

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Jarak

**Utjecaj prehrane na razvoj probavila mlađi manjića (*Lota lota*
Linnaeus, 1758) uzgojenih u akvakulturi**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad, izrađen na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. Davora Zanelle, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

Zahvale

Puno hvala tehničarki Zrinki Benčini na pomoći, svom znanju i potpori koju mi je pružala od prvog dana. Hvala profesorici Gordani Lacković-Venturin na pomoći oko histoloških podataka. Hvala mentoru izvanrednom profesoru Davoru Zanelli na iskazanom povjerenju u samostalnoj izradi ovog rada. Hvala kolegama Jurgenu Adriaenu i Thomasu Abeelu na pomoći u Belgiji, na znanju i stvaranju najboljih radnih navika u životu. Posebno hvala profesorici Maguire bez koje moj odlazak u Belgiju ne bi bio ni moguć. Hvala mojoj obitelji na već uobičajenoj podršci, pogotovo baki Seki. Hvala kolegama na podršci, pogotovo Špeli i Sandri koji su mi bili najveća podrška.

I na kraju, najveće hvala višoj asistentici dr. Romani Gračan za nevjerojatnu podršku, pomoć i razumijevanje kroz cijeli proces nastajanja ovog rada!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj prehrane na razvoj probavila mlađi manjića (*Lota lota* Linnaeus, 1758) uzgojenih u akvakulturi

Matea Jarak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

U ovom radu analiziran je utjecaj prehrane na razvoj probavila mlađi manjića (*Lota lota* Linnaeus, 1758) uzgojenih u recirkulacijskom sustavu akvakulture. Prehrana ličinki manjića temelji se na hranjenju živim organizmima, najčešće račićima artemijama, nakon čega se prelazi na hranjenje umjetnom hranom. Cilj ovog istraživanja je utvrditi razlike u razvoju probavila mlađi manjića uzgojenih u akvakulturi s obzirom na razdoblje prelaska na umjetnu, suhu hranu. Promjene u prehrani kao prelazak sa žive na umjetnu hranu mogu uzrokovati visoku smrtnost među jedinkama. U radu su analizirani histološki preparati poprečnog presjeka stražnjeg crijeva u 72 ličinke manjića uzgojenih u mrjestilištu edukacijsko-istraživačkog postrojenja AQUA-ERF iz Zele, Belgija. Uzorkovane jedinke bile su podijeljene u dvije skupine s obzirom na početak prehrane umjetnom hranom: 1) u 6. tjednu života i 2) u 8. tjednu života. Histološki preparati su obojani kombinacijom hematoksilina i eozina, te selektivnom metodom za vrčaste stanice kombinacijom perjudne kiseline i Schiffovog reagensa (PAS) te alcijanskim modrilom (AB). Mjerene su dužina i težina tijela, površina sluznice i visina epitela te je kvantitativno određen udio vrčastih stanica po površini sluznice i udio AB i PAS pozitivnih vrčastih stanica. Masa i težina tijela, površina sluznice, visina epitela, udio vrčastih stanica i AB vrčastih stanica pozitivno su korelirali sa starošću ličinki u obje istraživane skupine. Ličinke koje su prešle na umjetnu hranu u 8. tjednu života bile su bolje prilagođene novom načinu prehrane na što ukazuju kvantitativne histološke analize probavila, te povećani somatski rast analiziranih jedinki manjića.

(36 stranica, 18 slika, 8 tablica, 45 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Lota*, stražnje crijevo, umjetna hrana, vrčaste stanice, enterocite

Voditelj: izv.prof. dr.sc. Davor Zanella

Ocjenitelji: izv.prof.dr.sc. Davor Zanella

i z v . prof.dr.sc. Sven Jelaska

doc.dr.sc. Ana Galov

Zamjena: izv.prof.dr.sc. Domagoj Đikić

Rad prihvaćen: 6.2.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master's Thesis

Impact of feeds on development of the digestive system of burbot (*Lota lota* Linnaeus, 1758) reared in aquaculture

Matea Jarak

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb

This study describes impacts of feeds on development of the digestive system of burbot larvae (*Lota lota* Linnaeus, 1758) reared in recirculatory systems in aquaculture. The larvae diet starts with feeding larvae living prey and after they switch to manufactured diet which affects the mortality rate. Because of it, the aim of this experiment was to determine the period of weaning start, considering the development of the digestive system. In this study, histological sections of the posterior gut from 72 burbot larvae reared in hatchery in education and research facility from Zele, Belgium were analysed. Sampled larvae were divided into two groups: one group started weaning process in 6th week of life, where the second one started weaning in 8th week of life. The sections were stained with hematoxylin and eosin, combined periodic acid and Schiff reagents (PAS) and alcian blue (AB). The whole body length, wet body weight, the mucosa surface and epithelia height were measured, and goblet cells per mucosa and AB and PAS positive goblet cells were counted. Whole body length, wet body weight, the mucosa surface and epithelia height, count of goblet cells per mucosa measured and count of AB and PAS positive goblet cells positively correlated with the larvae age in both groups. The larvae that started with early weaning in 8th week showed a better growth in length and weight.

(36 page, 18 figures, 8 tables, 45 references, original in: Croatian)

Key words: *Lota*, hindgut, commercial diets, goblet cell, epithelia

Supervisor: Dr. Davor Zanella, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Davor Zanella, Assoc. Prof.

Dr. sc. Sven Jelaska, Assoc. Prof.

Dr. sc. Ana Galov Assis. Prof.

Replacement: Dr. sc. Domagoj Đikić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 6th 2015

Popis kratica

AB- alcijansko modriilo, eng. *alcian blue*

DHA- doikozahexanoična masna kiselina

dH₂O-destilirana voda

EPA-eikosapentanoična masna kiselina

HE- hematoksilin i eozin

PAS- metoda Schiffovog reagensa i perjodne kiseline, eng. *periodc acid Schiff*

SADRŽAJ

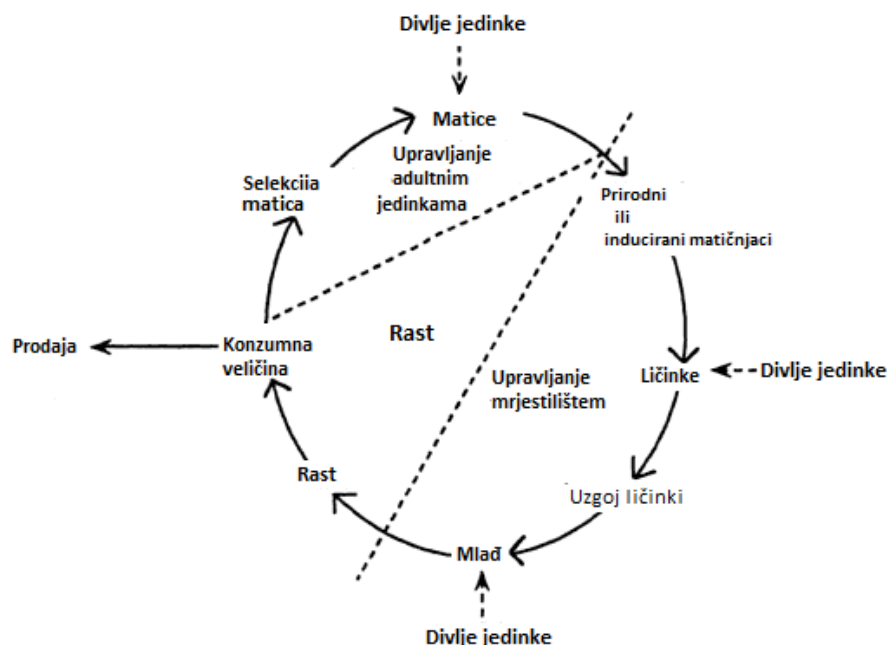
1. UVOD.....	1
1.1. AKVAKULTURA	1
1.2. RECIRKULACIJSKI UZGOJNI SUSTAVI	2
1.3. BIOLOGIJA MANJIĆA	4
1.4. UZGOJ LIČINKI U AKVAKULTURI	6
1.5. PREHRANA U AKVAKULTURI	7
1.6. PROBAVNI SUSTAV RIBA	9
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. . INICIJALNA FAZA.....	13
3.2. EKSPERIMENTALNA FAZA	13
3.2.1. TJEDNO UZORKOVANJE.....	14
3.3. LABORATORIJSKA OBRADA	15
3.3.1. OBRADA UZORAKA	15
3.3.2. HISTOLOŠKA BOJANJA.....	15
3.3.3. MIKROSKOPSKA OBRADA PREPARATA, MJERENJE I FOTOGORAFIRANJE	16
3.3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. DESKRIPTIVNE MORFOLOŠKE VRIJEDNOSTI	19
4.2. ODNOS STAROSTI LIČINKI I MORFOMETRIJSKIH MJERA PROBAVILA.....	21
4.3. RAZLIKE U GRAĐI STRAŽNJEG CRIJEVA IZMEĐU DVIJE SKUPINE LIČINKI.....	24
4.4. PROMJENE MORFOMETRIJSKIH VRIJEDNOSTI U CRIJEVU S OBZIROM NA TJEDNE ŽIVOTA.....	26
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA	33

1. UVOD

1.1. AKVAKULTURA

Akvakultura ili uzgoj akvatičkih organizama je dio poljoprivrede za koji se prakticira u raznim oblicima i različitim intenzitetom preko 2000 godina. Smatra se da potječe iz Kine te je prvi zapis o akvakulturi porijeklom iz Kine. Uzgoj u vodenoj sredini je stari zanat koji se izučavao generacijama te je razvijan na principu pokušaja i pogreške. Akvakultura kao znanost je relativno nova te je kao prvo dostignuće naveden razvoj inducirane reprodukcije hipofizacijom 1935. u Brazilu (Lovell 1998).

Definicija akvakulture je mnogo, ali je internacionalno prihvaćena ona iz FAO (eng. *Food and Agriculture Organization*) iz 1990. u kojoj stoji da je akvakultura: „...uzgoj akvatičnih organizama koji obuhvaćaju ribe, školjkaše, rakove i vodeno bilje. Ovakva poljoprivreda podrazumijeva neki oblik intervencije u procesu uzgoja mlađi da bi se povećala produkcija, poput regularnog stokinga, hranjenja, zaštite od predatora itd. Također, implicira da je kultivirani stok u individualnom ili korporacijskom vlasništvu.“ Većina uzgajališta koja se baziraju na kulturi spadaju u akvakulturu; ona uzgajališta koja uzgajaju ciljane vrste u specijaliziranim nastambama poput jezera, kaveza, stajaćih ili protočnih bazena te u vrećama, na konopima ili mrežama što se tiče školjkaša, se mogu nazvati tipovima akvakulture. Različite forme koje variraju od puštanja uzgojenih juvenilnih jedinki u jezero ili rezervoar u kojem samostalno žive do prikupljanja preko hvatanja mladih i gojenja do konzumne veličine u posebnim kontejnerima (Slika 1). Oblik uzgoja kojem teži većina pogona je onaj u kojem riba prolazi sve faze životnog ciklusa. Vrste zrakoperki koje se najčešće uzgajaju u svijetu pripadaju redovima Cypriniformes, Salmoniformes, Siluriformes, Perciformes i Anguiliformes (de Silva i Anderson 1995).



Slika1 Shematski prikaz proizvodnje u akvakulturi. Preuzeto i prilagođeno iz de Silva i Anderson 1995.

Ovisno o načinu prehrane postoje 3 glavna tipa akvakulture: ekstenzivna, intenzivna te semi-intenzivna kultura. Prehrana riba u ekstenzivnoj kulturi se bazira na uzimanju hrane iz okoliša u kojem se riba nalazi, bez dodatne prihrane. Intenzivan način uzgoja se bazira na prehrani dobro izbalansiranom hranom u obliku gotove smjese kojom se lako rukuje te ispunjava nutritivne zahtjeve vrste. Većina uzgojnih pogona kod nas spada u semi-intenzivan uzgoj koji podrazumijeva uzimanje hrane iz prirode uz dohranu riba (Treer i sur. 1995).

Unatoč prihvaćenom mišljenju, akvakultura nije vezana samo za uzgoj organizama u konzumne svrhe. Po de Silvi i Andersonu (1995) vrste se uzgajaju i iz drugih razloga kao što su:

1. Konzervacija: uzgoj nativnih vrsta kojima pada brojnost divljih populacija s ciljem reintrodukcije
2. Održavanje divljih populacija u ribnjačarstvima
3. Rekreacija: uzgoj stoka populacija za nasad u rijeke i jezera u svrhu sportskog ribolova
4. Uzgoj vrsta za akvarije
5. Proizvodnja industrijskih proizvoda poput farmaceutskih i sl.
6. Proizvodnja dodataka prehrani poput alge vrste *Spirulina* sp.
7. Manipulacija okoliša, poput prirodnog uklanjanja vodenog bilja (uzgoj amura i sličnih herbivornih vrsta)

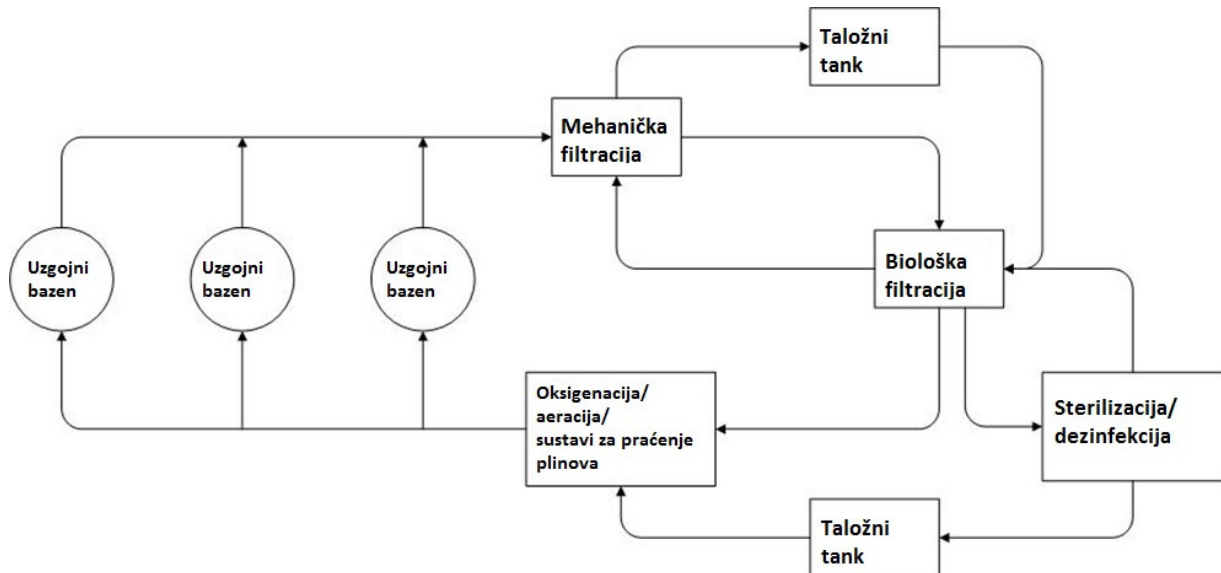
1.2. RECIRKULACIJSKI UZGOJNI SUSTAVI

U dokumentu FAO iz 2010. godine stoji: „...budućnost akvakulture je u produkciji ribe na održiviji način zbog veće potražnje u budućnosti te pooštrenih pravila vezanih za okoliš.“ Manjak prostora za širenje i novelokacije, ograničeni izvori svježe vode te svijest o zagađenju okoliša smatraju se glavnim preprekama za daljnji razvoj i širenje konvencionalnih načina uzgoja u kavezima te u protočnim sustavima u akvakulturi.

