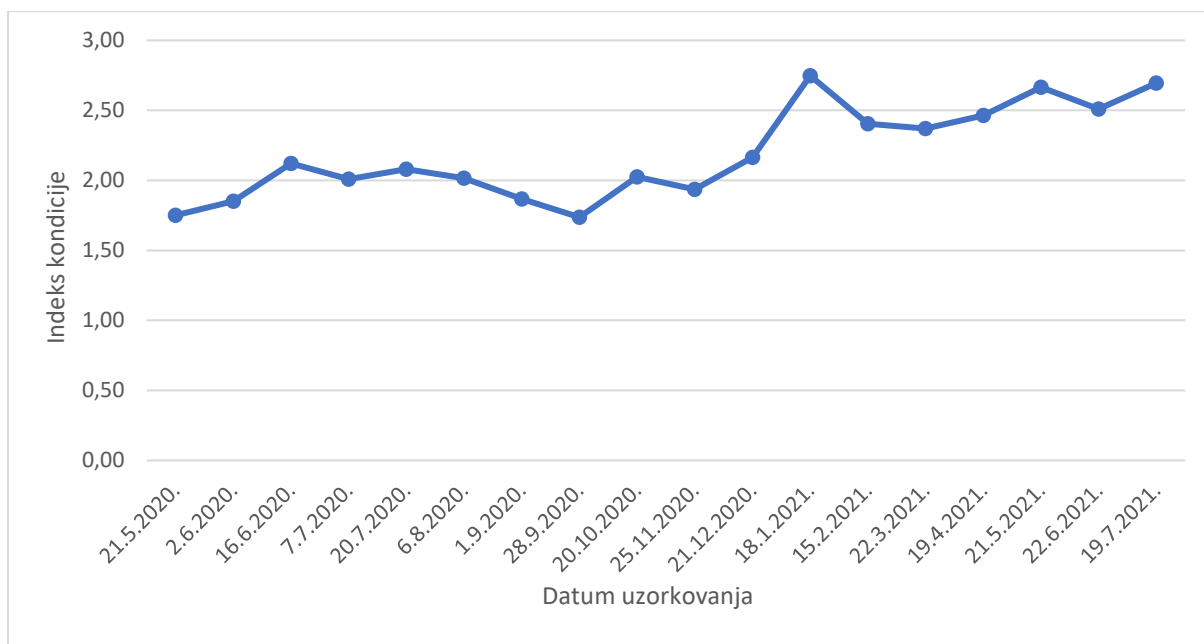
Slika 30. Prosječni indeks kondicije za jedinke lubina (*D. labrax*) računat standardnom duljinom jedinka

Indeks kondicije jedinki lubina, također je računat iz odnosa mase lubina u odnosu na njihovu ukupnu duljinu i kretao se tijekom istraživanog razdoblja u rasponu od 1,33 do 2,28 (Slika 31.). Prilikom nasađivanja mlađi u kaveze iznosio je 1,56. Najmanji indeks kondicije zabilježen je u svibnju 2021. godine, dok je najveći zabilježen u siječnju 2021. Statističkom analizom uočena je statistički značajna korelacija između indeksa kondicije i broja uginulih jedinki tj. mortaliteta, $r=-0,590$, $P=0,0248$. S druge strane, statističkom analizom odnosa između indeksa kondicije lubina i njihove mase, standardne i ukupne dužine lubina nije uočena statistički značajna korelacija.



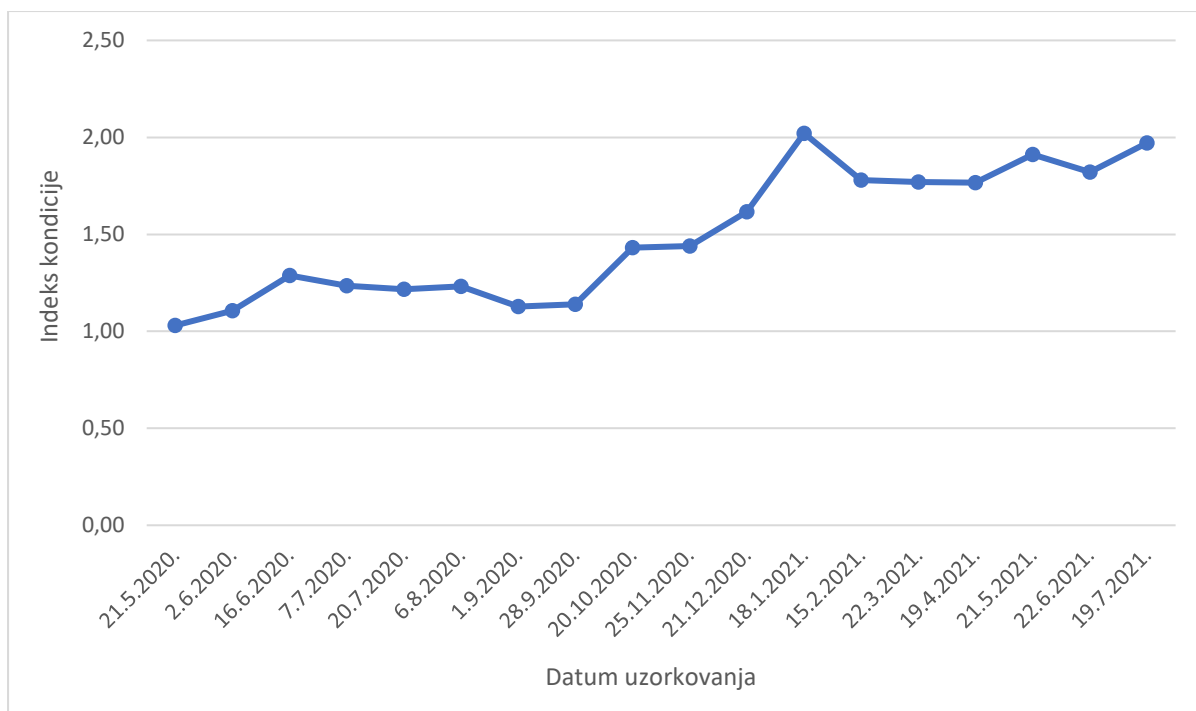
Slika 31. Prosječni indeks kondicije za jedinke lubina (*D. labrax*) računani iz odnosa mase i ukupne duljine lubina

Indeks kondicije računani iz omjera mase sa standardnom duljinom kod jedinki orade tijekom istraživanog razdoblja (Slika 32.) kretao se u rasponu od 1,74 do 2,75. Prilikom nasađivanja mladi u kaveze iznosio je 1,75. Najmanji indeks kondicije zabilježen je u rujnu 2020. godine, dok je najveći zabilježen u siječnju 2021. godine.