Recirkulacijski uzgojni sustavi u akvakulturi su razvijeni '80-tih godina prošlog stoljeća kao tehnologija za intenzivan uzgoj akvatičnih organizama. Njihova upotreba najčešća je na područjima gdje je svježja površinska voda nedostupna (Badiola i sur. 2012). Glavni su razlozi za razvitak takvih sustava očuvanje energije, reducirana potrošnja vode, reducirana upotreba zemljišta, mogućnost kreiranja različitih optimalnih karakteristika u uzgojnom prostoru i time skraćivanje uzgojnog ciklusa te mogućnost korištenja nespecifičnog lokaliteta (Martins i sur. 2010). Takvi sustavi omogućuju da čak 90-99% upotrijebljene vode bude reciklirano prolaskom kroz različite procese pročišćavanja. Recirkulacijski sustavi omogućuju veću kontrolu nad okolišnim parametrima i kvalitetom vode, time postižući optimalne uvjete za uzgoj kulture (Badiola i sur. 2012). Zbog toga što nisu vezani za površinske vode često ih se naziva i „urbanim“ akvakulturama.

Zbog recikliranja vode u sustavima su potrebni procesi pročišćavanja vode. Ti pojedinačni procesi uključuju mehaničke, kemijske i biološke komponente koje omogućuju kontinuirano ponovno korištenje vode iz uzgojnih sustava (Slika 2). Potrebno je točno poznavati karakteristike i kvalitetu svake komponente jer sofisticiranost i kvaliteta sustava ovisi o efikasnosti svake pojedine komponente, a sustav je efikasan onoliko koliko je efikasna njegova najslabija komponenta. Komponente koje se najčešće prate u ovakvim sustavima su: zasićenost kisikom, koncentracija amonijaka i slobodnog dušika,

te koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida. Povećanjem ili padom vrijednosti samo jedne od ovih komponenti, sustav može nepravilno funkcionirati. Potrebne vrijednosti se održavaju na sljedeći način: krupni otpad se otklanja sedimentacijom ili prosijavanjem u mehaničkim bubnjevima ili kroz filtre različitih veličina, kisik se dodaje aeracijom ili oksigenacijom, ugljikov dioksid se uklanja deplinifikacijom dok se amonijak pretvara u nitrat procesom nitrifikacije u aerobnim biološkim filtrima. U biološkim filtrima se održava zdrava mikrobiološka zajednica koja obavlja nitrifikaciju i „zadužena“ je za pročišćavanje vode i održavanje njene kvalitete.



Slika 2. Shematski prikazana organizacija recirkulacijskog uzgojnog sustava (preuzeto i prilagođeno iz Department of Primary Industries 2008).

Iako je takva zajednica jedna od osnova recirkulacijskog sustava, zbog nje postoji mogućnost obolijevanja uzgajanih organizama. Minerali, ostaci lijekova, metaboliti i ostaci hrane se mogu akumulirati u sustavu i negativno utjecati na zdravlje, kvalitetu i sigurnost uzgajanih životinja (Martins i sur. 2010). Zbog problema poput pojave bolesti te potrebnog liječenja nakon, zahtjevnog upravljanja i kontrole sustava te najčešće presudne komponente, visokog početnog i operacijskog kapitala koji je potreban, ovakvi sustavi još nisu zaživjeli u globalnoj akvakulturi.

Vrste koje se najčešće uzgajaju u recirkulacijskim sustavima su afrički oštrozubi som (*Clarias gariepinus* Burchell), tilapija (*Oreochromis niloticus* L.) i azijski brancin (*Lates calcarifer* Bloch). Tek je u zadnjih par godina razvijen interes za nešto raznolikiju slatkovodnu akvakulturu u Europi te se potiče uzgoj nativnih vrsta poput smuđa (*Sander lucioperca* L.) i grgeča (*Perca fluviatilis* L.). posljednji trend među uzgajanim vrstama su one koje ne zahtijevaju visoke temperature, poput manjića (*Lota lota* Linnaeus, 1758) (Trejchel i sur. 2013).

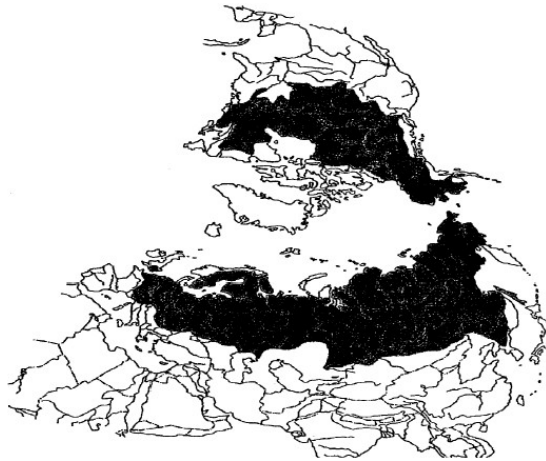
1.3. BIOLOGIJA MANJIĆA

Manjić je jedini predstavnik porodice tovarki (*Gadidae*, Actinopterygii) koji cijeli svoj životni ciklus provede u slatkoj vodi. Ova vrsta ima duguljasto, bočno spljošteno tijelo sa spljoštenom glavom. Na vrhu brade ima jedan brk, dok na nosnicama ima cjevaste nastavke (Slika 3). Ova vrsta ima dvije leđne peraje od kojih je prednja kratka i niska dok je stražnja puno duža. Podrepna peraja je dugačka gotovo kao stražnja leđna, a repna peraja je okruglasta. Trbušne peraje su lepezaste i smještene malo ispred prsnih koje su uske s produženom drugom perajnom šipčicom. Usta su široka te i gornja i donja čeljust sadrže puno sitnih zubića. Juvenilne životinje su najčešće crne dok odrasle jedinke mogu imati maslinasto zelene do crne mrlje na leđnoj strani dok im je trbuh krem boje ili bijel. Tijelo je prekriveno malim cikloidnim ljuskama koje se ne mogu koristiti za određivanje starosti (McPhail i Paragamian 2000).



Slika 3. Manjić (*Lota lota*) preuzeto s www.hlasek.com.

Manjić ima holarktičku distribuciju koja se proteže gotovo kontinuirano od Velike Britanije preko Europe i Azije do Beringovog prolaza te preko Sjeverne Amerike od Aljaske do Atlantske obale (McPhail i Paragamian 2000) kako je prikazano na slici 4. Ova vrsta dolazi u rijekama, jezerima i bočatim vodama. Može se svrstati u stenotermalnu vrstu hladnih voda, prilagođenu na život u hladnim uvjetima (Žarski i sur.2010).



Slika 4. Cirkumpolarna distribucija manjića (preuzeto iz McPhail i Paragamian 2000).

Odrasle jedinke možemo naći u jako oksigeniranim tekućicama i velikim, dubokim jezerima sa slabom strujom. Krepuskularne su i noćne životinje te preko dana traže zaklon ispod kamenja, u pukotinama na riječnoj obali te u korijenju drveća i gustoj vodenoj vegetaciji (McPhail i Paragamian 2000). Do razmnožavanja dolazi najčešće zimi ili u ranom proljeću te je sezona parenja vrlo kratka (2 do 3 tjedna). Manjići se pare pri niskim temperaturama (1-4°C), te su terenska opažanja pokazala da su jaja manjića prilagođena na maksimalno preživljavanje na temperaturama od 0-2°C (McPhail i Paragamian 2000). Odrasle jedinke se pare u jezerima ispod leda i u mirnijim dijelovima rijeka i potoka. Preferirani supstrat je šljunak, pijesak ili veći oblutci. Odrasle jedinke ne pripremaju mjesto za odlaganje jaja, već ih ženke otpuštaju u stupac vode visoko iznad supstrata. Jaja su inicijalno plutajuća te ih struja nosi dok ne potonu i upadnu u prostor između čestica supstrata (McPhail i Paragamian 2000). Zanimljivo je da se odrasle jedinke ne pare svake godine. Pulliainen i Korhonen (1990) su procijenili da se oko 30% odraslih jedinki u njihovom uzorku nije parilo svake godine.

Nakon izlijeganja, ličinke su limnetičke te pasivno plutaju u stupcu vode, no kako rastu sposobnost plivanja im raste te su mobilnije (McPhail i Paragamian 2000). Embriji manjića su vrlo mali i delikatni, ukupne dužine tijela 3-4 mm te nemaju usta niti probavnu cijev do ponekad i više od tjedan dana nakon izlijeganja (Jensen i sur. 2008). Kreću se u manjim plovama te se hrane danju. Mlađ manjića je isprva foto-pozitivna, no s vremenom (kad dosegnu otprilike 40 mm) mijenjaju svoje ponašanje i postaju foto-negativne. U jezerima to potiče prelazak u noćni, samački i bentički način života, skrivajući se preko dana ispod kamenja i u rupama, te noću izlazeći u lov (McPhail i Paragamian 2000). Takva promjena u ponašanju se može povezati sa promjenom u prehrani kod mlađi; nakon što prijeđu s endogene prehrane na egzogenu jedinke počinju loviti živi plijen. Starije studije pokazuju da se ličinke počinju hraniti pet do deset dana nakon izlijeganja (Wolnicki i sur. 2001, Wolnicki i sur. 2002, Jensen i sur. 2008). Ryder i Pesendorfer (1992) su istražili odnos veličine jedinke i vrstu njihovog plijena: ličinke dugačke 3-10 mm primarno se hrane veslonošcima i vodenbuhama, od 11-20 mm zooplanktonom i dvokrilcima, od 21-30 mm većinom zooplanktonom i manjim dijelom amfipodima, 31-40 mm najvećim dijelom amfipodima dok veće jedinke prehranu baziraju na amfipodima i kukcima.

Nestanak manjića u mnogim europskim rijekama doveo je do potrebe za poboljšanjem tehnologija u uzgoju mlađi, u svrhu reintrodukcije kao i uzgoja u konzumne svrhe. Položaj manjića u ekosustavu kao vršnog predatora doprinosi njegovoj važnosti u ekologiji. Zbog toga se danas provode brojne studije na različitim područjima biotehnologije te reprodukcije manjića i prehrane mlađi (Žarski i sur. 2010). Danas je reintrodukcija često bazirana na uzgoju mladih manjića u kulturi, a uzgoj mladih riba na umjetnoj hrani bi bio najisplativiji način dobivanja kulture u velikoj gustoći populacije i pod uvjetima veće kontrole (Harzevili i sur. 2000). Manjić je riba visoke kvalitete i potencijalna je vrsta za uzgoj u akvakulturi, iz više razloga: 1) stenotermalna je vrsta u hladnim vodama, 2) ima visoku stopu rasta, 3) ima visoku vrijednost na tržištu 4) ima bijelo, ukusno meso bez kostiju i s vrlo malo masnoća, 5) jetra je bogata ribljim uljem 6) kupci imaju dobru sliku o manjiću zbog toga što pripada porodici bakalara (Trabelsi i sur. 2011).

1.4. UZGOJ LIČINKI U AKVAKULTURI

Ličinački stadij je jedan od najvažnijih stadija u životu riba. Morfološke i fiziološke studije o ovom stadiju potvrđuju da se tijekom ovog kratkog perioda ličinke uvelike razlikuju od odraslih jedinki. Dostupnost hrane je jedna od najvažnijih stavki koje utječu na preživljavanje i rast ličinki. Ovisno o početku i kvaliteti probave nakon prestanka endogene prehrane (apsorpcijom žumanjčane vreće) dolazi do velike varijacije među vrstama (Žarska i sur. 2014). Na primjer, salmonidne vrste imaju dobro razvijen želudac i prije nego krene egzogena probava te su njihove ličinke u stanju probaviti i umjetnu hranu (Dabrowski 1984). Kod većine vrsta ličinkama je potrebna živa hrana na početku hranjenja. To je jedna od glavnih prepreka u efikasnoj larvikulturi kod velikog broja ribljih vrsta. Iz tog razloga ličinkama se mora davati prvo živa hrana koja je atraktivnija i puno lakša za probaviti od umjetne hrane (Žarska i sur. 2014). Prelazak sa žive na umjetnu hranu (eng. weaning) najčešće rezultira visokom stopom smrtnosti i jedan je od najkritičnijih stadija koji utječu na produktivnost mnogih uzgojnih pogona (Engrola 2010). S ekonomskog gledišta, vrlo je bitno da ličinke prijeđu sa žive na umjetnu hranu u što ranijem stadiju kulture zbog visokih troškova hranjenja živom hranom. Kod nekih vrsta taj je period hranjenja živom hranom relativno kratak; na primjer ličinke orade (*Sparus aurata* L.) ili jeza (*Leuciscus idus* L.) mogu probaviti umjetnu hranu već 10 dana nakon izlijeganja (Kwiatkowski i sur. 2008). No, većina vrsta poput smuđa, linjaka ili zlatnog karasa, te lista i brancina kao morskih vrsta, nisu u stanju probaviti umjetnu hranu prva dva tjedna nakon izlijeganja ili čak i duže. Uzevši u obzir objavljene studije, može se pretpostaviti da uspjeh prelaska na umjetnu hranu sa žive ovisi o razvijenosti probavnog sustava ličinki. Kod riba takav je razvoj više vezan za njihovu veličinu (dužina i težina) nego za starost, dok stopa rasta ovisi o faktorima poput temperature, fotoperiodu i količini i kvaliteti ponuđene hrane (Boeuf i Le Bail 1999, Wolnicki i sur. 2001, Wolnicki i sur. 2002, Brown i sur. 2003). Starost ličinke se ne podudara striktno s veličinom jedinki, čak niti unutar iste vrste, no veličina je često povezana sa stupnjem razvijenosti jedinke, poput razvijenosti probavnog sustava. Iz tog razloga je važno definirati optimalnu težinu i dužinu ličinke kao prvi korak ka efikasnom procesu prelaska na umjetnu hranu koji će osigurati visoku stopu preživljenja i stopu rasta (Žarska i sur. 2014).

1.5. PREHRANA U AKVAKULTURI

Razvoj tehnologije proizvodnje hrane omogućava višu održivost u akvakulturi te smanjuje utjecaj na okoliš. Recirkulacijski sustavi održavaju optimalne okolišne uvjete kroz cijelu godinu što pogoduje dobrobiti ribe i povećava iskoristivost hrane čime se povećava efikasnost hranjenja (Badiola i sur. 2012). Dobra prehrana u proizvodnji ribe je bitna u ekonomskom smislu proizvodnje zdravog i visokokvalitetnog produkta; prehrana je kritična sastavnica u proizvodnji jer troškovi dosižu i 40-50%. Postoje rezultati studija o prehrani mlađi manjića živom hranom u kontroliranim uvjetima (Wolnicki i sur. 2001, Žarski i sur. 2009, Harzevili i sur. 2003, Harzevili i sur. 2004) no pokusi sa prelaskom na umjetnu hranu (Trabelsi i sur. 2011, Jensen i sur. 2008, Jensen i sur. 2011) su pokazali visoku stopu smrtnosti. Dolazimo do zaključka da danas još uvijek nedostaju metode efektivnog prelaska na umjetnu hranu u intenzivnoj larvikulturi manjića.

Kako je već navedeno, ovisno o veličini ličinke njihova se prehrana sastoji od različitih vrsta zooplanktona, račića ili kukaca (Ryder i Pesendorfer 1992). U usporedbi s ostatkom tijela, usta su kod manjića relativno velika što im omogućuje da se hrane malim nauplijima vrste *Artemia* uvjetima uzgoja (Wolnicki i sur. 2002). Jensen i sur. (2008) su u svojem istraživanju započeli s hranjenjem ličinki nakon što se probavni sustav u potpunosti razvio (od usta do anusa), dok Žarski i sur. (2009) tvrde da početak hranjenja ovisi o starosti ličinke (oko 10 dana nakon izlijeganja). U oba slučaja žumanjčana vrećica je bila reapsorbirana. Osim o razvojnom stadiju ličinke, njezin pravilan razvoj ovisi i o vrsti žive hrane koju dobiva. Tako su u svojoj studiji Harzevili i sur. (2003) pokazali da su jedinke hranjene vrstom *Brachionus calyciflorus* (Rotifera, kolnjaci) imali višu stopu preživljenja od jedinki hranjena artemijama. U istom istraživanju pokazano je kako i prehrana mikroalgama poput vrstom *Chlorella* sp. povećava stopu preživljenja. Ovi rezultati pokazuju kako je kvaliteta početne hrane ključna za daljnji razvoj ličinki manjića te da je sitan plijen esencijalan u prvom hranjenju. Dodatak mikroalgi u bazene s ličinkama ima pozitivne efekte: alge mogu biti izvorom esencijalnih nutrijenata, stimulirati probavni sustav i utjecati na sastav mikroflore u ličinki. Najveća mana takvom uzgoju je skup uzgoj koji zahtjeva puno rada (Harzevili i sur. 2003). Pokusi Jensena i Caina (2009) su pokazali da se uspješan prelazak sa žive na umjetnu hranu može obaviti tek kada su ličinke stare oko 45 dana, tj. nakon 30 dana hranjenja živom hranom. Ukoliko se ličinke i nakon 30 dana nastavi hraniti artemijama, stopa preživljenja se povećava. Studije rađene na tu temu su dale slične rezultate što nam govori da je u procesu prelaska sa žive na umjetnu hranu stadij hranjenja živom hranom od velike važnosti. Ti rezultati nam pokazuju da je ovisnost ličinki o živom plijenu visoka te da rani prelazak na umjetnu prehranu može dati samo loše rezultate (Jensen i sur. 2008).

Umjetna hrana može biti kompletna ili služiti kao nadomjestak. Kompletna hrana pruža sve potrebne hranjive tvari poput proteina, ugljikohidrata, lipida, vitamina i minerala, koji su potrebni za optimalni rast i zdravlje uzgajane ribe. Ribe uzgajane u zatvorenim, umjetnim sustavima ne mogu uzimati hranu iz okoliša te je potrebno hranjenje kompletnom hranom (Craig i Helfrich 2002). U uzgoju kultura riba prevladavaju herbivorne i omnivorne vrste. Karnivorne vrste koje se uzgajaju su većinom morske ili diadromne slatkovodne salmonidne vrste. Svaka od uzgajanih vrste ima svoje nutritivne potrebe, posebno ponašanje vezano uz hranjenje i preferiranu hranu. Ribe je potrebno hraniti adekvatnim količinama hrane zbog ekonomične proizvodnje; višak hrane može dovesti do pretilosti ribe i smanjivanja kvalitete mesa (Lovell 1998).

Proteini su najskuplji dio hrane te je bitno točno odrediti potrebe za proteinima svake vrste i njezinih razvojnih stadija. Ovisno o tipu prehrane, ribe zahtijevaju različiti udio proteina, s tim da karnivori zahtijevaju oko 40-50%. Veći udio proteina u prehrani je potreban i u sustavima intenzivnog uzgoja poput recirkulacijskih (Craig i Helfrich 2002). Manje ribe generalno trebaju više proteina u prehrani zbog pravilnog rasta i razvoja. Rast ribe uključuje stvaranje mišićnog, masnog, epitelnog i vezivnog tkiva. Odnos mišićnog i masnog tkiva ovisi o prehrani; da bi jedinka pravilno rasla potreban je unos dovoljne količine proteina. No, ukoliko bi ličinke riba hranili samo proteinskom hranom, pravilni rast bi izostao. Ukoliko u prehrani ne postoji ne-proteinski izvor energije, koristit će se energija iz aminokiselina za rast i bazalni metabolizam, te će stopa rasta biti smanjena. Alternativni, ne-proteinski izvori energije su ugljikohidrati i lipidi. Unosom takvih komponenti u prehranu omogućuje se pravilno iskorištavanje aminokiselina iz proteina, te se količina proteina u hrani smanjuje (de Silva i Anderson 1995).

Ugljikohidrati su kao izvor energije najjeftiniji, no slabije su iskoristivi, te njihov udio u hrani varira među vrstama (de Silva i Anderson 1995). Iako nisu esencijalni, ugljikohidrati se koriste u prehrani kao dobro vezivo. Škrob je najčešće korišten ugljikohidrat te kuhanjem postaje lakše probavljiv za ribe. Ugljikohidrati se skladište u obliku glikogena, no ribe ga ne mogu iskoristiti kvalitetno kao sisavci (Craig i Helfrich 2002).

Lipidi su visokoenergetske molekule, te se također koriste kao zamjena za proteine u prehrani riba. Mogu opskrbiti jedinke i sa dva puta više energije nego proteini i ugljikohidrati. Lipidi tipično čine oko 15% riblje hrane i opskrbljuju jedinke s esencijalnim masnim kiselinama te služe u transportu vitamina. Iako su lipidi dostupniji i jeftiniji izvor energije, potrebno je pažljivo odrediti njihovu zastupljenost u hrani. Naslage masti mogu dovesti do pretilosti riba, a naslage u jetri do bolesti i pada kvalitete mesa. Jednostavni lipidi su najčešće masne kiseline i trigliceridi. Ribe tipično trebaju masne kiseline poput omega 3 i 6 (n-3 i n-6) grupa. Neki autori navode da se takve n-3 i n-6 masne kiseline najbolje uvode u prehranu preko raznih mikroalgi koje su zasićene takvim masnim kiselinama. Unos EPA (eikosapentanoične masne kiseline) i DHA (doikosaheksanoične masne kiseline) u prehranu zooplanktona kojim se prehranjuju ribe u uzgoju ima visok utjecaj na preživljenje i rast u kasnijim stadijima, kada su jedinke već prebačene na drugi tip prehrane (Harzevili i sur. 2003).

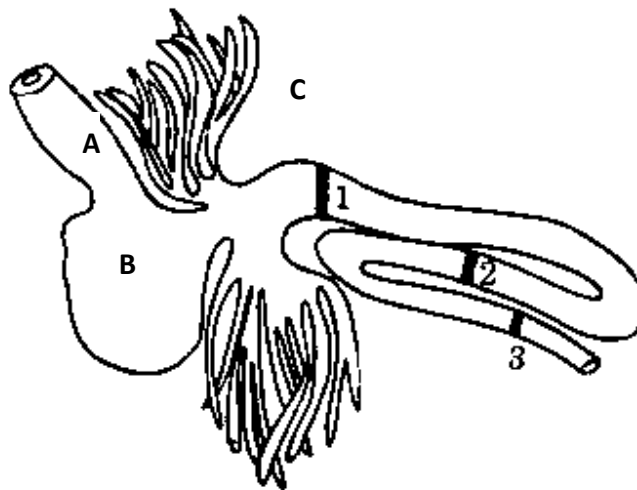
Vitamini su organske molekule potrebne za normalan rast i razvoj riba. Najčešće se moraju dodavati u hranu, jer ih ribe ne mogu same sintetizirati. Manjak pojedinog vitamina se očituje određenim simptomima, no smanjeni rast je rezultat deficita bilo kojeg vitamina (Craig i Helfrich 2002). Minerali su anorganski elementi prisutni u prehrani koji omogućavaju normalno funkcioniranje organizma. Makro-mineralni poput natrija, klor, kalija i fosfora reguliraju osmotsku ravnotežu te pomažu u formiranju i održavanju integriteta kostiju, dok, su mikro-minerali (u tragovima) potrebni u enzimatskim i hormonalnim sustavima (Craig i Helfrich 2002).

Nutritivne potrebe se ne mogu izračunati bez poznavanja unosa nutrijenata kod riba. Takva se istraživanja provode u kontroliranom okolišu poput akvarija ili bazena s funkcijom onemogućavanja interakcije s okolišem (prirodna hrana, temperatura i kvaliteta vode) u kojem se prati utjecaj isključivo nutritivnih varijabli. Ličinke brže reagiraju na te varijacije nego odrasle jedinke te su osjetljivije na razlike u prehrani; ukoliko tretman ne šteti ličinkama vjerojatno neće niti odraslim jedinkama (Lovell 1998).

1.6. PROBAVNI SUSTAV RIBA

Koštunjače čine najraznovrsniju skupinu kralješnjaka te ne čudi što i njihova hrana varira u veličini, strukturi, probavljivosti i hranjivom sastavu. Ovisno o vrsti i staništu ribe konzumiraju raznu hranu od planktona do aktivno plivajućih organizama, od pridnenih biljaka i beskralješnjaka sve do čestica nepoznatog podrijetla. Iz tog razloga možemo očekivati i širok spektar probavnih mehanizama. Problem je u neistraženosti struktura i funkcija probavnog sustava; istražen je samo mali broj vrsta riba (Treer i sur. 1995). Riba mogu biti karnivorne, omnivorne i herbivorne; mogu se hraniti živim i mrtvim organizmima te njihovim dijelovima; mogu biti makro ili mikrofagne (Stevens i Hume 1995).

Probavni sustav u riba se sastoji od više dijelova. Općenito ga možemo podijeliti u dva dijela, i to na probavni kanal i probavne žlijezde. Probavni kanal čine usnoždrijelna šupljina, jednjak, želudac, crijevo i analni otvor. Građa i smještaj tih organa različiti su u različitim vrsta ovisno o njihovom načinu života. Probavne žlijezde su jetra i gušterača (Treer i sur. 1995).



Slika5. Probavilo manjica. 1. prednji dio; 2. srednji dio; 3. stražnji dio crijeva, A. jednjak, B. želudac, C. pilorički nastavci (preuzeto i prilagođeno iz Kuperman i Kuz'mina 1994).

Usnoždrijelna šupljina riba pokazuje mnoge varijacije ovisno o načinu lova i obrade hrane. Pozicija i veličina usta ovise o lokaciji i veličini plijena. Kod karnivora koji su aktivni lovci usta su smještena na vrhu gubice i paralelna su s longitudinalnom osi ribe. U ustima često nalazimo zube koji služe za lov, pridržavanje plijena, trganje ili drobljenje hrane. Zubi se mogu nalaziti na čeljustima, jeziku ili u ždrijelu. Aktivni predatori imaju jaku čeljust sa oštrim zubima na njoj. U usnoj šupljini nalazimo mnogo stanica koje izlučuju sluz za koje se smatra da su nastale od običnih epitelnih stanica. Sluz koju izlučuju pomaže u zgrušnjanju i vezanju malih čestica hrane te olakšavaju gutanje velikog plijena (Hepher 1988). Također, funkcija sluzi je zaštita od mehaničkog i kemijskog oštećenja te osmoregulacija (Wilson i Castro 2010). Smatra se da brojnost tih stanica ovisi o prehranbenim navikama ribe, te da karnivori imaju puno manji broj mukoznih stanica od herbivora. Jednjak je kod riba kratak, širok i ravan te završava sfinkterom koji sprečava pretjerano gutanje vode (Hepher 1988). Sluznica jednjaka je formirana u obliku longitudinalnih nabora ili papila koje omogućuju rastezanje jednjaka pri gutanju velikog plijena. Kod

slatkovodnih vrsta rožnati epitel sluznice jednjaka je višeslojan, pločast i prekriven mikrovilima s brojnim mukoznim stanicama. Prema posteriornom dijelu jednjaka epitelne stanice prelaze u cilindrični oblik te se smanjuje broj velikih mukoznih stanica (Wilson i Castro 2010). Mišićnom aktivnošću jednjak prenosi hranu od usta do želuca u čemu mu pomaže i sluz koju izlučuju vrčaste stanice koje se nalaze u njegovom epitelu (Hepher 1988).

Nemaju sve vrste riba želudac. Njegov oblik i građa variraju ovisno o evolucijskoj odvedenosti vrste i njezinim prehranbenim navikama (Wilson i Castro 2010). Kod riba koje imaju želudac njegova uloga je zadržavanje hrane i primarna fizička i enzimatska probava (Bakke i sur. 2010). Histološki, prelazak iz jednjaka u želudac je jasan zbog promjene u epitelu. Epitel sluznice u želucu je cilindričan te se pojavljuju probavne žlijezde. Oblik želuca može varirati od ravnoga (I tip), do sifonalnog (U i J tip) i želuca s nastavkom (Y). Sluznica želuca je najbolje diferencirana od bilo kojeg dijela probavila. Histološki, želudac se može podijeliti na dva dijela: na kardiačku regiju i mišićavu piloričku regiju na koju se nastavlja crijevo. Razlike u sluznici između ove dvije regije su u probavnim žlijezdama koje se nalaze u piloričkoj regiji, a izostaju u kardiačkoj. Sluznica želuca je prekrivena cilindričnim epitelom koji je isprekidan probavnim izbočenjima (*foveola*) koja vode do cjevastih ili alveolarnih probavnih žlijezda u kojima nalazimo vrčaste stanice (Wilson i Castro 2010). Nalazimo i oksintiokepeptične stanice koje se nalaze u bazi žlijezda, koje kod riba izlučuju i koncentriranu klorovodičnu kiselinu (HCl) u apiklanim dijelovima cijevi žlijezda dok pepsinogen izlučuju iz granula smještenih više prema bazi cijevi. Izlučena HCl pomaže u primarnoj probavi denaturacijom proteina i pretvorbom inaktivnog pepsinogena iz granula u aktivni proteolitički enzim pepsin. Ovisno o vrsti, razvojnom stadiju, vremenu prošlom nakon obroka i prehranbenom statusu pH želuca može varirati između 1 i 5. U prijelaznom razdoblju između ličinke i juvenilne jedinice probavne žlijezde postaju funkcionalne a taj događaj se podudara s početkom ekspresije gena za pepsinogen i protonske pumpe (Bakke i sur. 2010). Želudac završava s pilorusom; mišićnim sfinkterom nastalim zadebljanjem glatkog mišića (Wilson i Castro 2010).

Gotovo sve vrste riba sa želucom imaju piloričke nastavke na mjestu gdje se spajaju želudac i prednje crijevo koji mogu varirati u veličini i obliku, te brojnosti. Smatra se da prolongiraju prolazak hrane, povećavaju apsorbivnu površinu i služe kao mjesto mikrobne probave. Prekriveni su sličnim tipom stanica kao i stijenka crijeva, bogate su sekretornim stanicama te se nekad mogu naći vrčaste stanice u sluznici. Ne postoji veza između žlijezda i ostalih organa s piloričkim nastavcima (Wilson i Castro 2010).