Slika 32. Prosječni indeks kondicije orade (*S. aurata*) računat iz odnosa mase i standardne duljine orade

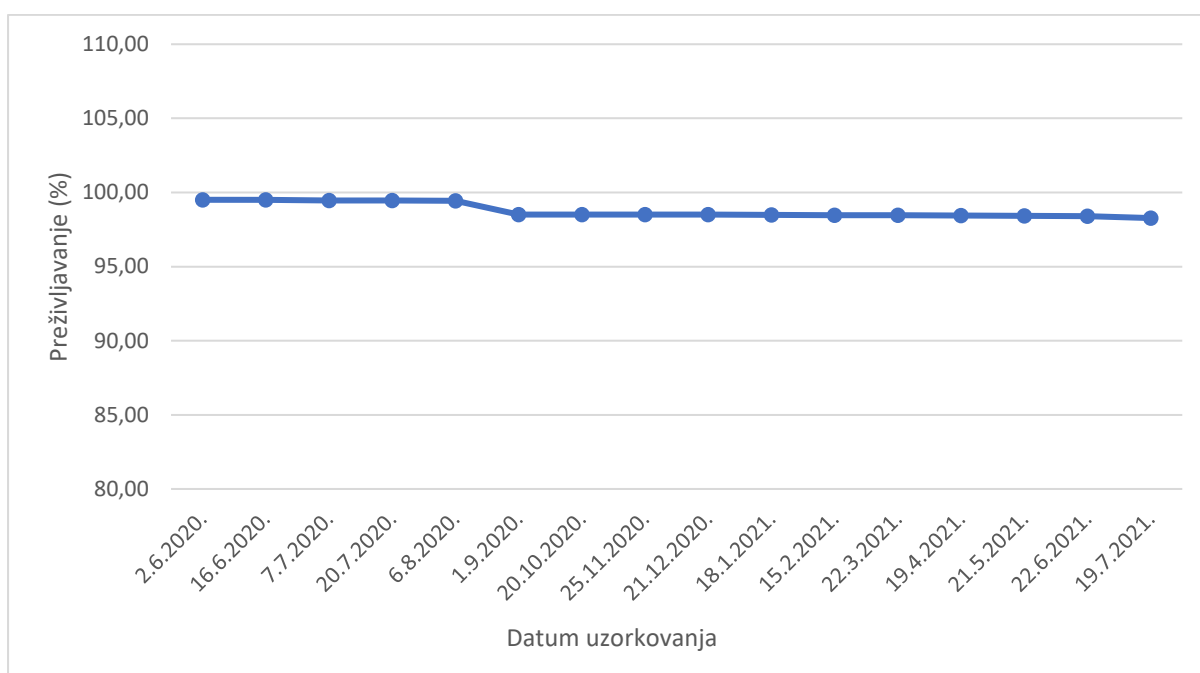
Indeks kondicije, računat iz odnosa mase s ukupnom duljinom, kretao se tijekom istraživanog razdoblja kod jedinki orade u rasponu od 1,03 do 2,02 (Slika 33.). Prilikom nasađivanja mladi orade u kaveze iznosio je 1,03. Najmanji indeks kondicije zabilježen je u svibnju 2020. godine dok je najveći zabilježen u siječnju 2021. Statističkom analizom je utvrđena pozitivna korelacija indeksa kondicije računanog u odnosu na standardnu $r=0,575$, $P=0,0241$ i ukupnu duljinu jedinki orade $r=0,586$, $P=0,0211$. Također, uočena je statistički značajna korelacija između indeksa kondicije orada i njihovih masa $r=0,846$, $P=0,0000$. Međutim, statističkom analizom nije uočena statistički značajna korelacija između indeksa kondicije i broja uginulih orada (mortaliteta).



Slika 33. Prosječni indeks kondicije za jedinke orade (*S. aurata*) računat iz odnosa mase i ukupne duljine jedinke

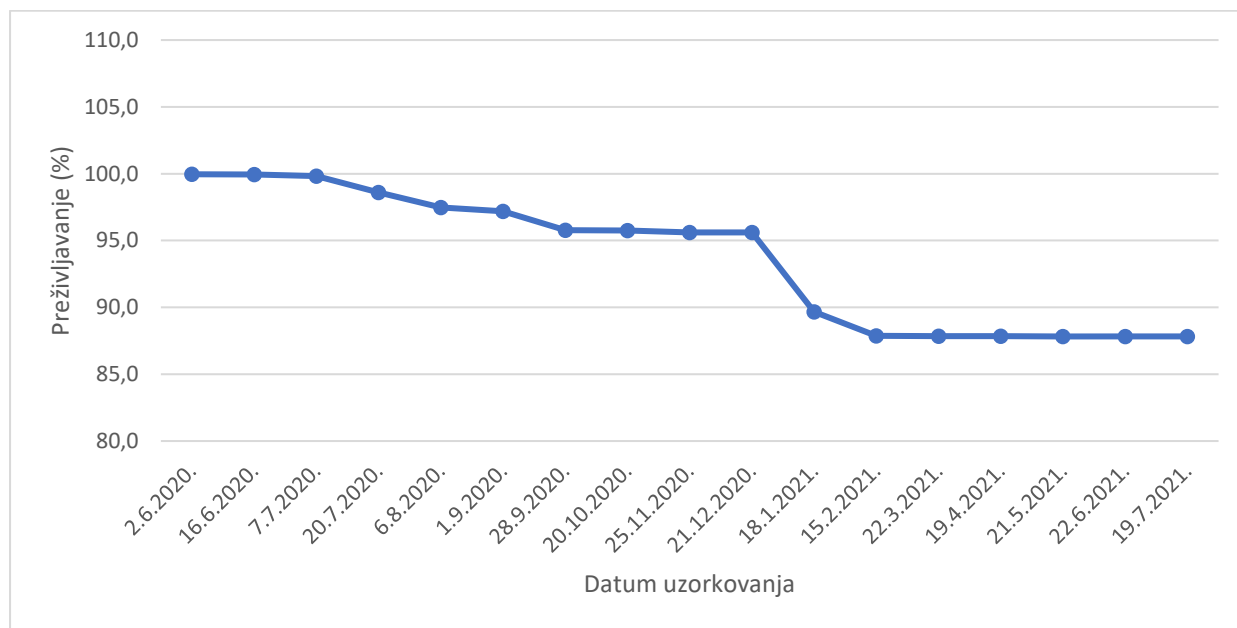
5.6. Preživljavanje lubina i orade

Na slici 34. vidljivo je da je najveći mortalitet bio u mjesecu kada je mlađ lubina nasadena u kavez. Veoma mali mortalitet bilježen je tijekom cijelog razdoblja istraživanja. Na kraju istraživanog razdoblja preživljavanje je iznosilo 98,27 %.



Slika 34. Preživljavanje jedinki lubina (*D. labrax*) tijekom istraživanog razdoblja

Na slici 35. vidljivo je da je mali mortalitet bilježen tijekom cijelog razdoblja istraživanja. Na kraju istraživanog razdoblja preživljavanje je iznosilo 87,8 %.



Slika 35. Preživljavanje jedinki orade (*S. aurata*) tijekom istraživanog razdoblja

5.7. Mikrobiološka analiza morske vode na uzgajalištu i kontrolnoj točki

Rezultati mikrobiološke analize morske vode na uzgajalištu i kontrolnoj točki prikazani su u tablicama od 2. do 6. za ukupne koliforme, *E. coli*, enterokoke, heterotrofne bakterije, te bakterije roda *Vibrio*, za svaku od četiri dubine stupca morske vode (0,5 m, 6m i 12m ispod površine i 0,5 m iznad dna) tijekom svih uzorkovanja u 2020. i 2021. godini.

Na uzgajalištu je najviše ukupnih koliforma (Tablica 2.) utvrđeno na površini prilikom uzorkovanja u srpnju 2020. godine, dok ih je najmanje bilo 0,5 m iznad dna, tijekom cijelog istraživanja. Na kontrolnoj točki najviše ukupnih koliforma utvrđeno je prilikom uzorkovanja u listopadu 2020. godine, na dubini 0,5 m iznad dna. Utvrđene vrijednosti ukupnih koliforma na kontrolnoj točki prilikom ostalih uzorkovanja većinom su bile <10 MPN/100mL.

Usporedba rezultata ukupnih koliforma dobivenih na četiri dubine uzorkovanja na uzgajalištu i kontrolnoj točki nije pokazala statistički značajne razlike (Kruskal-Wallis test, $P > 0,05$) tijekom svih pet uzorkovanja. Na temelju toga, vrijednosti ukupnih koliforma su objedinjene za stupac morske vode te je napravljena statistička usporedba između uzgajališta i

kontrole (Mann-Whitney test), kao i između provedenih uzorkovanja (Kruskal-Wallis test). Tako je jedino u srpnju 2020. godine utvrđena statistički značajna razlika između broja ukupnih koliforma u stupcu morske vode na uzgajalištu u odnosu na njihov broj na kontrolnoj točki (Mann-Whitney test, $P=0,029$). Usporedbom rezultata broja ukupnih koliforma za stupac morske vode između pojedinih uzorkovanja utvrđeno je da se vrijednosti statistički razlikuju i na uzgajalištu (Kruskal-Wallis test, $P=0,005$) i na kontrolnoj točki (Kruskal-Wallis test, $P=0,010$).

Tablica 2. Mikrobiološka analiza ukupnih koliforma (MPN/100mL) na uzgajalištu i kontrolnoj točki

Dubina	Uzgajalište					Kontrolna točka				
	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.
0,5 m ispod površine	1239	110	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10
6 m	410	243	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
12 m	75	227	<10	<10	<10	<10	738	<10	<10	<10
0,5 m iznad dna	10	<10	<10	<10	<10	<10	1467	<10	<10	<10
AV±STDEV*	433,5±564,9	147,5±109,2	9,9±0	9,9±0	9,9±0	9,9±0	556,2±697,5	9,9±0	9,9±0	9,9±0

AV±STDEV* - srednja vrijednost±standardna devijacija

Tijekom provedenog istraživanja na uzgajalištu i na kontrolnoj točki, na svim ispitivanim dubinama, mikrobiološka analiza je pokazala jednake vrijednosti *E. coli* (<10 MPN/100mL) u uzorcima morske vode sa uzgajališta i s kontrolne točke, prilikom svih uzorkovanja (Tablica 3.).

Tablica 3. Mikrobiološka analiza *E. coli* (MPN/100mL) na uzgajalištu i kontrolnoj točki

Dubina	Uzgajalište					Kontrolna točka				
	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.
0,5 m ispod površine	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
6 m	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
12 m	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
0,5 m iznad dna	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Isto tako, mikrobiološkom analizom broja enterokoka u stupcu morske vode na uzgajalištu i kontrolnoj točki (Tablica 4.), tijekom svih uzorkovanja nisu utvrđene razlike broja enterokoka (<10 MPN/100mL), s iznimkom u jednom uzorku na uzgajalištu, u srpnju 2020. godine na dubini 0,5 m ispod površine (10 MPN/100mL).

Tablica 4. Mikrobiološka analiza enterokoka (MPN/100mL) na uzgajalištu i kontrolnoj točki

Dubina	Uzgajalište					Kontrolna točka				
	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.
0,5 m ispod površine	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
6 m	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
12 m	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
0,5 m iznad dna	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Rezultati mikrobiološke analize broja heterotrofnih bakterija (HPC) na uzgajalištu (Tablica 5.) ukazali su na najveću brojnost (29000 CFU/mL) na dubini od 6 m prilikom uzorkovanja u listopadu 2020. godine, dok je najmanja brojnost utvrđena na istoj dubini prilikom uzorkovanja u travnju 2021. godine (50 CFU/mL). S druge strane, na kontrolnoj točki (Tablica 5.) najviše heterotrofnih bakterija utvrđeno je na dubini od 12 m tijekom uzorkovanja u srpnju 2021. godine (39200 CFU/mL), a najmanje na istoj dubini tijekom uzorkovanja u travnju 2021. godine (900 CFU/mL). Usporedbom HPC vrijednosti na pojedinim dubinama stupca morske vode, za svako pojedino uzorkovanje, pokazala se učestalija pojava statistički značajne razlike HPC-a među dubinama (4/5 uzorkovanja) na kontrolnoj točki ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis test: 7.2020., 10.2020., 2.2021., 7.2021), nego (3/5 uzorkovanja) na samom uzgajalištu ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis test: 10.2020., 4.2021., 7.2021).

Usporedbom rezultata HPC-a za morski stupac na uzgajalištu u odnosu na kontrolnu točku po pojedinim uzorkovanjima, statistički značajna razlika utvrđena je jedino kod uzorkovanja u travnju 2021. godine. Tada je HPC na kontrolnoj točki bio statistički značajno veći u stupcu morske vode (Mann-Whitney test, $P = 0,015$) na kontrolnoj točki ($2187,5 \pm 1691,3$ CFU/mL) nego na uzgajalištu ($625 \pm 590,9$ CFU/mL). Usporedbom vrijednosti HPC-a za stupac morske vode između pojedinih uzorkovanja Kruskal-Wallis testom utvrđena je statistički značajna razlika na uzgajalištu ($P \leq 0,001$) kao i na kontrolnoj točki ($P \leq 0,001$).

Tablica 5. Mikrobiološka analiza broja heterotrofnih bakterija (HPC) (CFU/mL) na uzgajalištu i kontrolnoj točki

Dubina	Uzgajalište					Kontrolna točka				
	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.
0,5 m ispod površine	2800	9800	1600	550	17550	5000	20500	36500	4500	11650
6 m	2800	29000	26600	50	2950	10050	10900	10700	950	20450
12 m	1100	19000	9900	1450	8350	2300	8200	12500	900	39200
0,5 m iznad dna	400	6300	200	450	20800	1100	1300	25200	2400	3850
AV±STDEV*	1775± 1217,6	16025± 10173,9	9575± 12130,5	625± 590,9	12412,5± 8221,7	4612,5± 3975	10225± 7953,8	21225± 12055,8	2187,5± 1691,3	18787,5± 15204,24

AV±STDEV* - srednja vrijednost±standardna devijacija

Mikrobiološkom analizom uzoraka morske vode sa uzgajališta (Tablica 6.), utvrđeno je najviše bakterija iz roda *Vibrio* prilikom uzorkovanjem u veljači 2021. godine na dubini od 6 m (500 CFU/mL), dok ih je najmanje bilo prilikom uzorkovanja u travnju 2021. godine pri dnu (2 CFU/mL). Na kontrolnoj točki najviše bakterija *Vibrio* (Tablica 6.) utvrđeno je uzorkovanjem u veljači 2021. godine pri dnu (540 CFU/mL) dok ih je najmanje utvrđeno prilikom uzorkovanja u srpnju 2021. godine na 6 m dubine, kada nisu izolirane iz uzorka morske vode.

Usporedbom vrijednosti *Vibrio* spp. dobivenih na pojedinim dubinama za svako uzorkovanje Kruskal-Wallis testom utvrđena je učestalija (3/5 uzorkovanja) statistički značajna razlika na kontrolnoj točki ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis test: 7.2020., 10.2020., 2.2021.), nego (2/5 uzorkovanja) na uzgajalištu ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis test: 2.2021., 7.2021.).

Usporedbom vrijednosti *Vibrio* spp. za vodeni stupac na uzgajalištu i kontrolnoj točki po pojedinim uzorkovanjima, utvrđena je statistički značajna razlika prilikom uzorkovanja u listopadu 2020. godine (Mann-Whitney test, $P = 0,050$) i srpnju 2021. godine ($P \leq 0,001$). U oba slučaja, statistički značajno veći broj *Vibrio* spp. bio je na uzgajalištu.

Usporedbom vrijednosti *Vibrio* spp. za stupac morske vode između pojedinih uzorkovanja Kruskal-Wallis testom utvrđena je statistički značajna razlika na uzgajalištu ($P \leq 0,001$), kao i na kontrolnoj točki ($P \leq 0,001$).