Crijevo se nastavlja na pilorički dio želuca. Primarna funkcija crijeva je dovršavanje procesa probave koja je započela u želucu te apsorpcija nutrijenata. Ulaskom u crijevo hrana se miješa sa sekretima crijeva kao i ostalih organa- gušterače i jetre. Sekrecija uključuje komponente koje su vezane za probavu, kao i elektrolite, najčešće bikarbonate koji neutraliziraju kiseli pH hrane koja dolazi iz želuca kako bi odgovarao onom koji je potreban za rad probavnih enzima u crijevima. U crijevu je pH viši nego u želucu, od 7 do 9 (Bakke i sur. 2010). Osnova probave je povećanje apsorbivne površine crijeva nabiranjem (primarnim, sekundarnim i tercijarnim) sluznice epitela i povećanjem brojnosti mikrovila na trepetljivikavoj površini apikalnog dijela membrane. Površina se također povećava i povećanjem dužine crijeva, te tako crijevo može zavojito rasti. Za razliku od gotovo svih ostalih vrsta riba kod tovariki (*Gadidae*) nalazimo sluzne žlijezde u crijevu koje nalikuju Lieberkuhnovim kriptama. Iako se vrlo malo zna o tim žlijezdama, pretpostavlja se da imaju ulogu u sekreciji te kao mjesto nastajanja novih stanica probavila iz zametnih stanica. Duljina crijeva se koristi kao indikator trofičke pripadnosti neke vrste. Generalno je crijevo duže i ima veću relativnu masu kod herbivora nego kod karnivora, no smatra se da se „gubitak“ na dužini nadoknađuje velikim brojem nabora u lumenu crijeva (Wilson i Castro 2010). Kod

većine riba ne možemo razlikovati dijelove crijeva po promjeni promjera i tipa epitela, no u stražnjem dijelu crijeva se povećava broj vrčastih stanica (Stevens i Hume 1995). Velik broj vrsta ima ileorektalni zalistak, te je kod nekih vrsta poput bakalara opisano malo slijepo crijevo (Wilson i Castro 2010). Smatra se da stražnji dio crijeva ima posebne ekskretorne, apsorpcijske i motoričke funkcije kod riba (Stevens i Hume 1995).

Radijalno se stijenka crijeva sastoji od 4 koncentrična sloja: 1) sluznice (*tunica mucosa*) koja je građena od epitela i lamine propije, prokrvljenog vezivnog tkiva u kojem nalazimo živce i leukocite; 2) vezivnog tkiva (submucosa); 3) mišićnog sloja (*tunica muscularis*) koji se sastoji od longitudinalnih slojeva prugastih i glatkih mišića; 4) dodatno vezivno tkivo (*tunica serosa*) koje veže crijevo sa okolnim strukturama, prokrvljeno je i povezano s limfnim sustavom (Wilson i Castro 2010). Naborima sluznice povećava se apsorbirajuća površina crijeva. Vrste sa kraćim crijevom taj nedostatak nadoknađuju velikim brojem nabora. Smatra se da ukoliko bi stijenka crijeva bio tanak i promjer crijeva velik, miješanje hrane ne bi bilo dovoljno i ekstrakcija nutrijenata bi bila oslabljena; to bi dovelo da produljenog zadržavanja hrane u crijevu i slabije apsorpcije nutrijenata (Tibbetts 1997).

Epitel sluznice crijeva spada u cilindrični epitel s dugim citoplazmatskim izdancima (mikrovilima). Jednoslojni cilindrični epitel izgrađuju visoke prizmatične stanice, enterocite. Vrčaste stanice, limfociti i enteroendokrine stanice su razbacane kroz epitel sluznice. Enterocite su generalno uske i visoke stanice s ovalnom jezgrom koja se nalazi odmah ispod sredine stanice, mitohondrijima lociranim u apikalnom i bazalnom dijelu stanice i razvijenim apikalnim četkastim pokrovom mikrovila. Mikrovili povećavaju staničnu površinu za apsorpciju i lučenje. Enterocite pokazuju jaku ekspresiju Na^+/K^+ -ATPaze koja je esencijalna za pokretanje brojnih trans-epitelnih prijenosa važnih za ionsku regulaciju i apsorpciju nutrijenata. Četkasti pokrov koji čine mikrovili je bitno mjesto probave i apsorpcije nutrijenata; čini funkcionalni mikrookoliš u kojem enzimi razgrađuju hranu te se tu odvija apsorpcija i transfer hrane. Velik broj probavnih enzima pokazuje svoju aktivnost baš u tom dijelu probavila; alkalna fosfataza, disaharidaza, leucin-aminopeptidaza, tri i di-peptidaza koje proizvode epitelne stanice te esteraza, α amilaza i karboksipeptidaza koje mikrovili apsorbiraju. Gustoća mikrovila je najčešće manja u stražnjem dijelu crijeva. Gladovanje može smanjiti gustoću mikrovila do točke kada ih uopće nema. Oblik enterocita govori o njihovoj apsorbirajućoj funkciji (Wilson i Castro 2010).

Vrčaste stanice su dominantne mukozne stanice u crijevu riba. Naziv su dobile zbog svog oblika poput vrča. Na okruglasti bazalni dio stanice nastavlja se tanka cijev koja završava apikalnom porom kroz koju se izlučuje sluz (Wilson i Castro 2010). Sluz koja pranja na stjenku crijeva sadrži glikokonjugate koji mogu biti neutralni, kiseli i bazični, ili kombinacija pojedinih. Kvaliteta mukosubstanca ovisi o raznim faktorima poput vrste ribe, razvojnog stadiju i dijelu crijeva. Sluz također može sadržavati i imunoglobuline i potencijalno ostale antimikrobiološke komponente poput enzima i peptida. Ti faktori štite sluznicu od potencijalnih štetnih utjecaja iz hrane ili okoliša, te osiguravaju optimalne uvjete za efikasnu probavu nutrijenata i apsorpciju (Bakke i sur. 2010). Većina vrčastih stanica sadrži kisele mucine poput sialomucina ili sulfomucina, dok su stanice koje sadrže neutralne mucine rjeđe (Ostrazewska 2005). Prve funkcionalne vrčaste stanice se pojavljuju kod ličinki riba u razdoblju kad se one počnu egzogeno hraniti (Bakke i sur. 2010). Čini se da sluz ima bitnu ulogu u oblikovanju hrane kod nekih vrsta riba te da su kiseli glikoproteini primarni tip sluzi koji sudjeluju u tim mehanizmima. Neutralni glikoproteini su češći u jednjaku, no smatra se da je njihova funkcija samo lubrificirajuća te da sluz

omogućuje prolaz manjim česticama hrane (Tibbetts 1997). Riberio i sur. (1999) su u svojem radu zaključili da glavnu ulogu u probavi proteina koja se kod ličinki događa u stražnjem crijevu, ima kisela fosfataza. Za funkcioniranje tog enzima potreban je kiseli medij.

Probavna cijev ličinki riba je morfološki, histološki i fiziološki jednostavnija od probavne cijevi odraslih jedinki. Za razliku od ostalih organskih sustava poput pokrovnog i mišićnog sustava te očiju i slušnog aparata koji se razvijaju postepeno, razvoj probavila od jednostavnog, nediferenciranog, ravnog crijeva kod ličinke sa žumanjčanom vrećom do kompleksnog, segmentiranog crijeva kod odrasle jedinke, karakteriziraju brze promjene. Početni oblik crijeva se ne mijenja dok se ne apsorbira žumanjčana vreća i uljne kapljice te se nakon toga u svega par dana (1-3 dana) brzo mijenja prije prvog hranjenja. Nakon toga se probavni sustav ličinke ne mijenja do transformacije ličinke u odraslu jedinku kada se ta transformacija ponovo odvija jako brzo. Usporedno s rastom i promjenama u kompleksnosti probavnog sustava, javljaju se i promjene u prehrani. Većina ličinki su u početku predatori sa velikim ustima i razvijenim očima makar njihovi adultni oblici bili filtratori, pelagički karnivori ili bentoski skupljači (Govoni i sur. 1986). Zubi kod ličinki služe više za pridržavanje plijena nego za usitnjavanje, s tim da plijen gutaju cijeli. Od 4 koncentrična sloja koja nalazimo kod odraslih jedinki kod ličinki postoje samo 3: sluznica s apsorptivnim epitelom, mišićni sloj građen od jednog sloja glatkih mišića i sloj vezivnog tkiva. Funkcije srednjeg i stražnjeg crijeva ličinki su od interesa jer su jednim dijelom slične funkcijama prednjeg i stražnjeg crijeva kod odraslih jedinki vrsta koje nemaju želudac. Citološkim analizama pokazalo se da u srednjem dijelu crijeva dolazi do apsorpcije lipida nakon hidrolize u lumenu crijeva i resinteze lipida unutar enterocita. Velike supranuklearne stanice su dokaz takvoj funkciji stanica i njihovim nestajanjem dokazuje se početak pravilne funkcije želuca i pripadajućih probavnih žlijezda. Nasuprot tome acidofilne, granularne supranuklearne stanice u stražnjem dijelu crijeva dokazuju apsorpciju makromolekula iz lumena crijeva pinocitozom. Razvojem želuca takve stanice također nestaju (Govoni i sur. 1986).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi razlike u razvoju probavila mlađi manjića uzgojenih u akvakulturi s obzirom na razdoblje prelaska na suhu hranu. Promjene u prehrani kao prelazak sa žive hrane na umjetnu mogu uzrokovati visoku smrtnost među jedinkama stoga je prelazak na umjetnu hranu bitna stavka kod uzgoja u akvakulturi zbog jednostavnije manipulacije i isplativosti. Promjene u površini sluznice, visini epitela, brojnosti vrčastih stanica te udjelu AB⁺ vrčastih stanica mogu ukazivati na probleme u razvoju probavila ličinki zbog kojih potencijalno ne bi mogle probaviti ponuđenu hranu.

Svrha istraživanja je histološkom analizom stražnjeg dijela crijeva utvrditi razvijenost probavila te analizirati postojanje potencijalnih promjena u razvoju sluznice probavila s obzirom na različito vrijeme početka hranjenja umjetnom hranom. Dobiveni rezultati koristit će se za utvrđivanje donje granice perioda u kojem je probavilo mlađi manjića dovoljno razvijeno da može podnijeti prelazak na umjetnu hranu.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu analizirani su histološki preparati stražnjeg crijeva manjića. Uzorci su uzgajani i uzorkovani u mrjestilištu edukacijsko-istraživačkom postrojenju AQUA-ERF, akvakulture Odisee, Zele, Belgija. Istraživanje se provodilo u tri faze: inicijalna faza, eksperimentalna faza i laboratorijska obrada.

3.1. INICIJALNA FAZA

Nakon dolaska u postrojenje, ličinke manjića su ostavljene da se aklimatiziraju i zatim puštene u sustav. Početna temperatura sustava je bila 12°C s 24-satnim osvjetljenjem. Kroz idućih mjesec dana temperatura se povisila na 16°C. Nakon što se pokazalo da većina ličinki više nema žumanjčanu vrećicu, 15. dana starosti počelo je hranjenje artemijama. Hranjenje je trajalo konstantno kroz 24 sata s artemijama koje su prikupljene to jutro. Inicijalna faza je trajala do 39 dana starosti mlađi.



Slika 6. Bazeni u kojima su bile ličinke za vrijeme inicijalne faze (foto: Matea Jarak).

3.2. EKSPERIMENTALNA FAZA

Nakon inicijalne faze mlađ stara 39 dana je razmještena bazene od 50 litara i to u gustoći 30 larvi po litri. Hranjenje artemijama je potrajalo do 46. dana zbog prilagođavanja ličinki na novi sustav. Direktni prelazak na suhu hranu prve skupine je počeo 46. dan (6. tjedan), komercijalnom hranom granulacije 100-200 μm (Aglonorse, Belgija). Druga skupina je 60. dan (8. tjedan) krenula sa istom vrste hrane veće granulacije (200-300 μm) na koju je tada prešla i prva skupina. Pokus je trajao do 88. dana starosti ličinki (tablica 1).



Slika 7. Bazeni u kojima su ličinke bile za vrijeme eksperimentalne faze (foto: Matea Jarak).

Tablica 1. Prikaz rasporeda hranjenja skupine 1 i skupine 2 kroz trajanje eksperimenta.

Dani života	Skupina 1	Skupina 2
11-15	Aklimatizacija na sustav	Aklimatizacija na sustav
15-46	Hranjenje artemijama	Hranjenje artemijama
46-60	Hranjenje umjetnom hranom	Hranjenje artemijama
60-88	Hranjenje umjetnom hranom	Hranjenje umjetnom hranom

3.2.1. TJEDNO UZORKOVANJE

Svaki tjedan uzimani su uzorci za biometrijska mjerenja i histološku analizu. Jedinke su eutanazirane benzokainom (20g/500ml vode). Jedinkama je izmjerena dužina tijela i masa. Jedinke namijenjene za histologiju su također eutanazirane benzokainom, fiksirane tijekom 24 sata u Bouinovom fiksativu (slika 8.) te zatim prebačene u 70% alkohol do daljnje obrade u laboratoriju.



Slika 8. Ličinka manjića nakon tretiranja Bouinovim fiksativom (foto: Matea Jarak).

3.3. LABORATORIJSKA OBRADA

3.3.1. OBRADA UZORAKA

Za laboratorijsku analizu su žrtvovane 72 jedinke kojima je odstranjena glava i rep. Ostaci tijela su dehidrirani u seriji alkohola (80%, 96% i 100%) te su ostavljeni u kloroformu preko noći. Paraplast se ostavio u termostatu (Shel lab) za to vrijeme na 60°C. Idući dan su se uzorci držali u otopinama kloroform-paraplast (1:1) te čisti paraplast I i čisti paraplast II po sat vremena u svakoj otopini. Uzorci su se uklopili u paraplast u lađicama od tvrdog, masnog papira i ostavili na sušenju do daljnje obrade. Osušeni blokovi paraplasta su se rezali na rotacijskom mikrotomu na debljini 6-8 µm i odlagali u vodenu kupelj (45°C) na kratko, te su se nakon toga nanosili na stakalca premazana glicerom bjelanjkom.

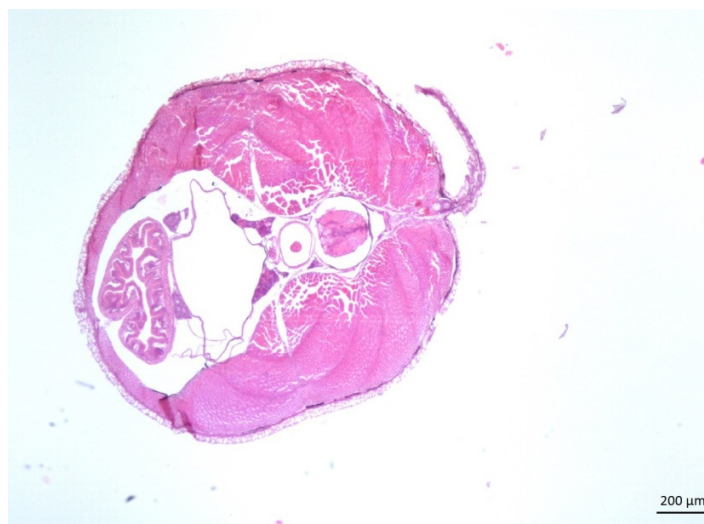
3.3.2. HISTOLOŠKA BOJANJA

Rezovi koji sadržavaju poprečne presjeke stražnjeg dijela crijeva bojali su se kombinacijom histoloških boja hematoksilina i eozina, te selektivnom metodom za vrčaste stanice PAS (perjodna kiselina i Schiffov reagens) i AB (alcijansko modrilo).