Tablica 6. Mikrobiološka analiza bakterija roda *Vibrio* (CFU/mL) na uzgajalištu i kontrolnoj točki

Dubina	Uzgajalište					Kontrolna točka				
	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.	7.2020.	10.2020.	2.2021.	4.2021.	7.2021.
0,5 m ispod površine	90	66	240	63	11	10	15	310	19	1
6 m	268	170	500	5	96	94	103	266	25	0
12 m	68	57	209	20	27	300	30	240	20	1,5
0,5 m iznad dna	288	167	22	2	15	16	66	540	52	0,5
AV±STDEV*	178,5±115,5	115±61,9	242,8±196,7	22,5±28,1	37,3±39,8	105±135,5	53,5±39,3	339±137,1	29±15,6	0,75±0,6

AV±STDEV* - srednja vrijednost±standardna devijacija

5.8. Mikrobiološka analiza vode iz bazena s mlađi s transportnog kamiona

Uzorci morske vode iz bazena s transportnog kamiona uzeti su u svibnju 2020. godine prilikom dolaska mlađi lubina, odnosno mlađi orade na uzgajalište. Istovremeno, uzeti su i uzorci morske vode na uzgajalištu iz kaveza za nasad pristigle mlađi. U Tablici 7. prikazani su rezultati mikrobioloških analiza uzetih uzoraka. Kako je vidljivo iz Tablice 7., postoji uočljiva razlika između dobivenih vrijednosti analiziranih pokazatelja u morskoj vodi iz bazena s transportnog kamiona i onih iz kaveza sa uzgajališta. Iako su dobivene vrijednosti u uzorcima iz bazena s mlađi lubina i mlađi orade višestruko veće u odnosu na vrijednosti istih pokazatelja na uzgajalištu, temeljem provedene statističke usporedbe dobivenih vrijednosti, razlike iako postoje, nisu statistički značajne (Mann-Whitney testom, $P > 0,05$). Utvrđene razlike su vezane na broj ukupnih koliforma, HPC i *Vibrio* kod oba uzorkovanja, kao i za broj *E. coli* između kaveza sa uzgajališta i bazena s transportnog kamiona.

Tablica 7. Mikrobiološka analize vode sa uzgajališta i transportnog kamiona s mladi

	Uzgajalište - lubin	Uzgajalište - orada	Kamion - lubin	Kamion - orada
	5.2020.	5.2020.	5.2020.	5.2020.
U.koliformi (MPN/100mL)	<10,0±0	10,0±0	150,0±15,6	20,0±10,
<i>E.coli</i> (MPN/100mL)	<10,0±0	<10,0±0	74,0±14,1	<10,0±0
Enterokoki (MPN/100mL)	<10,0±0	<10,0±0	<10,0±0	<10,0±0
HPC (CFU/mL)	100±28,3	75000±7071,1	140000±28284,3	180000±28284,3
<i>Vibrio</i> (CFU/mL)	5±1,4	22±2,8	2000±0	50±14,1

5.9. Rezultati MALDI-TOF

Identifikacijom izoliranih bakterija iz uzoraka morske vode s uzgajališta i kontrolne točke s pomoću MALDI-TOF-a utvrđena je prisutnost pojedinih vrsta bakterija u morskoj vodi na različitim dubinama. U Tablici 8. prikazane su identificirane vrste na točkama uzorkovanja na različitim dubinama (0,5 m, 6 m i 12 m ispod površine i 0,5 m iznad dna). Na kontrolnoj točki najviše je bakterija identificirano na površini (7 vrsta), dok ih je najmanje identificirano na 6 m dubine. Gotovo sve identificirane bakterije na kontrolnoj točki na 0,5 m ispod površine su iz roda *Vibrio*, osim jedne koja pripada rodu *Staphylococcus*. Na 6 m dubine kontrolne točke identificirane su dvije bakterije roda *Vibrio* i jedna iz roda *Pseudomonas*.

Tablica 8. Identificirane vrste na dubinama uzorkovanja na kontrolnoj točki i uzgajalištu

vrsta	kontrola				uzgajalište			
	0,5 m ispod površine	6 m	12m	0,5 m iznad dna	0,5 m ispod površine	6 m	12 m	0,5 m iznad dna
<i>V. pomeroyi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. tasmaniensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. gigantis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>V. chagasii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>V. fortis</i>	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>V. harveyi</i>	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>V. alginolyticu</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>V. rotiferianus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. mucidolens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-

Na uzgajalištu na svim dubinama identificirane su samo bakterije roda *Vibrio*. Najviše različitih bakterija roda *Vibrio* na uzgajalištu je bilo na 0,5 m ispod površine, dok ih najmanje na 0,5 m iznad dna. Promatrano za stupac morske vode (Tablica 9.), u uzorcima morske vode s kontrolne točke identificirana su tri bakterijska roda. U uzorcima dominira rod *Vibrio*, a slijede ga bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Staphylococcus* s po jednom vrstom *P. mucidolens* i *S. hominis*. S druge strane, u uzorcima morske vode s uzgajališta identificiran su samo bakterije iz roda *Vibrio*. Iako je broj identificiranih vrsta u uzorcima sa uzgajališta devet, a onih s kontrolne točke osam, uzorci se međusobno razlikuju po zastupljenim vrstama. Tako su u uzorcima s uzgajališta utvrđeni *V. alginolyticus* i *V. rotiferianus*, dok je u uzorcima s kontrolne točke utvrđen *V. parahaemolyticus*.

Tablica 9. Identificirane vrste pomoću MALDI-a na kontrolnoj točki i na uzgajalištu

Vrsta	kontrola	uzgajalište
<i>V. pomeroyi</i>	+	+
<i>V. tasmaniensis</i>	+	+
<i>V. pomeroyi</i>	+	+
<i>V. gigantis</i>	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-
<i>V. chagasii</i>	+	+
<i>V. fortis</i>	+	+
<i>V. harveyi</i>	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	+
<i>V. rotiferianus</i>	-	+
<i>P. mucidolens</i>	+	-
<i>S. hominis</i>	+	-

6. Rasprava

Uzgoj ribe u marikulturi u Jadranskom moru temelji se na nasadu mladi tijekom proljeća u kaveze, u kojima se ona uzgaja do konzumne veličine (200 g). Zbog nedostatka mladi u Hrvatskoj, ona se najčešće uvozi iz Francuske i Italije. Na sami uzgoj utječe veliki broj čimbenika, a o njima ovisi trošak proizvodnje te njezina isplativost. Značajnu ulogu imaju abiotički čimbenici poput temperature, koja utječe na metabolizam jedinki u uzgoju, što je posljedično povezano s količinom hrane koju jedinke konzumiraju, ali utjecaj ima i količina otopljenog kisika u moru, salinitet, kao i dob jedinki u uzgoju (Laiz-Carrion i sur., 2005). Spermanovom korelacijom utvrđena je korelacija između temperature mora i količine otopljenog kisika u moru. Utjecaj temperature mora na količinu otopljenog kisika utvrđen je i u prethodnim istraživanjima, u kojima je kisik pri visokim temperaturama postao ograničavajući faktor zbog smanjene topljivosti u vodi (Lanari i sur., 2002). Temperatura mora utječe na količinu hrane koja se koristi prilikom ishrane jedinki. Tijekom istraživanog razdoblja temperatura morske vode kretala se u rasponu od 11,0 do 24,8 °C, što je bilo u skladu s prijašnjim istraživanjem koje je provedeno na uzgajalištu Veli Bok kod otoka Cres. Brži rast jedinki bio je u toplijem dijelu godine zbog optimalnih uvjeta, te ujedno veće konzumacije hrane. Optimalna temperatura za uzgoj lubina je oko 25 °C (Düglera i sur., 2012), dok je za oradu između 22° i 26 °C (Brigolinia i sur., 2008). Kao i tijekom prethodnog istraživanja u uvali Veli Bok, tijekom zimskih mjeseci jedinke lubina i orade stagnirale su s rastom (Novosel, 2019). Jedinke su ponovo počele dobivati na svojoj masi u svibnju, kada je temperatura mora dostigla 15,8 °C. Do kraja istraživanog razdoblja jedinke lubina i orade gotovo su postigle konzumnu masu od 200 g. Faktor konverzije za jedinke lubina u istraživanom razdoblju kretao se u rasponu od 0,21 do 1,53, te je bio manji u odnosu na istraživanje tijekom 2017. i 2018. godine (0,36-2,35) (Novosel, 2019). Kod jedinki orade faktor konverzije se kretao u rasponu od 0,41 do 1,38, što je također manje nego u prijašnjem istraživanju (0,02-2,07). Ovaj faktor ukazuje na stanje organizama u uzgoju pod utjecajem okolišnih uvjeta (Pampanin i sur., 2005). Indeks kondicije kod lubina kretao se u rasponu 1,78 do 3,22, dok se kod orade kretao u rasponu od 1,74 do 2,75. U ovom istraživanju, indeks kondicije je računat iz omjera mase jedinki i standardne dužine uzorkovanih jedinki i iz omjera mase jedinki i ukupne dužine uzorkovanih jedinki. Standardna dužina korištena je prvenstveno zbog mogućnosti usporedbe dobivenih rezultata s rezultatima drugih istraživanja, budući da se ona češće koristi u takvim izračunima. Indeks kondicije računat s ukupnom i standardnom duljinom ukazuje na jaku pozitivnu korelaciju, iako usporedbom dobivenih rezultata ukupne i standardne duljine dolazi do razlika