3.3.2.1. HEMATOKSILIN I EOZIN METODA

Stakalca se prvo deparafiniraju uranjanjem u ksilol I i ksilol II (Zorka pharma) na 15 minuta, te u seriju alkohola (100%, 96%, 80% i 70%, Kemika) po 5 minuta. Zatim se ispiru u destiliranoj vodi 10 minuta. Preparati se zatim uranjaju u Mayerovu otopinu (hematoksilin, Kemika) na 6 minuta i ispiru u tekućoj vodi 2 puta po 10 minuta. Nakon što su se malo prosušila na papiru, stakalca se urone u eozin na 3 minute te se ispiru u dH₂O 2 puta po 5 minuta. Nakon toga slijedi dehidriranje gdje se stakalca uranjaju u seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 80%, 96% i 100%) te ksilol I i ksilol II po 5 minuta. Stakalca se uklapaju u kanadski balzam sa pokrovnim stakalcima. Tkivo se boja crvenom bojom (slika 9).

1) Priprema otopine eozina - 0,1g boje eozin žučkasti (Kemika) u prahu otopiti u 100 ml 75% alkohola te dodati 2-3 kapi ledene octene kiseline. Boja tad fosforicira i ima pH oko 4,5. Ukoliko ima taloga boja se filtrira.



Slika 9. Poprečni presjek kroz ličinku obojan hematoksilinom i eozinom. Skala 200 µm (foto: Matea Jarak).

3.3.2.2. METODA SCHIFFOVE BAZE I PERJODNE KISELINE U KOMBINACIJI S ALCIJANSKIM MODRILOM

Stakalca se prvo deparafiniraju uranjanjem u ksilol I i ksilol II (Zorka pharma) na 15 minuta, te u seriju alkohola (100%, 96%, 80% i 70%, Kemika) po 5 minuta. Zatim se ispiru u tekućoj vodi 3 minute i dH₂O par sekundi. Stakalce se zatim uranjaju u otopinu alcijanskog modrila na 30 minuta nakon čega se ispiru u dH₂O par minuta da bi se dobro isprao višak boje. Stakalca se zatim uranjaju u 0,5% perjodnu kiselinu na 30 minuta nakon čega idu u Schiffov reagens također na 30 minuta. Nakon toga slijedi serija od 3 puta po 5 minuta u svježe pripremljenoj SO₂ vodi te ispiranje u dH₂O 2 puta po 10 minuta. Slijedi dehidriranje gdje se stakalca uranjaju u seriju alkohola (70%, 80%, 96% i 100%) i ksilol I i ksilol II po 5 minuta. Stakalca se uklapaju u kanadski balzam sa pokrovnim stakalcima.

1) Priprema Schiffovog reagensa- 192ml dH₂O

- 8ml koncentrirane HCl
- 5g bezvodnog natrijevog sulfita (Na₂SO₃ Kemika)
- 0,5g bazičnog fuksina (pararosanilin, Kemika)

Miješati u intervalu od 10-15 minuta, nakon 2 sata dodati 500mg aktivnog ugljena, promiješati 2 minute te profiltrirati i staviti u frižider.

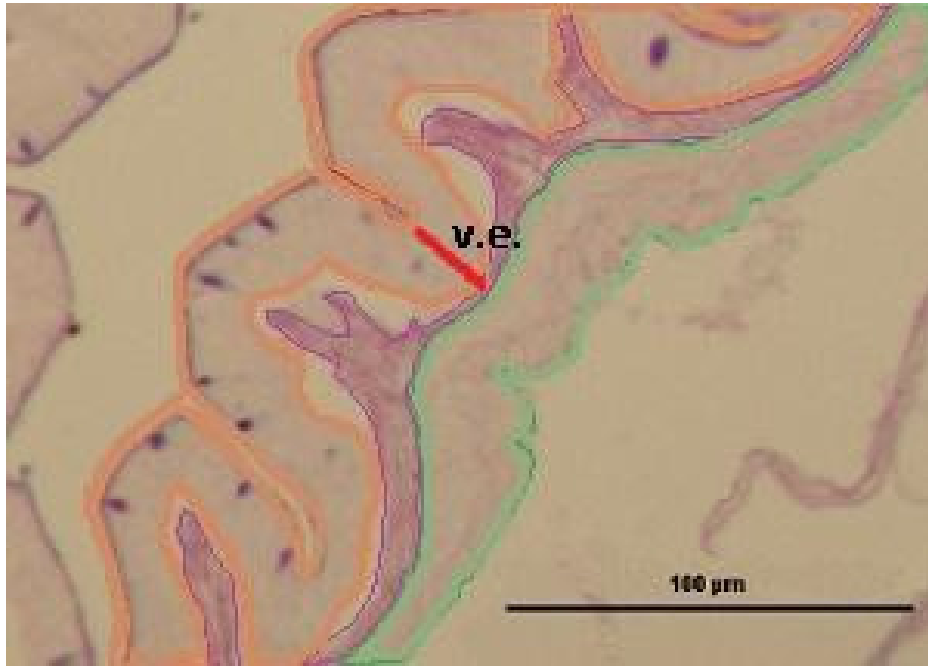
2) 0,5% perjodna kiselina –promiješati 0,5g perjodne kiseline (H₅IO₆,Sigma Aldrich) u 100ml dH₂O

3)SO₂ voda – 2g natrijevog metabisulfita(Na₂S₂O₅ , Merck) otopiti u 20ml dH₂O

- odvojiti 18ml te otopine i pomiješati sa 15ml 1N HCl i 30ml dH₂O

3.3.3. MIKROSKOPSKA OBRADA PREPARATA, MJERENJE I FOTOGORAFIRANJE

Preparati su pregledavani na mikroskopu Nikon Eclipse E600 na povećanjima 100x, 200x i 400x. Mikroskop je spojen na računalo kamerom Nikon DXM 1200. Mjerene su površine presjeka crijeva, sluznice (epitela i vezivnog tkiva) i lumena crijeva. Visina epitela (Slika 10) se mjerila na 5 različitih mjesta te se izračunao prosjek tih vrijednosti. Mjerenja i slikanje uzoraka su napravljena u računalnom programu Lucia G (verzija 4.8.). Određivana je i brojnost vrčastih stanica i to ukupna brojnost te udio stanicana izmjerenoj površini sluznice stražnjeg crijeva koje su pokazivale pozitivnu AB (plavo obojenje), PAS (ružičasto obojenje) i miješanu (ljubičasto obojenje) reakciju.



Slika 10. Presjek kroz crijevo s označenim mišičnim slojem (zeleno ocrtano), vezivnim tkivom (ružičasto ocrtano) i slojem epitela (narančasto ocrtano), te označenom visinom epitela sluznice (v.e.). Skala 100 µm (foto: Matea Jarak).

3.3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Ukupna površina crijeva i sluznice crijeva na kojoj je mjerenje izvršeno je provedena u mikrometrima (μm), a zatim pretvorena u milimetre ($1\text{ mm} = 1000\ \mu\text{m}$). Visina epitela je izražena u mikrometrima (μm). Brojnost vrčastih stanica prikazana je kao udio vrčastih stanica na izmjerenoj površini sluznice crijeva. Udio AB^+ vrčastih stanica prikazan je kao udio vrčastih stanica koje su imale pozitivnu reakciju na bojanje AB od ukupnog broja vrčastih stanica.

Sve vrijednosti i todužina tijela (mm), težina tijela (g), površina sluznice (mm^2), visina epitela (μm), udio vrčastih stanica po površini sluznice i udio AB^+ vrčastih stanica (%) su prikazane kao prosječna vrijednost, standardna devijacija te minimumi i maksimumi vrijednosti.

Raspodjela podataka testirana je Kolmogorov-Smirnov testom. S obzirom da raspodjela podataka nije slijedila normalnu distribuciju (Kolmogorov – Smirnov test $p < 0,05$) u daljnjim statističkim analizama korišteni su neparametrijski testovi.

Odnos starosti jedinki u tjednima i morfometrijski izmjerenih površina (površina sluznice i visina epitela) te udio vrčastih stanica po površini sluznice i udio AB^+ vrčastih stanica analiziran je pomoću Spearmanove korelacije.

Usporedba ukupnih dužina tijela i ukupnih težina tijela između dvije skupine ličinki riba koje su u različito vrijeme započele s hranjenjem umjetnom hranom testirana je pomoću Mann-Whitney U testa. Istim testom analizirane su razlike u morfometrijskim mjerama površina te ukupno brojnosti i udjela vrčastih stanica između dvije skupine ličinki riba koje su u različito vrijeme započele s hranjenjem umjetnom hranom. Mann-Whitney U test također je korišten da bi se utvrdilo postojanje razlika u udjelu vrčastih stanica u sluznici crijeva i prisutnosti hrane u probavilu manjića.

Postojanje razlika u morfometrijski mjerenim površinama crijeva, sluznice i epitela te kvantitativnoj distribuciji udjela vrčastih stanica u odnosu na tjedne života analiziranih manjića testirano je pomoću Kruskal-Wallis testa. U slučajevima kad su rezultati bili statistički značajni ($p < 0,05$), dodatno je korišten Mann – Whitney U test (Dytham 2003). Za tu priliku životinje su podijeljene u starosne grupe po 7 dana života.

Sve statističke analize rađene su u programu SPSS 17.0 za Windows (SPSS Inc., SAD).

4. REZULTATI

Vrijednosti koje su obrađene u ovim rezultatima su: starost ličinki (tjedan), početak hranjenja umjetnom hranom (tjedan), dužina tijela (mm), težina tijela (g), površina sluznice (mm²), visina epitela (μm), udio vrčastih stanica po površini sluznice (%/mm²) te udio AB⁺, PAS⁺ i miješanih vrčastih stanica na izmjerenoj površini sluznice probavila (%). Predstavljene vrijednosti su rezultat analiza 31 ličinke iz skupine 1 i 35 ličinki iz skupine 2. U skupinu 1 ubrajaju se ličinke koje su počele dobivati umjetnu hranu 6. tjedan života (46 dana nakon izlijeganja), dok u skupinu 2 spadaju ličinke koje su umjetnu hranu počele dobivati 8. tjedan života (60 dana nakon izlijeganja) (dalje u tekstu skupina 1 i skupina 2).

Pregledom histološkog preparata poprečno presječnog stražnjeg dijela crijeva vidljiva je tanka stijenka crijeva s manjim brojem nabora sluznice. Lumen crijeva je bio dosta veliki i u nekim uzorcima su uočeni ostaci hrane u probavilu. U stijenci probavila su bili dobro vidljivi slojevi sluznice, podsluznice i mišićnog sloja. Dok je mišićni i vezivni sloj bio relativno tanak, sloj sluznice se najviše isticao s visokim cilindričnim apsorptivnim stanicama i nepravilno raspoređenim pojedinačnim vrčastim stanicama. Na preparatima obojenim hematoksilinom i eozinom mukozni sekret vrčastih stanica je bio neobojen, dok su se te iste stanice specifično bojale kada su preparati obojani metodom PAS i AB.

4.1. DESKRIPTIVNE MORFOLOŠKE VRIJEDNOSTI

U tablici 2 prikazane su prosječne početne i krajnje vrijednosti mjerene za skupinu 1 i skupinu 2 od početka do kraja istraživanja.

Tablica 2. Prosječne vrijednosti dužina tijela i težina tijela ličinki iz skupine 1 i skupine 2 na početku i na kraju istraživanja (6. i 11. tjedan života).

	POČETNA DUŽINA (mm)	KRAJNJA DUŽINA (mm)	POČETNA TEŽINA (g)	KRAJNJA TEŽINA (g)
SKUPINA 1	15,9	21,14	0,033	0,065
SKUPINA 2	16,5	26,71	0,118	0,150

U tablici 3. i 4. prikazane su dužina tijela, težina tijela, površina sluznice, visina epitela, udio vrčastih stanica po površini sluznice i udio AB⁺ vrčastih stanica i to njihove prosječne vrijednosti (P.V.), standardna devijacija (S.D.), minimum (MIN) i maksimum (MAKS) za skupinu 1 i skupinu 2 ličinki.

Tablica 3. Vrijednosti morfometrijskih i kvantitativnih mjerenja ličinki iz skupine 1.

	DUŽINA (mm)	TEŽINA (g)	POVRŠINA SLUZNICE (mm ²)	VISINA EPITELA (μm)	UDIO VRČASTIH STANICA/POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)	UDIO AB ⁺ VRČASTIH STANICA (%)
P.V.	18,2289	0,0467	0,0710	25,2640	0,1708	0,1459
S.D	2,3864	0,0237	0,0541	10,3929	0,0783	0,0740
MIN	15,7933	0,0283	0,0196	8,8460	0,0563	0,0375
MAKS	24,0933	0,1199	0,2466	46,4260	0,3854	0,3207

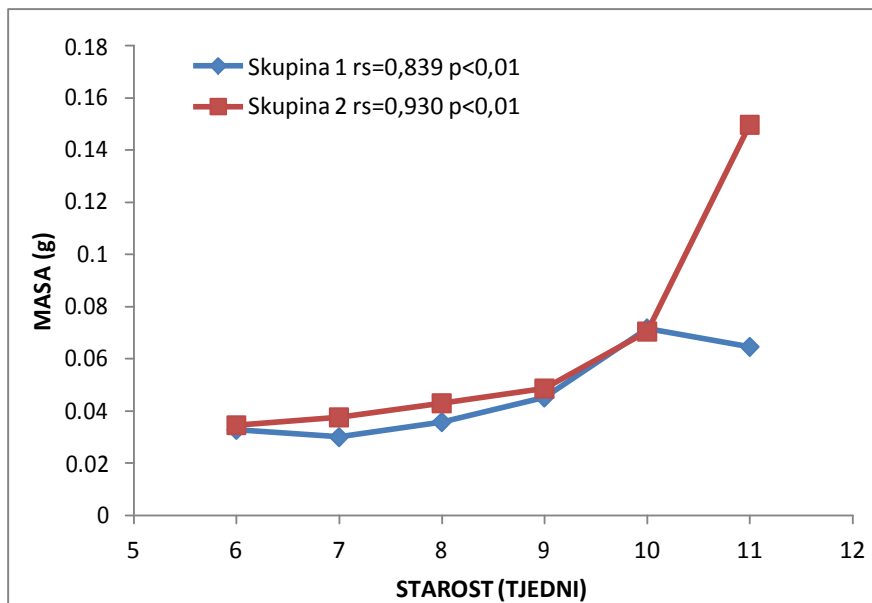
Tablica 4. Vrijednosti morfometrijskih i kvantitativnih mjerenja ličinki iz skupine 2.