u vrijednostima. U prethodno provedenom istraživanju, na ovom uzgajalištu u uvali Veli Bok, indeks kondicije za jedinke lubina bio je gotovo jednak (1,71 – 3,01) kao i u ovom istraživanju, a za jedinke orade bio je nešto veći (2,51-3,31) (Novosel, 2019). Do kraja razdoblja istraživanja preživljavanje lubina iznosilo je 98,27 %, dok je kod orada bilo 87,8 %. Ostvareni rezultati preživljavanja su u skladu s očekivanim preživljavanjem koje do konzumne veličine iznosi 80-85 % (Katavić i sur., 2005). Podaci o preživljavanju jedinki ukazuju na optimalnu gustoću nasada na uzgajalištu, koja ima utjecaj na preživljavanje te vođenju brige o higijenskim mjerama (čistoća mrežnog tega). Također, tijekom istraživanja nije bila zabilježena bolest koja bi uzrokovala mortalitet te na taj način utjecala na rezultate preživljavanja.

Osim abiotičkih faktora, u uzgoju je važna i mikrobiološka kvaliteta morske vode zbog koje je rađena mikrobiološka analiza. Općenito u većini studija o ekologiji vodenih mikroorganizama djelomično su obuhvaćeni ekosustavi akvakulture, bilo vodeni stupac, bilo sediment (Martins i sur., 2018; Duarte i sur., 2019). Vodeni stupac sadržava veliki postotak svojti koje su povezane sa zdravljem (Kolda i sur., 2020). Loša kvaliteta vode, te stres kod jedinki u uzgoju negativno utječe na njihov rast i razvoj pa i na pojavu bolesti te posljedično na mortalitet (Watts i sur., 2017). Od bolesti koje su značajne za uzgajane vrste, takvi loši uvjeti uzgoja u marikulturi, pogoduju razvoju vibrioze, pestereloze te miksobakterioze. Kvalitetu vode također narušava zaostala hrana, tj. otpad iz marikulture, što ne pogoduje rastu ribe (Wei i sur., 2020), ali potiče rast mikroorganizama (Hazari i sur., 2017). Visoka temperatura morske vode također potiče rast bakterija (Kapetanović i sur., 2017), koji na taj način dodatno doprinosi pogoršanju same kvalitete vode u uzgoju. To je također utvrđeno u istraživanju koje je provedeno u Indiji u kojem su znanstvenici uočili pozitivnu korelaciju temperature mora i broja bakterija u morskoj vodi (Hazari i sur., 2017).

Mikrobiološkom analizom uzoraka morske vode, tijekom svih uzorkovanja, na obje postaje uzorkovanja, uzgajalištu i kontrolnoj točki, vrijednosti *E. coli* i enterokoka su bile utvrđene u broju manjem od 10 MPN/100mL. *E. coli* koristi se kao pokazatelj fekalnog zagađenja i njena povećana koncentracija u morskoj vodi može predstavljati opasnost za zdravlje ljudi prilikom konzumacije kontaminirane hrane (Ng i sur., 2018). Mikrobiološka kontaminacija, koja utječe na zdravlje ljudi, uzrokuje ujedno i značajne gospodarske gubitke (Kim i Lee, 2017). Enterokoki, također ukazuju na higijensku ispravnost morske vode, te je njihov broj u visokoj korelaciji s prisutnosti patogenih bakterija. Zbog male prisutnosti oba ova pokazatelja fekalnog zagađenja u uzorcima analizirane morske vode, na različitim dubinama, ona je bila higijenski odgovarajuća za uspješan uzgoj.

Najviše ukupnih koliforma je utvrđeno na uzgajalištu na površini, a najmanje na dnu morskog stupca, dok ih je na kontrolnoj točki najviše utvrđeno na dnu. Također utvrđena je statistički značajna razlika broja ukupnih koliforma na kontrolnoj točki prilikom pojedinih uzorkovanja. Ukupni koliformi još su jedan od pokazatelja kakvoće morske vode. Uobičajeno se nalaze u tlu, slatkoj i morskoj vodi, te primarno nisu patogeni. Mikrobiološkom analizom uzoraka morske vode na različitim dubinama, na uzgajalištu i na kontrolnoj točki, statistički značajna razlika broja heterotrofnih bakterija utvrđena je gotovo prilikom svih (4/5) uzorkovanja na kontrolnoj točki, što ukazuje na manje oscilacije broja heterotrofnih bakterija u stupcu morske vode na uzgajalištu.

Heterotrofne bakterije dobar su pokazatelj obogaćenja organskom tvari, te postoji pozitivna korelacija njihovog broja s gustoćom ribe te količinom organske tvari (Kapetanović i sur., 2011). U provedenom istraživanju u srednjem Jadranu povećani broj heterotrofnih bakterija pratio je i povećani broj ukupnih koliforma, a broj *E. coli* se nije mijenjao (Kapetanović, 2011). Bakterije roda *Vibrio* analizirane su zbog procjene mogućnosti zaraze u riba, što je moguće kada su prisutne u većoj koncentraciji u okolnoj morskoj vodi. Osim što bakterije iz roda *Vibrio* uzrokuju bolest vibriozu kod riba, posljedično uzrokuju i velike ekonomske gubitke u akvakulturi. U jadranskoj regiji upravo je vibriozna jedna od najčešćih bakterijskih bolesti kod riba u uzgoju (Gavrilović i sur., 2018). Do pojave vibrioze neće doći ako se uzročnik nalazi u morskoj vodi u maloj koncentraciji (Kim i Lee, 2017). Najčešće prisutne vrste su: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* te *V. vulnificus* (Kapetanović i sur., 2013), od kojih su prve dvije vrste utvrđene tijekom ovog istraživanja u uzorcima morske vode. Uzročnik bolesti se u većoj koncentraciji u morskoj vodi nalazi tijekom ljetnih mjeseci, zbog optimalnije temperature za rast bakterija. U istraživanju, najviše bakterija roda *Vibrio* na uzgajalištu utvrđeno je uzorkovanjem u lipnju 2021. godine na dubini od 6 metara, dok ih je najmanje utvrđeno uzorkovanjem u travnju 2021. godine na dnu. Na kontrolnoj točki najviše bakterija roda *Vibrio* bilo je utvrđeno uzorkovanjem u travnju 2021. godine, dok ih je najmanje bilo u srpnju 2021. godine na 6 metara dubine. Temeljem provedene statističke usporedbe dobivenih vrijednosti bakterija roda *Vibrio* na četiri dubine uzorkovanja na kontrolnoj točki, uočena je statistički značajna razlika između dubina stupca morske vode na kontrolnoj točki prilikom svih uzorkovanja tijekom 2020. godine.