	DUŽINA (mm)	TEŽINA (g)	POVRŠINA SLUZNICE (mm ²)	VISINA EPITELA (μm)	UDIO VRČASTIH STANICA/POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)	UDIO AB ⁺ VRČASTIH STANICA (%)
P.V.	19,4335	0,0609	0,1156	25,9956	0,1303	0,1094
S.D.	3,4708	0,0388	0,14132	7,48727	0,05687	0,04874
MIN	16,2133	0,0322	0,0200	14,8280	0,0491	0,0379
MAKS	28,9200	0,1735	0,5507	45,5020	0,2984	0,2480

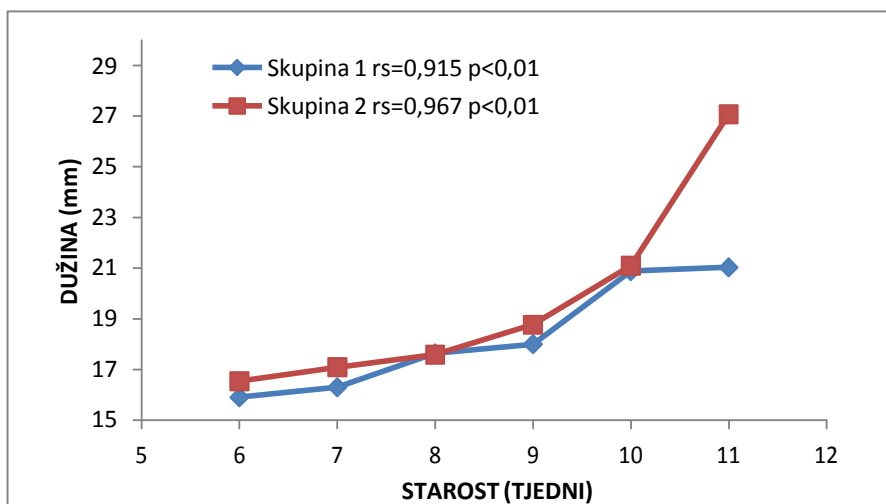
Prema rezultatu One-Sample Kolmogorov-Smirnov testa distribucija podataka je značajno različita od normalne distribucije ($p < 0,05$) stoga su u daljnjim statističkim analizama korišteni neparametrijski testovi.

4.2. ODNOS STAROSTI LIČINKI I MORFOMETRIJSKIH MJERA

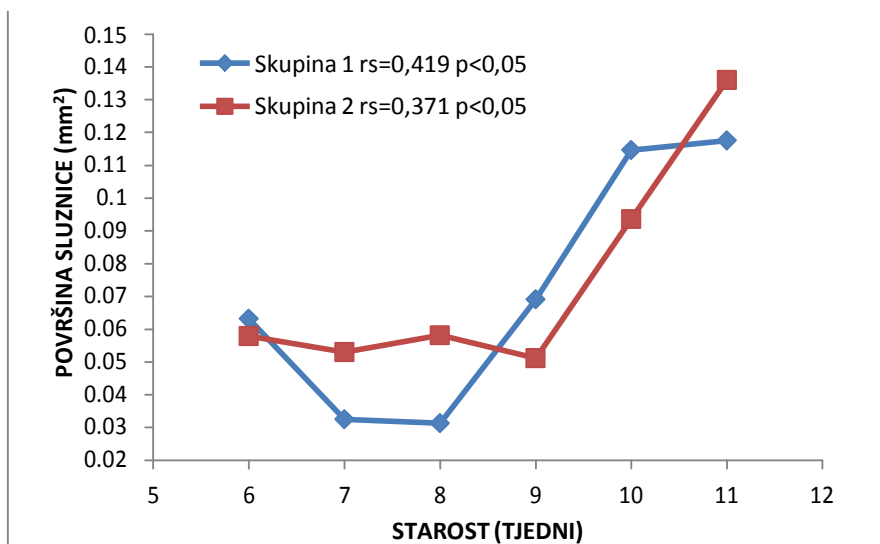
Neparametrijskim Spearmanovim testom korelacije (r_s) analizirani su odnosi među različitim vrijednostima morfometrijskih mjerenja. Test je pokazao da najviše vrijednosti korelira sa starošću jedinki stoga je starost u tjednima korištena kao uniformna varijabla u prikazu ovisnosti o masi tijela (graf 1), dužini tijela (graf 2), površini sluznice (graf 3), visini epitela (graf 4), ukupnoj brojnosti vrčastih stanica (graf 5) te udjelu AB⁺ vrčastih stanica u izmjerenoj površini sluznice stražnjeg crijeva (graf 6).



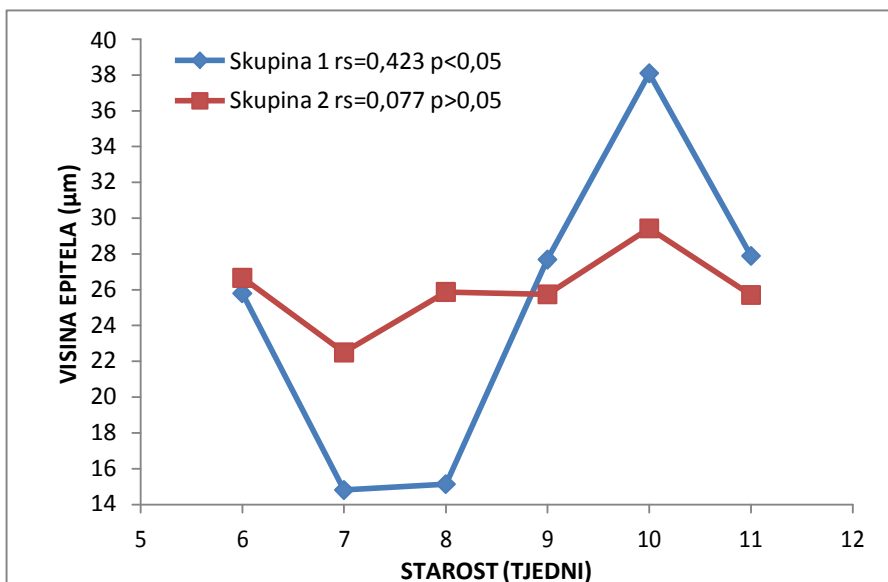
Graf 11. Prikaz ovisnosti mase tijela jedinki iz skupine 1 i skupine 2 o tjednima starosti.



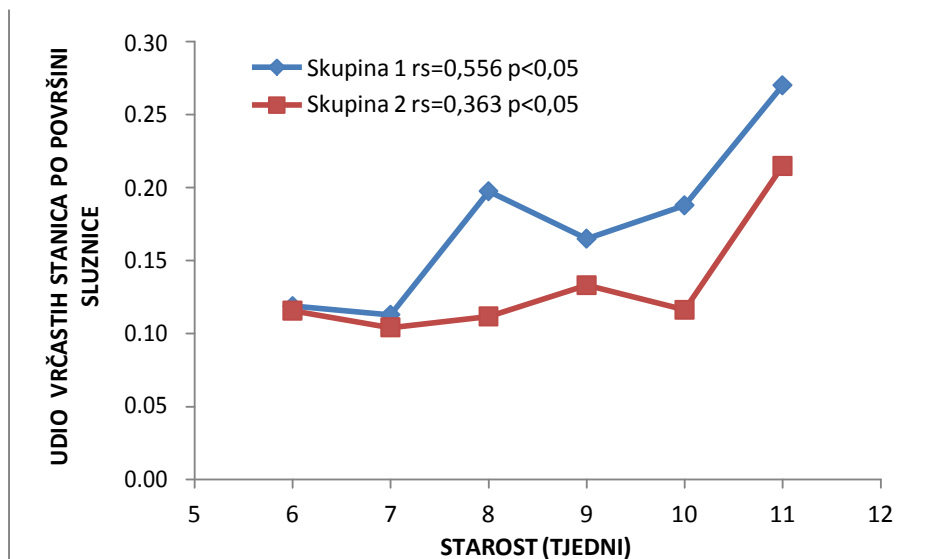
Graf 12. Prikaz ovisnosti dužine tijela jedinki iz skupine 1 i skupine 2 o tjednima starosti.



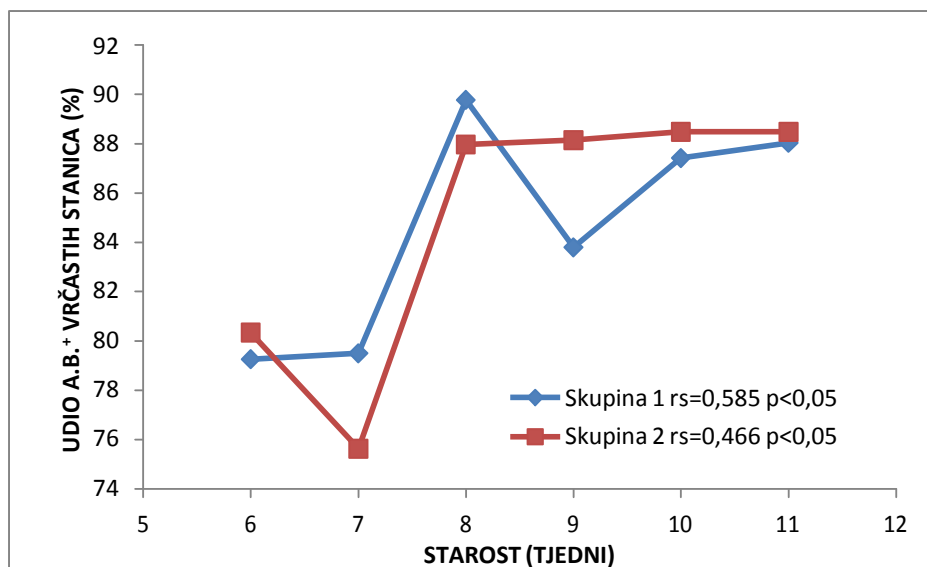
Graf 13. Prikaz ovisnosti površine sluznice jedinki iz skupine 1 i skupine 2 o tjeđnima starosti.



Graf 14. Prikaz ovisnosti visine epitela jedinki iz skupine 1 i skupine 2 o tjeđnima starosti.



Graf 15. Prikaz ovisnosti udjela vrčastih stanica po površini sluznice jedinki iz skupine 1 i skupine 2 o tjeđnima starosti.



Graf 16. Prikaz ovisnosti udjela AB+ vrčastih stanica o tjeđnima starosti.

4.3. RAZLIKE U GRAĐI STRAŽNJEG CRIJEVA IZMEĐU DVIJE SKUPINE LIČINKI

Provedbom Mann-Whitney U testa uspoređene su ukupne dužine tijela i ukupne težine tijela između skupine 1 i skupine 2. Test je pokazao da između ukupnih dužina tijela ne postoji statistička značajnost, no da između ukupnih težina ličinki postoji statistička značajnost od $p < 0,05$ (Tablica 5).

Tablica 5. Rezultati usporedbe ukupnih dužina tijela i težina tijela između skupine 1 i skupine 2 Mann-Whitney U testom. Označeni su statistički značajni rezultati.

	PROSJEČNA DUŽINA	PROSJEČNA TEŽINA
Mann-Whitney U koeficijent	434	384
P	0,163	0,042**

** Statistički značajno $p < 0,05$

Test je također proveden za utvrđivanje statistički značajnih razlika između skupine 1 i skupine 2 i to za vrijednosti površine sluznice, visinu epitela (slika 18), udio vrčastih stanica po površini sluznice te udio AB⁺ vrčastih stanica ovisno o početku hranjenja umjetnom hranom. Rezultati testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između dvije ispitivane skupine osim ukupne brojnosti vrčastih stanica (Tablica 6).

Tablica 6. Rezultati analize razlike morfometrijskih i kvantitativnih mjerenja između skupine 1 i skupine 2 ovisno o početku hranjenja umjetnom hranom Mann-Whitney U testom. Označeni su statistički značajni rezultati.

	POVRŠINA SLUZNICE (mm ²)	VISINA EPITELA (μm)	UDIO VRČASTIH STANICA/POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)	UDIO AB ⁺ VRČASTIH STANICA /POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)
Mann-Whitney U	456	507	368	391
P	0,266	0,648	0,025**	0,52

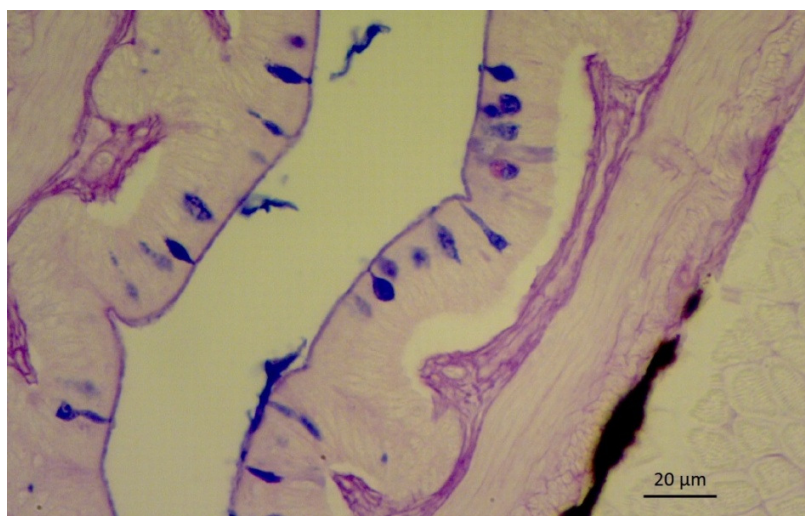
** Statistički značajno $p < 0,05$

Nadalje, Mann-Whitney U test koji je analizirana povezanost između prisutnosti hrane u probavilu i mjerenih morfoloških vrijednosti, pokazao je statistički značajnu razliku za ukupnu brojnost vrčastih stanica, te za udio AB⁺ vrčastih stanica (slika 17) u prisutnosti/odsutnosti hrane u probavilu, za obje analizirane skupine ličinki (Tablica 7).