Identifikacijom izoliranih bakterija s pomoću MALDI-TOF uređaja, utvrđena su tri roda bakterija u uzorcima morske vode s uzgajališta i s kontrolne točke. Na uzgajalištu je identificirano 9 vrsta bakterija u uzorcima morske vode, a sve iz roda *Vibrio*. Na kontrolnoj točki utvrđeno je 10 vrsta bakterija u uzorcima morske vode, a koje većinom također pripadaju

rodu *Vibrio*. Ostale identificirane bakterije pripadaju rodu *Pseudomonas* i *Staphylococcus*. Raznolikost bakterijskih vrsta koje su prisutne u morskoj vodi ovisi o njenoj kakvoći na samom uzgajalištu (Onianwah i sur., 2018). U uzorcima morske vode, na uzgajalištu i kontrolnoj točki utvrđen je *V. harveyi*, dok je na uzgajalištu utvrđen još i *V. alginolyticus*. Prethodnim istraživanjima je uočeno da ove dvije vrste iz roda *Vibrio* u posljednje vrijeme uzrokuju vibriozu kod riba u uzgoju (Kapetanović i sur., 2013). *V. harveyi* prema nedavnim istraživanjima ujedno je jedan od uzročnika gubitaka u uzgoju lubina u Mediteranu (Vendramin i sur., 2016). Mikrobiološkom analizom kože lubina na istom uzgajalištu u uvali Veli Bok utvrđena je prisutnost bakterija roda *Vibrio* i *Pseudomonas* (Ramljak, 2020). Od roda *Vibrio* najveći udio je činila vrsta *V. alginolyticus* (17,9 %), a odmah iza nje je bila vrsta *V. harveyi* (14,3 %) (Ramljak, 2020). Identifikacijom MALDI-TOF nisu identificirane bakterije roda *Aeromonas*, koje se često mogu izolirati u niskim koncentracijama kod jedinki lubina i orade u uzgoju, zajedno s patogenima poput *Vibrio* spp. (Martino i sur., 2011). Također, nije identificiran uzročnik pastereloze niti mikobakterioze, jer postoji mogućnost da tih rodova bakterija uopće nema u ovim uzorcima, obzirom da i mikrobiološki pokazatelji kakvoće morske vode ukazuju kako je ona izvrsne kakvoće, a veći mortalitet nije zabilježen tijekom ovog istraživanja.

7. Zaključak

S obzirom na praćene relevantne abiotičke čimbenike uzgoja lubina i orade možemo zaključiti da su oni povoljni za komercijalni uzgoj ovih dviju vrsta na uzgajalištu Veli Bok, na otoku Cresu. To potvrđuju optimalan rast i zadovoljavajuća konverzija hrane, a tržišna kvaliteta ribe potvrđena je dobrom kondicijom obiju vrsta tijekom uzgoja.

Također, tijekom istraživanja nije zabilježena bolest koja bi uzrokovala mortalitet te na taj način utjecala na rezultate preživljavanja.

Budući da su mikrobiološkom analizom uzoraka morske vode, tijekom svih uzorkovanja, vrijednosti *E. coli* i enterokoka bile utvrđene u broju manjem od 10 MPN/100mL možemo zaključiti da je na kaveznom uzgajalištu utvrđena izvrsna kakvoća vode prema Uredbi o kakvoći vode za kupanje (Narodne novine br. 51/14).

Iako su na uzgajalištu identificirane potencijalno patogene bakterije njihova mala koncentracija nije dovoljna da dovede do pojave bolesti.

Provedeno istraživanje i analize potvrđuju dobar izbor lokacije za uzgoj lubina i orade i zadovoljavajući menadžment na uzgajalištu.

8. Literatura

Altan, O. (2020): The first comparative study on the growth performance of European seabass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) and gilthead seabream (*Sparus aurata*, L. 1758) commercially farmed in low salinity brackish water and earthen ponds. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 19. 1681-1689

Arulampalam, P., Yusoff, F. M., Shariff, M., Law, A. T., Srinivasa Rao, P. S. (1998): Water quality and bacterial populations in a tropical marine cage culture farm. Aquaculture Research. 29. 617-624

Baum, J.K.; Myers, R.A.; Kehler, D.G.; Worm, B.; Harley, S.J.; Doherty, P.A. Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. Science 2003, 299, 389–392

Bavčević, L., 2014. Priručnik i vodič za proizvođačku praksu. Kavezni uzgoj lubina i komarče. Savjetodavna služba, Zagreb

Brigolin, D., Pastres, R., Tomassetti, P., Porrello, S. (2008): Modelling the biomass yield and the impact of seabream mariculture in the Adriatic and Tyrrhenian Sea (Italy). Aquacult Int. (2010): 18:149-163

Bulcock, P., Bostock, J., Jauncey, K., Beveridge, M., Telfer, T. (2001): The evolution of aquaculture feed supply systems. Eurofish. 2. 74-76

Cario, G., Casavola, A., Gjanci, P., Lupia, M., Petrioli, C., Spaccini, D. (2017): Long lasting underwater wireless sensors network for water quality monitoring in fish farms. Conference OCEANS 2017 19-22 June 2017 Aberdeen

Cascarano, M.C., Stavrakidis-Zachou, O., Mladineo, I., Thompson, K.D., Papandroulakis, N., Katharios, P. (2021): Mediterranean aquaculture in a changing climate: temperature effects on pathogens and diseases of three farmed fish species. Pathogenes 10. 1205

Culha, S.T. i Karaduman, F.R. (2020): The influence of marine fish farming on water and sediment quality: Ildir Bay (Aegean Sea). Environ Monitoring and Assessment. 192:528

Davidovich, N., Preto, T., Sharon, G., Zilberg, D., Bum, S.E., Baider, Z., Edery, N., Morick, D., Grossman, R., Kaidar-Shwartz, H., Dveyrin, Z., Rorman, E. (2020): Cutaneous appearance of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marium*, affecting gilthead seabream (*Sparus aurata*) cultured in recirculating aquaculture systems. Aquaculture. 528. 735507

Devi, P.A., Padmavathy, P., Aanand, S., Aruljothi, K., (2017): Review on water quality parameters in freshwater cage fish culture. *International Journal of Applied Research*. 3(5). 114-120

Duarte, L.N., Coelho, F.J.R.C., Cleary, D.F.R., Bonifácio, D., Martins, P., Gomes, N.C.M. (2019): Bacterial and microeukaryotic plankton communities in a semi-intensive aquaculture system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A seasonal survey. *Aquaculture*. 503. 59–69

Dügler, N., Kumulu, M., Turkmen, S., Ölçülü, A., Eroldogan, T., Yilmaz, H.A., Öçal, N. (2012): Thermal tolerance of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles acclimated to three temperature levels. *Journal of Thermal Biology* 37. 79-82

Ennouri, R., Mili, S., Missaoui H. (2021): Metallic element contaminant and nutrient assessment in sediments and water at marine fish farms of sea bass and sea bream in the Eastern Mediterranean Sea. *Maritime Technology and Research* 3. 237-253

FAO. (2020): *The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action*. FAO, Rome, 224 str.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Bonačić, K., Vardić Smrzlić, I., Kapetanović, D., Valić, D., Teskeredžić, E. (2012): Effectiveness of different antibacterial drugs on sea bass vibriosis caused by *Vibrio alginolyticus*. In: *Proceedings 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture*. Opatija. 591–594