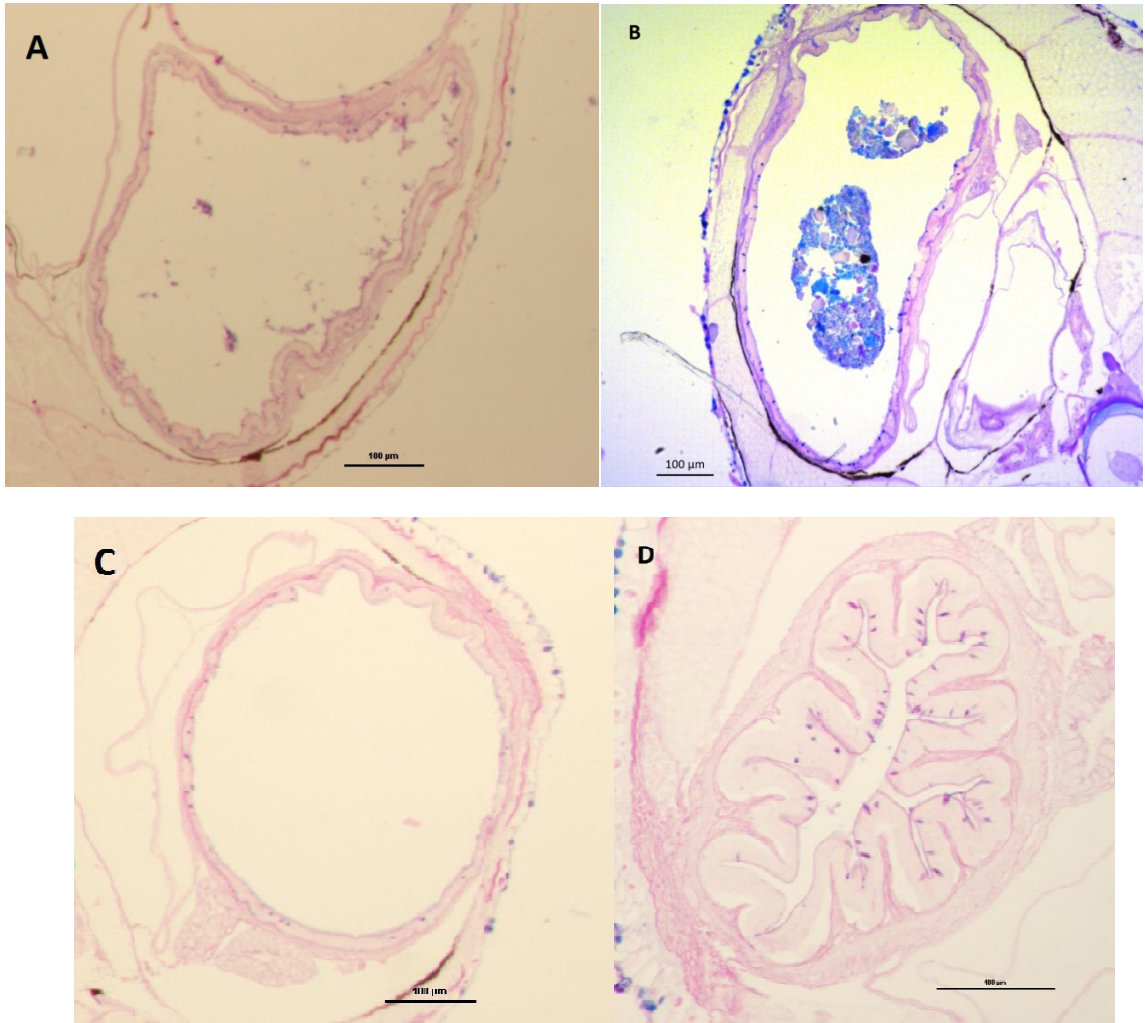
Tablica 7. Rezultati analize usporedbe prisutnosti hrane u probavilu i mjerenih morfoloških i kvantitativnih vrijednosti Mann-Whitney U testom. Označeni su statistički značajni rezultati.

	POVRŠINA SLUZNICE (mm ²)	VISINA EPITELA (μm)	UDIO VRČASTIH STANICA/ POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)	UDIO AB ⁺ VRČASTIH STANICA/POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)
Mann-Whitney U	430	436	342	372
P	0,186	0,213	0,014**	0,038**

** Statistički značajno p<0,05



Slika 17. AB⁺ vrčaste stanice u epitelu sluznice crijeva. Plavo su bojane AB⁺ vrčaste stanice i vidljiva je jedna PAS/AB⁺ stanica bojana ružičasto i plavo. Skala 20 μm (foto: Matea Jarak).



Slika 18. Na slikama A, B i C su prikazani presjeci crijeva ličinki starih 7 tjedana, tjedan dana nakon prelaska na umjetnu hranu. Vidljiva je mala visina epitela sluznice, manjak nabora i povećani lumen crijeva. Za usporedbu, na slici D je presjek crijeva ličinke jednake starosti koja još nije prešla na umjetnu hranu. Skala 100 µm (foto: Matea Jarak).

4.4. PROMJENE MORFOMETRIJSKIH VRIJEDNOSTI CRIJEVA

Razlike u morfometrijskim mjerenjima te kvantitativnoj distribuciji u odnosu na tjedne života ličinki manjića su testirane pomoću Kruskal-Wallis testa. Test je pokazao statističku značajnost za sve testirane vrijednosti ($p < 0,05$) osim vrijednosti visine epitela i udjela vrčastih stanica po površini sluznice u skupini 2. Za dodatnu potvrdu značajnih rezultata iz Kruskal-Wallis testa korišten je Mann-Whitney U test. Da bi se rezultati što jasnije prikazali i da bi se što točnije analizirala njihova statistička značajnost jedinke su podijeljene u grupe po 7 dana (Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati Kruskal-Wallis testa i Mann-Whitney U testa za skupinu 1 i skupinu 2. Označene su vrijednosti koje su statistički značajne ($p < 0,05$). Brojevi od 7 do 12 predstavljaju starosne grupe (tjedne života) u koje su jedinke podijeljene. U tablicu su unesene p vrijednosti navedene grupe iz Mann-Whitney U testa.

			PROSJEČNA DUŽINA (mm)	PROSJEČNA TEŽINA (g)	POVRŠINA SLUZNICE (mm ²)	VISINA EPITELA (μ m)	UDIO VRČASTIH STANICA/ POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)	UDIO AB ⁺ VRČASTIH STANICA POVRŠINI SLUZNICE (mm ²)
SKUPINA 1	KRUSKAL- WALLIS TEST	Hi ²	26,126	25,208	16,835	20,501	11,934	14,119
		p	<0,001**	<0,001**	0,005**	0,001**	0,036**	0,015**
	MANN- WHITNEY U TEST	7-8	0,196	0,042**	0,011**	0,006**	0,715	0,584
		8-9	0,008**	0,008**	0,754	0,917	0,076	0,028**
		9-10	0,916	0,023**	0,028**	0,028**	0,602	0,347
		10-11	0,042**	0,356	0,144	0,100	0,273	0,273
11-12	0,666	0,666	0,394	0,055	0,136	0,088		
SKUPINA 2	KRUSKAL- WALLIS TEST	Hi ²	31,928	29,556	11,632	1,938	9,064	12,271
		P	<0,001**	<0,001**	0,040**	0,858	0,107	0,031**
	MANN- WHITNEY U TEST	7-8	0,023**	0,023**	0,631	0,423	0,749	0,631
		8-9	0,106	0,106	0,749	0,749	0,749	0,262
		9-10	0,004**	0,189	0,522	0,522	0,631	0,522
		10-11	0,004**	0,023**	0,010**	0,631	0,631	0,522
		11-12	0,006**	0,006**	0,584	0,361	0,045**	0,011**

** Statistički značajno $p < 0,05$

5. RASPRAVA

Zbog sve veće potražnje ribe, proizvođači danas moraju nalaziti što brže, jednostavnije i jeftinije načine da ispune uzgojne kvote. Razvojem akvakulture, pogotovo recirkulacijskih sustava, proizvodnja ribe u velikim količinama je moguća uz sve manji radni napor i manje troškove. Razvojem tehnologije omogućeno je širenje uzgoja na područja gdje to prije ne bi bilo moguće; udaljenima od izvora vode i bez slobodnih velikih površina. Ponovnim korištenjem vode iz sustava, recirkulacijski sustavi nude smanjeni pritisak na okoliš u vidu odlaganja otpada i recikliranja nutrijenata. Daljnji napredak u tehnologiji je orijentiran na daljnje usavršavanje ovih sustava, no i na uvođenje novih vrsta kao kultura za uzgoj (Martins i sur. 2010).

Manjić se pokazao kao izvrstan kandidat za uzgoj u akvakulturi zbog njegovog visokog fekunditeta, visoke stope rasta i niskih temperatura na kojima živi. Kao i kod većine uzgajanih riba u kulturi, najveći kamen spoticanja u uzgoju je visoka stopa smrtnosti do koje dolazi u ličinačkom stadiju (Žarska i sur. 2014).

Iako je do sada provedeno nekoliko studija na larvikulturi manjića, većina njih nije imala visoku stopu preživljenja (Trabelsi i sur. 2011, Jensen i sur. 2008, Jensen i sur. 2011, Žarska i sur. 2014). U različitim studijama pokazano je da preživljenje i stopa rasta ličinki ovise o mnogo parametara poput temperature, fotoperioda, gusoće naseljenosti, dužine i težine tijela, te kvantiteti i kvaliteti ponuđene hrane (Boeuf i Le Bail 1999, Wolnicki i sur. 2001, Wolnicki i sur. 2002, Brown i sur. 2003). Najmanje studija je provedeno na temu uspješnog prelaska ličinki manjića sa žive na umjetnu hranu ovisno o stadiju razvijenosti njihovog probavnog sustava. Objavljene studije utvrdile su da je uspjeh prelaska sa žive na umjetnu hranu uvjetovan stadijem razvoja probavnog sustava ličinki (Žarska i sur. 2014).

U ovom radu naglasak je bio na razvijenosti probavnog sustava kod ličinki manjića, i to stražnjeg dijela crijeva. Istraživan je odnos starosti ličinke i vremena prelaska na umjetnu hranu, te kako ti faktori utječu na razvijenost probavila.

Važnost dužine i težine tijela pri kojoj ličinke prelaze na umjetnu hranu su u svojem radu naglasili Žarska i sur. (2014). U njemu su pokazali da je optimalna dužina tijela ličinke preko 25 mm, težina tijela preko 0,02 g te da bi ličinke trebale biti stare oko 50 dana (7 tjedana) da bi stopa preživljenja i stopa rasta bile zadovoljavajuće (Žarska i sur. 2014). Kao što je vidljivo iz tablice 2 ličinke su u obje skupine imale manju dužinu tijela, no težina im je bila iznad predložene te su jedinke iz skupine 1 prešle na umjetnu hranu oko tjedan dana ranije (46 dana). Žarska i sur. (2014) kao i Kolkovski (2001), ističu da je veličina ličinke vezana uz razvojni stadij i to ponajviše uz razvijenost probavila. Prelazak ličinke sa žive na umjetnu hranu prije negoli je došlo do potpune metamorfoze, tj. prije nego je probavni sustav funkcionalan u cijelosti naziva se ranim prelaskom na umjetnu hranu (eng. *early weaning*) (Brown i sur. 2003). Između starosti jedinke u tjednima i njihove mase te dužine tijela postoji korelacija *v i s o k e* statičke značajnosti za obje istraživane skupine. Mann-Whitney U test je pokazao da nema statističke značajnosti između vremena prelaska na umjetnu hranu i prosječne dužine tijela ličinki za obje skupine, no postoji povezanost s težinom ličinki. Kako je već navedeno, veličina i masa riba ne moraju odgovarati njihovoj starosti, čak niti među jedinkama iste vrste (Žarska i sur. 2014), no u ovom istraživanju korelacija ipak postoji.

Također, vidljivo je da ličinke iz obje skupine rastu u dužinu i dobivaju na masi kroz tjedne relativno jednako sve do 10. tjedna života. Tada jedinke iz skupine 2 pokazuju nagli rast i dobitak na masi, dok jedinke iz skupine 1 stagniraju u rastu.

Između starosti jedinke u tjednima i površine sluznice postoji korelacija statističke značajnosti za obje istraživane skupine. Istraživanja su pokazala da crijevo pa tako i sluznica crijeva pokazuju alometrijski rast kako bi iskorištenje nutrijenata iz hrane bilo što bolje. Povećanjem površine sluznice povećava se i apsorpcijska površina crijeva (Wold i sur. 2008).

Statistička značajnost između starosti ličinka i visine epitela postoje za skupinu 1, no ne i za skupinu 2. Unatoč tome vidljivo je da vrijednosti visine epitela za skupinu 2 nemaju neka velika odstupanja od početne visine, što je za ovakav sustav znak jednolikog i zdravog razvoja. Ako usporedimo vrijednosti iz ovog istraživanja s onim Žarske i sur. (2014), zamjetit ćemo kako ličinke iz skupine 2 imaju više prosječne vrijednosti za visinu enterocita ($25,99 \pm 7,49 \mu\text{m}$, tablica 3) nego što su imale ličinke u spomenutom istraživanju ($23,67 \pm 3,67 \mu\text{m}$) u kojem su te ličinke prešle na umjetnu hranu u istom tjednu i pokazale najvišu stopu preživljenja (58%).

Nagle promjene u visini epitela kod skupine 1 vidljive su 3 puta unutar 5 tjedana istraživanja. Prva nagla promjena vidljiva je već tjedan dana nakon prelaska na umjetnu hranu. Većina autora se slaže da prelazak na umjetnu hranu je velik šok ličinkama, te je u tom razdoblju stopa smrtnosti uvijek viša (Engrola 2010, Harzevili i sur. 2003, Trabelsi i sur. 2011, Žarska i sur. 2014). Visina epitela se smatra dobrim pokazateljem razvijenosti crijeva, podhranjivanja ili čak gladovanja (Žarska i sur. 2014). S obzirom da prelazak na umjetnu hranu u ovom istraživanju nije bio postepen, velika je mogućnost da ličinke jednostavno ili nisu mogle probaviti hranu ili im nije bila dovoljno atraktivna kao živa hrana koju su dobivale do tjedan dana prije. Takav nagli pad u visini epitela mogao bi značiti da su te ličinke bile izglednije te se može usporediti i s padom površine sluznice kod skupine 1. Sluznica i pripadajući epitel su vrlo osjetljivo područje. Iako imaju vrlo bitnu ulogu u zaštiti što od mehaničkog i kemijskog oštećenja, također služe kao barijera za patogene koji dolaze iz okoliša (Wilson i Castro 2010). Gubitkom apsorpcijske površine crijeva, smanjuje se unos nutrijenata u organizam, čime pada stopa rasta i usporava se razvoj jedinke (Žarska i sur. 2014). U preliminarnom istraživanju o utjecaju prelaska na umjetnu hranu na razvoj ličinki manjića, provedenom u istom ekperimentu, zabilježen je visoki mortalitet (oko 100 ličinki dnevno) za skupinu ličinki koja je ranije prešla na umjetnu hranu (Adriaen i sur. 2014).

Nakon nagle promjene u visini epitela vidljivo je da ta vrijednost stagnira do 8. tjedna kada naglo raste. Razlog tome može biti u jedinstvenom „dizajnu“ ličinki koji im omogućava da se brzo prilagode nastalim uvjetima u njihovom okolišu. Očito je da su se privikle na hranu koja im je dostupna i počele ju konzumirati i probavljati. U tjednu kada visina nije varirala potencijalno nije ni moglo doći do adekvatne probave jer se epitel morao regenerirati da bi mogao obavljati svoju funkciju apsorpcije nutrijenata.

Slične rezultate je pokazala studija Ostaszewske i sur. (2006) u kojoj su zaključili da se vrijeme gladovanja dodatno produljuje za vrijeme koje je potrebno za regeneraciju epitela sluznice te su pokazali da gladovanje bolje podnose jedinke koje su dobivale živu hranu prije toga. Zadnja nagla promjena u visini epitela kod skupine 1 dogodila se u 10. tjednu života. Ako usporedimo tu promjenu s promjenama ostalih vrijednosti iz grafova 1,2,3 i 5 možemo uočiti da i te vrijednosti pokazuju odstupanja u 10. tjednu i to pogotovo u skupini 2.

Udio vrčastih stanica po površini sluznice raste sa starošću ličinka te je statistički značajna vrijednost između tih parametara za obje istraživane skupine. Ostaszewska (2005) je također uočila da se sa starosti ličinke povećava i broj vrčastih stanica. Ukoliko usporedimo grafove 3 i 5 možemo vidjeti da se vrijednosti površine sluznice i broja vrčastih stanica slično odnose prema starosti ličinki, no Spearmanov test nije pokazao značajnu korelaciju između ovih vrijednosti. Pojava vrčastih stanica povezuje se s početkom hranjenja nakon apsorpcije žumanjčane vreće (Ostaszewska 2005). S tim da vrčaste stanice sudjeluju u probavi hrane pretpostavka je da će biti prisutne u sluznici crijeva i da će se ovisno o prisutnosti hrane u crijevu njihov broj povećavati ili smanjivati, tj. njihova aktivnost će biti vidljiva ili ne. To je pokazao i Mann-Whitney U test ($p < 0,05$) (tablica 6). Sluz koju izlučuju može biti neutralna (neutralni glikoproteini, PAS⁺) i kisela (kiseli karboksilni ili sulfatni glikoproteini, AB⁺, slika 17)(Ostaszewska 2005). U ovom istraživanju broj PAS⁺ vrčastih stanica je bio jako mali, te su ti rezultati izuzeti iz ovog rada. Brojnost AB⁺ vrčastih stanica je zato statistički značajno korelirana s masom i dužinom tijela, te starošću ličinki u obje skupine (graf 6). Mann-Whitney U test je pokazao da postoji statistička značajnost između udjela vrčastih stanica po površini sluznice i vremena prelaska na umjetnu hranu (tablica 5), gdje ličinke koje su ranije prešle na umjetnu hranu imaju veći udio vrčastih stanica po površini sluznice.

Kjorsvik i sur. (1991) su povezali pojavu AB⁺ vrčastih stanica u probavilu bakalara (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) s probavom artemija te zaključili da su kiseli glikoproteini vrlo bitni u probavi egzoskeleta. Riberio i sur. (1999) su dokazali da glavnu ulogu u razgradnji proteina kod ličinke senegalskog lista (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) ima kisela fosfataza, te da se probava proteina odvija u stražnjem crijevu. Slične rezultate je pokazala i Ostaszewska (2005); dok se lipidi u obliku malih kapljica akumuliraju u srednjem dijelu crijeva u stražnjem dijelu se akumuliraju proteini u obliku acidofilnih granula u enterocitama procesom pinocitoze. Na taj način se nadoknađuje nedostatak probavnih enzima i omogućuje se probava proteina koji su nužni za rast i razvoj ličinke. Pretpostavlja se da kiseli glikoproteini pomažu održati kiseli medij potreban kiseloj fosfatazi za razgradnju proteina. Također, karnivorne vrste poput manjića, jedinke uzgajane u recirkulacijskim sustavima i ličinke riba zahtijevaju hranu sa većim udjelom proteina (Craig i Helfrich 2002). Na grafu 6 skupina 2 pokazuje nagli rast u udjelu AB⁺ vrčastih stanica nakon 8. tjedna života. Taj rezultat se može objasniti početkom hranjenja umjetnom hranom koja ima visoki udio proteina.

Postoje dva potencijalna razloga ovakvih rezultata za vrijednosti mase, dužine, visine epitela, površine sluznice i udjela vrčastih stanica po površini sluznice: u 10. tjednu života ličinke manjića završavaju sa metamorfozom i probava odgovara onoj kod juvenilnih jedinki te se vrijednosti ustale. Činjenica je da se promjene iz ličinačkog u juvenilni stadij događaju vrlo brzo, te bi to moglo pojasniti nagli rast vrijednosti za skupinu 2 (masa, dužina, površina sluznice i udio vrčastih stanica po površini sluznice) i stagnaciju vrijednosti za skupinu 1 osim vrijednosti visine epitela koja naglo pada. Ta bi se promjena mogla objasniti tako što bi u teoriji jedinke iste veličine trebale imati jednako razvijeno

probavilo. Vjerojatno je zbog ranijeg prelaska na umjetnu hranu razvoj probavnog sustava kod skupine 1 bio neravnomjeran te se u 10. tjednu života ustalio no ostavio je posljedice na dužinu i masu tijela koje su manje u skupini 1. S tim da ne postoje studije rađene na metamorfozi manjića u akvakulturi, kamoli na probavnom sustavu, ovo obrazloženje je samo teorijsko. McPhail i Paragamian (2000) navode da do metamorfoze ličinki manjića u prirodi dolazi kada su dugačke oko 30 mm, no ako se uzme u obzir da ličinke u akvakulturi ne rastu jednakom brzinom kao one u prirodi, te da starost nije uvjetovana veličinom ličinke, moguće je da je ipak metamorfoza razlog ovih promjena. Drugi razlog bi mogao biti visoki mortalitet (Adriaen i sur. 2014) koji se pojavljuje nakon prelaska na umjetnu hranu, čime bi preostale ličinke potencijalno bile one koje su bile razvijenije i veće.

6. ZAKLJUČAK

- ❖ Masa tijela, težina tijela, površina sluznice, visina epitela, udio vrčastih stanica i AB⁺ vrčastih stanica pozitivno koreliraju sa starošću ličinki.
- ❖ Razvijenost probavnog sustava ne ovisi o starosti ličinke, već o njenoj veličini.
- ❖ Razvijenost sluznice i epitela su bitna varijabla u prelasku na umjetnu hranu kod ličinki.
- ❖ Udio vrčastih stanica se povećava s prisutnošću hrane u probavnom sustavu.
- ❖ Ovisno o razvijenosti probavila ličinke mogu bolje probaviti umjetnu hranu.
- ❖ Ličinke koje su prešle na umjetnu hranu u 8. tjednu života su bolje podnijele prelazak na umjetnu hranu, te su pokazale rast u dužinu i povećanje mase tijela.

7. LITERATURA

1. Adriaen, J., Jarak, M., Meeus, W., Abeel, T., Roelant, E. i Aerts, S. (2014): Early weaning of burbot (*Lota lota*) in RAS. Prezentacija postera na EAS (European Aquaculture Society), San Sebastian (Španjolska).
2. Badiola, M., Mendiola, D. i Bostock, J. (2012): Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*, **51**, 26-35.
3. Bakke, A.M., Glover, C. i Krogdahl, A. (2010): Feeding, Digestion and Absorption of Nutrients. U: Grosell, M. F. (ur.) *Fish Physiology: The Multifunctional Gut of Fish*. London, Academic Press, 57-111.
4. Bishop, C. i Odense, P.H. (1966): Morphology of the digestive tract of the cod, *Gadus morhua*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **23**, 1607-1615.
5. Boeuf, G. i Le Bail, P.-Y. (1999): Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, **177**, 129-152.
6. Brown, J.A., Minkoff, G. i Puvanendran, V. (2003): Larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. *Aquaculture*, **227**, 357-372.
7. Craig, S. i Helfrich, L. A. (2002): Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. Virginia Cooperative Extension, Publication, 420-256.
8. Dabrowski, K. (1984): Influence of initial weight during the change from live to compound feed on the survival and growth of four cyprinids. *Aquaculture*, **40**, 27-40.
9. de Silva, S.S. i Anderson T.A. (1995): *Fish nutrition in aquaculture*. London: Chapman & Hall.
10. Department of Primary Industries. (2008): Best Practice Environmental Management Guidelines for Recirculating Aquaculture Systems. Fisheries Victoria Management Report Series No. 37.
11. Dytham, C. (2003): *Choosing and using statistics. A biologist's guide*. Blackwell Science. Melbourne.
12. Engrola S. i Dinis, M.T. (2010): Senegalese sole larvae growth and protein utilization is depressed when co-fed high levels of inert diet and Artemia since first feeding. *Aquaculture Nutrition*, **16**, 457-465.
13. FAO. (2010): *The Status of World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
14. Fletcher Jr., R.C., Roy, W., Davie, A., Taylor, J., Robertson, D. i Migaud, H. (2007): Evaluation of new microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Implications on larval performances and tank hygiene. *Aquaculture*, **263**, 35-51.
15. Govoni, J.J., Boehlert, G.W. i Watanabe, Y. (1986): The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, **16**, 59-77.

16. Harzevili, A.S., De Chareloy, D., Auwerx, J., Vught, I., Van Slycken, J., Dhert, P. i Sorgeloos, P. (2003): Larval rearing of burbot (*Lota lota* L.) using *Branchionus calyciflorus* rotifer as started food. *Journal of Applied Ichthyology*, **19**, 84-87.
17. Harzevili, A.S., Dooremont, I., Vught, I., Auwerx, J., Quataert, P. i De Charleroy, D. (2004): First feeding of burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei) larvae under different temperature and light conditions. *Aquaculture research*, **35**, 49-55.
18. Hepher, B. (1988): Ingestion, digestion and absorption of food. U: Hepher, B. (ur.) *Nutrition of Pond Fishes*. Cambridge, Cambridge University Press, 16-56.
19. Jensen, N. i Cain, K. (2009): Burbot- not just another cod. *Hatchery International*, **10**, 14-15.
20. Jensen, N.R., Anders, P.J., Hoffman, C.A., Porter, L.S. Island, S.C. i Cain, K.D. (2011): Performance and macronutrient composition of age-0 burbot fed four diet treatments. *North American Journal of Aquaculture* , **73**, 360-368.
21. Jensen, N.R., Ireland, S.C., Siple, J.T., Williams, S.R. i Cain, K.D. (2008): Evaluation of egg incubation methods and larval feeding for North American burbot. *North American Journal of Aquaculture*, **70**, 160-170.
22. Kjorsvik, E., van den Meeren, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J. i Kvenseth, P.G. (1991): Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *Journal of Fish Biology*, **38**, 1-15.
23. Kolkovski, S. (2001): Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, **200**, 181-201.
24. Kuperman, B.I. i Kuz'mina, V.V. (1994): The ultrastructure of the intestinal epithelium in fishes with different types of feeding. *Journal of Fish Biology*, **44**, 181-193.
25. Kwiatkowski, M., Źarski, D., Kucharczyk, D., Kupren, K., Jamroz, M., Targonska, K., Krejszef, S., Hakuć-Bazowska, A., Kujawa, R. i Mamcarz, A. (2008): Influence of feeding natural and formulated diets on chosen rheophilic cyprinid larvae. *Archives of Polish Fisheries*, **16**, 383-396.
26. Lovell, T. (1998): *Fish Nutrition and Feeding Experiments*. U: Lovell, T. (ur.) *Nutrition and Feeding of Fish*. Norwell, Kluwer Academic Publishers.
27. Martins, C.I.M, Eding, E.H., Verdegem, M.C.J, Heinsbroek, L.T.N, Schneider, O., Blancheton, J.P., Roque d'Orbcastel, E. i Verreth, J.A.J. (2010): New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, **43**, 83-93.
28. McPhail, J.D. i Paragamian, V.L. (2000): Burbot biology and life history. U: Paragamian, V.L. i Willis Burbot, D.W. (ur.) *Biology, Ecology, and Management*. Bethesda, Maryland, American Fisheries Society, Fisheries Management Section, 11-23.

29. Ostaszewska, T., Korwin-Kossakowki, M. i Wolnicki, J. (2006): Morphological changes of digestive structures in starved tench *Tinca tinca* (L.) juveniles. *Aquaculture International*, **14**, 113-126.
30. Ostrazewska, T. (2005): Developmental Changes of Digestive System Structures in Pike-perch (*Sander lucioperca* L.). *Electronic Journal of Ichthyology*, **2**, 65-78.
31. Pulliainen, E. i Korhonen, K. (1990): Seasonal changes in condition indices in adult mature and non-maturing burbot, *Lota lota* (L.), in northeastern Bothnian Bay, northern Finland. *Journal of Fish Biology*, **36**, 251-259.
32. Riberio, L., Sarasquete, C. i Dinis, M.T. (1999): Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, **171**, 293-308.
33. Ryder, R.A. i Pesendorfer, J. (1992): Food, growth, habitat and community interactions of young-of-the-year burbot, *Lota lota* (L.), in a Precambrian Shield lake. *Hydrobiologia*, **234/244**, 211-227.
34. Stevens, C.E. i Hume, I.D. (1995): The digestive system of fish, amphibians, reptiles and birds. U Stevens, C.E. i Hume, I.D. (ur.) *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. Cambridge, Press syndicate of the University of Cambridge, 24-30
35. Tibbetts, I. (1997): The distribution and function of mucous cells and their secretions on the alimentary tract of *Arrahamphus sclerolepis krefftii*. *Journal of Fish Biology*, **50**, 809-820.
36. Trabelsi, A., Gardeur, J.-N., Teletchea, F. i Fontaine, P. (2011): Effects of 12 factors on burbot *Lota lota* (L., 1758) weaning performances using fractional factorial design experiment. *Aquaculture*, **316**, 104-110.
37. Treer, T., Safner, R., Aničić, I. i Lovrinov, M. (1995): *Akvakultura, Ribarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Globus.
38. Trejchel, K., Žarski, D., Palinska-Žarska, K., Krejszeff, S., Dryl, B., Dakowski, K. i Kucharczyk, D. (2013): Determination of the optimal feeding rate and light regime conditions in juvenile burbot, *Lota lota* (L.), under intensive aquaculture. *Aquaculture International*, **22**, 195-203.
39. Wilson, J.M. i Castro, L.F.C. (2010): Morphological Diversity of the Gastrointestinal Tract in Fishes. U: M. F. Grosell (ur.) *Fish Physiology: The Multifunctional Gut of Fish*. London, Academic Press, 1-57
40. Wold, P.-A., Hoehne-Reitan, K., Rainuzzo, J. i Kjorsvik E. (2008). Allometric growth and functional development of the gut in developing cod *Gadus morhua* L. larvae. *Journal of Fish Biology*, **72**, 1637-1658.
41. Wolnicki, J., Kaminski, R. i Myszkowski, L. (2002): Temperature-influenced growth and survival of burbot *Lota lota* (L.) larvae fed live food under controlled conditions. *Archives of Polish Fisheries*, **10**, 109-113.

42. Wolnicki, J., Myszkowski, L. i Kaminski, R. (2001): The influence of water temperature on the growth, survival, condition and biological quality of juvenile burbot, *Lota lota* (L.). Archives of Polish Fisheries, **9**, 79-86.
43. Źarska-Palinska, K., Źarski, D., Krejszeff, S., Nowosad, J., Bilas, M., Trejchel, K., Brylewski, A., Targonska, K. i Kucharczyk, D. (2014): The effect of age, size and digestive tract development on burbot, *Lota lota* (L.), larvae weaning effectiveness. Aquaculture Nutrition, **20**, 281-290.
44. Źarski, D., Sasinowski, W., Kucharczyk, D., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S. i Targonska, K. (2009): Mass Initial Rearing of Burbot *Lota lota* (L.) Larvae Under Controlled Conditions. Polish Journal of Natural Sciences, **24**, 76-84.
45. Źarski, D., Kucharczyk, D., Sasinowski, D., Targonska, K. i Mamcarz, A. (2010): The influence of temperature on successful reproductions of burbot, *Lota lota* (L.) under hatchery conditions. Polish Journal of Natural Sciences, **25**, 93-105.

Životopis

Matea Jarak

- Datum i mjesto rođenja: 10. prosinca 1987. godine, Zagreb, RH
- Adresa prebivališta: Čazmanska 4, Zagreb 10000
- Mobitel: +385921004651
- Email: jarakica@gmail.com

Završeno obrazovanje:

- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, diplomski studij Ekologije i zaštite prirode, modul More
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, preddiplomski studij biologije
- X. gimnazija, Zagreb
- Osnovna škola Tina Ujevića, Zagreb

Nagrade i priznanja:

- Dobitnica posebne Rektorove Nagrade Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za projekt "Noć biologije 2012/13."

Udruge i organizacije:

- Članica Udruge studenata biologije „BIUS” – Edukacijska sekcija, Herpetološka sekcija
- Članica Hrvatskog herpetološkog društva - Hyla
- Voditeljica Edukacijske sekcije udruge „BIUS” (2010. – 2013.)