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Conides, A., Kazazić, S., Vukić Lušić, D., Kolda, A., Kapetanović, D. (2018): Relationship between *Vibrio* bacteria abundance and water quality parameters in marine cage farm Area. 3rd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment. 8-11 November 2018. Volos, Greece

Giangrande, A., Gravina, M.F., Rossi, S., Longo, C., Pierri, C. (2021): Aquaculture and restoration: perspective from a Mediterranean sea experiences. *Water*. 13. 991

Gorlach-Lira, K., Pacheco, C., Carvalho, L. C. T., Melo Junior, H. N. and Crispim, M. C. (2013): The influence of fish culture in floating net cages on microbial indicators of water quality. *Brazilian Journal of Biology*. 73(3). 457-463

Gravningen, K., Thorarinnsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Rikardsen, S., Greger, E., Vigneulle, M. (1998): Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology*. 159-162

Havasi, M., Kumar, S., Nagy, Z., Beliczky, G., Nagy, S., Bercsenyi, M., Gál, D. 2015. Effects of feeding regime on growth, feed conversion and size variation of *Silurus glanis*, *Croatian Journal of Fisheries* 73: 142-147

Hawke, J.P., Plakas, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Snider, T.G., Guarino, A.M. (1987): Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture* 65. 193-204

Hazari, M.H. i Rathod, J.L. (2017): Physicochemical parameters and microbial loads of marine cage farm environment at Polem, Goa. *Indian Journal of Fisheries* 64. 120-124

Holden, I.K., Kehrer, M., Andersen, A.B., Wejse, C., Svensson, E., Johansen, I.S. (2018): *Mycobacterium marinum* infections in Denmark from 2004 to 2017: A retrospective study of incidence, patient characteristics, treatment regimens and outcome. *Scientific reports*. 8. 6738

Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B.E., Swerdlow, D.L. (2010): Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(2). 399–411

Kapetanović D., Dragun Z., Vardić Smrzlić I., Valić D., Teskeredžić E. (2013): The influence of European sea bass farming on the level of heterotrophic bacteria in marine water assessed by SimPlate substrate test. *Fresen. Environ. Bull.* 22. 1274–1279

Kapetanović D., Vardić Smrzlić I., Valić D., Teskeredžić Z., Teskeredžić E. (2017): Culturable microbiota associated with farmed Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Aquatic Living Resources* 30. 1-8

Kapetanović, D., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Vardić Smrzlić, I., Kazazić, S., Bojanić-Rašović, M., Kolda, A., Pešić, A., Perić, L., Žunić, J., Mandić, M., Joksimović, A., Vukić Lušić, D., Đurović, M. (2019): Assessment of microbial sea water and health status of farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Eastern Adriatic Sea (Montenegro and Croatia). *Studia Marina* 32. 52-64

Kapetanović, D., Valić, D., Vardić Smrzlić, I., Teskeeredžić, Z., Teskeredžić, E. (2011): Usporedba i značaj mikrobioloških pokazatelja vode u akvakulturi. *Hrvatske vode*. 19. 76. 151-156

Kapetanović, D., Vardić Smrzlić, I., Valić, D., Teskeredžić, E. (2013): Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea. *Marine pollution bulletin* 75. 46-52

Katavić, I. (2004): Strateške smjernice za razvitak Hrvatske u marikulturi. *Naše more*. 51.1-2

Katavić, I., Herstad, T.J., Kryvi, H., White, P., Franičević, V., Skakelja, N. (2005): GUIDELINES to marine aquaculture planning, integration and monitoring in Croatia. Project „Coastal zone management plan for Croatia“ Zagreb: pp.78

Kayansamruaj, P., Areechon, N., Unajak, S. (2020): Development of fish vaccine in Southeast Asia: A challenge for the sustainability of Se Asia aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*. 103. 73-87

Kim, J.Y. i Lee, J.L. (2017): Correlation of total bacterial and *Vibrio* spp. Populations between fish and water in the aquaculture system. *Frontiers in marine science*. 4. 147

Kolda, A., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubešić, Z., El-Matbouli, M., Lillehaug, A., Lončarević, S., Perić, L., Knežević, D., Vukić Lušič, D., Kapetanović, D. (2020): Profilinf of bacterial assemblages in the marine cage farm environment with implications of fish, human and ecosystem health. *Ecological indicators*. 118. 106785

Kurokawa, S., Kabayama, J., Fukuyasu, T., Don Hwang, S., Park, C-II., Park, S.B., Castillo, C.S., Hikima, J.I. Jung, T.S., Kondo, H., Hirono, I., Takeyama, H., Aoki, T. (2013): Bacterial classification of fish-pathogenic Mycobacterium Species by multigene phylogenetic analyses and MALDI biotyper identification system. *Marine biotechnology*. 15. 340-348

Laiz-Carrion, R., Sangiao-Alvarello, S., Guzman, J.M., Martin del Rio, M.P., Soengas, J.L. and Mancera, J.M. (2005): Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*. 250. 849-861

Lanari, D., D`Agaro, E., Ballestrazzi, R. (2002): Growth parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of live weight and water temperature. *Italian journal animal science* 1. 181-185

Lee, Y.K. i Mazmanian, S.K. (2010): Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?. *Science* 330. 1768-1773

Li, C., Li, Z., Wu, J., Zhu, L., Yue, J. (2017): A Hybrid Model for dissolved oxygen prediction in aquaculture based on multi-scale features. *Information Processing in Agriculture*. 5. 11-20

Li, L. i Ong, M.C. (2017): A preliminary study of a rigid semi-submersible fish farm for open seas. *ASME 2017 36th International Conference on Ocean, Offshore and Arctic Engineering*. American Society of Mechanical engineers. V009T12A044-V009T12A044

Lowrey, L., Tacchi, L., Woodhams, D.C., Salinas, I. (2015): Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and environmental microbiology* 81 (19). 6915-6925

Lozano, S., Iribarren, D., Moreira, M.T., Feijoo, G. (2010): Environmental impact efficiency in mussel cultivation. *Resources Conservation Recycling*. 54. 1269–1277

Marino, G., Marco, P., Petochi, T., Finoia, M.G., Tomassetti, P., Porrello, S., Parisi, G., Giorgi, G., Lazzaro, M., Poli, B.M. (2012): Organic vs conventional sea bass and sea bream cage farming, dostupno na: <https://www.was.org/easonline/mobile/Paper.aspx?i=3744> 25.4.2019

Martinez, B., Miranda, J.M., Nebot, C., Rodriguez, J.L., Cepeda, A., Franco, C.M. (2010): Differentiation of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*): Proximate Chemical Composition, Fatty Acid Profile, Trace Minerals and Antimicrobial Resistance of Contaminant Bacteria. *Food science and technology international*. 16. 435-441

Martino, M.E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., Cardazzo, B. (2011): Determination of Microbial Diversity of Aeromonas Strains on the Basis of Multilocus Sequence Typing, Phenotype, and Presence of Putative Virulence Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 77. 4986–5000

Martins, P., Coelho, F.J.R.C., Cleary, D.F.R., Pires, A.C.C., Marques, B., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Gomes, N.C.M. (2018): Seasonal patterns of bacterioplankton composition in a semi-intensive European seabass (*Dicentrarchus labrax*) aquaculture system. *Aquaculture*. 490. 240–250

Miccoli, A., Saraceni, P.R., Scapigliati, G. (2019): Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish and shellfish immunology*. 94. 800-809

Ministarstvo poljoprivrede, Uprava ribarstva, <https://ribarstvo.mps.hr/>, pristupljeno 5.1.2022.

Moretti, A., Pedini, Fernandez-Criado, M., Cittolin, G., Guidastri, R. (1999): Manual on Hatchery Production of Sea Bass and Gilthead Sea Bream. Volume 1. Rome. FAO: 194p

Myers, R.A.; Worm, B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature* 2003, 423, 280–283

Narodne novine, broj 51/14. Uredba o kakvoći voda za kupanje. Vlada Republike Hrvatske

Ng, C., Chen, H., Goh, S.G., Haller, L., Wu, Z., Charles, F.R., Trottet, A., Gin, K. (2018): Microbial water quality and the detection of multidrug resistant *E.coli* and antibiotic resistance gene in aquaculture sites of Singapore. *Marine Pollution Bulletin* 135. 475-480

Novosel, B. (2019): Utjecaj vremena nasadivanja mlađi orade, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) i lubina, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) na rast i konverziju hrane u kaveznom sustavu. Završni rad. Pula: Sveučilište Jurja Dobrile, Odjel za prirodne i zdravstvene studije

Oikon. Ribarstvo F d.o.o. (2012): Povećanje kapaciteta uzgajališta bijele ribe u uvali Veli Bok na Cresu. Studija o utjecaju na okoliš. Zagreb

Onianwah I. F., Stanley H. O., Oyakhire M. (2018): Microorganisms in Aquaculture Development. Global Advanced Research Journal of Microbiology 7. 127-131

Orada Adriatic d.o.o., <https://www.royal-adriatic.com/>, pristupljeno: 1.10.2021.

Pampanin, D.M., Volpato, E., Marangon, I., Nasci, C. (2005): Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. Comparative Biochemistry and Physiology. 140:41-52

Peck, M.A., Buckley, L.J., Caldarone, E.M., Bengtson, D.A. (2003): Effects of food consumption and temperature on growth rate and biochemical-based indicators of growth in early juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus*. Marine ecology progress series. 251. 233-243

Perez-Sanchez, T., Mora-Sanchez, B., Balcázar, J.L. (2018): Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. Trends in Microbiology. 10.1016/j.tim.2018.05.002

Rallis, E. i Koumantaki-Mathioudaki E. (2007): Treatment of *Mycobacterium marinum* cutaneous infections. Expert opinion. 8. 2965-2978

Ramljak, A. (2020): Prisutnost bakterija otpornih na antibiotike kao dijela mikroflore uzgojnog lubina (*Dicentrarchus labrax*). Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. Biološki odsjek

Rigos, G., Kogiannou, D., Padros, F., Cristoforo, C., Florio, D., Fioravanti, M., Zarza, C. (2021): Best therapeutic practices for the use of antibacterial agent in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. Reviews in aquaculture 13. 1285-1323

Sanz-Lázaro, C. i Marín, A. (2011): Diversity patterns of benthic macrofauna caused by marine fish farming. Diversity 3. 176-199

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011): Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerging Infectious Diseases journal. 17. 7-15

Scarano, C., Piras, F., Viridis, S., Ziino, G., Dalmasso, A., De Santis, E.P.L., Spanu, C. (2018): Antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. strains isolated for *Sparus aurata* reared in Italian mariculture farms. International journal of food microbiology 284. 91-97

Shainee, M., Ellingsen, H., Leira, B.J., Fredheim, A. (2013): Design theory in offshore fish cage designing. *Aquaculture*. 392-395. 134–141

Sisma-Ventura, G., Kress, N., Silverman, J., Gertner, Y., Ozer, T., Biton, E., Lazar, A., Gertman, I., Rahav, E., Herut, B. (2021): Post-eastern Mediterranean Transient Oxygen Decline in the Deep Waters of the Southeast Mediterranean Sea Supports Weakening of Ventilation Rates. *Frontiers in Marine Science*. 7. 10.3389/fmars.2020.598686

Smyrli, M. i Katharios, P. (2020): *Aeromonas* spp. In: Zrncic S. (ed): Diagnostic manual for the main pathogen in European seabass and gilthead seabream aquaculture. Zaragoza. CIHEAM 2020. 107-116

Strunjak-Perović, I., Hacmanjek, M., Čož-Rakovac, R., Teskeredžić, E., Teskeredžić, N., Topić-Popović, N. (1997): Bakterijske bolesti morskih riba. *Ribarstvo*. 55. 147-160

Subasinghe, R. (2009): Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: the issues, prospects and challenges. In : Rogers C. (ed.), Basurco B. (ed.). *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza : CIHEAM. 5-11. (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86). *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture, 2003/05/21-23, Izmir (Turkey)*. <http://om.ciheam.org/om/pdf/a86/00801057.pdf>

Teodorowicz, M. (2013): Surface water quality and intensive fish culture. *Archives of Polish Fisheries*. 21. 65-111

Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magarinos, B., Barja, L. (1991): Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99. 1-15

Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernandez, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., Padros, F. (2004): Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*. 229. 55–65

Vendramin N., Zrncic S., Padrós F., Oraic D., Le Breton A., Zarza C., Olesen N. J. (2016): Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 36, 38-45

Viličić, D. (2014): Specifična oceanološka svojstva hrvatskog dijela Jadrana. *Hrvatske vode* 22. 297-314

Vukić Lušić, D., Kolda, A., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Kazazić, S., Pikelj, K., Vardić Smrzlić, I., Perić, L., Žunić, J., Hengl, B., Knežević, D., Kapetanović, D. (2019): Mikrobna ekologija-pokazatelj zdravstvenog stanja morskog okoliša u Malostonskom zaljevu.

7. hrvatska konferencija o vodama s međunarodnim sudjelovanjem "Hrvatske vode u zaštiti okolisa i prirode" : zbornik radova / Biondić, Danko ; Holjević, Danko ; Vizner, Marija - Zagreb: Hrvatske vode, 585-591

Watanabe, T. (2002): Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science*. 68. 242– 252

Watts, J.E.M., Schreier, H.J., Lanska, L., Hale, M.S. (2017): The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*. 15. 158

Wei, Y., Wei, Q., An D. (2020): Intelligent monitoring and control of open sea cage culture: A review. *Computers and electronics in agriculture* 169. 105119

Wong, S., Waldrop, T., Summerfelt, S., Davidson, J., Barrows, F., Kenney, B.P., Welch, T., Wiens, G.D. Snekvik, K., Rawls, J.F., Good, C. (2013): Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. *Applied and environmental microbiology* 79 (16). 4974-4984

Yardimici, R.E. i Timur, G. (2015): Isolation and identification of *Tenacibaculum maritimum*, the Causative Agent of Tenacibaculosis in Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) on the Aegean Sea Coast of Turkey. *The Israeli journal of aquaculture=Bamidgeh* 67

Yazdi, S.K. i Shakouri, B. (2010): The effects of climate change on aquaculture. *International Journal of Environmental Science and Development*. 1. 378-382

9. Životopis

Rođena sam 14. studenog 1996. godine u Rijeci. Pohađala sam osnovnu školu Frane Petrića u Cresu, nakon koje sam upisala opću gimnaziju Ambroza Haračića PO Cres. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja 2015. godine uspisala sam preddipomski studij Znanost o moru na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. Studij sam završila 2019. godine s obranom teme završnog rada „Utjecaj vremena nasadiivanja mlađi orade, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) i lubina, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) na rast i konverziju hrane u kaveznom sustavu“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Gavrilović. Iste godine, 2019. upisala sam diplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Ekologija i zaštita prirode, modul: more. Ponešto iskustva stekla sam na uzgajalištu Veli Bok tvrtke Orada Adriatic d.o.o. gdje sam također odradila stručnu prasku. Godine 2020. upisala sam paralelno diplomski studij na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Ribarstvo i lovstvo.